

Dermatophilus congolensis.

III. COMPORTAMENTO EM RELAÇÃO AO OXIGÊNIO¹

LUIZ CELSO HYGINO DA CRUZ²

SINOPSE.— Foram feitos estudos sobre a sensibilidade de uma amostra de *Dermatophilus congolensis* em relação ao oxigênio. Os resultados mostraram que ele é microaerófilo, não crescendo em condições estritamente anaeróbias. Sua natureza microaerófila foi evidenciada em "shake tube", em ágar infusão de cérebro e coração, tendo sulfito de sódio como agente redutor e resazurina como indicador de redox em controles não inoculados. Nestas condições, foi verificado que a partir de pequenos inóculos, o *Dermatophilus congolensis* não cresce em Eh acima de 0,150 V.

Palavras chaves adicionais para índice: Influência do potencial de redox sobre o crescimento, produção de catalase, redução de nitrato.

INTRODUÇÃO

Não existe concordância entre os autores no que respeita ao tipo respiratório do *Dermatophilus congolensis*. Ele é considerado aeróbio por alguns (Bull 1929, Mason & Bekker 1934, Hudson 1937, Thompson 1954, Plowright 1958, Bentinck-Smith *et al.* 1961, Bridges & Romane 1961, Egerton 1964); aeróbio facultativo por outros (Nisbet & Bannatyne 1955, Gordon 1964) e microaerófilo por Atalaia e Mario (1968) e Roberts (1957a, b, 1961).

A maioria dos autores verificou a presença de catalase (Nicolet *et al.* 1967, Chodnick 1956, Roberts 1957a, Pier *et al.* 1963, Gordon 1964). A literatura ao nosso alcance deixou-nos a impressão de que somente Plowright (1958) não concorda que o esquizomiceto tenha capacidade de produzir essa enzima.

O *Dermatophilus congolensis* é redutor de nitrato, segundo alguns (Chodnick 1956, Bugyaki 1959) e não redutor, segundo outros (Bull 1929, Mason & Bekker 1934, Roberts 1957a, Pier *et al.* 1953, Gordon 1964, Portugal 1970).

O objetivo do presente trabalho foi determinar o tipo respiratório do *Dermatophilus congolensis* visando, com um melhor conhecimento de sua fisiologia, propiciar elementos para a elaboração de meios para realizar a profilaxia da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Em todos os experimentos foi usada a amostra "Santa Cruz", isolada de um bezerro proveniente de Santa Cruz, Estado da Guanabara.

Exigência de potencial de óxido-redução

Meio de cultura. O meio utilizado foi infusão de cérebro e coração (Difco), acrescido de 0,7% de ágar. Sulfito de sódio anidro (Na_2SO_3) foi adicionado nas propor-

ções de 0,01% e 0,1%, como redutor de Eh. Como indicador de redox foi usado o corante resazurina. Uma solução estoque em água destilada, esterilizada em autoclave, foi adicionada aos tubos controles até uma concentração final de 0,001%. A resazurina (azul), em Eh abaixo de 0,15V, é reduzida a resorufina (rósea), a qual, por sua vez, em Eh em torno de -0,05V é reduzida a diidrorresorufina (descorada) (Hewitt 1950).

Preparação do inóculo. A partir do crescimento (48 h a 37°C) em superfície de ágar infusão de cérebro e coração (Difco), preparamos uma suspensão em caldo simples. A densidade da turvação foi ajustada ao tubo dez da escala de MacFarland, que equivale a $\pm 10^8$ células por ml. Desta suspensão foram feitas diluições decimais no mesmo meio, até a concentração de $\pm 10^4$ células por ml.

Semeaduras. As sementeiras foram feitas com 0,1 ml de cada diluição, em tubo de ensaio de 10 x 100 mm. O meio foi, então, vertido nesses tubos até atingir uma altura de 5 a 6 cm. Para solidificar o ágar mais rapidamente, os tubos foram imersos em água fria. Rolhas de borracha branca esterilizadas foram utilizadas, em substituição aos tampões de algodão.

Incubação. A incubação foi feita em estufa a 37°C, com leituras a partir de 24 h.

Cultivo em anaerobiose

O germe foi cultivado em anaerobiose, segundo a técnica utilizada por Prévot (Lebert & Tardieux 1952). O meio, infusão de cérebro e coração, Difco, foi distribuído em tubos com um colo de ± 2 mm de diâmetro por 2 cm de comprimento. Após a sementeira, tomou-se cuidado para que o ar, dissolvido no meio, fosse totalmente removido. Para isso foi necessário bater constantemente nos tubos com um bastão, durante ± 20 minutos. Os tubos foram, então, selados à altura conveniente, com a chama de um maçarico.

