

Volume 8 Número 3 Jul.-Set. 1977

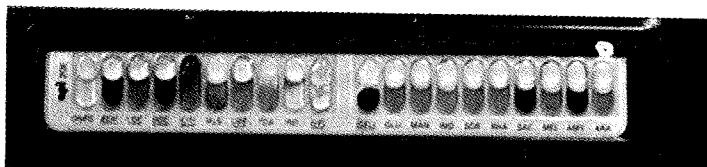
Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil



api system

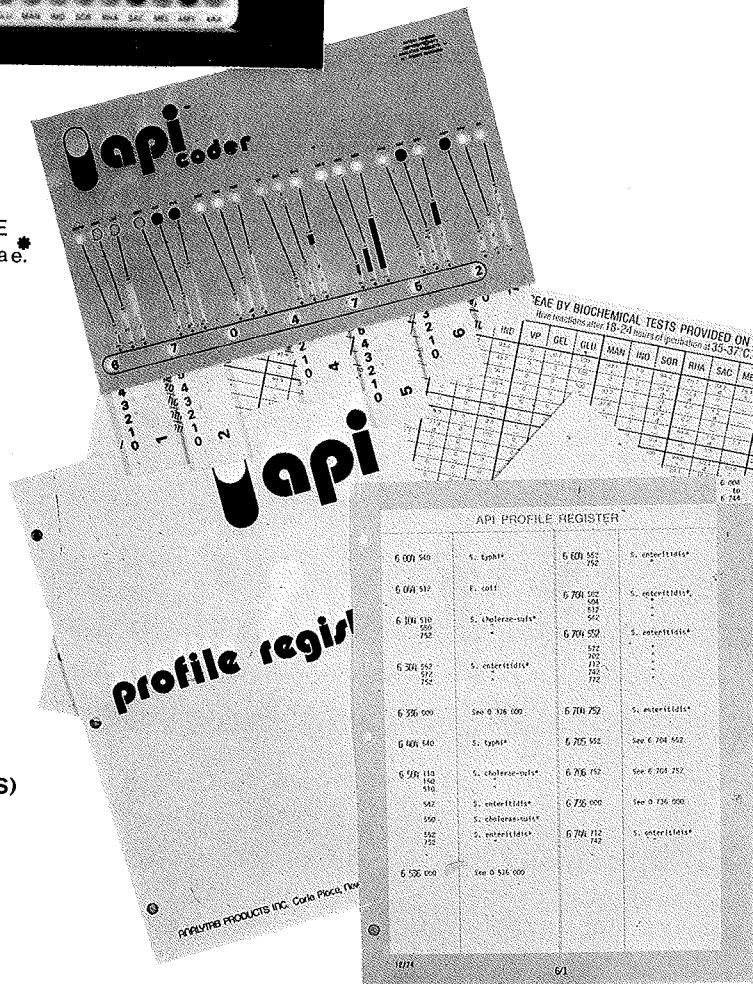
**abriu o caminho da estandardização
na identificação bacteriológica.**



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 - 2º 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 Araújo, Eduardo O. Cisalpino, Gobert A. Costa, Homero S. Jobin, Jandira Planet do Amaral, João Xavier Viana, José Noronha Peres, José Oliveira de Almeida, Lúcio P. de Carvalho Lima, Luiz Siqueira Carneiro, Milton Fontes Magarão, Oswaldo G. de Lima, Otávio Barachini, Otto G. Bier, Paulo de Góes, Raymundo A.C. Moniz de Aragão, Seymour H. Hutner, Werner K. Maas.

Delegados Regionais ALAGOAS: Ayro Pontes Lima Bomfim (Maceió). AMAZONAS: Aurélia Lopes Castrillon (Manaus). BAHIA: Carlos Brenha Chaves (Salvador). CEARÁ: Eldair dos Santos Sátiro (Fortaleza). ESPÍRITO SANTO: Henrique Tommasi Netto (Vitória). GÓIAS: Maria Aparecida Muniz (Goiânia). GUANABARA: Altair Antunes Zebral (Rio de Janeiro) e Milton de Uzeda (Rio de Janeiro). MARANHÃO: Salomão Fiquene (São Luiz). MINAS GERAIS: Romain Rolland 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 (Niterói). SANTA CATARINA: Aquilés 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). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.*, 241: 527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milimicro (mμ) e micromico (μμ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm; 10⁻⁶m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10⁻⁹m), ao invés de milimicro (mμ); e Angstroms (A; 10⁻¹⁰m). 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 "Berkeley'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 Berkeley deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

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

A página-título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

O resumo não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na secção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação. Exemplo:

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

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

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

MILLER, S.E. — *A textbook of clinical pathology*. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

Citações de "rúsumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Devem ser numeradas em arábico e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na secção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com retícula devem ser feitas em papel brilhante, com contraste adequado para reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob **TABELAS**. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTAS BREVES — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. O(s) autor(es) deve(m) consultar um número da Revista para familiarização com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Serão fornecidas, gratuitamente, 10 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Editor, correndo as despesas por conta dos interessados.

Revista de Microbiologia
Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
Volume 8 Julho-Setembro 1977 Número 3
Rev. Microbiol. (S. Paulo), 8(3)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Influência das condições de cultivo na produção da enterotoxina termolábil de <i>Escherichia coli</i> [Influence of culture conditions in the production of <i>Escherichia coli</i> heat-labile enterotoxin] — Bernadette D.G. de Melo Franco & Luiz Rachid Trabulsi	55
Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira. II. Caracterização e reprodução "in vitro" das acumulações limosas [Smile accumulations in fiberboard industries. II. Characterization and "in vitro" reproduction of slime accumulations] — Augusto Ferreira da Eira, Paulo de Campos Torres de Carvalho & Onaur Ruano	64
Flora fúngica anemófila da Grande São Paulo [Airborne fungi of the "Grande São Paulo" área (Brazil)] — Walderez Gambale, Adhemar Purchio & Júlio Croce	74
Uso da panela de pressão comum para esterilização [The use of pressure cooker for sterilization] — Edison Paulo Tavares de Oliveira, Hideyo Izuka, Hisako Gondo Higashi, José L. Brunini & José Luís de Lorenzo	80
Sensibilidade "in vitro" de leveduras do gênero <i>Candida</i> à violeta de genciana [Sensitivity "in vitro" of several <i>Candida</i> spp to gentian violet] — Arlete Emily Cury, Paulo S. Minami & Dulcinéia Saes Parra	84
Caracterización bioquímica y significado clínico de una especie recientemente descrita dentro de la familia enterobacteriaceas: <i>Citrobacter diversus</i> [Biochemical characterization and clinical signification of a recently described species in enterobacteriaceae: <i>Citrobacter diversus</i>] — Gustavo Prieto, Jeannette Vargas, Hilda Bracho & Mary de Mestroni	89
Effect of pH, temperature and time of stirring on the solubility of trypsin used in cell cultures — Edda de Rizzo	94
Comparação entre hidrólise ácida e enzimática de amido para determinação de açúcares redutores totais [comparison between acid and enzymatic hydrolysis of starch for determination of total reducing sugars] — Willibaldo Schmidell & Marcus Vinicius Fernandes	98

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.

Influência das condições de cultivo na produção da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*

Bernadette D. G. de Melo Franco* &
Luiz Rachid Trabulsi**

Summary

Influence of culture conditions in the production of Escherichia coli heat-labile enterotoxin

The influence of several factors in "in vitro" production of *E. coli* heat-labile enterotoxin was investigated. The enterotoxin assay was made in Y-1 cells. pH variation ranging from 6.5 to 8.5 did not influence enterotoxin production in Evans' medium. The production of enterotoxin was favorably influenced by the temperature of 37°C when compared with 28°C and by aeration of cultures. Culture under anaerobiosis rendered enterotoxin production in an appreciable amount. When bacterial growth curve was correlated with enterotoxin production, it was verified that the amount of enterotoxin increased progressively after 3 hours of incubation, attaining the highest value around 18 hours and remaining stable, at least, for 48 hours. The media of Evans, Syncase and Tryptic Soy Broth were equally adequate for enterotoxin production. Enterotoxin yield was irregular in nutrient broth and not produced at all in two minimal media. Enterotoxin activity was not reduced following storage at -20°C up to three months.

Resumo

Foi estudada a influência de vários fatores na produção "in vitro" da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*. A presença da enterotoxina foi verificada com o emprego de células Y-1. Os seguintes resultados foram obtidos: as variações de pH entre 6,5 e 8,5 no meio de Evans não influenciaram a produção da enterotoxina; esta produção foi influenciada favoravelmente pela temperatura de 37°C, quando comparada com a de 28°C, e pelo aumento da aeração da cultura. Entretanto, mesmo quando a bactéria foi cultivada em anaerobiose, houve produção de enterotoxina. Quando foram relacionadas as fases de crescimento da bactéria, com a produção de enterotoxina, verificou-se que a quantidade de enterotoxina aumentou, progressivamente, a partir de três horas de incubação, atingiu o máximo em torno de 18 horas, permanecendo estável pelo menos durante 48 horas. Os meios de Evans, Syncase e caldo soja tripticase foram igualmente adequados para a produção da enterotoxina. A produção foi irregular, em caldo simples, e negativa em dois meios sintéticos. A enterotoxina não perdeu sua atividade após estocagem a -20°C, por três meses.

Introdução

Os conhecimentos atuais sobre colibacilos entero-toxigênicos tiveram início em 1953, com o desenvolvimento do modelo experimental de De & Chatterje (3), para o estudo da patogenia da cólera. Foi demonstrado que a inoculação de culturas de vibrião colérico, em alças ligadas de intestino de coelho, determinava transsudação abundante de líquido, para a luz destas alças, dilatando-as intensamente.

Em 1956, De & col. (2) empregaram o método para estudar amostras de colibacilos, isolados de adultos normais e diarreicos, demonstrando que os colibacilos de diarreicos determinavam efeito semelhante ao

do vibrião colérico nas alças ligadas, o mesmo só acontecendo raramente com colibacilos isolados de normais. Em 1960, Trabulsi (24, 25) inoculou, em alças ligadas de intestino de coelhos, 16 amostras de colibacilos isolados de fezes de crianças com diarréia aguda e verificou que seis eram capazes de provocar transsudação de líquido para a luz das alças. Em 1961, Taylor & col. (23) utilizaram o mesmo método para estudar amostras de colibacilos isolados de diferentes pacientes, inclusive de fezes de crianças diarreicas e verificaram que as últimas, e algumas provenientes de bezerros, tinham a capacidade de determinar transsudação de líquido para a luz das alças. Nos estudos mencionados os autores não tentaram verificar

* Parte da tese de mestrado de Bernadette D. G. de Melo Franco, realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e National Science Foundation (Estados Unidos).

** Disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu 862 3º andar, São Paulo, SP.

se preparações livres de células eram capazes de determinar o mesmo efeito que as culturas totais. O primeiro esforço neste sentido foi realizado por Taylor & Bettelheim (22) em 1966, mas os resultados não foram confirmados (11). A partir de 1967, com os trabalhos de Smith & Halls (20, 21), Gyles & Barnum (11), Kohler (13), Smith & Gyles (19), Gorbach & col. (10) e Sack & col. (17), ficou confirmado, definitivamente, que os sobrenadantes ou lisados estéreis, de vários tipos sorológicos de colibacilos, de origem animal ou humana, determinavam transsudação de líquido para a luz das alças ligadas, preparadas em coelhos e em outros animais. As substâncias responsáveis pelo efeito foram denominadas enterotoxinas, uma sendo termolábil e outra termoestável.

Surgiu, então, o conceito de colibacilos enterotixigênicos, responsáveis por diarréia no homem (adultos e crianças) e em várias espécies animais (13, 16, 20, 21). A participação da toxina termoestável nos processos diarreicos humanos ainda não foi totalmente esclarecida; a da toxina termolábil não é mais discutida (16). Numerosos trabalhos demonstram que a toxina termolábil é muito semelhante à enterotoxina do vibrião colérico nos aspectos estudados, inclusive mecanismo de ação (16).

Vários estudos atestam que os colibacilos produtores de toxina termolábil constituem importante grupo de agentes etiológicos de diarréias, em crianças e adultos, não se podendo mais deixar de pesquisá-los em diagnóstico de enterites (16). Sendo indistinguíveis de colibacilos não produtores de enterotoxinas, bioquímica ou sorologicamente, a única maneira de revelar sua presença, nas fezes de um paciente, é demonstrando sua capacidade de produzir enterotoxina termolábil. Além das alças ligadas de intestino de coelho, outros métodos podem ser utilizados para a pesquisa de enterotoxina termolábil (16). Destaca-se, pela maior simplicidade, o método da cultura de tecidos com células Y-1 (4) ou CHO (9), particularmente as primeiras, que permitem leitura mais fácil.

No presente trabalho são analisados os fatores que influenciam a produção de enterotoxina termolábil "in vitro".

O conhecimento destes fatores é indispensável para a padronização das técnicas, para fins de diagnóstico bacteriológico ou de investigação científica. Os dados existentes na literatura, além de incompletos, são frequentemente contraditórios (6, 7, 14).

Material e Métodos

Pesquisa de enterotoxina — Foi feita em células Y-1 (4), mantidas em garrafas de vidro de 100ml, contendo 4ml de meio F-10 Difco (12), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e acrescido de solução de penicilina G potássica (100.000 U/ml) e sulfato

de estreptomicina (25mg/ml), para concentração final de 1%. Antes da pesquisa de enterotoxina, as células foram lavadas duas vezes com salina de Puck Gibco (15) e descoladas por tratamento com solução de tripsina-EDTA (2,5g/l e 0,2g/l, respectivamente) em tampão salina fosfatada 0,2M pH 7,6. A suspensão celular obtida foi homogeneizada, distribuída para garrafas contendo meio F-10 com soro fetal bovino e, em seguida, incubada a 37°C, durante três a quatro dias.

Após retirada do meio de cultura e lavagem das células com salina de Puck, adicionou-se, às garrafas, 3,6ml de meio usado para cultivo, porém contendo somente 1% de soro fetal bovino. A estas garrafas, adicionou-se o filtrado da cultura bacteriana (0,4ml por garrafa), obtendo-se a proporção final de 1:10, correspondente ao filtrado não diluído, apresentado nos resultados. Em seguida, fez-se a insuflação de CO₂ estéril nas garrafas, as quais foram incubadas a 37°C, durante 18h, após o que as alterações morfológicas foram observadas.

O filtrado da cultura bacteriana foi obtido com filtros Millipore 0,45 µm e suas diluições foram feitas no mesmo meio usado para cultivo da bactéria.

Em cada experimento, controles conhecidamente positivos e negativos foram usados, além daquele representado pelo meio usado para cultivo da bactéria.

O arredondamento celular foi expresso em cruzes, tomando-se como base para leitura o frasco contendo somente células Y-1 e o meio de cultivo de teste:

- +++ : 100% de arredondamento celular
- ++ : 75% de arredondamento celular
- ++ : 50% de arredondamento celular
- + : 25% de arredondamento celular
- : sem arredondamento celular

Amostras de *Escherichia coli* — As amostras H-10407, 126/75, 05/75, 13D, 204/75, 0109 e 0138 são produtoras de enterotoxina termolábil e a amostra H-11352 não o é. A primeira e última amostras foram gentilmente cedidas pelo Dr. Werner K. Maas do Departamento de Microbiologia da Universidade de Nova Iorque; as demais foram isoladas em São Paulo, de fezes de crianças com diarréia aguda.

Meios de cultura — Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

Meio de Evans (6), composto de: solução A: 6g de extrato de levedura em 100ml de água; solução B: 20g de casaminoácidos, 2,5g de NaCl e 8,71g de K₂HPO₄, dissolvidos em 900ml de água; e solução C: MgSO₄ 5%, MnCl₂ 0,5% e FeCl₃ 0,5% em H₂SO₄ 0,01M. As soluções A e B foram esterilizadas por autoclavagem a 121°C, durante 15min. e a solução C por filtração em Millipore. No instante do uso, misturou-se as soluções A e B e 1ml da solução C. Para pH diferente de 8,5

(6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), preparou-se as soluções A e B em tampão fosfato 0,2M, no pH desejado, ao invés de água, suprimindo-se o K_2HPO_4 da solução B.

Meio Syncase (8), composto de: solução A: 5g de glicose em 100ml de água e solução B: 10g de casaminoácidos, 5g Na_2HPO_4 , 5g K_2HPO_4 , 1,18g NH_4Cl , 0,089g Na_2SO_4 • 0,042g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,004g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ e 0,005g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ dissolvidos em 900ml de água. A solução A foi esterilizada por filtração e a solução B por autoclavagem a 121°C, durante 15min. No momento do uso, misturou-se as soluções A e B, obtendo-se pH final de 7,5.

Meio X-1, composto de 5g/l de sacarose, 10g/l acetato de sódio, 2g/l KH_2PO_4 , 0,5g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4g/l K_2HPO_4 , 1g/l $(NH_4)_2SO_4$, 0,5g/l ácido L aspártico, 0,3g/l ácido L glutâmico, 0,002g/l ácido nicotínico, 0,002g/l tiamina-HCl, 0,00002g/l biotina, 0,02g/l adenina, 0,02g/l citosina, 0,0002g/l $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, 0,003g/l $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,00025g/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ e 0,003g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. A esterilização do meio foi obtida por filtração em Millipore, obtendo-se pH final de 6,6.

Meio Mínimo de Hayes (1), composto de solução A: 2g de glicose em 100ml de água e solução B: 20g NH_4Cl , 4g NH_4NO_3 , 8g Na_2SO_4 , 12g K_2HPO_4 e 0,4g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em 900ml de água. A solução A foi esterilizada por filtração e a solução B por autoclavagem a 121°C durante 15 min. No momento do uso, misturou-se as soluções A e B, obtendo-se pH final de 6,5.

Caldo simples, composto de 3g/l de extrato de carne e 5g/l de peptona, esterilizados em autoclave a 121°C durante 15min. O pH final obtido foi 7,0.

Caldo soja tripticase (TSB), de Difco Laboratories, USA.

Resultados

Os resultados podem ser divididos em três partes. Na primeira, utilizando-se o meio de Evans, verificamos a produção de enterotoxina nos vários pH do meio e analisamos a influência da temperatura e atmosfera de incubação das culturas e seu tempo de crescimento, na produção da enterotoxina. Conhecida a influência destes fatores, verificamos se outros meios de cultura seriam adequados para produção de enterotoxina termolábil pelos colibacilos enterotoxigênicos. Na terceira parte, estudamos a estabilidade da enterotoxina termolábil, em diferentes temperaturas de armazenamento.

1. *Influência do pH* — O experimento para verificação da influência do pH foi feito do seguinte modo: os ingredientes do meio foram dissolvidos em tampão fosfato 0,2M nos pH 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0, e posteriormente distribuídos em tubos de ensaio, na proporção de 5ml por tubo. Os meios foram inoculados com as amostras H-10407 e 126/75, fazendo-se a pesquisa da enterotoxina após 18 horas de incubação a 37°C, com aeração. O pH de cada meio foi determinado após obtenção do filtrado para pesquisa de enterotoxina.

Verifica-se, na Tabela 1, que a produção de enterotoxina foi praticamente a mesma no meio de Evans de diferentes pH, tendo sido idênticos os resultados apresentados pela amostra 126/75.

2. *Influência da temperatura de incubação* — Foi investigada a influência das temperaturas de 37°C e 28°C. A cultura foi feita com aeração e prolongou-se por 18 horas, empregando-se a amostra H-10407.

Tabela 1

Produção de enterotoxina termolábil pela amostra H-10407 em meio de Evans em diferentes pH, a 37°C, com aeração, por 18 h

Diluição do filtrado	6,4 ^a (6,8) ^b	6,9 (7,3)	7,5 (7,9)	7,8 (8,4)	8,5 (8,7)
não diluído	++++	+++	+++	+++	+++
1:10	+++	++	++	++	++
1:100	++	+	+	+	+
1:1000	+	—	+	+	—
Células Y-1 tratadas com os filtrados dos meios não inoculados	—	—	—	—	—
Células Y-1 não tratadas	—	—	—	—	—

a = valores de pH após autoclavagem

b = valores de pH do filtrado

Tabela 2

Produção de enterotoxina termolábil pela amostra H-10407 em meio de Evans, a 37°C e a 28°C, com aeração, por 18h

Temperatura	Diluição do filtrado	Arredondamento das células
37°C	não diluído	+++
	1:10	++
	1:100	++
	1:1000	+
28°C	não diluído	+++
	1:10	+
	1:100	—
Células Y-1 tratadas com o filtrado do meio não inoculado	—	
Células Y-1 não tratadas	—	

Os resultados obtidos (Tabela 2) mostram produção de enterotoxina nas duas temperaturas, sendo que a de 37°C permite o encontro de enterotoxina no filtrado diluído até 1:1000 e a de 28°C, até 1:10, apenas.

3. *Influência da aeração* — A influência da aeração foi investigada, cultivando-se a amostra H-10407 a 37°C, por 18 horas. Uma série de experimentos foi feita em tubos de ensaio, com e sem agitação, e outra em frascos Erlenmeyer e balões, contendo diferentes volumes de meio de cultura, incubados sem agitação. Uma terceira série de experimentos foi feita em tubos de ensaio incubados em anaerobiose, empregando-se o sistema GasPak (BBL). No último caso, usamos também a amostra 126/75, além da H-10407.

Para realização do experimento em anaerobiose, incluiu-se uma amostra não enterotoxigênica (*E. coli* H-11352), para um controle mais adequado de qualquer arredondamento inespecífico das células Y-1, eventualmente provocado por algum produto metabólico não produzido em condições aeróbias.

Na Tabela 3 observa-se que a produção de enterotoxina foi maior quando a aeração foi maior. Assim, nas culturas estáticas a produção foi menor em tubos de ensaio do que em balões e frascos Erlenmeyer, e, nestes últimos, houve maior produção nas culturas rasas, em relação às profundas. Por outro lado, a produção da enterotoxina, nas culturas agitadas, foi maior do que em qualquer dos outros sistemas. Entretanto, mesmo em anaerobiose, tanto a amostra 126/75, quanto a H-10407 produziram enterotoxina (Tabela 4).

4. *Influência do tempo de crescimento* — O experimento foi feito com as amostras H-10407 e 126/75, cultivadas a 37°C, com aeração. O crescimento das culturas foi acompanhado, nefelometricamente (Nefelômetro Unigalvo EEL), com intervalos de 1h e as alí-

Tabela 3

Produção de enterotoxina termolábil pela amostra H-10407 em meio de Evans, a 37°C por 18h, em culturas aeradas de diferentes maneiras

Culturas	Diluição do filtrado	Atividade
Agitadas em tubos de ensaio	não diluído	+++
	1:10	++
	1:100	++
Estáticas em tubos de ensaio	1:1000	+
	não diluído	+++
	1:10	+
Estáticas rasas em Erlenmeyers e balões	1:100	—
	não diluído	+++
	1:10	++
Estáticas profundas em Erlenmeyers e balões	1:100	+
	não diluído	+++
	1:10	++
Células Y-1 tratadas com o filtrado do meio não inoculado	1:100	—
	—	
Células Y-1 não tratadas	—	

Tabela 4

Produção de enterotoxina termolábil pela amostra H-10407 e 126/75 em meio de Evans, a 37°C, por 18h em anaerobiose

Amostra	Diluição do filtrado	Arredondamento das células
H-10407	não diluído	+++
	1:10	++
	1:100	—
126/75	não diluído	+++
	1:10	++
	1:100	—
H-11352	não diluído	—
Células Y-1 tratadas com o filtrado do meio não inoculado	—	
	—	
Células Y-1 não tratadas	—	

quotas para pesquisa de enterotoxina foram retiradas às horas 0, 1, 5, 10, 18, 24 e 48, após o início da curva de crescimento. Quando indicado, a alíquota foi diluída, seriadamente, em meio de Evans estéril, antes da pesquisa de enterotoxina.

Observa-se, na Tabela 5, que somente após 3h de incubação foi possível detectar os primeiros traços de

Tabela 5

Produção de enterotoxina termolábil pela amostra H-10407 durante o crescimento em meio de Evans, a 37°C, com aeração.

Tempo	Diluição do filtrado	Arredondamento das células
0h	não diluído	—
1h	não diluído	—
3h	não diluído	++
5h	não diluído 1:10	+++ —
10h	não diluído 1:10 1:100	+++ ++ —
18h	não diluído 1:10 1:100	+++ ++ ++
24h	não diluído 1:10 1:100 1:1000	+++ ++ ++ +
48h	não diluído 1:10 1:100 1:1000	+++ ++ ++ +

Células Y-1 tratadas com o filtrado	—
do meio não inoculado	

Células Y-1 não tratadas	—
--------------------------	---

enterotoxina liberada para o meio de cultura. Em seguida, à medida que o número de células aumentou, a quantidade de enterotoxina liberada para o meio de cultura também aumentou até o início da fase estacionária ser atingido. Nesta fase, embora o número de bactérias permanecesse constante, a quantidade de enterotoxina detectável no filtrado aumentou até atingir o máximo, em torno das 18h, não variando mais até 48h. Estes dados podem ser melhor visualizados na Figura 1, que expressa a relação curva de crescimento/curva de produção de enterotoxina da amostra H-10407, empregando-se, para construção da curva de produção de enterotoxina, as leituras de porcentagem de arredondamento celular, apresentadas por uma diluição 1:10 do filtrado da cultura. Para construção da curva de crescimento bacteriano, foram empregadas as leituras de densidade óptica. Os resultados obtidos com a amostra 126/75 foram semelhantes, diferindo apenas na maior quantidade de enterotoxina produzida por esta.

