

**COMPORTAMENTO HEMOLÍTICO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO
STREPTOCOCCUS ROSENBACH, 1884 EM MEIO DE CULTURA
PRODUZIDO COM SANGUE DE TARTARUGA DE ÁGUA DOCE
TRACHEMYS ADIUTRIX VANZOLINI, 1995.**

Rafael Tagori de M.C.Martins¹
Valério Monteiro Neto²
Larissa Barreto³
Israel Viegas Moreira⁴

RESUMO

Este trabalho apresenta dados sobre o comportamento hemolítico de bactérias do gênero *Streptococcus*, causadoras de Pneumonia e da Síndrome do Choque Tóxico, em meios de cultura fabricado com sangue de tartaruga de água doce *Trachemys adiutrix*. Esta tartaruga tem sido estudada por sua endemicidade no Estado do Maranhão, resistência a ambientes desérticos e por apresentar anomalias congênitas com causas ainda indeterminadas. Nossos resultados mostraram diferenças na coloração do meio fabricado com sangue de tartaruga em oposição ao meio normal no qual se utiliza sangue de carneiro. Diferenças também foram observadas quanto ao tempo de crescimento das colônias bacterianas. Quanto à atividade hemolítica, nenhuma diferença foi constatada sugerindo que as hemolisinas bacterianas atuam com a mesma intensidade no sangue de mamíferos e de tartarugas.

Palavras-chave: tartarugas, bactérias, Streptococcus, Pneumonia.

ABSTRACT

Hemolytic behavior of *Streptococcus* bacterium in culture mean made with freshwater turtle blood *Trachemys adiutrix* Vanzolini, 1995

This work presents data about the hemolytic behavior of *Streptococcus* bacterium to cause diseases such as Pneumonia and Toxic Shock Syndrome, in culture mean made with freshwater turtle blood *Trachemys adiutrix* species. This turtle has been studied by its endemicity in Maranhão state, resistance to the desert environments and by presenting congenital anomalies with unknown causes. Our results showed differences in coloration of the mean made with turtle blood to the contrary to the normal mean where to use sheep blood. Also, differences were observed as to the growth time bacterium colonies. For the hemolytic activity no difference was observed what suggest that the bacteriotoxins to act with the same intensity in mammal and turtle bloods.

Key-words: turtles, bacteria, Streptococcus, Pneumonia

INTRODUÇÃO

Os meios de cultura são definidos como a associação equilibrada de agentes químicos (nutrientes, pH, etc.) e físicos (temperatura, viscosidade, atmosfera, etc) que permitem o cultivo de microorganismos fora de seu "habitat" natural. Tendo os microorganismos habitats tão variados (solo, águas, organismo humano) é muito provável que tenham exigências físicas e nutritivas muito diferentes. Meios de cultura podem

ser classificados, entre outras características, como meios seletivos. Este tipo de meio permite dominância absoluta e crescimento acelerado do microorganismo que se procura isolar.

Segundo Oplustil *et al* (2004), o meio de cultura ágar-sangue é um meio seletivo sólido que permite o crescimento da maioria das bactérias gram-positivas e gram-negativas. Ainda de acordo com estes autores, permite também verificar a atividade hemolítica de alguns microorganismos bacterianos como é o caso de

¹ Graduando do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão – UFMA. rtagori@yahoo.com.br

^{2,4} Departamento de Patologia/Laboratório de Microbiologia – UFMA.

³ Departamento de Oceanografia e Limnologia/ Laboratório de Hidrobiologia – UFMA

bactérias do gênero *Streptococcus*. Tal gênero engloba, os cocos gram-positivos de maior importância em medicina humana e animal, por serem agentes etiológicos de patologias conhecidas e extensamente estudadas como é o caso da pneumonia, causado por *Streptococcus pneumoniae*, e da Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócico, que tem por agente causador *Streptococcus pyogenes*.

Pneumonia está associada a doenças do trato respiratório superior. Para esta patologia, existem inúmeras etiologias, no entanto a mais comum é a causada por *S. pneumoniae*, presente na flora normal do trato respiratório de répteis. A bactéria *S. pyogenes* tornou-se importante nestes últimos anos em virtude de sua patogenicidade para humanos, embora em animais e, especificamente em tartarugas, ainda não existem referências sobre isso.

Trachemys adiutrix (Vanzolini, 1995) é uma espécie semi-aquática e endêmica do Estado do Maranhão, que habita preferencialmente águas paradas, podendo, durante a estação chuvosa, se deslocar por longas distâncias. Os animais, em ambiente natural, são encontrados andando sobre dunas, em área de capinzal e dentro de lagoas eutróficas e oligotróficas, e com vegetação abundante (Barreto *et al.*, em preparo).

Esta tartaruga, popularmente conhecida como capininga, tem sido estudada por sua endemicidade, resistência em ambientes desérticos e também, por estar apresentando anomalias congênitas (Figura 1) com causas ainda indeterminadas (Martins *et al.*, 2003).