Verificação da produção de catalase

Após verificar-se a presença de catalase pelo método miniaturizado descrito por Hartman (1968), foi feita determinação quantitativa com o catalasímetro de Lobeck.

O aparelho de Lobeck é constituído de tal maneira que a mistura de cultura e água oxigenada, que participam da reação, contrariamente ao que se passa em certos dispositivos (aparelho de Röder, por exemplo), não é expulsa pelo oxigênio produzido, permanecendo no

¹ Aceito para publicação em 20 de maio de 1974.

Este trabalho é parte da tese apresentada para obtenção do grau de M.Sc. perante o Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

² Professor Assistente, M.Sc., regente da disciplina de Micologia do Instituto de Biologia da UFRRJ, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26.

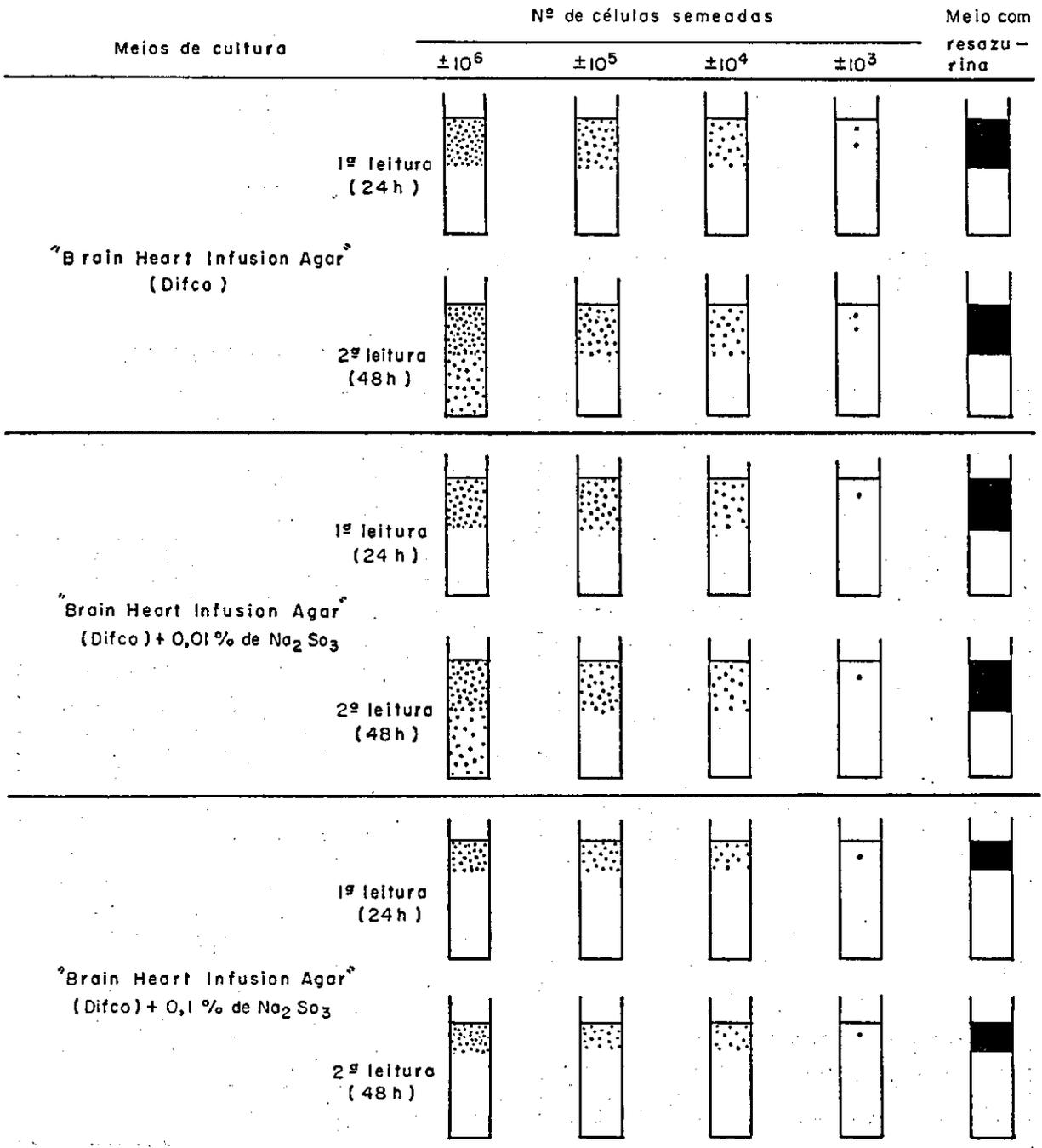


FIG. 1. Influência do Eh sobre o crescimento do *D. congolensis*.

aparelho até que a produção deste gás termine. Desta maneira pode-se, com este catalasímetro, realizar medidas mais exatas. Para este teste, o *D. congolensis* foi cultivado por 48 h em ágar infusão de cérebro e coração de bovino, Difco. A massa celular coletada da superfície do meio pesou 185 mg. A água oxigenada a 3% foi sendo adicionada em quantidades de 1 ml, sucessivamente, até não haver mais liberação de gás. Para efeito comparativo foi usada uma amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, fortemente produtora de catalase.