5. Influência do meio de cultura — Além do meio de Evans, foram estudados mais 5 meios de cultura, para verificar a capacidade de produção de enterotoxina termolábil pelas amostras H-10407 e 126/75. O crescimento das amostras foi obtido em tubos de ensaio contendo 5ml de meio de cultura, incubados a 37°C, com aeração, por 18h.

Fig. 1 — Relação entre produção de enterotoxina termolábil e crescimento de *E. coli* H-10407 em meio de Evans, a 37°C, com aeração

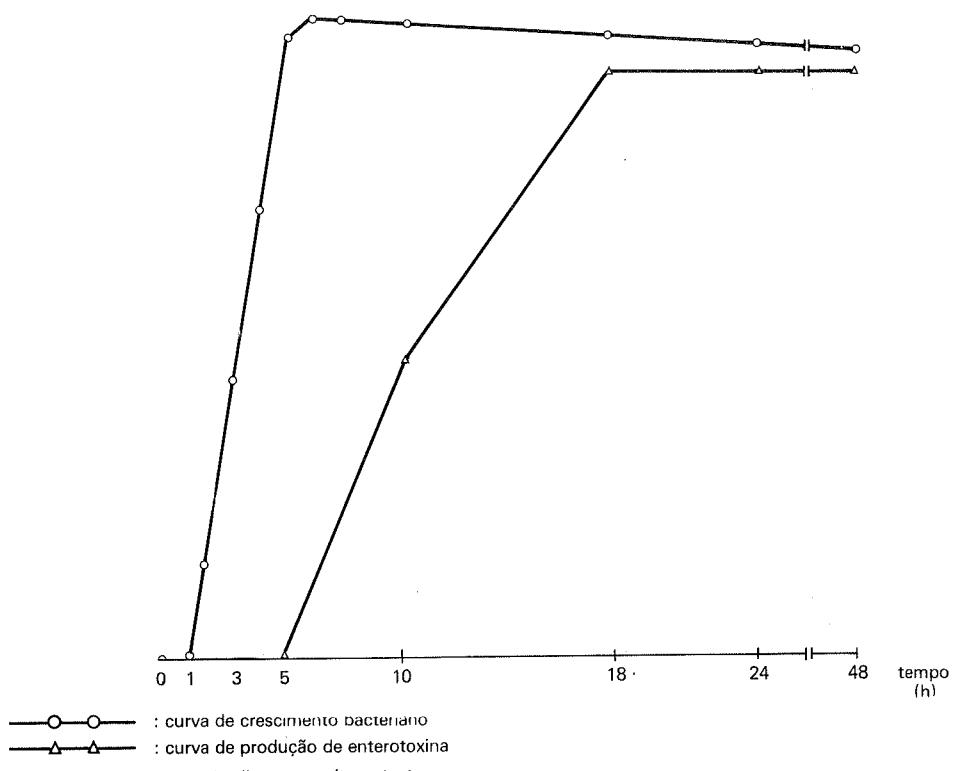


Tabela 6

Produção de enterotoxina termolábil pelas amostras H-10407 e 126/75 a 37°C com aeração, por 18h, em diferentes meios de cultura

Meio de cultura (filtrado não diluído)	Amostra	-
	<i>E. coli</i> H-10407	<i>E. coli</i> 126/75
Meio de Evans	+++	+++
Syncase	+++	+++
TSB	+++	+++
Caldo simples	-	+++
Meio mínimo de Hayes	-	-
Meio X-1	-	-
Células Y-1 tratadas com os filtrados dos meios não inoculados	-	-
Células Y-1 não tratadas	-	-

Os resultados dos experimentos, expressos na Tabela 6, mostram que os meios de Evans, Syncase e TSB permitiram, às amostras H-10407 e 126/75, a produção de enterotoxina de maneira semelhante; no caldo simples, a enterotoxina foi produzida somente pela amostra 126/75. O meio mínimo de Hayes e o meio X-1 não permitiram a produção de enterotoxina, pelo menos em quantidade demonstrável. Com o objetivo de verificar se outras amostras de *E. coli* podiam produzir enterotoxina no caldo simples, foram investigadas as amostras enterotoxigênicas 204/75, 13D, 05/75, 0109 e 0138. Conforme a Tabela 7, somente a amostra 204/75 produziu enterotoxina no caldo simples, embora as cinco a produzissem no meio de Evans.

A fim de melhor avaliar os meios de Evans, Syncase e TSB, foi feita ainda a pesquisa de enterotoxina produzida pela amostra H-10407, após diluição seriada dos filtrados de cada meio. Verifica-se, na Tabela 8,

Tabela 7

Produção de enterotoxina termolábil por amostras enterotoxigênicas de *E. coli* em caldo simples e em meio de Evans, a 37°C, com aeração, por 18h

Amostras	Meio de cultura (filtrado não diluído)	
	caldo simples	meio de Evans
<i>E. coli</i> 204/75	+++	+++
<i>E. coli</i> 13D	-	+++
<i>E. coli</i> 05/75	-	+++
<i>E. coli</i> 0109	-	++
<i>E. coli</i> 0138	-	++
Células Y-1 tratadas com os filtrados dos meios não inoculados	-	-
Células Y-1 não tratadas	-	-

que os três meios comportaram-se de maneira semelhante.

6. Estabilidade — Verificou-se a conservação da atividade de diversos filtrados de cultura, pelo armazenamento em diferentes temperaturas e por intervalos variáveis de tempo. As culturas foram feitas em meio de Evans, a 37°C, com aeração, por 18 horas. A amostra utilizada para preparação destes filtrados foi a H-10407.

Os resultados da Tabela 9 mostram diminuição da atividade da enterotoxina em temperatura ambiente e na geladeira, mais acentuadamente no primeiro caso. A -20°C, a atividade foi plenamente mantida pelo período de três meses.

Tabela 8

Avaliação semi-quantitativa da produção de enterotoxina termolábil pela amostra H-10407 nos meios de Evans, TSB e Syncase, a 37°C, com aeração, por 18h

Diluição do filtrado	Meios de Cultura		
	Evans	Syncase	TSB
não diluído	+++	+++	+++
1:10	++	+++	+++
1:100	++	++	++
1:1000	+	+	+
1:10000	+	-	-
Células Y-1 tratadas com os filtrados dos meios não inoculados	-	-	-
Células Y-1 não tratadas	-	-	-

Tabela 9

Variação da atividade biológica de filtrados de cultura da amostra H-10407 obtidos em meio de Evans a 37°C, com aeração, por 18h, armazenados em diferentes temperaturas e intervalos de tempo

Temperatura	Tempo	Armazenamento	
		Diluição do filtrado	Atividade*
Ambiente	1 mês	não diluído	+++
		1:10	+
		1:100	-
	3 meses	não diluído	++
		1:10	+
		1:100	-
4°C	2 meses	não diluído	++
		1:10	++
		1:100	+
	9 meses	não diluído	++
		1:10	-
		1:100	-
-20°C	3 meses	não diluído	+++
		1:10	++
		1:100	++
	-	não diluído	+++
		1:10	++
		1:100	++

Células Y-1 não tratadas

* Antes do armazenamento, os filtrados diluídos 1:100 tiveram atividade de ++, pelo menos.

Discussão

Os resultados do presente trabalho mostram que a produção de enterotoxina termolábil de *E. coli* no meio de Evans é influenciada em extensão variável pela temperatura, aeração e tempo de crescimento da cultura. O pH do meio, na faixa entre 6,5 e 8,5, não influenciou de maneira significante a produção de enterotoxina.

Das duas temperaturas investigadas, 37°C e 28°C, a primeira foi substancialmente superior à segunda. Conforme a Tabela 2, o filtrado proveniente da cultura a 37°C era ativo sobre as células, mesmo diluído a 1:1000, enquanto o proveniente da cultura a 28°C apresentou atividade somente até a diluição 1:10.

A influência da aeração foi bastante acentuada e notada em todos os sistemas empregados. A atividade dos filtrados provenientes de culturas rasas foi em torno de 10 vezes superior à dos filtrados de culturas profundas. Quando a cultura foi submetida à agitação, a atividade foi 100 vezes maior. Entretanto, a enterotoxina foi produzida em culturas profundas sem agitação e mesmo em anaerobiose, em quantidade relativamente grande. De modo geral, os filtrados provenientes destas culturas apresentaram regular atividade, quando não diluídas, e pequena, quando diluídas a 1:10.

A influência favorável da aeração na produção da enterotoxina termolábil tem sido verificada por vários autores (6, 17). Entretanto, sua produção, quando a cultura é feita em anaerobiose, não havia sido ainda demonstrada.

A comparação da curva de crescimento da bactéria com a curva de produção de enterotoxina oferece ensinamentos de grande importância prática. Três horas depois de iniciado o cultivo, o filtrado já apresenta alguma atividade, a qual aumenta progressivamente e atinge o máximo 18 a 24h após. Daí em diante, a atividade permanece estável, pelo menos até 48h. Os resultados encontrados na literatura, a respeito das relações entre curvas de crescimento e produção de enterotoxina, são, em parte, contraditórios. Evans & col. (6) obtiveram resultados semelhantes aos nossos, mas Sack & col. (17) somente encontraram atividade em seus filtrados 12h após o início do cultivo, isto é, quando a cultura já se encontrava em fase estacionária de crescimento. Por outro lado, Gyles & Barnum (11) referem-se à maior atividade em filtrados de 36h. Deve-se, entretanto, chamar a atenção para o fato de que esses autores usaram outros métodos para demonstrar a enterotoxina termolábil.

Os nossos resultados, mostrando a ausência de influência do pH na faixa entre 6,5 e 8,5 não apoiam a ênfase dada por alguns autores ao pH alcalino (6, 14). Ao contrário, sugerem que pH em torno da neutralidade pode ser usado, sem prejuízo na produção da enterotoxina. Isto foi observado no meio de Evans, em TSB e em BHI (Brain Heart Infusion), que foi empre-

gado algumas vezes. Além disso, vários autores usam meios com pH em torno de 7,0, quando desejam obter enterotoxina (5, 18).

A composição do meio de cultura influenciou de maneira acentuada a produção de enterotoxina, a qual não foi detectada no meio mínimo de Hayes, nem no meio X-1; a sua produção foi irregular no caldo simples e regular, e em grande quantidade, no meio de Evans, Syncase e TSB, com relação às duas amostras testadas. A avaliação semi-quantitativa mostrou que a quantidade de enterotoxina produzida foi praticamente igual nos três meios. De acordo com estes resultados, o extrato de levedura é dispensável para a produção de enterotoxina e sua ausência no meio Syncase não o tornou inadequado para produção de toxina, conforme admitem Evans & col. (6).

A inclusão de meios sintéticos, neste estudo, teve por objetivo a qualificação de um meio de composição constante, para produção de enterotoxina, em condições de rotina. Entretanto, este objetivo não foi alcançado. Recentemente, Mitchell & col. (14) divisaram um meio sintético, à base de sais minerais, glicose e vitaminas, no qual as amostras de *E. coli* investigadas produziram enterotoxina em quantidade apreciável. Uma das amostras produziu quantidade idêntica àquele produzida em Syncase e, a outra, menor.

Sendo essencialmente práticos os objetivos deste trabalho, não nos preocupamos em investigar os mecanismos através dos quais os fatores investigados influenciam a produção de enterotoxina. Sabendo-se que a quantidade de enterotoxina, em uma cultura, é função do número de células, pode-se dizer que os fatores que estimulam o crescimento da bactéria determinam aumento na produção de enterotoxina. Influem, portanto, a aeração, temperatura e, certamente, o tempo de cultivo, até o início da fase estacionária de crescimento da bactéria. Ao contrário, a superioridade de alguns meios de cultura e o aumento da quantidade de enterotoxina, após o início da fase estacionária, devem ser explicados de outra maneira. No primeiro caso, a bactéria cresceu abundantemente nos meios onde não produziu enterotoxina; no segundo, evidentemente, não houve aumento do número de células após o início da fase estacionária. Pouco, ou praticamente nada, se conhece sobre este assunto. Com relação à composição do meio de cultura, Mitchell & col. (14) verificaram que, reduzindo-se pela metade a concentração ideal de fosfato, ocorre diminuição significativa da quantidade de enterotoxina produzida. Outros estudos realizados pelos mesmos autores sugeriram que uma vitamina instável poderia ser importante para a síntese de enterotoxina. É possível que a ausência de produção de enterotoxina em meios sintéticos e a produção irregular em caldo simples sejam decorrência da ausência, nestes meios, de nutrientes adequados. Quanto ao aumento na quantidade de en-

terotoxina, após início da fase estacionária, uma explicação seria a lise celular. A verificação experimental desta hipótese foi infrutífera, pois os lisados celulares causaram a morte das células Y-1, mascarando o efeito da enterotoxina termolábil.

Os dados obtidos sobre a estabilidade demonstram que a enterotoxina é relativamente estável, uma vez que se mantém ativa por algum tempo, em temperatura ambiente e em geladeira. Além disso, pode ser mantida, sem perda de atividade, a -20°C por, pelo menos, três meses.

As seguintes normas, para a melhor produção de enterotoxina termolábil por uma amostra de *E. coli*, podem ser estabelecidas: deve ser empregado meio de cultura rico em nutrientes, como o meio de Evans, TSB ou Syncase; se o meio escolhido for o de Evans, é dispensável o acerto do pH. A temperatura de escolha para incubação deve ser 37°C, e devem ser em-

pregadas boas condições de aeração. Para tanto, recomenda-se o emprego de estufa com agitação. Na ausência desta, condições semelhantes de aeração podem ser obtidas com culturas estáticas rasas, como por exemplo, em frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 10ml de meio de cultura. O tempo de incubação adotado dependerá do objetivo a ser alcançado. Para obtenção da máxima quantidade de enterotoxina detectável em um filtrado, esta deve ser obtida 18 a 24h após o início da cultura. Por outro lado, a capacidade enterotoxigênica de uma amostra de *E. coli* pode ser determinada 5h após iniciada a cultura.

A atividade dos filtrados de cultura pode ser testada mesmo após certo tempo de armazenamento. Neste caso, o filtrado deve ser mantido a -20°C, evitando-se o armazenamento à temperatura ambiente ou mesmo em geladeira.

Referências Bibliográficas

- CLOWES, R. C. & HAYES, W. — Experiments of microbial genetics. Blackwell Scientific Publications. Oxford. p. 184, 1968.
- DE, S. N.; BHATTACHARYA, K. & SARKAR, J. K. — A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *J. Path. Bact.*, 71: 201-209, 1956.
- DE, S. N. & CHATTERJE, D. N. — An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J. Path. Bact.*, 66: 559-562, 1953.
- DONTA, S. T.; MOON, H. W. & WHIPP, S. C. — Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, 183: 334-335, 1974.
- DONTA, S. T.; MOON, H. W.; WHIPP, S. C. & SKARTVEDT, S. M. — In vivo production and inactivation of *Escherichia coli* enterotoxin. *Gastroenterology*, 67: 983-990, 1974.
- EVANS, D. J.; EVANS, D. G. & GORBACH, S. L. — Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immunity*, 8: 725-730, 1973.
- EVANS, D. G.; EVANS, D. J. & PIERCE, N. F. — Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immunity*, 7: 873-880, 1973.
- FINKELSTEIN, R. A.; NORRIS, H. T. & DUTTA, N. K. — Pathogenesis of experimental cholera in infant rabbits. 1. Observations on the intra-intestinal infections and experimental cholera produced with cell-free products. *J. Infect. Dis.*, 114: 203-216, 1964.
- GUERRANT, R. L.; BRUNTON, L. L.; SCHNAITMAN, T. C.; REBHUN, L. I. & GILMAN, A. G. — Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cells morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immunity*, 10: 320-327, 1974.
- GORBACH, S. L.; BANWELL, J. G.; CHATTERJEE, B. D.; JACOBS, B. & SACK, R. B. — Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics 1. alterations in intestinal microflora. *J. Clin. Invest.*, 50: 881-889, 1971.
- GYLES, C. L. & BARNUM, C. A. — A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *J. Infect. Dis.*, 120: 419-426, 1969.
- HAM, R. G. — An improved nutrient solution for diploid chinese hamster and human cell lines. *Exp. Cell Res.*, 29: 515-526, 1963.
- KOHLER, E. M. — Enterotoxic activity of filtrates of *Escherichia coli* in young pigs. *Amer. J. vet. Res.*, 29: 2263-2274, 1968.
- MITCHELL, I. G.; TAME, M. J. & KENWORTHY, R. — Conditions for the production of *Escherichia coli* enterotoxin in a defined medium. *J. Med. Microbiol.*, 7: 395-400, 1974.
- PUCK, T. T.; CIENCIURA, S. J. & FISCHER, H. W. — Clonal growth "in vitro" of human cells with fibroblastic morphology. Comparison of growth and genetic characteristics of single epithelioid and fibroblast-like cells from a variety of human organs. *J. exp. Med.*, 106: 145-154, 1957.
- SACK, R. B. — Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, p. 333-353, 1975.
- SACK, R. B.; GORBACH, S. L.; BANWELL, J. G.; JACOBS, B.; CHATTERJEE, B. D. & MITRA, R. C. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Infect. Dis.*, 123: 378-385, 1971.
- SHORE, E. G.; DEAN, A. G.; HOLIK, K. J. & DAVIS, B. R. — Enterotoxin producing *Escherichia coli* and diarrheal disease in adult travelers: a prospective study. *J. Infect. Dis.*, 129: 577-582, 1974.
- SMITH, H. W. & GYLES, C. L. — The effect of cell-free fluids prepared from cultures of human and animal enteropathogenic strains of *Escherichia coli* on ligated intestinal segments of rabbits and pigs. *J. Med. Microbiol.*, 3: 403-409, 1970.
- SMITH, H. W. & HALLS, S. — Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J. Path. Bact.*, 93: 499-529, 1967.

21. SMITH, H. W. & HALLS, S. — Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Path. Bact.*, 93: 531-543, 1967.
22. TAYLOR, J. & BETTELHEIM, K. A. — The action of chloroform-killed suspensions of enteropathogenic *Escherichia coli* on ligated rabbit-gut segments. *J. gen. Microbiol.*, 42: 309-313, 1966.
23. TAYLOR, J.; WILKINS, M. P. & PAYNE, J. M. — Relation of rabbit gut reaction to enteropathogenic *Escherichia coli*. *Brit. J. exp. Path.*, 42: 43-52, 1961.
24. TRABULSI, L. R. — Contribuição para o estudo das diarréias infantis pela *Escherichia coli*. A prova de enteropatogenicidade, em coelho, como recurso na caracterização de possíveis "colipatogênicos". Tese de doutoramento. São Paulo, 1960.
25. TRABULSI, L. R. — Revelação de colibacilos associados às diarréias infantis pelo método da infecção experimental da alça ligada do intestino do coelho. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 6: 197-207, 1964.

Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira. II. Caracterização e reprodução "in vitro" das acumulações limosas*

Augusto Ferreira da Eira**,
Paulo de Campos Torres de Carvalho*** e Onaur Ruano****

Resumo

Estudo das principais características macroscópicas e microscópicas das acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras de madeira; isolamento direto de microrganismos, a partir das hifas mais freqüentes das acumulações limosas, com estudo dos hábitos vegetativos e reprodutivos dessas hifas; e confronto das características de crescimento "in vitro" dos microrganismos isolados, com as principais características do limo "in natura". Os isolamentos, o crescimento "in vitro" dos microrganismos do limo, bem como a conservação dos isolados em cultura pura, foram efetuados utilizando-se o meio natural de "água servida". Conclusões: (a) as acumulações limosas são constituídas, essencialmente, de uma trama micelialana à qual se agregam bactérias, leveduras, fibras e uma variedade de impurezas, formando aglomerados mucilaginosos; (b) as estruturas hifálicas mais freqüentemente associadas com os materiais limosos são hifas hialinas, com espessura média de 7,8 μ m e com septos bem evidentes; (c) *Trichosporon cutaneum* mostrou-se estreitamente associado às acumulações limosas, não apenas pela freqüência de seu isolamento como por suas características de crescimento "in vitro", que foram análogas às principais características do limo "in natura"; (d) *Trichoderma viride* e várias espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* mostraram-se altamente adaptadas ao meio natural de "água servida" e reproduziram "in vitro" algumas características do limo "in natura".

Summary

Slime accumulations in fiberboard industries. II. Characterization and "in vitro" reproduction of slime accumulations

The study covers the macroscopic and microscopic characterization of slime accumulations; the direct isolation of microorganism in pure culture from the most frequent hyphae in the slime, with analysis of the vegetative and reproductive habits of such hyphae; and the comparison of the characteristics of slime microorganism growth "in vitro" to the main characteristics of the slime accumulation "in natura". Isolation, slime microorganism growth "in vitro", as well as conservation of isolates in pure culture were carried out with waste water as the natural medium. Conclusions: (a) the slime accumulations were essentially formed by mycelial mats to which fibers and other wood constituents, impurities, bacteria and yeasts were aggregated, thus forming the mucilaginous agglomerates; (b) the most frequent microscopic constituent in slime accumulation were hialine hyphae, with well defined septa and 7.8 μ m in diameter; (c) *Trichosporon cutaneum* was closely related to slime accumulation once it was the most frequently isolated organism whose growth characteristics "in vitro" were analogous to the main features of the slime "in natura"; (d) *Trichoderma viride* and several species of the genera *Penicillium* and *Aspergillus* showed to be highly adapted to the waste water medium and reproduced "in vitro" a few characteristics of the slime "in natura".

Introdução

As acumulações limosas, na indústria de papel e celulose, são constituídas por microrganismos, produtos do seu metabolismo, fibras e vários compostos orgânicos e inorgânicos (3, 9, 12, 18). Essas acumulações são, inicialmente, gelatinosas e aderentes, membranosas, espessas, viscosas e pastosas ou gomosas, tornando-se, em estágios mais avançados, coriáceas e muito duras (20). Na indústria de chapas de fibras da madeira, os

materiais limosos apresentam semelhanças aos estágios iniciais descritos acima, inclusive quanto aos tipos de microrganismos isolados (10, 11). Entretanto, os métodos envolvidos no isolamento de microrganismos desses materiais podem suscitar dúvidas quanto à real associação das espécies mais freqüentemente isoladas (10, 11), mormente em se tratando de populações microbianas complexas (17).

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

** Deptº de Fitotecnia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu — UNESP, Botucatu, SP.

*** Deptº de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da E.S.A. "Luiz de Queiroz" - USP; Piracicaba, SP.

**** Deptº de Fitotecnia da Fundação Faculdade "Luiz Meneghel", Bandeirantes, PR.

O início da formação de acumulações limosas deve-se aos nutrientes provenientes da polpa da madeira, presentes na água de recirculação e que são adsorvidos à superfície das máquinas (7, 8, 9, 20). A própria água industrial, retirada dos rios, possui uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos que contribuem para complementar os requisitos nutricionais da microflora do limo (16, 22). Fatores como o tempo de geração, qualidade da água industrial, luz, aeração, umidade, temperatura e nível de contaminação dos sistemas industriais são significativos no processo (3).

Existem referências de que os fungos são importantes elementos na formação do limo (10, 11, 12). Preparações microscópicas do limo nas indústrias de papel e celulose (12) mostraram um emaranhado formado por fibras de celulose e hifas não esporulantes, associadas a bactérias e impurezas. A importância dos fungos foi também enfatizada, face às altas contagens de colônias obtidas nos isolamentos de microrganismos em indústrias de celulose e papel, nos Estados Unidos (12), alertando-se ainda que a flora é dinâmica: em 1957, o gênero mais freqüentemente isolado por diluições em série foi *Phoma*; de 1959 a 1961, este organismo praticamente não foi isolado enquanto que *Sporotrichum* sp., *Geotrichum candidum*, *Phialophora fastigiata* e *Trichosporon pullulans* foram dominantes (12).

As bactérias também têm sido responsabilizadas pelas acumulações limosas na indústria de papel e celulose (2, 5, 6, 7, 8, 12, 18, 19, 20, 23). No Brasil, em indústrias de chapas de fibras de madeira, foi encontrada baixa freqüência de bactérias associadas às acumulações limosas, tendo sido isoladas, em maior freqüência, várias espécies dos gêneros *Trichosporon*, *Kluyveromyces* e

Penicillium e, em menor freqüência, vários deuteromictos, leveduras e algumas bactérias não identificadas (10, 11). Os autores dos últimos trabalhos citados verificaram que *Trichosporon cutaneum* (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota, foi o microrganismo isolado em maior freqüência (25%).

No presente trabalho, são estudados a associação entre acumulações limosas da indústria de chapas de fibras da madeira e os microrganismos isolados desses materiais, através da caracterização macroscópica e microscópica do limo, e o confronto das características do crescimento "in vitro" dos microrganismos isolados, com as principais características do limo "in natura".

Materiais e Métodos

As amostras de limo, coletadas em diferentes locais (Figura 1), ao 10º e 16º dia após a limpeza das máquinas, foram subdivididas em *limo claro*, *intermediário* e *escuro*, de acordo com padrões anteriormente descritos (11). A Figura 2 ilustra aspectos do problema de acumulações limosas na indústria.

Após a caracterização macroscópica das acumulações limosas, foram preparadas lâminas em lactofenol, para exame das estruturas microscópicas, cujos critérios são apresentados na Tabela 1 e Figura 3. Para a avaliação quantitativa das estruturas microscópicas, utilizou-se uma câmara lúcida, cujas imagens foram tracejadas em papel fosco, utilizando-se cores diferentes para cada estrutura. As áreas ocupadas pelos elementos incluídos nos itens I, J e K (ver Tabela 1) foram medidas com planímetro.