Claramente, de acordo com Ricklefs (1996), a conservação da biodiversidade global dá resultados

mais satisfatórios dirigindo-se os esforços para áreas de endemismo. Ainda segundo este autor, um alto valor econômico pode ser atribuído a espécies individuais ou endêmicas por que elas atraem o ecoturismo para uma determinada localidade. A espécie *T. adiutrix* ocorre em áreas com grande potencial turístico e seu estudo completo, correto manejo e conservação contribuem para a economia local através do turismo, além da possibilidade da exploração, como recurso natural renovável, por parte das indústrias farmacêutica e de cosméticos. Foi demonstrado por Martins *et al.*, (2003) que seu plasma coagula em presença de *Staphylococcus aureus* à temperatura ambiente, mas ainda não existem dados disponíveis na literatura científica sobre o comportamento de bactérias em qualquer meio de cultura em que seu sangue seja usado como base.

Com base no exposto acima, este trabalho tem por objetivo comparar o comportamento hemolítico de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*, em meio de cultura produzido com sangue de tartaruga de água-doce.

MATERIALE MÉTODOS

Para coleta de amostra, nas tartarugas, o local da punção sanguínea foi lavado e escovado com sabão de coco e água corrente por cinco minutos. O animal foi imerso totalmente em álcool iodado a 2% por cinco minutos a uma temperatura de, aproximadamente, 5°C para que entrasse em estágio letárgico. Foi aplicado álcool a 70% por cerca de um minuto para remoção do excesso de iodo no local da



Figura 1. Agenesia do membro superior direito

incisão. A traqueotomia foi feita na região inferior do pescoço e, com o auxílio de um funil de vidro estéril, o sangue foi transferido para um erlenmeyer contendo pérolas de vidro para que acontecesse a desfibrinação.

Para o preparo do meio de cultura ágar-sangue com sangue de tartaruga, foram transferidos aproximadamente 50 microlitros (5% do total coletado) de sangue desfibrinado para uma placa de Petri estéril e, em seguida, adicionado 10 ml da base de ágar-sangue à temperatura aproximada de 50°C, homogeneizando-se com movimentos circulares e deixando-se resfriar a temperatura ambiente.

O meio de cultura ágar-sangue com sangue de carneiro foi preparado segundo Koneman *et al* (1999) adicionando-se 5% de sangue desfibrinado a 10 ml de base de ágar-sangue estéril, a temperatura aproximada de 50°C, e distribuída em placa de petri estéril para que resfriasse a temperatura ambiente.

Terminada a confecção dos respectivos meios, foram semeadas nas placas, colônias de *Streptococcus pneumoniae* e *S. pyogenes*, que foram incubadas em jarra de anaerobiose com 5 a 10% de CO₂ em estufa bacteriológica a 36°C por 24 h conforme Koneman *et al* (1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram usadas concentrações sanguíneas da ordem de 5% para confecção dos meios de cultura por que, de acordo com Koneman *et al* (1999), concentrações de sangue menores de 5% produzem reações hemolíticas difíceis de distinguir. Diferenças foram observadas quanto à coloração final das placas com os meios. Placas que continham meio de cultura confeccionado a partir de sangue de tartaruga apresentaram cor mais clara, quando comparadas às placas que tinham como base o sangue de carneiro. Possivelmente, isto se explica pelo fato conhecido de hemácias de répteis serem nucleadas, com núcleos em posição central nas células. Pritchard e Trebbau (1984) afirmam que glóbulos vermelhos de peixes, anfíbios, répteis e aves são nucleados, biconvexos e em geral elípticos.

Moura *et al* (1999) corrobora esta informação quando mostra que eritrócitos de répteis crocodilianos da espécie *Caiman crocodilus yacaré* (Daudin, 1802) apresentam forma elíptica, e núcleo, basófilo, de cromatina condensada, ocupando posição central da célula. Para *T. adiutrix* ainda não existem dados confirmatórios sobre a morfologia dos

eritrócitos, mas por se tratar de um réptil, é muito provável que a presença de um núcleo centralizado diminua a quantidade de hemoglobina dissolvida no citoplasma celular, o que, possivelmente, confere cores mais claras aos meios em questão, quando comparados, com as placas que contém como base sangue de carneiro.

De acordo com Murray *et al* (2000), as necessidades nutricionais de bactérias do gênero *Streptococcus* são complexas, exigindo o uso de meio de cultura enriquecido com sangue ou com soro para seu isolamento. Ainda segundo estes autores o crescimento de *Streptococcus pyogenes* é ótimo em meios enriquecidos de ágar-sangue.

Streptococcus podem produzir em meio ágar-sangue de carneiro 04 tipos de hemólise (Koneman *et al*, 1999). Nossos testes mostram que em meio de cultura produzido com sangue de tartaruga observam-se apenas dois padrões de hemólise denominadas hemólises total e parcial. Koneman *et al* (1999) diz que a correta análise dos padrões de hemólise fornece elementos de importância para a identificação de bactérias patogênicas de interesse médico.