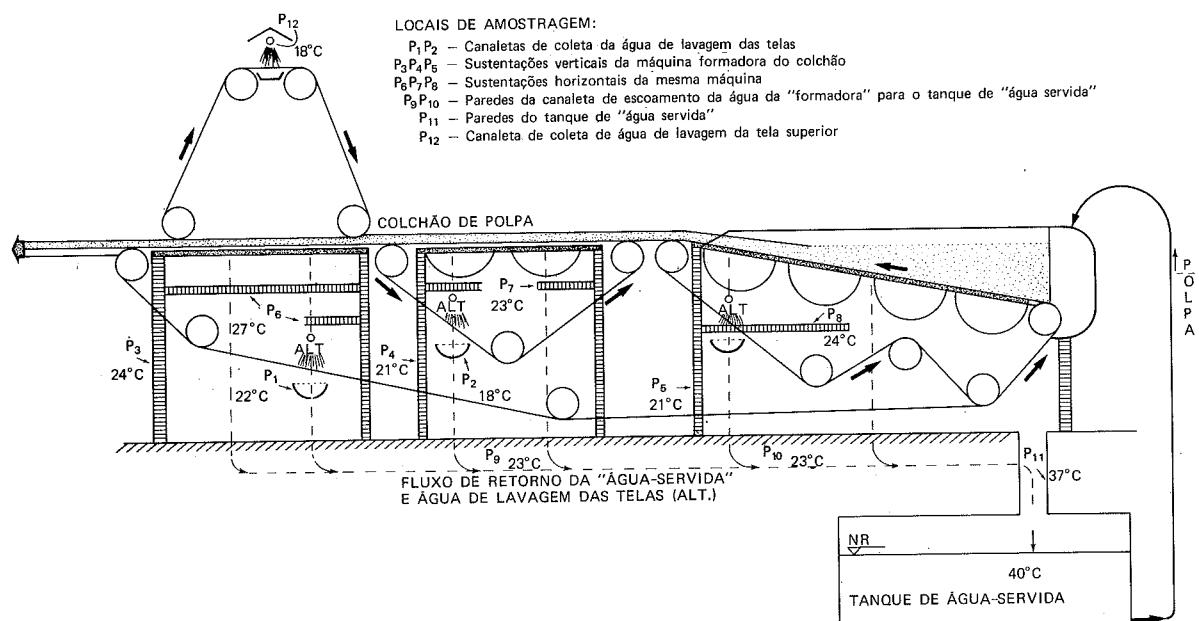


Fig. 1. Indicação dos locais de coleta, (com referência a temperaturas ambientais nos locais de amostragem dos materiais limosos), em indústria de chapas de fibras da madeira, relacionada com a máquina formadora do colchão de polpa e sistema de recirculação da "água servida" (médias do mês de julho a agosto de 1975).

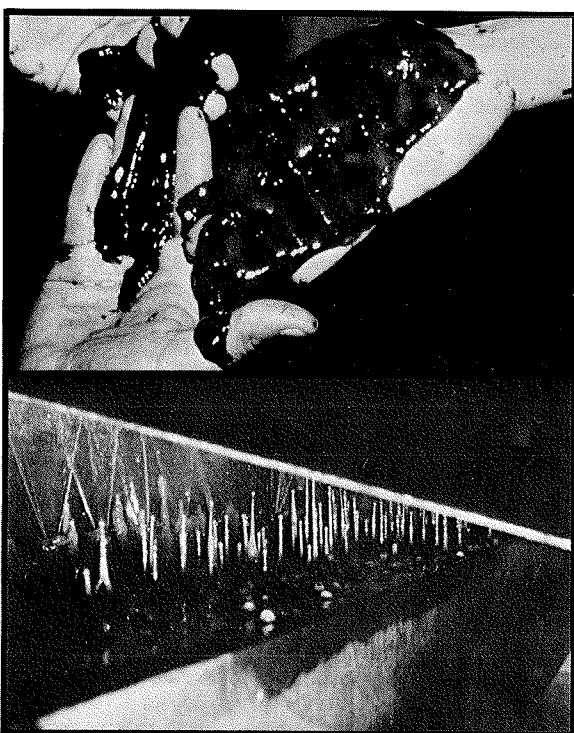


Fig. 2: Aspectos das acumulações limosas em indústrias de chapas de fibras de madeira: acima, limo de tonalidade clara, encontrado nas sustentações horizontais da máquina formadora do colchão de polpa (P 7); abaixo, limo de tonalidade intermediária e escura, encontrado nas paredes da canaleta de cimento da máquina formadora (P 10).

Para o isolamento direto de microrganismos, a partir das hifas mais freqüentes no limo, materiais limosos claro e intermediário foram lavados cinco vezes em água esterilizada, com o auxílio de agitador magnético, a fim de se soltar a trama miceliana, livrando-a de esporos, células de levedura e impurezas. Amostras do material foram espalhadas em meio de agar-água, com auxílio de espátula-de-Drigausky. Sob o microscópio e com auxílio de técnicas de micromanipulação, foram coletados fragmentos de hifas espessas (característica microscópica A), as quais foram repicadas para tubo contendo meio inclinado de "água servida"-agar, enriquecido com 0,1% de extrato de levedura. Após a purificação, os microrganismos isolados foram agrupados em relação aos tipos culturais obtidos por diluições em série (11) e identificados conforme a metodologia já descrita (11).

Os hábitos vegetativos e reprodutivos das hifas mais freqüentes no limo foram estudados com a mesma metodologia acima descrita. Fragmentos de hifas espessas do limo "in natura", de coloração clara, foram semeados em lâminas escavadas, contendo uma gota de "água servida" filtrada e esterilizada, a qual foi coberta com uma lamínula, fixada à lâmina por pontos de silicone, de forma a permitir aeração. Este conjunto foi incubado a 27°C, em placas de Petri com umidade saturada. Com a mesma metodologia, foram estudados os hábitos vegetativos e reprodutivos de *Trichosporon cutaneum*, em cultura pura obtida a partir de hifas espessas do limo.

Tabela 1

Convenção para determinação das características microscópicas das acumulações limosas em indústrias de chapas de fibras de madeira.

Código	Característica
A	Hifas de 5,5-10,6 μm ($\bar{m} = 7,8 \mu\text{m}$) de espessura, hialinas, cilíndricas, septos evidentes (7,3-12,8 μm ; $\bar{m} = 8,9 \mu\text{m}$ de espessura), distando entre si 41,2-125,4 μm ($\bar{m} = 68,4 \mu\text{m}$), com ramificações laterais de menor espessura (característica C), unidirecionadas e à base dos septos.
B	Hifas 6,9-13,8 μm diam. ($\bar{m} = 10,2 \mu\text{m}$), sub-hialinas, septadas, distância entre septos 55,0-154,2 μm ($\bar{m} = 75,3 \mu\text{m}$).
C	Hifas 3,6-5,4 μm diam. ($\bar{m} = 4,4 \mu\text{m}$), hialinas, cilíndricas (semelhante à característica A), septos evidentes (5,4-7,3 μm ; $\bar{m} = 6,2 \mu\text{m}$ de espessura), distando entre si 21,8-145,4 μm ($\bar{m} = 58,9 \mu\text{m}$).
D	Hifas 1,8-2,9 μm diam. ($\bar{m} = 2,5 \mu\text{m}$), hialinas, distância entre septos 36,4-181,8 μm ($\bar{m} = 77,8 \mu\text{m}$).
E	Pseudo-hifas hialinas, com constricções regulares (em forma de colar) ou irregulares, relacionadas ao pseudomicélio de leveduras e outras hifas hialinas ou levemente coloridas, com perfil irregular; diam. 4,2-6,8 μm ($\bar{m} = 5,5 \mu\text{m}$), distância entre septos 8,2-13,7 μm ($\bar{m} = 10,7 \mu\text{m}$).
F	Hifas caracterizadas em A, B, C, D e E, apresentando esporulação por gemulação (blastosporos) e fissão transversal terminal ou intercalar (artrosporos) ou outros esporos.
G	Clamidosporos terminais ou intercalares, paredes duplas, e diam. de 3,6-10,9 μm ($\bar{m} = 6,9 \mu\text{m}$).
H	Bactérias (bacilos) em cadeias longas.
I	Bactérias (bacilos) em aglomerados mucilaginosos.
J	Leveduras em aglomerados mucilaginosos.
K	Impurezas, células ou tecidos parénquimatosos, fibras, meias fibras, casca da madeira, cristais e outros resíduos industriais de aditivos inerentes ao processo.

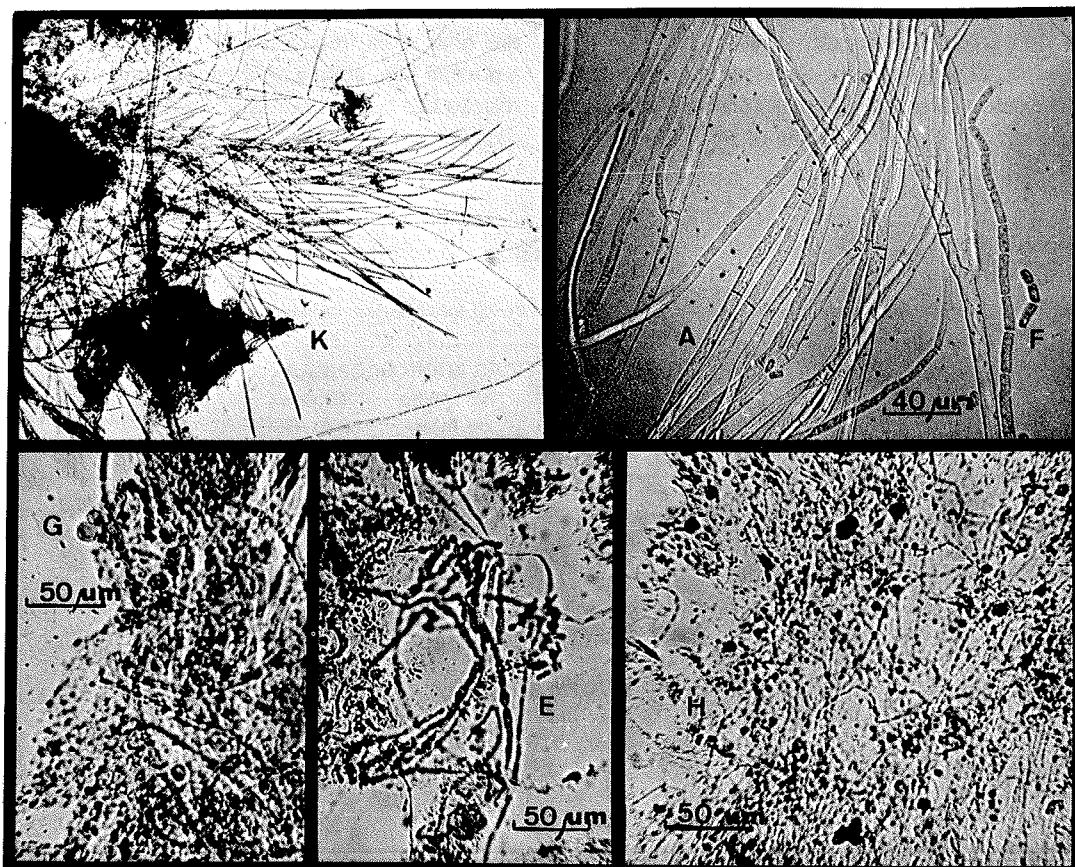


Fig. 3. Características microscópicas encontradas em acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras da madeira classificadas de acordo com a Tabela 1. Da esquerda à direita e de cima para baixo: aspecto geral hifálico e presença de impurezas (K); hifas de 5,5 a 10,6 μm de espessura, com septos evidentes (A), reproduzindo-se pela formação de artrospores (F); formação de clamidosporos (G); hifas de perfil irregular (E); bacilos formando cadeias (H).

Devido às dificuldades de um estudo conjunto da totalidade de microrganismos isolados do limo (11), o exame de suas características de crescimento, em meio líquido de "água servida", foi conduzido em três séries de ensaios. Como testemunhas, foram inoculadas porções de limo claro "in natura" (gotas de material aderente à ponta da alça de platina), em cada série de testes. Os microrganismos foram inoculados por blocos de cultura de aproximadamente 2 mm^2 de superfície (10) e incubados em agitadores horizontais a 27°C e 100 ciclos por minuto, durante sete dias.

A avaliação foi efetuada através do peso seco da biomassa, freqüência das características microscópicas reproduzidas (conforme padrões estabelecidos na Tabela 1) e, pelas características macroscópicas dos materiais formados (limo claro, intermediário e escuro ou formação de sedimentos), conforme padrões descritos anteriormente (11).

Resultados e Discussão

Os dados médios da caracterização macroscópica dos materiais limosos, amostrados em vários locais da

Tabela 2

Porcentagem das acumulações limosas de diferentes tonalidades, coletadas ao 10º e 16º dia após a limpeza da máquina formadora do colchão de polpa.

Locais de amostragem	Limo claro		Limo intermediário		Limo escuro	
	10º d	16º d	10º d	16º d	10º d	16º d
P1	0,00*	—	96,30	—	3,70	—
P2	0,00	—	98,90	—	1,10	—
P3	0,00	0,00	98,30	100,00	1,70	0,00
P4	0,00	0,00	98,90	97,59	1,10	2,40
P5	10,10	3,83	58,40	87,40	35,10	8,70
P6	2,10	0,00	97,30	100,00	0,60	0,00
P7	95,40	95,50	1,70	0,00	2,90	4,50
P8	81,90	44,23	18,10	53,15	0,00	2,62
P9	0,00	0,00	85,70	96,08	14,30	3,92
P10	0,00	0,00	78,30	54,96	21,70	45,04
P11	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
P12	0,00	0,00	98,40	96,19	1,60	3,11
Média	15,79	14,36	69,19	68,54	15,32	17,03

(*) Dados médios de duas a três repetições (porcentagem em volume de cada tonalidade em relação ao volume total de cada amostra);

(—) não foram coletadas amostras.

máquina formadora do colchão, no 10º e 16º dia após a limpeza da máquina, estão apresentados na Tabela 2. Os dados médios da porcentagem das características microscópicas analisadas, para os mesmos locais de amostragem acima referidos, estão relatados nas Tabelas 3 e 4.

Pelo isolamento direto de microrganismos, a partir das hifas mais freqüentes do limo, foram obtidos 116 amostras que, após a purificação, foram agrupadas em relação aos tipos culturais obtidos nos isolamentos por diluições em série (11) e identificadas conforme os dados da Tabela 5.

Tabela 3

Caracterização microscópica das acumulações limosas ao 10º dia (23/07/75) após a limpeza da máquina formadora de colchão de polpa

Tonalidades do limo	Locais de amostragem	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS					Nº médio de hifas/ campo	Esporula- ção (%)	Bactérias	Leve- duras J(%)	Impu- rezas K(%)	
		A	B	C	D	E						
Limo Claro	P5	62,0*	0,0	27,1	6,4	4,5	21,8	6,3	0,3 0,0	71,4	6,8	9,7
	P6	27,1	47,4	16,8	1,2	7,5	37,2	0,1	0,1 0,0	0,0	0,9	12,2
	P7	81,2	0,0	8,0	3,4	7,4	36,9	5,5	0,8 1,7	8,0	1,7	8,9
	P8	90,8	0,0	7,7	0,4	1,1	42,3	14,9	0,3 0,0	16,6	2,9	4,4
Média		65,3	11,8	14,9	2,8	5,1	34,5	6,7	0,4 0,4	24,0	3,1	8,8
Limo Interme- diário	P1	77,6	0,0	21,1	0,2	1,1	27,6	0,0	0,0 0,0	0,0	1,2	40,4
	P2	84,7	0,0	2,7	0,8	11,8	36,1	0,2	1,6 0,1	3,4	13,1	61,6
	P3	91,6	0,0	7,4	0,3	0,6	40,7	1,2	0,7 0,0	2,3	4,2	60,9
	P5	85,0	0,0	10,1	3,3	1,6	25,5	2,9	2,7 0,0	18,4	5,1	38,8
	P6	65,9	0,0	26,2	4,6	3,3	29,8	0,0	0,0 0,0	0,0	1,0	49,8
	P7	71,0	0,0	20,6	4,6	3,9	36,9	1,0	2,1 0,0	9,3	0,0	51,8
	P8	74,0	0,0	9,4	4,1	12,4	41,1	13,0	2,1 0,0	5,9	1,1	46,2
	P9	83,8	0,0	9,5	1,3	5,4	32,2	0,9	2,7 0,0	3,9	0,6	66,2
	P10	84,4	0,0	8,8	1,4	5,4	29,3	3,7	2,5 0,0	4,5	8,2	46,7
	P12	78,4	0,0	12,5	5,5	3,6	33,5	0,9	1,5 0,0	4,9	10,6	57,9
Média		79,6	0,0	12,8	2,6	4,9	33,3	2,4	1,6 0,0	5,3	4,5	52,0
Limo Escuro	P1	40,3	3,5	46,1	4,8	5,2	18,4	2,6	0,0 0,0	0,0	1,3	46,9
	P2	77,0	4,1	5,4	6,7	6,8	32,7	3,4	0,4 0,0	5,2	11,2	56,5
	P3	86,6	0,0	6,1	0,7	6,6	45,5	0,5	4,1 0,5	5,7	4,9	61,8
	P5	74,3	0,0	7,8	1,2	16,6	31,5	3,9	5,4 0,0	10,9	4,9	53,2
	P6	44,8	0,0	17,8	5,7	31,7	27,1	3,6	2,5 0,1	0,0	1,5	57,0
	P7	80,3	0,0	12,0	2,5	5,2	46,7	8,2	2,7 0,0	0,7	2,1	58,0
	P9	82,1	0,5	8,7	1,3	7,3	37,4	1,2	4,7 0,0	4,0	4,0	49,6
	P10	74,5	0,0	13,6	5,4	6,4	31,9	42,8	4,4 0,0	1,4	13,3	62,9
	P11	5,4	0,0	18,2	6,6	69,8	24,1	3,1	30,5 0,0	0,0	3,9	55,4
	P12	76,6	0,0	10,4	5,6	7,5	27,9	3,1	2,4 0,1	6,4	11,3	62,7
Média		64,2	0,8	14,6	4,1	16,3	32,3	7,2	5,7 0,1	3,4	5,8	56,4
Média geral		69,7	4,2	14,1	3,2	8,8	33,4	5,4	2,6 0,2	10,9	4,5	39,1

* Média de 3 repetições (lâminas) e, cada repetição constituída pela leitura média de 5 campos microscópicos de 400x, casualizados em relação ao material da lâmina;

(%) = em relação ao número total de hifas A, B, C, D e E;

(%) = em relação à área total do campo microscópico projetado pela câmara lúcida ($70,85 \text{ cm}^2$);

A = hifas de $7,8 \mu\text{m}$ de espessura, hialinas com septos em relevo;

B = hifas de $10,2 \mu\text{m}$ de espessura, sub-hialinas;

C = hifas de $4,4 \mu\text{m}$ de espessura, cilíndricas, hialinas;

D = hifas de $2,5 \mu\text{m}$ de espessura;

E = pseudo-hifas e outras hifas diferentes de A, B, C e D;

F = hifas formando artrosporos, blastosporos e outros esporos;

G = hifas formando claridosporos;

H = bacilos em longas cadeias;

I = bacilos em aglomerados musciliaginosos;

J = leveduras em aglomerados musciliaginosos;

K = fibras e outras impurezas.

Tabela 4

Caracterização microscópica das acumulações limosas ao 16º dia (29/07/75) após a limpeza da máquina formadora de colchão de polpa

Tonalidades do limo	Locais de amostragem	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS											
		A	B	C	D	E	Nº médio de hifas/campo	F	G	H	I(%2)	Leveduras J(%2)	Impurezas K(%2)
Limo	P5	67,7*	0,0	1,7	7,0	23,2	18,1	3,2	6,8	6,5	62,7	9,6	8,7
	P7	96,0	0,0	0,9	0,0	3,1	47,1	15,1	2,3	0,0	22,8	4,1	5,3
	P8	99,6	0,0	0,2	0,2	0,0	34,2	1,5	0,6	44,9	20,9	0,0	6,2
	P12	92,2	0,7	3,8	0,6	2,7	45,5	2,6	1,9	0,0	5,1	12,7	18,7
Média		88,9	0,2	1,6	2,0	7,3	36,2	5,6	2,9	12,8	27,9	6,6	9,7
Intermediário	P3	90,6	0,0	4,8	0,8	3,8	38,9	2,4	1,4	0,0	2,4	4,6	60,2
	P4	90,7	0,0	3,3	1,2	4,8	36,3	1,0	2,0	0,2	3,0	5,1	61,6
	P5	90,0	0,0	3,7	0,3	6,0	36,3	2,5	2,1	0,2	2,0	7,9	54,0
	P6	92,0	0,0	2,1	0,5	5,4	43,9	2,7	1,5	0,0	1,0	7,6	63,7
	P8	51,7	0,0	1,8	1,0	45,5	33,1	15,0	6,8	0,0	7,4	9,9	66,1
	P9	46,4	45,8	3,2	1,9	2,8	26,1	0,5	1,2	0,1	3,4	5,0	73,7
	P10	60,0	17,9	12,2	2,6	7,3	25,8	1,4	1,9	0,0	2,6	6,5	62,2
	P12	83,9	0,0	8,5	3,6	4,0	30,5	2,3	2,0	0,0	1,3	5,0	49,0
Média		75,7	8,0	4,9	1,5	10,0	33,9	3,5	2,4	0,1	2,9	6,5	61,3
Escuro	P4	70,9	0,0	0,0	13,9	15,2	12,6	5,2	20,9	33,7	36,2	7,5	48,3
	P5	67,4	0,0	4,7	5,5	22,4	23,0	10,5	10,9	0,0	4,4	14,5	60,3
	P7	69,8	0,0	8,4	5,4	16,4	25,2	7,8	7,7	0,0	4,5	11,5	67,2
	P8	60,3	0,0	5,0	4,9	27,9	19,4	5,3	6,4	0,0	4,4	9,1	74,4
	P9	74,5	11,4	3,7	3,1	7,3	21,7	1,0	6,1	0,0	2,4	5,0	71,4
	P10	82,3	1,9	8,8	4,4	2,6	29,4	10,1	6,9	1,7	3,1	12,4	66,0
	P11	44,9	0,0	9,6	11,1	36,1	9,2	7,3	34,5	0,0	2,9	5,6	84,5
	P12	47,3	0,0	11,4	30,5	10,8	19,5	13,4	11,6	0,2	3,1	16,6	66,1
Média		64,7	1,7	6,5	9,8	17,3	20,0	7,6	13,1	4,5	7,6	10,3	67,3
Média geral		76,4	3,3	4,3	4,4	11,5	30,0	5,6	6,1	5,8	12,8	7,8	86,2

* Média de 3 repetições (lâminas) e, cada repetição constituída pela leitura média de 5 campos microscópicos de 400x, casualizados em relação ao material da lâmina;

(%1) = em relação ao número total de hifas A, B, C, D e E;

(%2) = em relação à área total do campo microscópico projetado pela câmara lúcida ($70,85 \text{ cm}^2$);

A = hifas de $7,8 \mu\text{m}$ de espessura, hialinas com septos em relevo;

B = hifas de $10,2 \mu\text{m}$ de espessura, sub-hialinas;

C = hifas de $4,4 \mu\text{m}$ de espessura, cilíndricas, hialinas;

D = hifas de $2,5 \mu\text{m}$ de espessura;

E = pseudo-hifas e outras hifas diferentes de A, B, C e D;

F = hifas formando artrosporos, blastosporos e outros esporos;

G = hifas formando clamidosporos;

H = bacilos em longas cadeias;

I = bacilos em aglomerados musciliaginosos;

J = leveduras em aglomerados musciliaginosos;

K = fibras e outras impurezas.

Os resultados obtidos no estudo do crescimento e reprodução das hifas mais freqüentes no limo, bem como de *T. cutaneum*, são apresentados na Figura 4.

Os dados médios de peso seco da biomassa e avaliações macro e microscópicas do crescimento "in vitro" de microrganismos isolados do limo, obtidos pelo culti-

vo de 182 tipos culturais em meio líquido de "água-servida", são apresentados na Tabela 6.

Os resultados obtidos pela caracterização dos materiais limosos, em diferentes locais de amostragem, revelaram a predominância do limo de tonalidade intermediária (Tabela 2). Entretanto, relacionando-se as Figuras

Tabela 5

Freqüência de microrganismos isolados, a partir de cultivo das hifas mais freqüentes no limo

Microrganismos	Limo claro	Limo intermediário	Total	%
<i>Trichosporon cutaneum</i>	69	7	76	65,52
<i>Trichosporon</i> spp	20	7	27	23,28
<i>Kluyveromyces</i> spp	—	7	7	6,03
<i>Monillaceae</i> (<i>Sporotrichum</i> ?)	—	6	6	5,17
Total Geral	89	27	116	—

1 e 2 e a Tabela 2, nota-se que o limo de tonalidade clara predominou nos locais abundantemente lavados, enquanto que, nas paredes do tanque de "água servida", predominou o limo escuro. Na literatura consultada, não foram encontradas referências sobre a predominância de materiais limosos diferentes em relação aos locais de ocorrência na indústria. De maneira geral, as acumulações limosas nas indústrias de celulose e papel assemelham-se às relatadas no presente trabalho, pelo menos nos estágios iniciais de sua formação; já os estágios finais, coriáceos ou muito duros (20), não foram encontrados na indústria de chapas de madeira.

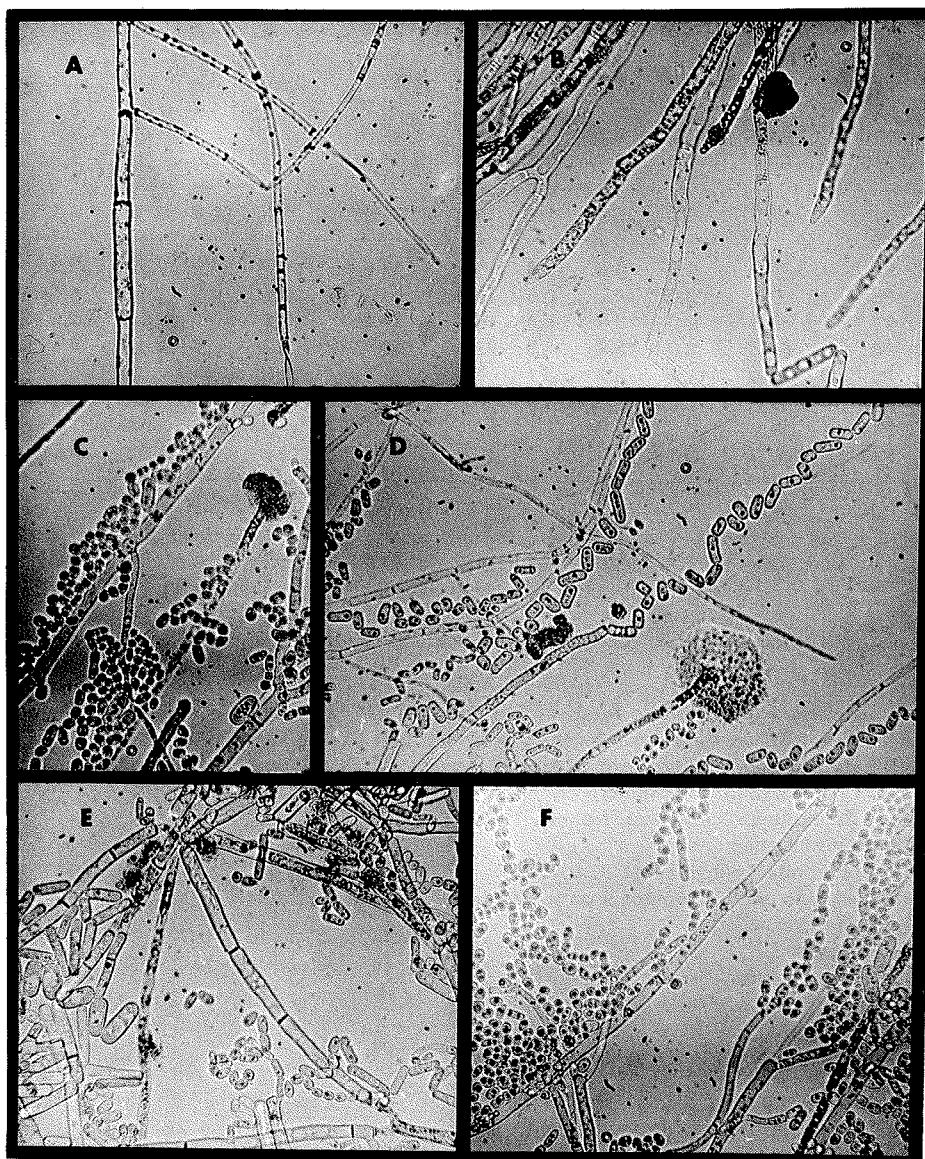


Fig. 4 Hábitos vegetativos e reprodutivos de hifas espessas do limo (característica microscópica A): hifa espessa inoculada em meio de "água servida" por micromanipulação (A), inicio da reprodução asexual através de arthrosporos (B), formação de blastosporos (C) e arthrosporos de forma e tamanho variáveis (D). Estágios reprodutivos de *T. cutaneum*: formação de arthrosporos de formas e tamanhos variáveis (E e F) e blastosporos (F).

Por outro lado, os resultados das avaliações microscópicas das acumulações limosas (Tabelas 3 e 4) denotaram que o limo é composto principalmente por hifas não esporulantes, em cuja trama miceliana prendem-se fibras, bactérias, leveduras e uma variedade de impurezas, formando aglomerados mucilaginosos. Sob este

aspecto geral, as observações de Eveleigh & Brewer (12), obtidas do exame microscópico direto dos materiais limosos de indústrias de celulose e papel, concordam com as derivadas do presente trabalho. Esses autores foram os únicos que se preocuparam em associar estruturas microscópicas aos materiais limosos. Todavia, estudos

Tabela 6

Caracterização macro e microscópica do crescimento "in vitro" de 182 tipos culturais de microrganismos isolados de acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras de madeira

MICRORGANISMOS	NÚMERO DE TIPOS CULTURAIS FORMANDO:				PESO SECO (mg)	CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICAS											
	LC	LI	LE	SED		FREQÜÊNCIA DE HIFAS (%)					ESPORULAÇÃO (%)		BACTÉRIAS		LEVEDURAS		
						A	B	C	D	E	F	G	H	I(%)	J(%)		
<i>Trichosporon cutaneum</i>	10	12	—	1	33,8	85,5	—	8,4	0,7	5,4	64,3	0,4	—	—	0,9		
<i>T. fermentans</i>	—	—	—	1	26,9	—	—	—	70,0	30,0	80,0	—	—	—	80,0		
<i>T. inkin</i>	1	—	—	—	70,9	2,3	—	—	—	97,7	50,0	4,0	—	—	8,3		
<i>T. pullulans</i>	5	5	—	1	41,3	4,6	—	28,6	12,9	53,9	71,4	0,6	—	—	7,0		
<i>Trichosporon</i> spp	8	19	—	5	35,2	16,8	—	27,5	1,9	53,8	71,5	0,7	—	—	18,1		
<i>Candida curvata</i>	1	—	—	—	85,7	54,3	—	46,7	—	—	100,0	—	—	—	3,3		
<i>Candida</i> spp	—	1	—	4	25,6	0,9	—	1,7	63,3	34,1	15,0	1,1	—	—	22,4		
<i>Endomycopsis bispora</i>	1	—	—	—	69,2	5,0	—	95,0	—	—	100,0	—	—	—	—		
<i>Endomycopsis</i> sp	—	1	—	—	50,9	5,0	—	5,0	—	90,0	85,0	5,0	—	—	20,0		
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	—	—	—	1	11,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,0		
<i>Cryptococcus</i> spp	—	—	—	2	37,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5,5		
<i>Hansenula anomala</i>	—	—	—	1	5,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,0		
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	—	1	—	—	50,2	—	—	66,0	34,0	4,0	—	—	—	—	10,0		
<i>K. drosophilicarum</i>	—	1	—	1	20,5	—	—	91,7	8,3	—	—	—	—	—	19,8		
<i>K. marxianus</i>	2	—	—	7	24,7	2,5	—	22,5	—	75,0	90,0	—	—	—	24,6		
<i>K. phaseolosporus</i>	—	—	—	1	27,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,3		
<i>K. vanudeni</i>	—	—	—	4	28,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,0		
<i>Kluyveromyces</i> spp	—	1	1	10	20,5	—	—	—	—	100,0	50,0	3,3	—	—	21,3		
<i>Pichia</i> sp	—	—	—	1	4,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4,0		
<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	—	—	1	6,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5,0		
<i>R. rubra</i>	—	—	—	2	23,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9,1		
<i>Toluropsis</i> sp	—	1	—	—	35,1	—	—	—	—	100,0	—	—	—	—	—		
Leveduras não classificadas	—	2	—	5	14,5	0,8	—	24,8	46,6	27,8	75,0	1,1	—	—	9,4		
<i>Penicillium</i> spp	16	14	—	2	34,0	2,9	—	4,9	40,8	51,4	—	3,4	—	—	—		
<i>Aspergillus niger</i>	1	—	—	—	139,8	4,0	—	6,0	46,7	43,3	—	—	—	—	—		
<i>Aspergillus</i> spp	—	—	—	3	2,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
<i>Beauveria</i> sp	—	—	—	1	0,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
<i>Cephalosporium</i> spp	—	1	—	1	19,7	—	—	—	70,0	30,0	43,3	—	—	—	—		
<i>Cladosporium</i> sp	—	—	—	1	1,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
<i>Graphium</i> sp	—	1	—	—	51,3	—	—	—	—	100,0	—	—	—	—	—		
<i>Isaria</i> sp	—	—	—	1	2,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
<i>Mucor</i> sp	—	—	—	1	4,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
<i>Paecilomyces</i> spp	2	—	—	—	51,3	5,0	—	3,3	25,8	65,9	—	11,7	—	—	—		
<i>Steccherinum</i> spp	2	—	—	—	13,0	12,0	—	—	0,7	87,3	—	—	—	—	—		
<i>Trichoderma viride</i>	2	—	—	—	107,8	15,8	—	3,3	28,3	52,6	—	19,1	—	—	—		
Moniliaceae (<i>Sporotrichum</i> ?)	—	1	—	—	57,6	—	100,0	—	—	—	5,0	—	—	—	—		
Eumicetos não classificados	1	—	—	4	7,6	—	—	20,0	80,0	—	5,0	—	—	**	51,1		
Bactérias (bacilos)	1	2	—	3	7,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
LIMO CLARO (Testem.)	—	3	—	—	91,4	68,3	—	21,0	—	10,7	93,3	4,0	—	6,7	30,0		
(população mista)	2 ^a Série	3	—	—	40,5	20,0	—	23,0	43,3	13,4	55,0	5,0	—	10,0	8,3		
	3 ^a Série	—	3	—	41,3	10,0	—	26,7	43,3	20,0	76,7	1,0	—	11,6	56,6		

LC, LI e LE, respectivamente, limos de tonalidade clara, intermediária e escura;

SED = sedimentos;

(%) = em relação ao total das características A a B;

(%) = em relação à área total do campo microscópico;

A, B, C, D, E, F, G, H, I, J = Características microscópicas descritas na Tabela 1;

** = algumas cadeias de bacilos.

mais aprofundados, da freqüência dos tipos de hifas e de outras estruturas microscópicas dos materiais limosos, não foram encontrados na literatura consultada.

A análise das Tabelas 3 e 4 permitiu apontar a estrutura hifálica A (hifas de 7,8 μm de espessura, hialinas, cilíndricas com septos bem evidentes) como a mais freqüente nas acumulações limosas encontradas em indústrias de chapas de fibras da madeira, levando-se em conta a média geral, os diferentes locais de amostragem (com raras exceções) e, ainda, as diferentes tonalidades dos materiais limosos. Os dados transcritos na Tabela 6, excetuando-se a característica B, denotaram que os demais tipos de hifas podem ser formados pelo mesmo microrganismo e que, um mesmo tipo de hifa pode ser formado por vários microrganismos. Fatores como temperatura, nutrientes, pH, aeração, teor de CO₂ e outros, podem causar o dimorfismo em alguns fungos, principalmente no grupo das leveduras (4). As estruturas A e C, apesar de sua semelhança, foram mantidas em separado, com a finalidade de confrontar as características microscópicas do limo "in natura" com as características de crescimento "in vitro" dos microrganismos isolados do limo. Em sistema fechado, o acúmulo de metabolitos ou deplexão de nutrientes poderia inibir a formação da característica A (hifas mais vigorosas) e favorecer a formação de hifas semelhantes, mas menos espessas (característica 'C'). Por conseguinte, somente estudos mais acurados, envolvendo isolamentos dirigidos às demais estruturas hifálicas, poderiam permitir o agrupamento de algumas características, fato a ser levado em conta na continuação da pesquisa.

Com relação à tonalidade dos materiais limosos, os resultados evidenciaram que os materiais mais escuros englobam maior quantidade de impurezas. Com efeito, o confronto das Figuras 1 e 2 e da Tabela 2 mostra, conforme já discutido anteriormente, que os limos mais escuros formam-se geralmente em locais de menor lavagem ou que recebem maior quantidade de fibras e outros componentes da madeira, provenientes da lavagem das telas. As tonalidades mais escuras também poderiam ser devidas à maior oxidação dos materiais componentes do limo (20).

Na literatura consultada, não foram encontradas citações a respeito de métodos de isolamento direto de estruturas microscópicas do limo, tais como os isolamentos diretos, efetuados no presente trabalho. Os resultados de freqüência, obtidos nestes isolamentos (Tabela 5), evidenciaram a estreita associação de *Trichosporon cutaneum* com as acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras, corroborando com os resultados obtidos pelo método de diluições em série (10, 11), sabidamente seletivo a microrganismos esporulantes e, a despeito da quebra sensível de viabilidade das estruturas hifálicas durante o processo de homogeneização das amostras (12). Esta última observação pode explicar também o número elevado de perdas nos isolamentos diri-

gidos às hifas, provavelmente devido às lavagens sucessivas dos materiais limosos.

A utilização de técnicas de micromanipulação para estudar o desenvolvimento e reprodução de fragmentos das hifas mais freqüentes dos materiais limosos e de *Trichosporon cutaneum*, possibilitaram visualizar as formas reprodutivas da característica microscópica A do limo "in natura" em condições de laboratório e, assim, correlacionar essas estruturas com as obtidas durante as operações de cultivo "in vitro" dos microrganismos isolados do limo. A análise da Figura 4, confrontando os hábitos vegetativos e reprodutivos das hifas espessas "A" do limo com os de *Trichosporon cutaneum*, evidenciou toda a similaridade entre este organismo e as referidas hifas, ratificando sua estreita associação na complexa flora limosa das indústrias de chapas de fibras da madeira.

Finalmente, as características do crescimento "in vitro", dos tipos culturais de microrganismos isolados das acumulações limosas (Tabela 6), evidenciaram uma vez mais a associação de *Trichosporon cutaneum* à flora limosa estudada neste trabalho, uma vez que a maioria dos tipos culturais desse microrganismo reproduziu as hifas mais freqüentemente encontradas no limo "in natura".

A escolha do método de cultivo "in vitro" dos microrganismos do limo, ainda que discordante das opiniões de Coster (7), segundo as quais o meio teste deve ser invariável, concordou com Conkey e Carlson (5), quando se visa o estudo da flora microbiana do limo e seu controle, nas condições específicas de cada indústria. As considerações feitas por Casey (3) também foram levadas em conta para a escolha do método utilizado neste trabalho. Os resultados apresentados na Tabela 6 denotaram que os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Graphium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma*, apesar de reproduzirem em menor escala as principais características microscópicas do limo, apresentaram-se mais adaptados ao sistema de cultivo artificial utilizado neste trabalho. Este fato confirma a dificuldade da escolha de um método que invariavelmente se aproxime das condições naturais, conforme discutido por alguns autores (1, 3, 5, 7).

Deve-se ressaltar ainda que o método idealizado por Coster (7), apesar de utilizar um meio artificial simulando a "água branca" (portanto, menos sujeito a variações nutricionais), não passa de um sistema fechado, onde a exaustão de nutrientes e o acúmulo de metabolitos tóxicos certamente favorece determinados microrganismos de uma flora, na dependência do rendimento de seus processos de vinculação energética ou de sua resistência aos metabolitos auto-inibidores (1, 4, 17).

A utilização de populações mistas, tal como o inóculo de hifas do limo claro, previamente lavado (Tabela 6), evidencia ainda mais este problema, considerando a inconstância da freqüência dos tipos de hifas formadas em sistemas artificiais de cultivo, em confronto com o

limo "in natura" (Tabelas 3 e 4). Os estudos de Eveleigh & Brewer (13 e 14) bem como os mecanismos de associações gerais de microrganismos discutidos por Marshall (15) e Pochon & Barjac (17), podem elucidar as dificuldades encontradas na reprodução "in vitro" de fenômenos causados por populações complexas, a partir de inóculos naturais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dr.^a Marney Pascoli Cereda, Eng.^a Agr.^a Eneida Assumpção e aos bolsistas da Duratex Benedito Tadeu Calsolari, Agenor Martinho Correa e Eng.^a Agr.^a Ilza M. Nicoletti, pela colaboração prestada durante o transcorrer desta pesquisa.

Referências Bibliográficas

1. ALEXANDER, M. — Introduction to soil microbiology, 472 p. N.Y. London, John Wiley & Sons, Inc. (ed.), 1961.
2. BECKWITH, T.D. — The bacteriology of pulp slime. *J. Bacteriol.*, 22:15-33, 1931.
3. CASEY, J.P. — Pulp and paper: chemistry and chemical technology, vol. II, 668 + 147 p. 2nd ed. New York, Interscience Publishers, Inc., 1960.
4. COCHRANE, V. W. — Physiology of fungi, 524 p. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1958.
5. CONKEY, J.H. & CARLSON, J.A. — An examination of methods for testing biostatic agents. *Tappi* (N.Y.), 45:514-523, 1962.
6. _____ & _____ — Relative toxicity of biostatic agents suggested for use in the pulp and paper industry. *Tappi* (N.Y.), 46:23A-39A, 1963.
7. COSTER, E. — The slime problem in the paper industry caused by microorganisms. *Appita* (Sydney), 21:132-138, 1968.
8. 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.
9. 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. 2nd ed. Mexico, Espanha, Argentina e Chile, Comp. Editorial Continental S.A., 1969.
10. 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.
11. EIRA, A.F.; CARVALHO, P.C.T.; GOLDONI, J.S. & ASSUMPÇÃO, ENEIDA DE, — As acumulações limosas na indústria de chapas de fibras da madeira. I. Natureza da flora microbiana. *Rev. Microbiol.* (São Paulo) 8:31-35, 1977.
12. 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.
13. _____ & _____ — Nutritional requirements of the microflora of a slime accumulation in a paper mill. *Can. J. Bot.*, 42:341-350, 1964b.
14. _____ & _____ — Interrelationships between microorganisms in an accumulation of slime in a paper mill. *Can. J. Bot.*, 43:519-526, 1965.
15. MARSHALL, C.E. — Microbial associations. *Science*, 41(1052): 306-312, 1915.
16. 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.
17. POCHON, J. & BARJAC, H. — Traté de microbiologie des sols: Applications agronomiques, 685 p. Paris, Dunod Ed., 1958.
18. SANBORN, J. R. — Development and control of microorganisms in a pulp and paper mill system. *J. Bacteriol.*, 26:373-378, 1933.
19. _____ — Slime-producing coliform and coliform-like bacteria. *J. Bacteriol.*, 48:211-217, 1944.
20. _____ — Slime control in the pulp and paper industry, 132 p. New York, Lockwood Trade Journal Co. Inc., 1965.
21. WANG, C.J.K. — Fungi of pulp and paper in New York, 115 p. State Univ. College of Forestry at Syracuse University, 1965.
22. WATERS, V.F. — Characteristics of water. In Water technology in the pulp and paper industry. *Tech. Ass. Pulp. Pap. Ind.* (N.Y.), *Tappi Monogr. Ser.* n° 18, 170 p, 1957.
23. 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.

Flora fúngica anemófila da grande São Paulo

Walderez Gambale*, Adhemar Purchio* & Júlio Croce**

Resumo

A incidência de fungos anemófilos foi estudada, por exposição de 429 placas de Petri contendo agar Sabouraud, em 11 locais da Grande São Paulo, a saber: São Caetano do Sul, Capuava, Suzano, Guarulhos, Osasco, Vila Anastácio, Cerqueira Cesar, Campos Elíseos, Tatuapé, Aclimação e Moema. As placas foram expostas semanalmente, permanecendo abertas durante 5 min., entre setembro de 1973 a agosto de 1974. Foram isolados 46 gêneros de fungos anemófilos, sendo os mais freqüentes: *Cladosporium* (64,8%), *Epicoccum* (51,7%), *Rhodotorula* (48,9%), *Penicillium* (41,7%), *Aspergillus* (23,3%), *Aureobasidium* (19,6%), *Phoma* (17,7%), *Alternaria* (17%), *Candida* (14,7%), *Fusarium* (14%), *Trichoderma* (11,2%) e *Cephalosporium* (11%). O isolamento foi correlacionado às estações sazonais, durante o período mencionado, e a resultados já obtidos em trabalhos realizados anteriormente em São Paulo e outras cidades brasileiras.

Summary

Airborne fungi of the "Grande São Paulo" area (Brazil)

Incidence of airborne fungal spores in the so-called Greater São Paulo was studied, by exposing 429 Petri dishes in 11 distinct areas, during 5 min., from September 1973 through August 1974. Identification according to Riddle technique revealed the occurrence of 46 distinct fungus genera, the most frequent being: *Cladosporium* (64,8%), *Epicoccum* (51,7%), *Rhodotorula* (48,9%), *Penicillium* (41,7%), *Aspergillus* (23,3%), *Aureobasidium* (19,6%), *Phoma* (17,7%), *Alternaria* (17%), *Candida* (14,7%), *Fusarium* (14%), *Trichoderma* (11,2%) e *Cephalosporium* (11%). Fungal frequency was correlate to the year months and to the results achieved by other Brazilian authors.

Introdução

Em diversos países, numerosos estudos foram efetuados visando conhecer a incidência dos fungos anemófilos e sua importância clínica, como agentes etiológicos de doenças respiratórias.

No Brasil, as publicações sobre a incidência de fungos na atmosfera são em número muito reduzido. As primeiras pesquisas nesse sentido foram realizadas por Lima (15) e Patto (21), respectivamente em Belo Horizonte e no Rio de Janeiro e Niterói.

Atualmente, foram realizados levantamentos sobre a flora fúngica anemófila nas seguintes cidades brasileiras: Belém (9), Belo Horizonte (10), Piracicaba (22), Porto Alegre (13), Recife (1, 2, 10), Rio de Janeiro (16, 19, 20), Santos (14) e São Paulo (3, 4, 14, 17).

Da relação acima, destaca-se o trabalho de Faria (10), que estudou exaustivamente a flora fúngica anemófila de Belo Horizonte, correlacionando-a a diversos aspectos ambientais como: pressão barométrica, temperatura, umidade relativa, ventos, precipitação plu-

viométrica total, evaporação, insolação horária, nebulosidade e visibilidade.

Na cidade de São Paulo, o primeiro trabalho visando à incidência dos fungos anemófilos foi realizado por Almeida & Fava Netto (3), em 1947. Os autores expuseram placas de Petri durante 5 minutos em vários bairros e verificaram o predomínio de fungos dos seguintes gêneros: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhodotorula*, *Neurospora*, *Mucor* e *Candida*.

Almeida & col. (4), em 1951, através de exposições realizadas em diferentes épocas climáticas e em vários bairros de São Paulo, isolaram fungos dos gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Trichotecium*, *Candida*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Hemispora*, *Torula*, *Actinomyces* e *Stemphylium*.

Outros autores (17) expuseram placas de Petri contendo agar Sabouraud, quinzenalmente, no 7º andar de um edifício na zona central da cidade, isolando fungos dos seguintes gêneros: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, *Monilia sitophila*, *Hormiscium*, *Fusarium*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Rhi-*

* Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 2921, 01000 São Paulo SP.

** Cadeira de Patologia e Clínica das Doenças Imunológicas e Hematológicas, Faculdade de Ciências Médicas de Santos.

zopus e outros fungos imperfeitos não identificados.

Lacaz & col. (14) publicaram, em 1958, os resultados de investigações efetuadas em São Paulo e Santos. Através da exposição semanal de duas placas durante 15 minutos, em um único local, na cidade de São Paulo, realizaram 49 exposições, isolando fungos dos seguintes grupos: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, leveduras brancas, leveduras pretas, *Mucor*, *Aspergillus*, *Candida* e outros com freqüência abaixo de 10%.

Considerando-se os fungos anemófilos como agentes etiológicos de doenças respiratórias alérgicas e oportunistas, responsáveis por diferentes quadros clínicos de micoses, o presente trabalho visa: conhecer a flora fúngica anemófila em áreas da Grande São Paulo; investigar a variação sazonal dos gêneros mais freqüentes; estabelecer comparações com dados encontrados anteriormente para a cidade de São Paulo e para outras áreas geográficas do Brasil.

Material e Métodos

A localização da rede de amostragem foi fornecida pela CETESB (Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Básico) que, no estudo sobre poluição ambiental, considera os seguintes parâmetros como critério para distribuição de estações coletoras: densidade demográfica, zoneamento (zonas industriais, mistas, residenciais e comerciais); fatores meteorológicos topográficos (corredores topográficos de passagem de correntes aéreas).

Com base nos fatores acima, foram escolhidos os seguintes locais: São Caetano do Sul (SC) — zona mista e complexo urbano-industrial; Capuava (CAP) — zona mista, complexo urbano-industrial, área de passagem de correntes aéreas; Suzano (SUZ) — complexo urbano-industrial e corredor topográfico de passagem de correntes aéreas; Guarulhos (GUA) — zona mista, área urbano-industrial; Osasco (OSA) — zona mista, área urbano-industrial e corredor topográfico de correntes aéreas; São Paulo com os seguintes bairros: Tatuapé (TAT), Campos Elíseos (CE), Cerqueira César (CC), Aclimação (ACL), Vila Anastácio (VA) e Moema (MOE).

A coleta dos fungos foi feita através de exposição de placas de Petri contendo o meio agar-Sabouraud, para deposição de esporos ou outras estruturas fúngicas presentes no ar. Foi exposta uma placa em cada vez a 1,20m de altura do solo, durante 5 minutos, semanalmente, entre o período de setembro de 1973 a agosto de 1974, em cada um dos onze locais de coleta. No total, foram expostas 429 placas, em locais descampados, exceto em dias chuvosos quando a exposição foi feita sob abrigo.

A identificação dos fungos foi feita através da téc-

nica de microcultura, entre lâmina e lamínula, segundo Riddell (23).