Foi observado, também, que os padrões hemolíticos foram iguais nas placas de cultura, não importando de que espécie provinha o sangue. Isto sugere que as Pnuemolisinas fabricadas por *S. pneumoniae* e as Estreptolisinas produzidas por *S. pyogenes* atuam com a mesma intensidade tanto nas hemácias de mamíferos como nas de quelônios. É sabido que estas hemolisinas têm efeito biológico de lise de eritrócitos e plaquetas e que, também, têm efeitos letais sobre uma variedade de tipos celulares (Koneman *et al*, 1999).

Observou-se, também, que a quantidade de sangue de tartaruga usado para o fabrico das placas contendo o referido meio foi bem pequena, aproximadamente cinco gotas. Os padrões de hemólise, entretanto, puderam ser observados de forma clara o que demonstra que o meio de cultura feito com sangue de tartaruga pode ser bem mais econômico (em se tratando de quantidades sanguíneas) que os meios tradicionais.

Para meios de cultura fabricados com sangue de mamíferos, a literatura mostra que o tempo médio de florescimento, à temperatura de 38°C, é aproximadamente 24 horas. (Figura 2) Foi observado, que o florescimento das colônias bacterianas em meio de cultura fabricado com sangue de tartaruga, ocorre em cerca de quatro horas quando as placas

são mantidas à temperatura ambiente (cerca de 25°C), e em seis horas quando mantidas à temperatura de 38°C em estufa bacteriológica. (Figura 3). Nossos resultados sugerem que o meio de cultura fabricado a partir do sangue de tartaruga possui algum fator diferencial e estimulador de crescimento, ainda não identificado, para os microorganismos em questão.

De acordo com Martins (2002) o gênero *Streptococcus* faz parte da microbiota normal, embora muitos deles sejam responsáveis por uma variedade de manifestações clínicas sendo considerados importantes agentes infecciosos tanto para o homem quanto para animais.

Trabulsi (2002) informa que o gênero *Streptococcus* contém um grande número de espécies, algumas sendo reconhecidamente patogênicas como *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*. Segundo Martins (2002), as infecções mais comuns causadas por *S. pyogenes*, em humanos, são faringoamidalites, piodermites e eripsela. *S.pneumoniae* é a principal causa da pneumonia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KONEMAM, EK; ALLEN, SD; JANDA, WM; SCRECKENBERGE, PC, WINN Jr, WC 1997. Color Atlas and textbook of. Diagnostic Microbiology. 5a Ed. Lippincott.

MARTINS, L.T. 2002. Streptococcus e Enterococcus p 157-170
In: Microbiologia 3ª edição. Trabulsi, L.R., Ed. Atheneu, Sp.

MARTINS, R.T. BARRETO, L. & PEREIRA-MARTINS, S.R. 2003 Observação de anomalias congênitas em tartarugas de água doce *Trachemys adiutrix* (Vanzolini, 1995) em ambiente natural. Bol. Lab. Hidrobiol, (16): 75-76 p 157-170.

MOURA, W.L.; MATSUSHIMA, E.R; OLIVEIRA, L.W; EGAMI, M.I. Morphological and cytochemical observations of blood cells of *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (*Reptilia, Crocodylia*). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. Vol.36 n.1 São Paulo 1999.

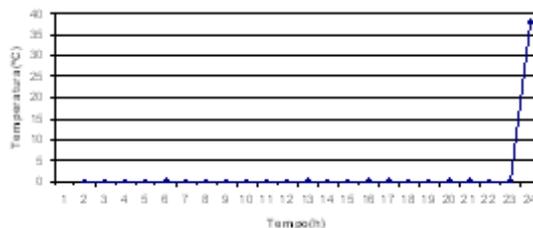


Figura 2. Florescimento das colônias bacterianas em meio de cultura fabricado com sangue de mamífero.

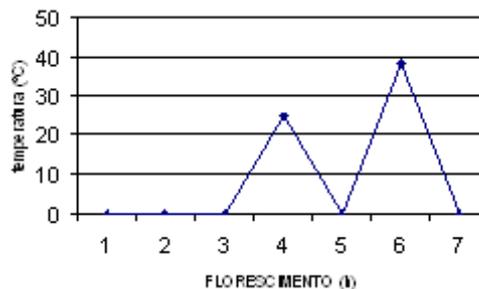


Figura 3. Florescimento das colônias bacterianas em meio de cultura fabricado com sangue de tartaruga.

MURRAY, P.R.; ROSENAL K.S., KOBAYASHI, G.S., PFALLER, M.A. 2000. Microbiologia Médica. 3ª ed. Guanabara-Koogan, RJ.

OPLUSTIL, C.P., ZOCCOLI C.M., NINA R.T. 2004 Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 2ª ed. Ed. Sarvier., SP.

PRITCHARD, P.H.C. & TREBBAU, P. 1984. Kinosternon scropioides scropioides (Linnaeus, 1766). In: *The Turtles of Venezuela*, Soc. For The Study of Amphibians and Reptils. Oxford

RICKLEFS, R. 1996. A economia da natureza. Ed. Guanabara Koogan, RJ .

TRABULSI, L.R. 2002. Bactérias de Interesse Médico In: Microbiologia 3ª edição. Trabulsi, L.R., Ed. Atheneu, Sp. P 119-121.

Distribuído em março de 2006.