Fungos que não exibissem estruturas de reprodução, indicativas para a identificação, foram transferidos para agar-infuso de milho, agar Czapecz ou agar batata (preparado a partir de batata cozida). Quando a fase esporulante não foi evidenciada nesses meios, o fungo foi incluído em *Mycelia sterilia*.

As leveduras foram categorizadas em filamentosas e não filamentosas, através de cultivo em lâmina em meio agar infuso de milho.

Para a identificação dos organismos isolados, foi consultada a literatura mencionada a seguir (5-8, 12, 24-27).

Resultados

Através de 429 exposições, foram isolados 46 gêneros de fungos cujas freqüências encontram-se na Tabela 1.

Variação sazonal dos fungos isolados com freqüência acima de 10% — Esse grupo de fungos foi isolado em todas as épocas sazonais durante o período estudado (Tabela 2). O gênero isolado com maior freqüência, na primavera e inverno, foi *Epicoccum*; no verão, *Penicillium*; e no outono, *Cladosporium*.

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* atingiram freqüências máximas de isolamento no verão; *Rhodotorula*; *Phoma*, *Candida*, *Trichoderma* e *Cephalosporium*, no outono; e *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Alternaria* e *Fusarium*, no inverno.

Distribuição dos fungos, com freqüência de isolamento acima de 10%, segundo os locais — Os fungos do grupo considerado foram isolados em todos os locais de coleta (Tabela 3). O gênero *Cladosporium* atingiu freqüência maior em todos os locais, exceto Moema, Suzano e Aclimação.

Cephalosporium sp. e *Epicoccum* sp. obtiveram suas freqüências máximas em Suzano; *Cladosporium* sp. e *Alternaria* sp., em Osasco; *Aureobasidium* sp., em Cerqueira César; *Phoma* sp. e *Candida* sp., nos Campos Elíseos; *Trichoderma* sp., na Aclimação; e os demais, no bairro de Moema.

Outros fungos — Alguns fungos não ocorreram em determinadas épocas, *Neurospora* sp. não foi isolada no verão; *Paecilomyces* sp. e *Phialophora* sp. não foram encontradas na primavera.

Foram isolados ainda, com freqüências totais significativas, mas sem características estacionais, membros dos seguintes gêneros de fungos: *Helminthosporium*, *Peironella* sp., *Pestalotia* e *Stemphylium*, com freqüências máximas, respectivamente, 10,5%, 6,3%, 4,2% e 5,6% atingidas no outono; *Curvularia* e *Scopulariopsis* com freqüências máximas, respectivamente, 11,8% e 5,9% atingidas no verão; e *Nigrospora* com 10,9% no inverno.

Tabela 1

Freqüência de isolamento de fungos anemófilos na Grande São Paulo (setembro de 1973 a agosto de 1974)

Gênero	F	% +
<i>Cladosporium</i>	278	64,8
<i>Epicoccum</i>	222	51,7
<i>Rhodotorula</i>	210	48,9
<i>Penicillium</i>	179	41,7
<i>Aspergillus</i>	100	23,3
<i>Aureobasidium</i>	84	19,6
<i>Phoma</i>	76	17,7
<i>Alternaria</i>	73	17,0
<i>Candida</i>	63	14,7
<i>Fusarium</i>	60	14,0
<i>Trichoderma</i>	48	11,2
<i>Cephalosporium</i>	47	11,0
<i>Helminthosporium</i>	40	9,3
<i>Curvularia</i>	33	7,7
<i>Nigrospora</i>	32	7,5
<i>Streptomyces</i> +	31	7,2
<i>Peironellaea</i>	20	4,7
<i>Neurospora</i>	19	4,4
<i>Paecilomyces</i>	14	3,3
<i>Pestalotia</i>	12	2,8
<i>Scopulariopsis</i>	11	2,6
<i>Stemphylium</i>	11	2,6
<i>Phialophora</i>	9	2,1
<i>Rhizopus</i>	8	1,9
<i>Trichotecium</i>	8	1,9
<i>Pleospora</i>	7	1,6
<i>Chaetomium</i>	7	1,6
<i>Mucor</i>	6	1,4
<i>Byssochlamys</i>	5	1,2
<i>Botrytis</i>	5	1,2
<i>Fusidium</i>	5	1,2
<i>Popularia</i>	5	1,2
<i>Geotrichum</i>	4	0,9
<i>Sporotrichum</i>	4	0,9
<i>Stachybotrys</i>	3	0,7
<i>Circinella</i>	2	0,5
<i>Syncephalastrum</i>	2	0,5
<i>Periconia</i>	2	0,5
<i>Sepedonium</i>	2	0,5
<i>Diplosporium</i>	2	0,5
<i>Torula</i>	1	0,2
<i>Cryptococcus</i>	1	0,2
<i>Nocardia</i> +	1	0,2
<i>Spegazzinia</i>	1	0,2
<i>Microsporum</i>	1	0,2
<i>Verticillium</i>	1	0,2
<i>Cunninghamella</i>	1	0,2
<i>Hormiscium</i>	1	0,2
Fungos não classificados	293	68,3
Leveduras não filamentosas	192	44,7

+ Cálculo baseado em 429 exposições
++ Bactérias

Tabela 2

Variação sazonal de fungos anemófilos mais freqüentes na Grande São Paulo

Gêneros	Épocas climáticas			
	Primavera (108)	Verão (68)	Outono (143)	Inverno (110)
<i>Cladosporium</i>	57,4	52,9	67,1	76,4
<i>Epicoccum</i>	63,9	32,2	32,2	77,3
<i>Rhodotorula</i>	39,8	39,7	58,7	50,9
<i>Penicillium</i>	34,3	57,3	35,7	47,3
<i>Aspergillus</i>	13,0	32,3	21,7	30,0
<i>Aureobasidium</i>	10,2	14,7	21,0	30,0
<i>Phoma</i>	8,3	19,1	25,9	15,4
<i>Alternaria</i>	4,6	19,1	18,2	26,4
<i>Candida</i> +	5,5	4,4	28,7	11,8
<i>Fusarium</i>	9,3	13,2	16,1	16,4
<i>Trichoderma</i>	4,6	8,8	14,7	14,5
<i>Cephalosporium</i>	7,4	14,7	16,1	5,4

() N.º de exposições

+ Leveduras filamentosas

Todos os demais fungos, indicados na Tabela 1, foram isolados ocasionalmente, com freqüência total entre 0,2 e 2%.

Foram isolados, ainda, 293 fungos que não apresentaram órgãos de reprodução, 192 leveduras não filamentosas e 6 gêneros que não puderam ser identificados.

Foram considerados, também, os gêneros *Streptomyces* e *Nocardia*, reconhecidos como bactérias, mas aqui incluídos para fins de comparação aos trabalhos realizados anteriormente.

Discussão

Verifica-se, pela Tabela 1, que, à semelhança de resultados obtidos em outras áreas geográficas, a atmosfera da Grande São Paulo apresenta os fungos pertencentes ao grupo, denominado por Morrow, Meyer & Prince (18), dominantes universais. Dos 12 fungos isolados com freqüência acima de 10%, somente *Epicoccum* sp., *Cephalosporium* sp. e *Candida* sp. não pertencem ao citado grupo.

Fato interessante a ser assinalado é que a maioria dos fungos foi isolada com freqüência elevada nos períodos de outono e inverno. Faria (10) observou que a concentração de esporos fúngicos, no ar, aumenta com a elevação da pressão atmosférica, evaporação e velocidade do vento e com a diminuição da temperatura, umidade relativa e precipitação. O período relativo ao outono, na Grande São Paulo, é caracte-

Tabela 3

Freqüência dos gêneros de fungos anemófilos mais comuns na Grande São Paulo,
segundo os locais (setembro de 1973 a agosto 1974)

Gêneros	Locais										
	SC (39)	CAP (39)	SUZ (40)	GUA (41)	OSA (38)	VA (40)	CC (38)	CE (36)	TAT (40)	ACL (39)	MOE (39)
<i>Cladosporium</i>	76,9	53,8	62,5	56,1	84,2	55,0	71,0	61,1	72,5	61,5	59,0
<i>Epicoccum</i>	51,3	48,7	72,5	41,5	34,2	37,5	63,2	58,3	50,0	69,2	43,6
<i>Rhodotorula</i>	41,0	48,7	45,0	46,3	47,4	42,5	55,3	58,3	47,5	43,6	64,1
<i>Penicillium</i>	30,8	41,0	37,5	36,6	47,4	37,5	42,1	41,7	37,5	48,7	59,0
<i>Aspergillus</i>	23,1	15,4	25,0	19,5	18,4	25,0	23,7	27,8	15,0	28,2	35,9
<i>Aureobasidium</i>	20,5	10,3	17,5	12,2	18,4	20,0	31,6	13,9	25,0	28,2	17,9
<i>Phoma</i>	10,3	23,1	15,0	12,2	15,8	22,5	21,0	36,1	12,5	10,3	17,9
<i>Alternaria</i>	20,5	20,5	12,5	9,8	28,9	20,0	18,4	8,3	20,0	10,3	17,9
<i>Candida</i> +	17,9	7,7	2,6	12,2	18,4	7,5	18,4	38,9	17,5	5,1	17,9
<i>Fusarium</i>	10,3	20,5	17,5	21,9	10,5	5,0	15,8	13,9	12,5	2,6	23,1
<i>Trichoderma</i>	17,9	7,7	10,0	9,8	5,3	15,0	10,5	11,1	12,5	18,0	5,1
<i>Cephalosporium</i>	5,1	7,7	27,5	7,3	15,8	10,0	5,3	2,8	7,5	15,4	15,4

() N.º de exposições

+ Levedura filamentosa

SC — São Caetano do Sul CAP — Capuava SUZ — Suzano GUA — Guarulhos OSA — Osasco
VA — Vila Anastácio CC — Cerqueira César TAT — Tatuapé CE — Campos Elíseos ACL — Aclimação
MOE — Moema

rizado por queda regular da temperatura, nebulosidade e umidade (11). Nota-se ainda a queda dos índices pluviométricos e o aumento da pressão atmosférica, em relação às estações anteriores (11). O inverno é caracterizado por alta pressão atmosférica, nebulosidade mínima, baixa temperatura, estabilidade no ar, bom tempo e índices pluviométricos baixos (11). Este resultado condiz com o esperado. A formação do esporo, principal forma de disseminação dos fungos, ocorre nos períodos em que as condições climáticas são adversas, ou seja, nas estações secas.

Comparação com resultados obtidos anteriormente na cidade de São Paulo — A Tabela 4 mostra os resultados de trabalhos realizados anteriormente, na cidade de São Paulo. O último deles foi apresentado em 1958, por Lacaz & col. (14), notando-se algumas diferenças entre seus resultados e os agora obtidos.

Assim é que: foram isolados, mais freqüentemente, *Cladosporium* sp., enquanto aqueles autores encontraram, com maior freqüência, *Penicillium* sp. Não foi isolado *Geotrichoides* sp., nem *Torulopsis* sp., este último, provavelmente, por não ter sido feita a identificação completa das leveduras. Por outro lado, foram encontrados fungos dos gêneros *Epicoccum*, *Alternaria*, *Phoma*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Nigrospora* e outros menos freqüentes, que não foram constatados por Lacaz & col. (14).

Tabela 4

Fungos anemófilos isolados em São Paulo por diversos autores

ALMEIDA & FAVA NETTO (1947) +	ALMEIDA & col. (1951) +	MENDES & LACAZ (1951)	LACAZ & col. (1958)
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i> 23,6	<i>Penicillium</i> 83,7
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> 17,2	<i>Cladosporium</i> 73,4
<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Rhodotorula</i> 6,4	<i>Rhodotorula</i> 63,2
<i>Rhodotorula</i>	<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i> 4,5	<i>Torulopsis</i> 20,4
<i>Rhizopus</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Neurospora</i> 3,6	<i>Lev. Brancas</i> 20,0
<i>Neurospora</i>	<i>Cephalosporium</i>	<i>Hormiscium</i> 1,8	<i>Lev. Pretas</i> 14,0
<i>Mucor</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> 1,8	<i>Mucor</i> 12,0
<i>Candida</i>	<i>Torula</i>	<i>Candida</i> 0,9	<i>Aspergillus</i> 10,2
<i>Aspergillus</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Cephalosporium</i> 0,9*	<i>Candida</i> 10,2
	<i>Mucor</i>	<i>Rhizopus</i> 0,9	<i>Cephalosporium</i> 8,1
	<i>Chaetomium</i>	Fungos não identificados 21,0	<i>Aureobasidium</i> 8,1
	<i>Hemispora</i>		<i>Hormiscium</i> 6,1
	<i>Stemphylium</i>		<i>Neurospora</i> 4,0
	<i>Trichotecium</i>		<i>Rhizopus</i> 4,0
	<i>Actinomyces</i>		<i>Geotrichum</i> 2,0
			<i>Geotrichoides</i> 2,0
			<i>Streptomyces</i> 2,0
			<i>Sporotrichum</i> 2,0

+ Não há referência sobre freqüência

Diante disso, acreditamos ter havido variação na flora fungica anemófila da região, pelo menos no que concerne aos fungos isolados com maior freqüência, pois o maior número de gêneros encontrados no presente trabalho talvez se deva ao fato da amostragem ter sido maior.

Comparação com resultados obtidos em outras cidades brasileiras — A Tabela 5 contém os resultados

Tabela 5

Fungos anemófilos mais freqüentes (acima de 10%) em cidades brasileiras de acordo com os últimos trabalhos

Gêneros	Cidades							
	SP	BH	BE	RE	RJ	SA	PI	PA
%								
<i>Cladosporium</i>	64,8	90,3	17,5	31,9	15,0	87,0	50,0	—
<i>Epicoccum</i>	51,7	31,0	—	—	—	76,0	—	—
<i>Rhodotorula</i>	48,9	28,0	—	29,0	10,0	80,0	12,5	—
<i>Penicillium</i>	41,7	64,7	36,6	44,4	20,0	93,8	62,3	—
<i>Aspergillus</i>	23,3	58,6	63,8	72,2	10,0	46,0	43,7	46,6
<i>Aureobasidium</i>	19,6	31,9	—	13,8	—	—	—	—
<i>Phoma</i>	17,7	29,7	—	22,2	—	—	—	—
<i>Alternaria</i>	17,0	21,1	—	—	—	—	—	—
<i>Candida</i>	14,7	16,7	—	41,6	—	—	31,2	—
<i>Fusarium</i>	14,0	24,7	14,5	23,6	—	—	—	—
<i>Trichoderma</i>	11,2	—	15,0	—	—	—	—	—
<i>Cephalosporium</i>	11,0	24,2	10,5	—	—	—	—	—
<i>Curvularia</i>	—	33,3	68,3	—	—	—	—	—
<i>Helminthosporium</i>	—	19,4	—	—	—	—	—	—
<i>Mucor</i>	—	—	26,9	—	—	27,0	—	—
<i>Paecilomyces</i>	—	—	10,0	—	—	—	—	—
<i>Torulopsis</i>	—	—	—	20,2	—	19,0	12,5	—
<i>Cryptococcus</i>	—	—	—	16,8	—	—	—	—
<i>Phialophora</i>	—	—	—	12,5	—	—	—	—
<i>Gloesporium</i>	—	—	—	11,1	—	—	—	—
<i>Pyrenophaeta</i>	—	—	—	11,1	—	—	—	—
<i>Rhizopus</i>	—	—	—	—	—	19,0	18,1	—
<i>Neurospora</i>	—	—	—	—	—	—	21,1	—

SP — São Paulo (Trabalho presente)

BH — Belo Horizonte (10)

BE — Belém (9)

RE — Recife (10)

RJ — Rio de Janeiro (16)

SA — Santos (14)

PI — Piracicaba (22)

PA — Porto Alegre (13)

dos trabalhos mais recentes, realizados em algumas cidades brasileiras, mostrando apenas aqueles fungos que incidiram com freqüência acima de 10%. Ressalte-se que a discussão, apresentada a seguir, baseia-se exclusivamente nesses fungos. A não inclusão de um gênero, numa cidade, pode ser devida ou a sua ausência, ou a seu isolamento, com freqüência abaixo da estabelecida.

Apesar dos estudos não terem sido realizados nos mesmos padrões, nem sempre com grande número de observações, a comparação é válida em termos de fungos mais freqüentemente isolados.

Com exceção de *Trichoderma* sp., encontrado na Grande São Paulo, e de *Curvularia* sp. e *Helminthosporium* sp., isolados em Belo Horizonte, os demais são comuns às duas regiões.

Em Belém, foram isolados fungos dos gêneros *Curvularia*, *Mucor* e *Paecilomyces*, não encontrados com a freqüência considerada na Grande São Paulo. Os gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cephalosporium* são comuns aos dois locais. Na Grande São Paulo, por sua vez, foram isolados os gêneros *Epicoccum*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Phoma*, *Alternaria* e *Candida*.

Comparando-se com a flora micótica de Recife, observa-se que, à exceção de *Epicoccum* sp., *Alternaria* sp., *Trichoderma* sp. e *Cephalosporium* sp., não isolados nessa cidade, e dos gêneros *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Phialophora*, *Gloesporium* e *Pyrenophaeta* não isolados na Grande São Paulo, os demais foram encontrados nas duas regiões.

Os seguintes gêneros de fungos foram encontrados no Rio de Janeiro, Santos, Piracicaba e Grande São Paulo: *Cladosporium*, *Rhodotorula*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Em Santos e Piracicaba isolou-se, respectivamente, *Epicoccum* sp. e *Candida* sp., também encontradas na Grande São Paulo.

Em Porto Alegre, apenas o gênero *Aspergillus* foi isolado com freqüência acima de 10%.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CETESB, nas pessoas do Eng. Nelson Nefussi e Eng. Silvio Souza Esteves e do técnico Jorge Cutary Aguillar do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí, os quais muito contribuiram para a realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. ALECRIM, I. — Taxonomia de alguns fungos do ar. *Ciênc. e Cult.*, 7:157, 1955.
2. ALECRIM, I. & TEIXEIRA, H. — Fungos anemófilos da cidade do Recife (Pernambuco-Brasil). *An. Fac. Med. Recife*, 18:269-274, 1958.
3. ALMEIDA, F. de & FAVA NETTO, C. — Observações sobre a flora micológica do ar na cidade de São Paulo. *Fich. Terap. Labor-farma*, 9:1-3, 1947.
4. ALMEIDA, F. de; BRANDÃO, C.H.; MONTEIRO, E.L. & MOURA, R.A. — Flora micológica do ar. Sua significação e importância. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 11:5-12, 1951.
5. ARX, J.A. von — *Fungi sporulating in pure culture*. Germany, J. Cramer, 1970.
6. BARNET, H.L. & HUNTER, B.B. — *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. 3th ed. Minneapolis, Burgess Publishing Co., 1972.
7. CLEMENTS, F.E. & SHEAR, C.L. — *The genera of fungi*. 2nd ed. New York, Hafner Publishing Co., 1954.
8. CONNANT, N.F.; SMITH, D.T.; BAKER, R.D.; CALLAWAY, J.L. & MARTIN, D.S. — *Manual of clinical mycology*, 2nd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1972.
9. COSTA, C.A.A. — Contribuição ao estudo qualitativo da flora micótica do ar na cidade de Belém. Sua possível relação com a asma brônquica e rinite alérgica. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Pará, 1960.
10. FARIA, A. — Aspectos ecológicos e clínicos da flora micótica anemófila de Belo Horizonte. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais, 1967.
11. FRANÇA, A. — Estudo sobre o clima da bacia de São Paulo. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Geografia da Universidade de São Paulo, 1945.
12. GILMAN, J.C. — *A manual of soil fungi*. 2nd ed. Iowa, The Iowa State University Press, 1957.
13. HOMRICH, M.H. — Observações sobre a ocorrência de esporos de fungos alergógenos no ar de Porto Alegre e arredores. *Rev. Bras. Biol.*, 21:149-153, 1961.
14. LACAZ, C. DA S.; MENDES, E.; PINTO, R.J.R.; CARDOSO, T. & LUCCHETTI, L.C.H. — Fungos anemófilos nas cidades de São Paulo e Santos (Brasil). *Rev. Hosp. Clin.*, 13:187-193, 1958.
15. LIMA, A. de O. — Os fungos do ar em alergia respiratória: IV. Os esporos de *Alternaria* e *helminthosporos* na atmosfera da cidade de Belo Horizonte. *Brasil med.*, 55:759-760, 1941.
16. LIMA, A. DE O.; SEABRA, O.; FRANÇA, A.T. & CUKIER, J. — Incidência de fungos na atmosfera de algumas cidades brasileiras. *Hospital*, 63:1045-1054, 1963.
17. MENDES, E. & LACAZ, C. da S. — Fungos anemófilos da cidade de São Paulo. *Rev. paul. med.*, 41:270-271, 1952.
18. MORROW, M.B.; MEYER, G.H. & PRINCE, H.E. — A summary of airborne mold surveys. *Ann. Allergy*, 22:575-587, 1964.
19. PASSARELLI, N.; MIRANDA, M.P. de & CASTRO, C. — Cogumelos do ar na cidade do Rio de Janeiro, *Rev. Méd. Cir. do Brasil*, 52:173-182, 1944.
20. PASSARELLI, N.; MIRANDA, M.P. DE & CASTRO, C. — A study of the incidence of airborne fungi in the city of Rio de Janeiro. *Ann. Allergy*, 7:334-338, 1949.
21. PATTO, O. — Iniciação à alergia. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, 1953.
22. PINHEIRO, L.F.L.; NEDER, R.N. & AZEVEDO, J.L. — Flora micológica e bacteriana do ar na cidade de Piracicaba. *Hospital*, 69:627-633, 1966.
23. RIDDELL, R.W. — Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, 42:265, 1950.
24. SILVEIRA, V.D. — Lições de micologia, 2^a ed. São Paulo e Porto Alegre — Livraria Kosmos, 1946.
25. WILSON, J.W. & PLUNKETT, O.A. — *The fungous diseases of man*. Berkeley and Los Angeles, University of California Pressa, 1965.
26. ZAPATER, R.C. — Micología alergógena. B. Aires, Librería "El Ateneo" Editorial, 1953.
27. ZAPATER, R.C. — *Atlas de diagnóstico Micológico*. 3^a ed. Barcelona, Editorial "El Ateneo", 1973.

Uso da panela de pressão comum para esterilização

Edison Paulo Tavares de Oliveira*, Hideyo Iizuka**
 Hisako Gondo Higashi**, José L. Brunini*** &
 José Luís de Lorenzo****

Resumo

Confirmação, experimental, do emprego da panela de pressão para esterilização, como alternativa à autoclave, que nem sempre é disponível em trabalhos de campo e em outros procedimentos nos quais seja imprescindível a esterilização rigorosa. Estabelecimentos de normas para a padronização no uso, com determinação do tempo mínimo necessário para a destruição de esporos de cinco diferentes espécies, em sua maioria patogênicas, selecionadas por serem das mais resistentes à termo-coagulação proteica.

Summary

The use of pressure cooker for sterilization

Establishment of norms and patterns in the use of pressure cooker, determination of the minimum time necessary for destruction of spores from five different, mostly pathogenic agents selected among those which show high resistance to protein thermocoagulation. Discussion of the advantages of the common pressure cooker for sterilization purposes, in places where the availability of an autoclave is practically impossible, particularly in rural zones.

Introdução

O emprego do calor úmido, para a termocoagulação proteica, torna a panela de pressão em instrumento potencialmente útil para os processos de esterilização necessários em grande número de procedimentos biomédicos. Não há dúvida quanto à supremacia da autoclave no processo de esterilização (1, 2, 7, 8, 10). Tal equipamento, entretanto, nem sempre é disponível em consultórios médicos e odontológicos, em farmácias e em laboratórios de pequeno porte, tendo-se em vista seu custo relativamente alto (6), os requisitos para sua instalação e a necessidade de pessoal treinado para sua operação. Em determinadas regiões do país, o uso da autoclave é praticamente impossível. Particularmente em trabalhos de campo, o processo de esterilização torna-se problemático*****.

A panela de pressão já vem sendo indicada como potencial substituta da autoclave (2, 3, 9), graças ao princípio do calor úmido sob pressão. Não obstante, ainda não há normas determinadas para seu uso como instrumento para esterilização, pois os dados encontrados na literatura ou não são concordantes entre si ou não apresentam comprovação experimental (2, 5, 7). A insuficiência de trabalhos específicos (6) e a falta de bases experimentais, com exceção dos trabalhos de poucos autores (4, 6, 9), fazem com que o assunto mereça considerações adicionais.

Jürgensen (5) utilizou, durante 20 minutos, a panela de pressão para esterilização de material bacteriológico de canais radiculares, sem contudo fornecer dados ou

* Seção de Toxinas e Anatoxinas, Instituto Butantan, Caixa Postal 65, 01000 São Paulo SP; e Depto. de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

** Setor de Anaeróbios, Instituto Butantan.

*** Clínica de Alergia, Hospital do Servidor Público Municipal, São Paulo.

**** Depto. de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo.

***** As atividades desempenhadas pelos membros do Projeto Rondon, por exemplo, no campo da medicina cirúrgica, obstétricia, epidemiologia, veterinária e outras, são, via de regra, realizadas a consideráveis distâncias de centros hospitalares.

padrões relativos a tempos de exposição. Mischol (7) é contrário ao uso da panela de pressão, considerando-a inadequada para a esterilização de instrumental odontológico, para o qual somente a autoclave é recomendada. Cable (3) considera a panela de pressão adequada para esterilização rigorosa, especialmente quando o material é previamente lavado com solução detergente. Todavia, o autor não fornece dados sobre os tempos utilizados. Grahame (4) também recomenda o uso da panela de pressão, durante 20 minutos, sob 15 lb. de pressão. Sandoval & Vera (9) discutem as especificações de construção da panela de pressão, salientando sua importância na esterilização, e relatando que ela deve ser operada durante 20 minutos, com 500 ml de água no seu interior. Todavia, não indicaram os tipos de microrganismos testados. Por outro lado, suas amostras microbioanas eram incubadas apenas durante 48 horas, tempo nem sempre suficiente para tal experimentação, no volume de água por eles recomendado, considerando-se as relações existentes entre este e a intensidade da chama (fonte de calor).

Kamiyama (6) confirmou, experimentalmente, que 500 ml de água são ideais para panelas de 3, 4 e 4,5 litros de capacidade. Tendo utilizado material contaminado com esporos de *Bacillus subtilis*, em meio de tioglicolato, concluiu que a destruição de esporos ocorria em 20 minutos, nos materiais em que o vapor entrava em contato com cada fibra e com todas suas camadas (materiais de densidade) ou em 15 minutos, quando se tratava de materiais em que o vapor entrava em contato somente com sua superfície (materiais de superfície). Segundo a autora, a panela de pressão pode ser usada sempre que necessária.

Diante dos dados apresentados, torna-se evidente a necessidade de calibragem e padronização no uso da panela de pressão como equipamento esterilizador. Para tanto, foram testados materiais de cultivo de cinco espécies de bactérias esporulantes, selecionadas em função de sua resistência à termocoagulação proteica.

Material e Métodos

Microrganismos e meios de cultura — Foram utilizadas amostras, da coleção do Instituto Butantan, das seguintes espécies: *Clostridium tetani* (amostra B89), *C. botulinum* tipo A (amostra 395), *C. septicum* (amostra 66), *C. oedematiens* (amostra A-159) e *Bacillus subtilis* (sem numeração). As culturas foram mantidas em Tarozzi previamente regenerado. Este meio também foi utilizado nas repicagens das amostras. O caldo simples e o ágar simples foram usados nas provas de pureza das culturas. O crescimento bacteriano era verificado através de esfregaços corados pelo método de Gram e pelo método de Wirtz (para comprovação da presença de esporos).

Materiais empregados — Panelas de pressão comuns, de 4 litros; tela de metal, para uso como grade de suporte, apoiada no fundo da panela através de tripé; frascos para penicilina, de 10 ml, para as culturas testadas; termomanômetro "Fabbe", acoplado à válvula de escape da panela; ampola de enxofre com ponto de fusão de 110°C; papel-controle de esterilização em autoclave, da Propper Mfg Co. Inc., N.Y.; bioindicador "Merck" para controle de esterilização em autoclave (esporos de *Bacillus stearothermophilus*, cultivados em caldo nutritivo com açúcares e indicador de pH).

Testes preliminares do funcionamento da panela de pressão — Visam verificar as temperaturas e as pressões atingidas no decorrer da operação total e, por outro lado, se a pressão máxima, uma vez atingida, é mantida constante durante todo o processo. Para tanto, foi usado um termomanômetro, previamente acoplado ao sistema de escape da panela, que indica temperatura em escala Celsius e a pressão em kg/cm³.

Foram colocados 500 ml de água no interior da panela, de forma a não cobrir a tela metálica apoiada no tripé. Quando era mais forte a chama usada para o aquecimento, eram necessários 1.000 ml de água, para que a água não se esgotasse.

Os sistemas de aferição eram colocados um de cada vez no interior da panela de pressão, os quais, juntamente com os dados colhidos da indicação do termomanômetro, dariam indicações das condições de temperatura e de pressão para a esterilização. Para tal propósito, foram usados: uma ampola de enxofre (fusão em 110°C); um indicador de temperatura e pressão (Propper Mfg Co. Inc.) que confere a coloração preta a um preparado, originalmente de cor marfim, surgindo a inscrição "OK" sempre que se atinge a 121°C e 15 libras de pressão; e um bioindicador "Merck", de esterilização em autoclave, que mostra quando seus esporos são inativos pelo instrumento esterilizante.

Testes de esterilização nos tempos de 15, 20 e 25 minutos — Somente foram usadas culturas de 72 horas, com abundante esporulação. O material era inicialmente repicado em Tarozzi e testado quanto à pureza.

Para melhor avaliar a eficiência do uso da panela de pressão comum para esterilização, procurou-se determinar o número aproximado de esporos contidos nas amostras. Para isso, toma-se, como comparação, as cepas de *C. oedematiens* e *B. subtilis*. Com amostra semelhante à suspensão de microrganismos usados como "inoculum", são feitas diluições divididas em duas porções equitativas: uma aquecida a 70°C, durante 20 minutos, e a outra não; em seguida, semeia-se o material separadamente, em condições adequadas ao crescimento.

Após sete dias de incubação, conta-se o número de colônias de cada amostra. Determina-se, aproximadamente, por comparação, o número de microrganismos contido nas amostras antes do processamento.

Dois mililitros das suspensões são colocados em frascos de 10 ml, previamente esterilizados em estufa (180°C durante duas horas), cujas tampas são vedadas com esparadrapo. Em seguida, os frascos são introduzidos na panela.

Para todos os testes, o procedimento é o mesmo: a panela é devidamente fechada e colocada na chama do bico de Bunsen, seguindo-se as fases mencionadas nos testes anteriores.

O tempo de exposição ao calor é marcado após o início da saída de vapor, pela válvula de escape. Para a primeira verificação, as culturas são expostas ao calor durante 15 minutos; para a segunda e terceira, durante 20 a 25 minutos, respectivamente.

A panela é esfriada naturalmente e as amostras colhidas do material contido em cada frasco são semeadas em meios de Tarozzi previamente regenerados. A incubação é feita a 37°C e as leituras executadas a partir de 48 horas, durante sete dias consecutivos.

Teste de esterilização com frascos hermeticamente vedados — A mesma série de experiências foi desenvolvida com a utilização de frascos com vedação metálica, tal como são encontrados no comércio. Nestes, a inoculação com suspensões de microrganismos era feita através do uso de seringas plásticas previamente esterilizadas.

Testes de esterilização de substratos sólidos impregnados com suspensão de esporos — Considerando a variação na razão do aquecimento de diferentes materiais, foram feitos experimentos utilizando, também, amostras de suspensão de esporos, embebendo terra e impregnando tiras de papel de filtro.

Para isso, são utilizadas tiras de papel de filtro tipo Whatman nº 33 e terra, introduzidas em tubos e esterilizados em autoclave (120°C durante 20 minutos).

As tiras de papel medem 10 cm de comprimento por 1,5 cm de largura, sendo impregnadas com 1 ml das suspensões de esporos concentrados ao dobro das então usadas. Cada duas gramas de terra são embebidas com 2 ml das suspensões de esporos. Depois de secas, as preparações são submetidas ao mesmo processamento de esterilização já descrito.

Resultados

Amostras semelhantes às utilizadas como inóculo de *C. oedematiens* e *B. subtilis* foram diluídas para a determinação do número provável de microrganismos. A suspensão de *C. oedematiens* foi diluída a 1:100.000 e dividida em duas porções: uma previamente aquecida a 70°C, durante 20 minutos e a outra não; em seguida semeado 0,10 ml separadamente, em condições adequadas ao crescimento. Após sete dias, foi feita a contagem de colônias.

A porção aquecida previamente apresentou em torno de 32×10^6 microrganismos a cada 2 ml de inóculo. Para a amostra não aquecida, o número de microrganismos foi em torno de 72×10^6 .

As suspensões de *B. subtilis* foram diluídas a 1:1.000.000, procedendo-se da mesma maneira que o anterior. Neste caso, o número provável de microrganismos após o aquecimento prévio foi de 37×10^7 , e de 64×10^7 , antes do aquecimento para cada 2 ml da amostra.

Amostras mantidas em meio líquido — A leitura dos resultados com as amostras colhidas após 15 minutos de exposição ao calor úmido sob pressão e, semeadas em meio Tarozzi, incubadas a 37°C durante 48 horas, demonstrou crescimento de *C. tetani*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. botulinum* e *B. subtilis*, evidenciando-se a resistência dos esporos ao tempo de exposição. A presença dos germes foi confirmada através de bacterioscopia.

A esterilização durante 20 minutos só foi eficaz em relação a *Bacillus subtilis*, que não cresceu até após 168 horas (7 dias) de incubação; os demais microrganismos desenvolveram-se normalmente em 48 horas. Com 25 minutos de exposição ao calor não houve crescimento de nenhum dos microrganismos, durante os sete dias de incubação. Isto indica que o tempo de 25 minutos foi suficiente para a destruição dos esporos das espécies testadas.

Amostras impregnadas em substrato — Os resultados obtidos com as amostras impregnando o papel de filtro e embebendo a terra mostraram que houve uma destruição dos cinco tipos de esporos testados após o aquecimento de 15 minutos nas mesmas condições experimentais já descritas.

Os testes foram sempre confirmados através de leituras da ampola de enxofre, do papel-controle de temperatura e pressão (Propper, Mfg. Co. Inc.) e do bioindicador "Merck" de esterilização.

Em todos os testes, os resultados foram francamente favoráveis em relação as condições ideais de esterilização.

Discussão

Os resultados permitem sugerir o uso de panela de pressão comum como alternativa para a autoclave, ao contrário da posição adotada por Miscol (7).

Ficou esclarecido que o tempo necessário para a inativação dos cinco tipos de germes esporulados é de 25 minutos, para uma completa esterilização. Os esporos de *B. subtilis* mostraram-se inviáveis com 20 minutos de exposição, enquanto que os de *C. tetani*, *C. septicum*, *C. oedematiens* e *C. botulinum* só foram destruídos com 25 minutos de exposição. Isto contraria as opiniões de Grahame (4) e de Sandoval & Vera (9), que recomendam 20 minutos como tempo de esterilização e Jürgensen (5),

que utilizou o mesmo tempo em testes bacteriológicos de canais radiculares.

Por outro lado os esporos, quando impregnando algumas substâncias sólidas, mostraram-se mais sensíveis, necessitando 15 minutos para sua destruição.

A quantidade de água no interior da panela, conforme Sandoval & Vera (9) e Kamiyama (6) seria 500 ml. Em nossos experimentos verificamos que, quando se usa a chama de bico de Bunsen, mais intensa, a quantidade

é insuficiente, esgotando-se completamente até o final da operação. Por esse motivo, propomos o uso de 1.000 ml de água para panela com capacidade de 4 litros, o que não interfere com o uso. Pelo contrário, essa quantidade evita a dessecação do material e o esgotamento da água colocada no interior da panela.

Concluindo, a panela de pressão comum funciona satisfatoriamente como instrumento de esterilização e o tempo suficiente para esterilização segura é de 25 minutos.

Referências Bibliográficas

1. BIER, O. — Bacteriologia e imunologia. 13^a ed., São Paulo, Melhoramentos, 1966.
2. BURNETT, G.W. & SCHERP, H.W. — Oral microbiology and infectious disease. Baltimore, Williams & Wilkins, 1975.
3. CABLE, M.N. — Simplified method of sterilisation. *Dent. Abstr.* (Chic) 7: 722, 1962.
4. GRAHAME, R. — Sterilisation of instruments and dressings in general practice. *Lancet*, I (7395):1109-1110, 1965.
5. JÜRGENSEN, C.A. — O teste bacteriológico do canal radicular no consultório dentário. *Fac. Nac. Odont. Brasil*, 7:77-87, 1954.
6. KAMIYAMA, Y. — Experiências sobre a utilidade de panela de pressão como autoclave. *Rev. Esc. En. Univ. S. Paulo*, 3, 1969.
7. MISCHOL, E. — Sterilisation with small autoclaves. *Dent. Abstr.* (Chic), 3:634-635, 1958.
8. NOLTE, W.A. — Oral Microbiology, St. Louis, 2^a ed., The C.V. Mosby Company, 1973.
9. SANDOVAL, A. & VERA, A.G. — Un nuevo aporte para la esterilización de urgencia. *Odont. Chile*, 18:33-37, 1969.
10. STAINER, R.Y.; DOUDOROFF, M. & ADELBURG, E.A. — Mundo dos Micróbios, 1^a ed., bras., S. Paulo, E.D., 1969.

Sensibilidade *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* à violeta de genciana*

Arlete Emily Cury, Paulo S. Minami & Dulcinéia Saes Parra

Resumo

Estudo da sensibilidade de 17 amostras de leveduras do gênero *Candida* à violeta de genciana, concluindo-se que 12 foram sensíveis ao quimioterápico, na concentração de 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, em meio sólido. Em meios líquidos, até a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, não ocorreu atividade inibidora. Passagens sucessivas, em concentrações cada vez maiores, em meios líquidos, seguidas de teste em meio sólido a 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, revelaram aumento no número de amostras resistentes à droga: o número inicial de amostras resistentes (cinco) passou para 13. Ocorreu, ainda, diminuição do período inicial de crescimento em meios com concentrações mais altas de violeta de genciana, após cultivo prévio das amostras, em concentrações menores da droga. Os resultados observados podem explicar o grande número de casos recidivantes de candidíase, tratados com violeta de genciana.

Summary

Sensitivity "in vitro" of several Candida spp to gentian violet

From 17 strains tested, 12 showed sensitivity to gentian violet at 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in solid agar medium. In liquid media with up to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentian violet there was no inhibitory activity. After successive transfers, through higher dye concentration, an increase in the number of resistant strains was observed: the initial resistant strains (five) were increased to 13. Strains previously grown in lower concentration of gentian violet showed a decrease in the initial growth rate by increasing the dye concentration. The data might explain the numerous cases of candidiasis relapse when treatment with gentian violet is employed.

Introdução

A violeta de genciana (cloreto de metilrosanilina) é um quimioterápico utilizado há longo tempo na terapêutica de candidíases da pele ou mucosas (3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12).

Em solução aquosa, recomenda-se em concentrações de 0,1 a 2% (3, 4, 5, 7, 10, 11), para uso tópico, e a 0,01% para instilação de cavidades fechadas (3).

Sob forma de gel (11) ou cremes (6, 8), é usada em candidíase vulvovaginal. Nestes casos, na concentração de 1%, quando comparada à antibióticoterapia, revelou baixa proporção de cura e alta percentagem de reincidência.

Por outro lado, atividade inibidora, "in vitro", foi verificada em concentrações que variam de 1×10^5 a 1×10^6 , aproximadamente (2, 9, 11).

No presente trabalho, procuramos primeiramente reestudar, "in vitro", o comportamento de espécies de *Candida* frente a diferentes concentrações de violeta

de genciana em meio líquido e em meio sólido. Em seguida, procuramos selecionar amostras que sobrevivessem a concentrações gradativamente maiores do quimioterápico.

Material e Métodos

Amostras — Foram estudadas 17 amostras de *Candida*, isoladas de material humano. As de *C. albicans*, de números 97, 99, 100 e 144, isoladas, respectivamente, de úlcera de pálpebra e escarro, foram provenientes da Faculdade de Medicina da USP, e a de nº 464, da The London School of Hygiene and Tropical Medicine, sob nº 3156. Outras amostras desta espécie (números 1335, 1336, 8224, 9024, 9226, 9230 e 9247) e as de *C. kruzei* (nímeros 1189 e 9060), *C. guilliermondii* (nímeros 1351 e 9431) e *C. tropicalis* (número 8357), foram isoladas de secreção vaginal, no Laboratório Clínico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

* Disciplina de Parasitologia e Micologia Clínicas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Caixa Postal 30.786, 01000, São Paulo SP.

Meio líquido — Caldo Sabouraud enriquecido (dextrose 21 g; peptona 10 g; extrato de levedura 1 g; água destilada 1000ml), ao qual foi adicionada violeta de genciana em concentrações finais de 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do meio, e distribuído em volumes de 5ml em tubos de ensaio de 16mm \times 160mm. O mesmo volume foi utilizado para os controles, sem adição de violeta de genciana.

Meio sólido — Agar-Sabouraud-dextrose (dextrose 20g; peptona 10g; agar 20g; água destilada 1000ml), com violeta de genciana a 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, distribuindo-se volumes de 20ml em placas de Petri de 20mm \times 100mm, procedendo-se da mesma maneira para o controle, sem violeta de genciana.

Suspensões das amostras — A partir de culturas com 24h de crescimento em agar-Sabouraud dextrose, à temperatura ambiente, foram preparadas suspensões em água destilada estéril, em concentração suficiente para fornecer 20% de transmitância (Coleman Junior 680nm, em tubos de 18 \times 150).

Na primeira etapa, foi semeado 0,3ml das suspensões de cada amostra, sobre meio sólido com violeta de genciana a 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ espalhando-se homogeneamente com alça de Drigalsky. Ao mesmo tempo, 0,2ml foi semeado em meio líquido, com diferentes concentrações da droga (25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Em ambos os casos, observações quanto ao crescimento foram realizadas, diariamente, até o sétimo dia de incubação a 37°C.

Em etapa posterior, amostras que apresentaram crescimento máximo, estável durante 24h, em concentrações mais baixas da droga no meio líquido, foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 5ml de água destilada estéril, transferindo-se 0,2ml para meios com concentrações sucessivamente maiores.

Para crescimento das amostras, em meio líquido, foi considerada a turvação produzida.

Comparando-se com os controles em meios sólido e líquido, utilizou-se os seguintes símbolos para expressar o crescimento das leveduras:

- = ausência de crescimento
- + = pequeno crescimento
- ++ = grande crescimento
- +++ = crescimento abundante

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão os resultados obtidos quando suspensões das amostras selvagens de *Candida* foram semeadas em meio sólido contendo 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de violeta de genciana. Na Tabela 2 estão os resultados quando as amostras selvagens foram semeadas em

Tabela 1

Comportamento das amostras selvagens de *Candida* em meio sólido com 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de violeta de genciana

Amostra nº	Meio sólido com violeta de genciana a 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$							Controle ^a
	1	2	3	4	5	6	7	
97 (C.a.)	-	-	-	-	+	+	+	+++
99 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
100 (C.a.)	-	-	-	-	+	+	+	+++
144 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
464 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
1189 (C.k.)	-	+	+	+	+	+	+	+++
1335 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
1336 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
1351 (C.g.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
8224 (C.a.)	-	-	-	-	+	+	+	+++
8357 (C.t.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
9024 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
9060 (C.k.)	-	+	+	+	+	+	+	+++
9226 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
9230 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
9247 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++
9431 (C.g.)	-	-	-	-	-	-	-	+++

Obs.: (C.a.) = *C. albicans*

(C.k.) = *C. kruzei*

(C.g.) = *C. guilliermondii*

(C.t.) = *C. tropicalis*

a = meio sólido, sem violeta de genciana

meios líquidos, respectivamente com: 25, 50 ou 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ da droga.

Nas Tabelas 3 e 4 estão os resultados obtidos com suspensões das amostras provenientes de crescimento anterior em 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, quando semeadas em meios líquidos contendo, respectivamente, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de violeta de genciana.

Na Tabela 5, estão os resultados obtidos com 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, após crescimento anterior, sucessivamente, em 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Nas Tabelas de 6 a 8 estão os resultados das amostras com crescimento anterior, em concentrações mais baixas, em meio líquido e depois de semeadas em meio sólido, com violeta de genciana a 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A Tabela 6 expressa os resultados das amostras provenientes de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; na Tabela 7, sucessivamente de 25 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e, na Tabela 8, sucessivamente de 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Devido à utilização da violeta de genciana em altas concentrações, como medicamento (3-6, 8, 10-12), procurou-se estudar, inicialmente, a sensibilidade "in vitro", de amostras selvagens, de *Candida*, usando-se o meio sólido contendo 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do quimioterápico.

Verifica-se, pela Tabela 1, que o crescimento de algumas amostras iniciou-se já em 48h (nº 1189 e 9060)

Tabela 2

Comportamento das amostras selvagens de *Candida* em meios líquidos, com diferentes concentrações de violeta de genciana

Amostra nº	Meio líquido com violeta de genciana												Controle ^a
	25 µg/ml			50 µg/ml			100 µg/ml						
	Tempo de incubação (dias) a 37°C			1 ... 7	1	2	3	4 ... 7	1	2	3	4 ... 7	1
97 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
99 (C.a.)	++	++	-	+	++	++	++	-	-	+	++	++	+++
100 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
144 (C.a.)	++	++	+	++	++	++	++	-	+	++	++	++	+++
464 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+++
1189 (C.k.)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
1335 (C.a.)	++	+	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	+++
1336 (C.a.)	++	++	-	+	++	++	++	-	+	+	++	++	+++
1351 (C.g.)	++	++	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	+++
8224 (C.a.)	++	++	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	+++
8357 (C.t.)	++	++	-	+	++	++	++	-	-	+	++	++	+++
9024 (C.a.)	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+++
9060 (C.k.)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
9226 (C.a.)	++	++	+	++	++	++	++	-	-	+	++	++	+++
9230 (C.a.)	++	++	-	-	+	++	++	-	-	+	++	++	+++
9247 (C.a.)	++	++	-	-	+	++	++	-	-	+	++	++	+++
9431 (C.g.)	++	++	+	++	++	++	++	-	+	+	++	++	+++

a = meio líquido sem violeta de genciana.

Tabela 3

Comportamento das amostras de *Candida*, provenientes de meios líquidos com 25 µg/ml de violeta de genciana, frente a 50 µg/ml do quimioterápico

Amostra nº	Meio líquido com 50 µg/ml de violeta de genciana ^a			Controle ^b	
	Tempo de incubação (dias) a 37°C				
	1	2	3		
97 (C.a.)	++	++		+++	
99 (C.a.)	+	++	++	+++	
100 (C.a.)	++	++		+++	
144 (C.a.)	++	++		+++	
464 (C.a.)	++	++		+++	
1189 (C.k.)	++	++		+++	
1335 (C.a.)	++	++		+++	
1336 (C.a.)	+	++	++	+++	
1351 (C.g.)	++	++		+++	
8224 (C.a.)	++	++		+++	
8357 (C.t.)	+	++	++	+++	
9024 (C.a.)	+	++	++	+++	
9060 (C.k.)	++	++		+++	
9226 (C.a.)	++	++		+++	
9230 (C.a.)	+	++	++	+++	
9247 (C.a.)	+	++	++	+++	
9431 (C.g.)	++	++		+++	

a = amostras mantidas até duas leituras de grande crescimento (++) , após o que foram passadas para concentrações maiores de violeta de genciana

b = meio líquido, sem violeta de genciana

Tabela 4

Comportamento das amostras de *Candida*, provenientes de meios com 25 µg/ml de violeta de genciana, frente a 100 µg/ml do quimioterápico

Amostra nº	Meio líquido com 100 µg/ml de violeta de genciana ^a					Controle ^b	
	Tempo de incubação (dias) a 37°C						
	1	2	3	4	5		
97 (C.a.)	++	++				+++	
99 (C.a.)	+	++	++			+++	
100 (C.a.)	++	++				+++	
144 (C.a.)	+	++	++			+++	
464 (C.a.)	+	++	++			+++	
1189 (C.k.)	++	++				+++	
1335 (C.a.)	+	+	++	++		+++	
1336 (C.a.)	+	+	++	++		+++	
1351 (C.g.)	+	+	++	++		+++	
8224 (C.a.)	+	+	++	++		+++	
8357 (C.t.)	+	+	++	++		+++	
9024 (C.a.)	+	+	++	++		+++	
9060 (C.k.)	+	+	++	++		+++	
9226 (C.a.)	+	+	++	++		+++	
9230 (C.a.)	-	+	++	++		+++	
9247 (C.a.)	+	+	+	++	++	+++	
9431 (C.g.)	+	+	++	++		+++	

a = amostras mantidas até duas leituras de grande crescimento (++) , após o que foram passadas para concentrações maiores de violeta de genciana.

b = meio líquido, sem violeta de genciana

Tabela 5

Comportamento das amostras de *Candida*, provenientes de crescimentos sucessivos em meios com 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de violeta de genciana, frente a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do quimioterápico, em meio líquido

Amostra n°	Meio líquido com 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de violeta de genciana ^a			Controle ^b	
	Tempo de incubação (dias) a 37°C				
	1	2	3		
97 (C.a.)	++	++		+++	
99 (C.a.)	++	++		+++	
100 (C.a.)	++	++		+++	
144 (C.a.)	++	++		+++	
464 (C.a.)	++	++		+++	
1189 (C.k.)	++	++		+++	
1335 (C.a.)	++	++		+++	
1336 (C.a.)	++	++		+++	
1351 (C.g.)	++	++		+++	
8224 (C.a.)	++	++		+++	
8357 (C.t.)	+	++	++	+++	
9024 (C.a.)	++	++		+++	
9060 (C.k.)	++	++		+++	
9226 (C.a.)	++	++		+++	
9230 (C.a.)	+	++	++	+++	
9247 (C.a.)	++	++		+++	
9431 (C.g.)	++	++		+++	

a = amostras mantidas até duas leituras de grande crescimento (++)
após o que foram passadas para concentrações maiores de violeta de genciana

b = meio líquido, sem violeta de genciana

Tabela 6

Comportamento das amostras de *Candida*, provenientes de meios líquidos com 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de violeta de genciana, frente a concentração de 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do quimioterápico em meio sólido

Amostra n°	Meio sólido com violeta de genciana a 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$							Controle ^a	
	Tempo de incubação (dias) a 37°C								
	1	2	3	4	5	6	7		
97 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
99 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
100 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
144 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
464 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
1189 (C.k.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
1335 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
1336 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
1351 (C.g.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
8224 (C.a.)	+	+	+	+	++	++	++	+++	
8357 (C.t.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9024 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9060 (C.k.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
9226 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9230 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9247 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9431 (C.g.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	

a = meio sólido, sem violeta de genciana

Tabela 7

Comportamento das amostras de *Candida*, provenientes de crescimentos sucessivos em meios líquidos com 25 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de violeta de genciana, frente a concentração de 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do quimioterápico em meio sólido

Amostra n°	Meio sólido com violeta de genciana a 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$							Controle ^a	
	Tempo de incubação (dias) a 37°C								
	1	2	3	4	5	6	7		
97 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
99 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
100 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
144 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
464 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
1189 (C.k.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
1335 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
1336 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
1351 (C.g.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
8224 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
8357 (C.t.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9024 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9060 (C.k.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9226 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9230 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9247 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9431 (C.g.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	

a = meio sólido, sem violeta de genciana

Tabela 8

Comportamento das amostras de *Candida*, provenientes de crescimentos sucessivos em meios líquidos com 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de violeta de genciana, frente a concentração de 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do quimioterápico em meio sólido

Amostra n°	Meio sólido com violeta de genciana a 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$							Controle ^a	
	Tempo de incubação (dias) a 37°C								
	1	2	3	4	5	6	7		
97 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
99 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
100 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
144 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
464 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
1189 (C.k.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
1335 (C.a.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
1336 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
1351 (C.g.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
8224 (C.a.)	+	+	+	+	+	+	+	+++	
8357 (C.t.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9024 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9060 (C.k.)	++	++	++	++	++	++	++	+++	
9226 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9230 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9247 (C.a.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	
9431 (C.g.)	-	-	-	-	-	-	-	+++	

a = meio sólido, sem violeta de genciana

e o de outras, somente após 5 dias de incubação (amostras nº 97, 100 e 8224). Este fato mostra a alta resistência de algumas amostras de *Candida*, em meios sólidos com altas concentrações (10.000 μ g/ml) de violeta de genciana.

Observa-se, pela Tabela 2, que o crescimento em concentrações de 25, 50 e até 100 μ g/ml ocorreu em períodos de incubação menores que três dias. Embora o crescimento nos meios sólidos ou líquidos, contendo violeta de genciana, tenha sido relativamente menor e mais demorado que aquele em meios controle, as observações realizadas não concordam com os achados "in vitro" de outros autores (2, 9, 11). Verifica-se que algumas amostras são quase insensíveis à droga, em discordância do observado por estes autores, utilizando concentrações muito inferiores de violeta de genciana.

Quanto às espécies, três amostras selvagens de *C. albicans* (nº 97, 100 e 8224) e duas de *C. kruzei* (nº 1189 e 9060) cresceram em 10.000 μ g/ml do quimioterápico, enquanto as outras foram inibidas nesta concentração (Tabela 1).

Em meios líquidos, cinco das 17 amostras selvagens de *Candida* tiveram o crescimento retardado, em concentração de violeta de genciana a 50 μ g/ml, crescendo em períodos de dois ou três dias. Estas mesmas amostras e mais quatro outras apresentaram o mesmo comportamento, na concentração de 100 μ g/ml (Tabela 2).

A passagem prévia das amostras que apresentaram crescimento lento, em concentrações do quimioterápico de até 50 μ g/ml, permitiu crescimento mais precoce das mesmas, quando semeadas em concentrações de até 100 μ g/ml (Tabelas 2 a 4).

A semeadura em meio sólido contendo 10.000 μ g/ml de violeta de genciana, após passagem em concentrações de 100 μ g/ml (Tabela 6) ou crescentes de 25 e 100 μ g/ml (Tabela 7) ou 25, 50 e 100 μ g/ml, sucessivamente (Tabela 8), permite verificar que o menor número de culturas viáveis, oito no primeiro caso, foi aumentado, nos dois casos subsequentes, para 10 e 13, respectivamente. O contato, em concentrações graduativas cada vez maiores, é fator importante na seleção de amostras, cada vez menos sensíveis à violeta de genciana.

Convém assinalar que as amostras de *C. guillermondii* (nº 9431 e 1351), *C. tropicalis* (nº 8357) e só uma de *C. albicans* (nº 9247) mantiveram a sensibilidade inicial à violeta de genciana (Tabelas 1 e 8).

Comparando-se os resultados das provas de sensibilidade das amostras selvagens, em meio sólido com

10.000 μ g/ml do quimioterápico, com as provas após passagens em concentrações sucessivamente crescentes, verifica-se o grande aumento no número de amostras resistentes — de cinco para 13, em 17 amostras estudadas.

A análise destes dados permite pressupor a existência de linhagens de *Candida* resistentes à violeta de genciana, em condições naturais.

Tais linhagens poderiam ser selecionadas por tratamentos prolongados, principalmente, pelo uso de pequenas doses do quimioterápico, ou naqueles que, por quaisquer motivos, permitissem que houvesse decréscimo na concentração da droga que efetivamente pudesse entrar em contato com o microrganismo.

Referências Bibliográficas

1. FARLEY, D.L. — The use of gentian violet as a restrainer in the isolation of the pathogenic molds. *Arch. Dermat. & Syph.*, 2:459-465, 1920.
2. GOMEZ-VEGA, P. — Mycostatic studies on certain *Monilia* and related fungi. *Arch. Dermat. & Syph.*, 32:49-52, 1935.
3. GOODMAN, L. & GILMÁN, A. — Antisépticos, Germicidas, Fungicidas y Parasiticidas. In *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México. Editorial Hispano-American. 1945, p. 919-1006.
4. HILDICK-SMITH, G.H.; BLANK, H. & SARKANY, I. — Candidiasis. In *Fungus Diseases and Their Treatment*. Boston. Little, Brown, 1964. p. 129-206.
5. LACAZ, C.S. — Micoses superficiais. In *Manual de Micología Médica*. 4^a ed., São Paulo, Sarvier, 1967. p. 79-141.
6. PEARL, G.; GUTTMACHER, A.F. & JAKUBOWICZ, H. — Vaginal candidiasis. New method of diagnosis and treatment. *Obst. & Gynec.*, 5:640-648, 1955.
7. PEREIRA, C.C.A. — Micoses superficiais. In PRADO, F.C.; RAMOS, J. & VALLE, J.R., (Ed.) — Atualização Terapêutica. 10^a ed., São Paulo, Artes Médicas, 1975. p. 553-556.
8. PICKHARDT, W.L. & BREEN, J.L. — Identification of and therapy for vaginal candidiasis. *Am. J. Obst. & Gynec.*, 74:42-45, 1957.
9. SIMON, C. & TABRIZI, S.A. — Über die in vitro-Empfindlichkeit von *Candida albicans* gegen Nystatin, Amphotericin B und Gentianaviolett. *Med. Welt*, 37:2164-2168, 1967.
10. SUTTON, R.L., Jr. — Gentian violet as therapeutic agent. *J. Amer. Med. Assoc.*, 110:1733-1738, 1938.
11. WATERS, E.G. & WAGER, H.P. — Vaginal mycosis in Pregnancy: An improved gentian violet treatment. *Am. J. Obst. & Gynec.*, 60:885-887, 1950.
12. WILSON, W. & PLUNKETT, O.A. — Candidiasis. In *The fungous diseases of man*. Berkeley, University of California Press, 1965. p. 165-178.

**Caracterizacion bioquímica y significado clínico de
una especie recientemente descrita dentro de
la familia enterobacteriaceas: *Citrobacter diversus****

Gustavo Prieto, Jeannette Vargas, Hilda Bracho & Mary de Mestroni**

Resumen

Características bioquímicas de 29 cepas de *Citrobacter diversus* aisladas entre los años 1972-1975 de material clínico humano diferente al de las heces. Los miembros de esta especie no producen H₂S en el medio de TSI después de 24 horas de incubación, ni crecen en el medio de KCN. Producen indol a partir del triptofano, decarboxilan la ornitina y fermentan el adonitol. El malonato fué utilizado por el 93% de las cepas. Estas características en conjunto le diferencian de otras enterobacterias. La mayoría de las cepas producen reacciones positivas tardías entre 48 y 72 horas en los medios de lactosa, sucrosa y salicin. La metodología que conduce a su identificación en el laboratorio clínico es descrita. *Citrobacter diversus* es aislado a partir de una variedad de especímenes clínicos. Se aísle como único agente de un hemocultivo en un niño que padecía de meningitis a *Haemophilus influenzae*, en tres infecciones de herida operatoria y en un paciente con proceso infeccioso crónico de vías urinarias a *Escherichia coli*. En los casos restantes se le consigue acompañando a otras bacterias algunas de las cuales son reconocidas como patógenos primarios y otras como oportunistas.

Summary

Biochemical characterization and clinical signification of a recently described species in enterobacteriaceae: Citrobacter diversus

The biochemical characteristics of 29 strains of *Citrobacter diversus*, isolated between 1972-1975 from specimens of human origin different to the stools were determined. Members of this species did not produce hydrogen sulfide in TSI medium after 24 hours of incubation and failed to grow in KCN medium. They produced indole and ornithine decarboxylase and fermented adonitol. Malonate was utilized by 93% of the strains. These biochemical characteristics permit to differentiate this species from other Enterobacteriaceae. Most of the strains show delayed reactions after 48-72 hours in lactose, sucrose and salicin. *Citrobacter diversus* was isolated from a variety of clinical specimens. It was isolated as a pure culture from blood culture taken from a child who was suffering *Haemophilus influenzae* meningitis. Three cases were recovered from wound infections and another was cultured from a patient with chronic urinary infection due to *Escherichia coli*. In all the other cases the organism was found with other bacteria which are known as pathogens and other as opportunists.

Introducción

Durante la última década los bacilos Gram-negativos aeróbicos han desplazado, especialmente en el medio hospitalario, al *Staphylococcus aureus* de las casuísticas etiológicas como agentes productores de procesos infecciosos en el humano (2). Miembros de este grupo de bacterias a los cuales tradicionalmente se les reconocía ausencia o reducido poder de patogenicidad, aparecen en la actualidad frecuentemente implicados en tales procesos. Esta variación etiológica ha motivado que el laboratorio de bacteriología disponga de una metodología que permita la caracterización de los aislamientos clínicos, conocimiento éste

que puede prestar ayuda para emprender una terapia adecuada y para conocer la epidemiología de las infecciones nosocomiales.

En la familia Enterobacteriaceae la taxonomía del género *Citrobacter* ha sido revisada recientemente por Ewing & Davis (1) quienes propusieron en base a precedentes históricos prioridad para la designación "*Citrobacter diversus*", a una segunda especie dentro de este género. Varios habían sido los nombres propuestos en el pasado para designar esta especie, habiéndose conocido como: *Citrobacter intermedium* (5), *Citrobacter koseri* (3), *Padlewskia* (4) y *Levinea malo-nática* (6).

Citrobacter diversus constituye un grupo de bacte-

* Cátedra de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia y Hospital Universitario de Maracaibo. Venezuela.

** Hospital Coromoto. Maracaibo. Venezuela.

rias que comparten las características generales del género *Citrobacter* dentro de la tribu *Salmonellae*, y que puede diferenciarse de la otra especie del género, *Citrobacter freundii*, en base a la fermentación del adonitol, producción de indol a partir de triptófano y a la ausencia de crecimiento en el medio de KCN.

En el presente trabajo se estudian las características bioquímicas y el posible significado clínico de *Citrobacter diversus*.

Materiales y Métodos

Se analizan las características bioquímicas de 29 cepas de *Citrobacter diversus* aisladas entre los años 1972-1975, de material clínico humano diferente al de las heces. El aislamiento inicial se realiza en medios de agar sangre, agar chocolate y principalmente medios diferenciales como el Mac Conkey.

Para la caracterización bioquímica se sigue la metodología descrita por Ewing & Davis (1). Los aislamientos primarios y las pruebas bioquímicas fueron realizadas a temperatura de 35°-37°C.

La historia de los pacientes de donde estas cepas fueron aisladas fueron revisadas y los aislamientos agrupados como infección primaria, infección secundaria, o de significado indeterminado basándose en criterios ya establecidos.

Resultados

En el aislamiento inicial el 97% de las cepas muestran la característica de colonias no fermentadoras de la lactosa en el medio de Mac Conkey. Como puede apreciarse en la tabla 1 en el medio de TSI el 66%

producen reacciones de bisel alcalino, taco ácido, gas positivo, H_2S negativo mientras que el 34% restante muestran reacciones de bisel y taco ácido con producción de gas. Ninguna de las cepas produce H_2S en este medio después de 24 horas de incubación.

En la tabla 2 se puede observar la diferenciación de *Citrobacter diversus* con otras enterobacterias, utilizando una bioquímica primaria constituida por indol, citrato, motilidad y ornitina, cuando las cepas en el TSI producen el primer tipo de las reacciones descritas.

La tabla 3 muestra, utilizando las mismas reacciones bioquímicas, la diferenciación de estas cepas cuando en el TSI se produce el segundo tipo de las reacciones ya mencionadas. El 100% de las cepas estudiadas producen a las 24 horas positividad en las pruebas de indol, motilidad, citrato y ornitina. La urea fué hidrolizada por el 55% de las cepas, produciendo en ésta cambios únicamente a nivel del bisel.

Para la clasificación definitiva fué necesario utilizar las pruebas bioquímicas que muestran las tablas 4 y 5,

Tabla 1

Reacciones en el TSI

Reacción en el TSI	Nº de cepas	%
Bisel : Alcalino		
Taco : Ácido	19	66
Gas : Positivo		
H_2S : Negativo		
Bisel : Ácido		
Taco : Ácido	10	34
Gas : Positivo		
H_2S : Negativo		

Tabla 2

Cuadros diferenciales

Bisel : Alc.

TSI Taco: AG O A

H_2S : -

	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Shigella</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter hafniae</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Proteus morganii</i>	<i>Proteus rettgeri</i>	<i>Providencia</i>
Indol	+	v	- o +	+	-	-	-	+ o -	+	+	+
Urea	v ^t	v ^t	-	-	-	v ^t	-	v ^t	+	+	-
Motilidad	+	+	-	+ o -	+	+	+	+ o -	+	+	+
Citrato	+	+	-	-	-	+	v	v	-	+	+
Ornิตina	+	v	v	v	+	+	+	-	+	-	-

ALG = Alcalino

A = Ácido

G = Gas

V = Variable

t = Tardío

Tabla 3

Cuadros diferenciales

Biesel : A
TSI Taco: AG o A
 H_2S : —

	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i> ¹	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Serratia</i> ²	<i>Serratia rubidea</i>
Indol	+	v	+	-	-	- o +	-	-
Urea	v ^t	v ^t	-	+	+ o -	v ^t	v ^t	v ^t
Motilidad	+	+	+ o ~	-	+	+ o -	+	+ o -
Citrato	+	+	-	+	+	v	+	+ o (+)
Ornitina	+	v	v	-	+	-	+	+ o -

A = Ácido

G = Gas

V = Variable

^t = Tardío1 = *E. cloacae*; *E. aerogenes*2 = *S. marcescens*; *S. liquefasciens*

Tabla 4

Caracterización bioquímica y significado clínico de una especie recientemente descrita dentro de la familia enterobacteriaceae:

Citrobacter diversus

Prueba bioquímica	<i>C. freundii</i>		<i>C. diversus</i>	
	Reaccion	% + (+)	Reaccion	% + (+)
H S en TSI	-	0	-	0
Indol	+ o -	50	+	100
K.C.N.	+	97	-	0
Ornitina decarboxilasa	+ o -	58	+	100
Adonitol	-	-	+	100

+ = 90% o más de positividad a las 24 horas

(+) = reacciones positivas después de 24 horas

de las cuales son de gran importancia: la inhibición del crecimiento en el medio de KCN y la fermentación del adonitol (0% y 100% de positividad respectivamente en nuestras cepas), éstas permiten diferenciar *Citrobacter diversus* de la variante H_2S negativa de *Citrobacter freundii*.

En los medios de lactosa, sucrosa y salicin producen reacciones positivas débiles a las 24 horas 52, 31 y 10% respectivamente, reacciones positivas tardías entre 48—72 horas son observadas en el 41, 7 y 83% de las cepas para los mismos medios mientras que los carbohidratos restantes fueron fermentados a las 24 horas o permanecieron negativos después de 72 horas de incubación. El 7% de las cepas dan la reacción dehidrolasa de la arginina positiva a las 24 horas, 24% de ellas necesito 72 horas para dar esta reacción positiva y el 69% restante permaneció negativo para esta reacción.

Tabla 5

Caracterización bioquímica y significado clínico de una especie recientemente descrita dentro de la familia enterobacteriaceae:

Citrobacter diversus

Reacciones bioquímicas

Prueba bioquímica	Reaccion	% +	(+)
Rojo de metilo	+	100	
Voges proskauer	-	0	
K.C.N.	-	0	
Gelatina (25°C)	-	0	
Lisina decarboxilasa	-	0	
Arginina dehidrolasa	- o (+)	7	(24)
Fenilalanina-deaminasa	-	0	
Malonato	+	93	
Gas de glucosa	+	100	
Lactosa	+ o (+)	52	(41)
Sucrosa	- o +	31	(7)
Manitol	+	100	
Dulcitol	- o +	38	
Salicin	(+) o +	10	(83)
Adonitol	+	100	
Inositol	-	0	
Sorbitol	+	100	
Arabinosa	+	100	
Raffinosa	-	0	
Rhamnosa	+	100	
Maltosa	+	100	
Xilosa	+	100	
Og glucosa	F	100	
Oxidasa	-	0	
Nitratos	+	100	
O.N.P.G.	+	97	

+ = 90% o más de positividad a las 24 horas

(+) = reacciones positivas después de las 24 horas

F = fermentativo

ONPG = ortho-nitrophenyl-beta-galactopyranoside

OF = oxidativo fermentativo

La tabla 6 muestra un estudio comparativo entre las reacciones obtenidas por Ewing & Davis (1) en 1972 y las logradas en este estudio.

La tabla 7 ilustra las fuentes de aislamientos de las cepas estudiadas. Exceptuando los aislamientos producidos a partir de un hemocultivo, tres heridas operatorias y un urocultivo, en los restantes se pro-

duce el aislamiento de *Citrobacter diversus* acompañado de otras bacterias tales como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratum*, *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwofii*, o frecuentemente de otros miembros de la familia enterobacteriaceae principalmente *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*.

Tabla 6

Caracterización bioquímica y significado clínico de una especie recientemente descrita dentro de la familia enterobacteriaceae: *Citrobacter diversus*

Reacciones bioquímicas

	Ewing & Davis (1) 113 cepas			Prieto & col. 29 cepas		
	Reacción	% +	(+)	Reacción	% +	(+)
Urea	v	78	(11)	- o +	31	(24)
Indol	+	100		+	100	
Citrato	+	99		+	100	
Motilidad	+	93		+	100	
Rojo de metilo	+	100		+	100	
Voges proskauer	-	0		-	0	
K.C.N.	-	0		-	0	
Gelatina (25°C)	-	0		-	0	
Lisina decarboxilasa	-	0		-	0	
Arginina dehidrolasa	+ o (+)	60	(38)	- o (+)	7	(24)
Ornítina decarboxilasa	+	100		+	100	
Fenilalanina deaminasa	-	0		-	0	
Malonato	+ o -	88.5		+	93	
Gas de glucosa	+	100		+	100	
Lactosa	v	33	(51)	+ o (+)	52	(41)
Sucrosa	- o +	17		- o +	31	(7)
Manitol	+	100		+	100	
Dulcitol	+ o -	53		- o +	38	
Salicin	(+) o +	10	(81)	(+) o +	10	(83)
Adonitol	+	100		+	100	
Inositol	-	0		-	0	
Sorbitol	+	97		+	100	
Arabinosa	+	99		+	100	
Raffinosa	-	0		-	0	
Rhamnosa	+	99		+	100	
Maltosa	+	100		+	100	
Xilosa	+	100		+	100	
OF glucosa	F	100		+	100	
Oxidasa	-	0		-	0	
Nitratos	+	100		+	100	
O.N.P.G.	+	100		+	97	

+ = 90% de positividad a las 24 horas

(+) = reacciones positivas después de las 24 horas

F = fermentativo

ONPG = ortho-nitrophenyl-beta-galactopyranoside

OF = oxidativo fermentativo

Tabla 7

Caracterización bioquímica y significado clínico de una especie recientemente descrita dentro de la familia enterobacteriaceae:

Citrobacter diversus

Sitios de aislamiento

Sitios de aislamiento	Nº de cepas
Secreción herida operatoria	10
Esputo	4
Orina*	4
Secreción ulcerada varicosa	3
Hemocultivo	1
Exudado faringeo	1
Secreción traqueal	2
Secreción vaginal	1
Desconocido	3
Total	29

* Urocultivos con contejos superiores a 10^5 bacterias por ml. de orina.

Discusión

En términos generales los resultados de este estudio coinciden con los obtenidos por Ewing & Davis (1). Consideramos igualmente que la diferenciación de *Citrobacter diversus* con la variante H₂S negativo de *Citrobacter freundii* que representa el 16% de los aislamientos de esa especie y de los cuales aproximadamente el 50% son indol positivo, es importante especialmente cuando su comportamiento ante algunos agentes antimicrobianos es también diferente. En este sentido la inhibición del crecimiento en el medio de KCN (0% y 97% de positividad para *Citrobacter diversus* y *Citrobacter freundii* respectivamente) y la fer-

mentación del adonitol (0% en *Citrobacter freundii* y 100% en *Citrobacter diversus*) son pruebas bioquímicas que permiten establecer la diferenciación.

Citrobacter diversus sólo fué aislado como único agente en las siguientes condiciones: de un hemocultivo en un niño de 4 meses que padecía de meningitis a *Haemophilus influenzae*, en tres infecciones de herida operatoria, dos de las cuales eran de pacientes que se encontraban en malas condiciones generales y en un paciente con proceso infeccioso crónico de vías urinarias a *Escherichia coli*. En los casos restantes su papel pudiera catalogarse de secundario o indeterminado ya que es aislado acompañando a otras bacterias, algunas de las cuales son reconocidas como patógenos primarios y otras como oportunistas.

Referencias bibliográficas

1. EWING, W. & DAVIS, B. — Biochemical Characterization of *Citrobacter diversus* (Burk) Werkman and Gillen and Desinatón of the Neotype Strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22:12-18, 1972.
2. FINLAND, M. — Chanching ecology of bacterial infections as related to antibacterial therapy. *J. Infec. Dis.*, 121:419-431, 1970.
3. FREDRICSEN, W. — *Citrobacter koseri* (n. sp.). A new species within the genus *Citrobacter*, with a comment on the taxonomic position of *Citrobacter intermedium*. (Werkman and Gillen). *Fac. Sci. Univ. J. E. Purkyne Brno*, 47:89-94, 1970.
4. MACIEREWICZ, M. — A proposal of a new group (genus) of Enterobacteriaceae. *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 18 : 333-339, 1966.
5. SLIFKIN, M. & ENGWALL, C. — The clinical significance of *Citrobacter intermedium* Amer. *J. Clin. Pathol.*, 52:351-353, 1968.
6. YOUNG, V.; KENTON, D.; HOBBS, B. & MOODY, M. — Levine, a new genus of the family Enterobacteriaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 21:58-63, 1971.

Effect of pH, temperature and time of stirring on the solubility of trypsin used in cell cultures

Edda de Rizzo*

Summary

The trypsin solution is one of the most commonly used solutions in cell culture for the disaggregation of cultured cells and tissues. Investigating the solubility of trypsin powder at different pH levels it was found that its maximum proteolytic activity can already be detected five minutes after the suspension of the powder in buffer or distilled water. Thus, the prolonged stirring to which trypsin is submitted for its solubilization when 0.2% trypsin solutions at pH 7.4 are prepared, does not increase that activity, stimulates the autolysis of the enzyme which starts as soon as pH 5.0 is reached, and eventually, allows microorganisms present as natural contaminants of trypsin powder (bacteria, virus, mycoplasma, molds) to synthesize toxins that often cause a cytotoxic effect on the cell cultures preventing their utilization in virology. The preparation of trypsin solutions as concentrates (10% or 50 X) at low pH (4.3), and their storage at -20°C are recommended because by preserving the proteolytic activity of trypsin, the solutions can be kept stable for longer periods of time.

Resumo

Efeito do pH, temperatura e tempo de agitação sobre a solubilidade da tripsina usada em cultura celular

A solução de tripsina é uma das mais usadas em cultura celular, tanto na dispersão de células para serem cultivadas "in vitro", como na de tecidos, para a obtenção de culturas celulares primárias. O estudo da solubilidade da tripsina em pó, em diferentes pH, demonstrou que toda a sua atividade proteolítica já pode ser detectada cinco minutos após a suspensão do pó em tampão ou em água destilada. Assim, os longos períodos de agitação a que a tripsina é indevidamente submetida para alcançar maior solubilização quando soluções a 0,2% de tripsina, pH 7,4, são preparadas: a) não aumentam sua atividade proteolítica; b) fazem com que a autólise da enzima (que geralmente se inicia quando pH 5,0 é alcançado) seja estimulada; e c) eventualmente permitem que os microrganismos presentes como contaminantes naturais da tripsina em pó (bactérias, vírus, micoplasmas, fungos, etc) se multipliquem ou sintetizem toxinas que, freqüentemente, causam efeito citotóxico nas culturas celulares, impedindo sua utilização em virologia. A preparação de soluções de tripsina em pH baixo (4,3), sob a forma de concentrados (10% ou 50 X), assim como sua estocagem a -20°C, são recomendadas por que, preservando a atividade proteolítica da tripsina, proporcionam maior estabilidade às soluções, as quais podem, então, ser estocadas por mais tempo do que as soluções diluídas.

Introduction

Trypsin, an enzyme belonging to the endopeptidase group, is synthesized by pancreas in the form of an active precursor called trypsinogen and can be completely and specifically inhibited by natural, high molecular weight compounds of the protein class (1,4).

The use of trypsin in the digestion of the substrate in which a cell culture was grown was first described by Rous & Jones (5). Later, Moscona (3) described the disaggregation of embryo tissues by treatment with trypsin and found out that cell suspensions could be kept by subsequent cultivation. Other enzymes, such as elastase, pancreatin, papain and collagenase

can also disaggregate tissues but trypsin is, by far, the most used.

Crude trypsin, specially swine trypsin, used in tissue culture to disperse cultured cells, is commercially available as a yellowish, fine powder and often contains adventitious agents, i.e., bacteria, viruses, molds, yeast and mycoplasma. It is prepared in phosphate buffer, pH 7.4, and stirred for variable periods of time, usually at room temperature or at 37°C, before sterilization by filtration.

In the present study, the effects of pH, temperature and time of stirring on the solubility of trypsin powder used in cell culture techniques, were investigated.

* Tissue Culture and Control Laboratory, Virology Department, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.
Fellow of the CNPq (Contract n° 1111.5040/76).

Materials and Methods

Trypsin — Trypsin powder (1:300) from Nutritional Biochemical Co., Control lot n° 1190, was chosen for the study and used as 0.2% in trypsin diluent (phosphate buffer), pH 7.4, and as 10% in distilled water.

Skim milk — To 288 g of powdered skim milk (Molico, Nestlé) mixed with 2.500ml of distilled water, 12ml of 0.5% phenol red solution were added and the pH was adjusted with 1N NaOH solution until the preparation became salmon-pink. The volume was then made up to 3.000ml and the skim milk was autoclaved at 110°C for 15 minutes.

For use the original solution was diluted to 1:4 in Tris buffer, pH 7.6.

Proteolytic titer — The proteolytic titer of the routinely used 0.2% trypsin solution was initially investigated at 4 and 37°C. For this, 0.6g of trypsin powder were added to 300ml of trypsin diluent, pH 7.4, and the pH adjusted to 7.4 by the addition of 1N NaOH. The volume was divided in two 150ml samples which were kept at 4 and 37°C, respectively. At pre-determined times (5, 10, 60, 120 and 180 min) three milliliter aliquots were collected, clarified thru 25mm AP 20 pads (Millipore Co.), serially diluted (two fold) up to 1:1024 in cold Tris buffer, pH 7.6, and mixed with equal volumes of 1:4 skim milk. After shaking, the mixtures were incubated at 37°C and then kept for 10 min at room temperature. The titer scored was the highest dilution of the sample which cleared the mixture.

The same test was carried out with 10% trypsin solution (50 x concentrated) in water, adjusted to pH 2.0, 4.3, 7.4 and 11.0 by the addition of 1N HCl or 1N NaOH in proper amounts, with pH monitoring. Samples were collected at 5, 20 and 60 min of stirring, treated as previously, and tested for the proteolytic titer, which represents the proteolytic activity shown by the solubilized trypsin.

Protein — The protein contents of 10% trypsin solutions tested at pH 2.0, 4.3 and 11.0 was determined by the Lowry method (2).

Bacterial growth — 0.1 ml amounts of the 10% trypsin solutions were collected at 5, 20 and 60 min of stirring, spread on blood agar plates, and incubated at 37°C. The growth was recorded after 24 hours and the contamination present was identified.

Results

Table 1 summarizes results obtained by carrying out tests on the solubility of the 0.2% trypsin solution, routinely used in cell culture. It was observed that at 4°C all the proteolytic activity of the trypsin (proteolytic titer equal to 1:64) was detected in the first

sample tested (5 min) and that it remained unchanged even after 180 min of stirring. At 37°C, however, the starting proteolytic titer dropped 2 fold at both 10 and 60 min, 4 fold at 120, and 8 fold at 180 min.

The final pH scored was slightly increased at 37°C.

Table 1

Proteolytic titer of the 0.2% trypsin solution, pH 7.4, stirred at 4 and 37°C

Temperature of the test (°C)	0.2 % trypsin at pH		Time of agitation (min)	Proteolytic titer
	initial	final		
4	7.4	7.4	5	1: 64
			10	1: 64
			60	1: 64
			120	1: 64
			180	1: 64
37	7.4	7.47	5	1: 64
			10	1: 32
			60	1: 32
			120	1: 16
			180	1: 8

Table 2 shows the results of preliminary tests on solubility of trypsin performed at room temperature (22°C) with 10% trypsin stock-solution in water, at pH 2.0, 4.3 and 11.0. At pH 4.3 all the proteolytic activity could be detected in the 5 min sample, and the proteolytic titer (1:2560) did not vary during the whole test (60 min). At pH 2.0 a two fold decrease of the starting activity occurred after 20 min of agitation; at pH 11.0 a two fold decrease occurred in the first five minutes and the titer remained the same for the 60 min duration of the test.

Table 2

Proteolytic titer and protein contents of 10% trypsin stock-solution at pH 2.0, 4.3 and 11.0, stirred at 22°C.

10% trypsin at pH	Time of agitation (min)	Proteolytic titer	Protein contents (mg/ml)
2.0	5	1: 2560	43.7
	20	1: 1280	43.8
	60	1: 1280	50.4
4.3	5	1: 2560	46.5
	20	1: 2560	53.1
	60	1: 2560	56.2
11.0	5	1: 1280	43.1
	20	1: 1280	44.6
	60	1: 1280	45.7

In the same table it can also be observed that although a better solubility of the powder, represented by a greater protein contents, could be attained with longer stirring (60 min) in all three pH tested, a decrease of the proteolytic activity was also detected at the same time. The stability of the proteolytic titer which represents the proteolytic activity, was better at pH 4.3 than at the other two studied pH.

Bacillus cereus was the only natural bacterial contaminant detected in the powder of the brand of trypsin under test and also in other brands commercially available. Table 3 presents data obtained on the growth of *B. cereus* in blood agar plates inoculated with 0.1ml samples collected at 5,20 and 60 min of agitation. The control for the bacterial growth test was represented by one sample of the solution under test which was sterilized by filtration thru a 0.22 µm membrane. The

temperatures (4, 22 and 37°C). The aim of the test was to show the wide variation of the proteolytic activity of the stock-solution samples collected at 5,20 and 60 minutes according to the period of agitation, and to investigate which pH preserved best the proteolytic activity of the trypsin solution used in cell culture.

The proteolytic activity represented by the proteolytic titer was more stable in the experiments carried out at 4°C. At this temperature the titer of the samples maintained at pH 2.0, 4.3 and 7.4 was not affected. The same did not occur at pH 11.0. At room temperature and at 37°C the best stability was observed at pH 4.3 and 7.4, but not at pH 2.0 and 11.0.

Table 4

Variation of the proteolytic titer according to pH, time of agitation and temperature

pH of the test	10% trypsin solution	Time of agitation (min)	Bacterial growth
4.3	Filtered thru 0.22 µm (Control)	5	0
		20	0
		60	0
	Not filtered	5	++
		20	++
		60	+++
2.0	Not filtered	5	++
		20	++
		60	+++
	Not filtered	5	++
		20	++
		60	+++
11.0	Not filtered	5	++
		20	++
		60	+++

0 : absence of growth

+: growth in 25% of the area of blood agar plates inoculated

++: growth in 50% of the area of blood agar plates inoculated

+++: growth in 75% of the area of blood agar plates inoculated

+++: growth in 100% of the area of blood agar plates inoculated

results indicated that with longer periods of stirring (60 min) the *B. cereus* originally present could eventually multiply and be detected later in greater number in the blood agar plates inoculated with the collected samples.

Data obtained previously led to the experiment whose results are shown in Table 4, carried out with 10% trypsin stock-solutions adjusted to pH 2.0, 4.3, 7.4 and 11.0, and held under stirring at three different

10% trypsin at pH	Time of agitation (min)	Proteolytic titer tested at temperature of		
		4°C	22°C	37°C
2.0	5	1: 2560	1: 2560	1: 1280
	20	1: 2560	1: 2560	1: 1280
	60	1: 2560	1: 2560	1: 1280
4.3	5	1: 2560	1: 2560	1: 2560
	20	1: 2560	1: 2560	1: 2560
	60	1: 2560	1: 2560	1: 2560
7.4	5	1: 2560	1: 2560	1: 2560
	20	1: 2560	1: 2560	1: 2560
	60	1: 2560	1: 2560	1: 2560
11.0	5	1: 2560	1: 1280	1: 1280
	20	1: 1280	1: 1280	1: 1280
	60	1: 1280	1: 1280	1: 640

Discussion

The trypsin routinely used in tissue culture is prepared either as 10% (50 X concentrated) stock solution which is stored frozen at -20°C for months until dilution and use, or as 0.2% solution, kept at 2 to 8°C for some weeks.

During the preparation and before sterilization by filtration both solutions show a cloudy look given by the trypsin powder. The fact leads to the erroneous idea that long periods of stirring, usually held at room temperature or at 37°C, are necessary to attain higher solubility and, consequently, the maximum proteolytic activity of trypsin.

Tests carried out in this investigation demonstrated that the proteolytic titer of 10% trypsin stock-solutions under test was best preserved at 4°C, when their pH

ranged from 2.0 to 7.4. All the proteolytic activity being detected after five minutes of agitation demonstrated that stirrings longer than 5 to 10 min, performed at 22 or 37°C, with solutions at high pH, cause a decrease of the activity of trypsin and consequently, of its capacity to detach cells from the walls of the culture flasks and from each other. Turned less effective the trypsin solution will act slower on the cell monolayers when cultures are replicated, or in the disaggregation of tissues during trypsinization for the obtention of primary cell cultures.

Although higher protein contents could be reached with longer stirring, they did not mean an improved solubilization of trypsin but were consequence of the solubilization of other components present in the commercial, powdered trypsin tested, which are responsible for the cloudy appearance of the solution.

Regarding to the presence of natural bacterial contaminants in the trypsin powder, the elimination of long periods of stirring at temperatures higher than 10°C, prevents the autolysis of the enzyme (which starts at pH above 5.0) and may very likely prevent the prepared trypsin from presenting greater amounts of toxins synthesized by the contaminants. This fact should be considered a very important precaution in the preparation of trypsin, culture media, calf serum and other solutions used in cell culture as toxins, once present in the preparations, cannot be eliminated because they

pass thru the filtering membranes (0.22 μm) used in the processes of sterilization. Thus, trypsin solutions should be prepared as concentrates (10% or 50 X) at pH 4.3, shortly stirred, centrifuged at 4°C for the elimination of the unnecessary components present in the trypsin powder, rapidly sterilized by filtration, and stored at -20°C until the dilution for use, when the pH would be adjusted to 7.4 by the addition of sterile 7.5% NaHCO₃ solution. Concentrated acidic trypsin solutions, kept frozen at -20°C, remain stable longer than the ones prepared at 0.2%, which are usually stored at 4°C for limited periods of time.

References

1. DESNUELLE, P. — Trypsin, in *The Enzymes*, vol. 4, 2nd ed., Academic Press, N. York, 1960.
2. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
3. MOSCONA, A. — Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.*, 3 : 535-541, 1952.
4. NORTHRUP, J. H.; KUNITZ, M. & HERRIOT, R. — Crystalline enzymes 2nd ed., Columbia University Press, N. York, 1948.
5. ROUS, P. & JONES, F. S. — A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues and for the plating out of individual cells. *J. exp. Med.*, 23 : 549-556, 1916.

Comparação entre hidrólise ácida e enzimática de amido para determinação de açúcares redutores totais*

Willibaldo Schmidell & Marcus Vinicius Fernandes**

Summary

Comparison between acid and enzymatic hydrolysis of starch for determination of total reducing sugars

Acid and enzymatic hydrolysis were employed for determination of total reducing sugars in cassava flour, and during the culture of *Aspergillus niger* NRRL 337 in a medium containing cassava flour as the main carbon source. Enzymatic hydrolysis gives better results because it is not affected by the cellular material, which might not happen when employing acid hydrolysis. Determinations in the cassava flour give similar results from both methods.

Resumo

Hidrólise ácida e enzimática foram empregadas para a determinação de açúcares redutores totais na farinha de mandioca, e durante o cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 337 em meio contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. Concluiu-se que para a determinação de açúcares redutores totais durante o cultivo acima citado, a hidrólise enzimática apresenta melhores resultados, por não ser influenciada pela presença do material celular. Nas determinações em farinha de mandioca o resultado obtido por qualquer dos métodos é equivalente.

Introdução

Ao se estudar a cinética do crescimento de um microrganismo, uma das determinações mais importantes consiste na dosagem adequada do substrato limitante a cada instante do cultivo. Em particular, quando se estuda o crescimento de microrganismos em meios de cultura, que têm como fonte de carbono o amido, é frequente acompanhar-se o consumo desse substrato através de dosagens de açúcares redutores totais (ART), ou seja, a soma dos açúcares redutores existentes e os açúcares redutores provenientes de uma hidrólise a que uma amostra do mosto em fermentação é submetido.

No caso do cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 337, em meio de cultura, à base de farinha de mandioca (assunto que vem sendo pesquisado em nossos laboratórios), a determinação de ART vem sendo efetuada por hidrólise ácida (1, 6, 9), de acordo com o método de Sachsse (2), sendo os açúcares redutores resultantes dosados pelo método de Semogyi (8). Em virtude da impossibilidade de separação do material celular, por se trabalhar com meio de cultura que contém sólidos em suspensão, o método de Sachsse é aplicado sobre a totalidade de amostra do mosto em fermentação, sendo, lícito pois, esperar interferência, em virtude da presença das célu-

las em suspensão, em quantidades variáveis ao longo do tempo.

O escopo deste trabalho consiste na comparação de resultados quando se efetua a dosagem de açúcares redutores totais, utilizando hidrólise ácida, e quando se substitui esta hidrólise pela enzimática.

A utilização de hidrólise enzimática, em métodos analíticos, para determinação de amido, tem sido citada por alguns autores (4, 7). Tem sido ressaltado também que tal hidrólise não é total (7), motivo pelo qual existe a necessidade da determinação de um fator empírico, entre a quantidade de amido e de açúcares redutores gerados após a hidrólise enzimática (empregando-se soluções padrão de amido). Na verdade, mesmo na hidrólise ácida, indicada pelo método de Sachsse (2), existe, na literatura, a proposta do fator empírico 0,925, evidenciando uma conversão incompleta, pois seria de se esperar o fator estequiométrico 0,9.

No caso da hidrólise enzimática, fomos forçados a introduzir algumas alterações no método proposto na literatura (4, 7), a fim de adequá-lo às nossas condições de utilização, motivo pelo qual procuramos descrevê-lo com maiores detalhes.

* Financiado em parte pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

** Departamento de Engenharia Química — Escola Politécnica da USP, Caixa Postal 8174,01000 São Paulo, SP.

Materiais e Métodos

Solução tampão citrato (pH = 4,8) — A partir de solução de ácido cítrico 0,05M, ajusta-se o pH a 4,8 com NaOH 2N.

Solução de glucoamilase — Diluir cem vezes, em tampão citrato, o concentrado de glucoamilase (Diazyme L-100, Miles Laboratories Inc.), que possui a atividade de 9000 UI (unidades internacionais) por ml.

Desta forma, teremos uma solução com atividade de 90 UI/ml. Uma unidade internacional de glucoamilase é definida como a quantidade de glucoamilase necessária para liberar 1 μmol de glicose em um minuto, num grande excesso de amido (4).

Dosagem de açúcares redutores totais por hidrólise enzimática — Em balão volumétrico, coloca-se o volume adequado de mosto em fermentação (meio de cultura e células) e a solução de glucoamilase (90 UI/ml), de forma tal que se tenha uma relação enzima-substrato de 18 UI por 1mg de amido. Em paralelo, realiza-se um "branco" no qual a solução problema seja substituída por água destilada. Deixa-se em termostato a 45°C por 30 minutos. Logo após, adiciona-se uma gota de fenolftaleína e neutraliza-se com NaOH 2N, com a finalidade de inativar as enzimas. Executa-se a inativação também no "branco". Dilui-se convenientemente, filtra-se em papel filtro CS&S589(2) e dosam-se os açúcares redutores pelo método de Somogyi (8), sendo os resultados expressos como glicose.

O fator empírico, mencionado na introdução, para este processo, foi determinado, encontrando-se o valor 0,977, ou seja:

$$Am = 0,977 AR \quad (r = 0,9986)$$

Onde: Am = concentração de amido (g/l)

AR = concentração de açúcares redutores (g/l)
r = coeficiente de correlação da regressão linear

Tal fator foi obtido no intervalo de concentrações (de amido solúvel) de 0,199 g/l até 50,52 g/l (sendo também perfeitamente utilizável quando se examina, mais atentamente, concentrações relativamente baixas, ou seja, entre 0,199 g/l e 1,99 g/l). Esta faixa é importante, no que se refere a determinações de consumo de substrato nos instantes finais de um cultivo descontínuo.

Dosagem de açúcares redutores totais por hidrólise ácida — Utiliza-se o método de Sachsse (2), que consiste em colocar 25ml do mosto em fermentação em balão de fundo chato, completa-se a 103,3ml com água destilada, adiciona-se 6,7ml de HCl ($d = 1,18$) e deixa-se em ebulição, com condensador de refluxo, por 2,5 horas. Neutraliza-se com NaOH 6N, dilui-se convenientemente, filtra-se e dosam-se os açúcares redutores pelo método de Somogyi (8), sendo os resultados expressos como glicose.

O fator empírico, para este processo, foi determinado, encontrando-se o valor 0,946, ou seja:

$$Am = 0,946 AR \quad (r = 0,9986)$$

Tal fator foi obtido no mesmo intervalo de concentrações de amido solúvel, anteriormente mencionado.

Ensaio de cultivo de *A. niger* — No trabalho efetuado em tanque de fermentação utilizou-se meio de cultura com a seguinte composição: farinha de mandioca 25,0g; extrato de levedura 0,10g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,50g; $(NH_4)_2SO_4$ 5,0g; $Na_2 \cdot 12H_2O$ 3,78; KH_2PO_4 3,5g; água potável até 1.000 ml. A farinha de mandioca era previamente gelatinizada, em 500 ml de água potável. O meio de cultura era esterilizado em autoclave a 120°C, durante 30 minutos.

O ensaio de cultivo de *A. niger* foi levado a efeito em um fermentador Microferm MF-114 (New Brunswick Sc. Co.), de 14 litros de capacidade total, contendo 9 litros de meio de cultura e 1 litro de inóculo. Condições do cultivo: temperatura = 35°C; pH = 3,0; vazão de ar = 12 litros/min; freqüência de agitação = 500 rpm.

O inóculo foi preparado em incubador rotativo, utilizando-se frascos erlenmeyer de 1000ml, com 200ml de meio líquido, com a composição acima indicada. A técnica seguida para o preparo do inóculo foi a descrita por Venosa & col. (9), fixando-se as seguintes condições de cultivo: temperatura, 35°C; pH inicial, 5,0; freqüência de agitação, 200 rpm.

Determinação de açúcares redutores — O mosto era submetido a filtração, dosando-se, no filtrado, a concentração de açúcares redutores, pelo método de Somogyi (8), sendo os resultados expressos como glicose.

Determinação da concentração de proteína celular — Efetuada pelo método de Lowry (5), segundo procedimento descrito anteriormente (6).

Resultados

A aplicação dos métodos de dosagem de açúcares redutores totais, via hidrólise ácida ou via hidrólise enzimática, em suspensões de farinha de mandioca, é apresentada na Tabela 1. Pode-se afirmar que qualquer que seja o método de dosagem escolhido, os resultados obtidos não apresentam diferenças sensíveis, desde que sejam levados em conta os fatores empíricos mencionados. Isto pode ser efetuado calculando-se os açúcares redutores totais através das seguintes expressões:

$$\text{hidrólise ácida: } ART = \frac{0,946 (AR_m - AR_i)}{0,9} + AR_i$$

hidrólise enzimática:

$$ART = \frac{0,977 (AR_m - AR_i - ARE)}{0,9} + AR_i$$

Tabela 1

Resultados das dosagens de açúcares redutores totais por hidrólise ácida e enzimática em suspensões de farinha de mandioca*

Concentração de farinha de mandioca	Concentração de ART** (hidrólise ácida)				Concentração de ART** (hidrólise enzimática)			
	1	2	média	1	2	3	4	média
40,56	34,41	36,56	35,49	36,18	34,67	37,41	35,47	35,93
30,42	25,46	25,46	25,46	26,89	26,04	25,55	26,23	26,18
20,28	17,99	17,60	17,80	17,29	17,25	17,23	18,01	17,45

* todos os valores estão expressos em g/l.

** ART = açúcares redutores totais.

Discussão

onde: AR_i = açúcares redutores existentes na amostra antes da hidrólise

ART = açúcares redutores totais

AR_m = açúcares redutores determinados após a hidrólise

AR_E = açúcares redutores provenientes do preparado enzimático, determinados através do "branco"

A Figura 1 mostra os resultados das determinações de açúcares redutores totais pelos dois métodos durante o cultivo de *A. niger*, em meio à base de farinha de mandioca. Como observação imediata, pode-se verificar que as determinações por hidrólise ácida apresentam resultados sempre maiores em relação aos dosados por hidrólise enzimática.

Em virtude de, durante o cultivo de *A. niger*, as determinações de açúcares redutores totais por hidrólise ácida apresentarem resultados sempre maiores que os obtidos por hidrólise enzimática, somos levados a concluir que a dosagem por hidrólise ácida é influenciada pela presença do material celular, tendo em vista o fato de efetuármos as dosagens no total do material em fermentação. A hipótese de que a diferença, entre os resultados dos dois métodos, seja provocada pela farinha de mandioca deve ser descartada, já que as dosagens nesse material apresentam resultados equivalentes, independentemente do método utilizado.

Os resultados obtidos por hidrólise enzimática são coerentes, uma vez que, ao final do cultivo de *A. niger*,

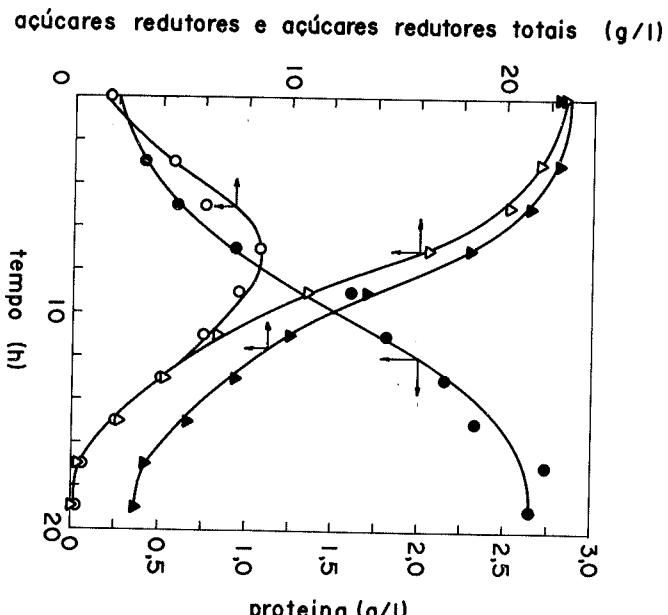


Fig. 1: Proteína celular (●), açúcares redutores (○) e açúcares redutores totais determinados via hidrólise ácida (▲) e enzimática (Δ) durante o cultivo de *A. niger* NRRL 337 em fermentador a 35°C e pH = 3,0.

a concentração de açúcares redutores coincide com a de açúcares redutores totais, indicando a hidrólise completa do material amiláceo. Pelos motivos acima, pode-se afirmar que a determinação de açúcares redutores totais, utilizando hidrólise enzimática, tem maiores possibilidades de representar o fenômeno de consumo do substrato, durante o cultivo de *A. niger* em meio à base de farinha de mandioca.

Outros fatores favoráveis à escolha da hidrólise enzimática seriam o fato de se utilizar um procedimento específico, no que diz respeito à hidrólise e, ainda, ser este método mais simples e rápido que o de hidrólise ácida, exigindo tempo de conversão cinco vezes menor.

Referências Bibliográficas

1. BORZANI, W.; BONOMI, A.M.F.L.J.; VENOSA, C.M.S.; LESER, E.W.; MARTINS, V.M.N.C. & SCHMIDELL, W. — Cultivo de microrganismos em meios contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. II. Modelo cinético para o cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 337 em frascos agitados. *Rev. Bras. Tec.*, 6:125-132, 1975.
2. BROWNE, C.A. & ZERBAN, F.A. — Physical and chemical methods of sugar analysis. 3^a ed. New York, John Wiley & Sons, 1948.
3. LEME, R.A.S. — Curso de Estatística, 3^a ed. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico S/A, 1967.
4. LIBRY, R.A. — Direct starch analysis using DMSO solubilization and glucoamylase. *Cereal Chemistry*, 47:273-281, 1970.
5. LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
6. SCHMIDELL, W. & FERNANDES, M.V. — The measurement of cellular protein content as a method for determining mold concentration. *J. Ferm. Technol.*, 54:225-228, 1976.
7. SHETTY, R.M. & LINEBACK, D.R. — Determining the degree of starch gelatinization. *Cereal Chemistry*, 51:364-375, 1974.
8. SOMOGYI, M. — Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195:19-23, 1952.
9. VENOSA, C.M.S.; LESER, E.W.; MARTINS, V.M.N.C. & SCHMIDELL, W. — Cultivo de microrganismos em meios contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. I. Influência de condições experimentais no cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 337 em frascos agitados. *Rev. Bras. Tec.*, 6:117-124, 1975.