Redução de nitrato

O *D. congolensis* foi cultivado em caldo nitrado a 0,1%, em aerobiose, em anaerobiose e em vácuo parcial. Os testes para presença de nitrito e amônia foram feitos, respectivamente, com os reativos de Griess-Ilosway e Nessler.

RESULTADOS

Influência do potencial de óxido-redução (Eh) sobre o crescimento

O efeito da adição de sulfito de sódio pode ser visto na Fig. 1. Uma pequena concentração (0,01%) que não alterou o Eh do meio básico também não influenciou o nível de crescimento do *D. congolensis*. Uma concentração maior (0,1%), que provocou uma diminuição da zona reoxidada, impediu a vegetação na profundidade do tubo.

Quando o inóculo utilizado era inferior a $\pm 10^6$ células por ml, não havia crescimento na superfície. Como sementes superiores, o microrganismo vegetou, também, na superfície.

Cultivo em anaerobiose

D. congolensis não se desenvolveu quando incubado em anaerobiose estrita.

Produção de catalase

D. congolensis é produtor de catalase mas não tão forte como o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Quadro 1).

QUADRO 1. Atividade da catalase em *S. aureus* e *D. congolensis*

Microrganismos	Massa celular	I ₂ O ₂ consumida	O ₂ produzido
<i>Staphylococcus aureus</i>	185 mg	21 ml	208 ml
<i>Dermatophilus congolensis</i>	185 mg	9 ml	81 ml

Redução de nitrato

Nas condições de nossa experiência, o *D. congolensis* não reduziu o nitrato de potássio.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os diferentes autores não estão de acordo no que concerne a ser o *D. congolensis* aeróbio, microaerófilo ou anaeróbio. Estas divergências na literatura podem ser apenas aparentes porque depende do uso destes termos: se para exprimir características culturais, ou se para indicar tipo metabólico. Infelizmente, muitos autores não definem em que sentido eles utilizam estas expressões.

Das nossas experiências podemos concluir que o *D. congolensis* tem um metabolismo estritamente aeróbio porque ele foi incapaz de crescer em caldo sob vácuo, necessitando, pois, de oxigênio como último receptor de elétrons. Culturalmente pode ser considerado como microaerófilo por não ser capaz de crescer na superfície do meio em "shake tube", a partir de pequeno inóculo. Segundo o "Manual of Microbiological Methods" (Soc. Am. Bact. 1957), os microaerófilos são bactérias que têm crescimento ótimo a alguns milímetros abaixo da superfície e crescem melhor na presença de pequenas quantidades de oxigênio. Não é uma contradição que o tipo metabólico do *D. congolensis* seja aeróbio estrito e a característica cultural microaerófila, porque o tipo cultural mostra a exigência de potencial de redox. O *D. congolensis*, mesmo que obrigatoriamente necessite utilizar oxigênio como último receptor de elétrons, não é capaz de crescer no Eh que existe na porção do meio em contato com o ar.

Gordon (1964), cultivando várias amostras em jarra de Brewer, obteve crescimento, tendo concluído que o *D. congolensis* é anaeróbio. O importante, para nós, está em determinar se ele é metabolicamente anaeróbio e isto não pode ser alcançado mediante o uso da jarra de Brewer mais sim pelo método usado por Prévot (Lebert & Tardieux 1952), por nós utilizado. Gordon chama o *D. congolensis* de anaeróbio facultativo porque ele conseguiu, também, crescimento na superfície de placas na presença do ar.

Nisbet e Bannatyne (1955) dizem ser o *D. congolensis* anaeróbio facultativo mas, ao contrário de Gordon (1964), não se referem à técnica utilizada.

O uso dos termos aeróbio, anaeróbio e microaerófilo, em dois sentidos, sempre criou confusão para quem estuda microrganismos e, por isso, foi proposto na "Roundtable Discussion" sobre as relações de bactérias com o oxigênio (McBee *et al.* 1955) utilizar estes termos somente como características culturais. Para exprimir a habilidade de utilizar ou não o oxigênio molecular metabolicamente, foram propostos os termos oxibiônicos e anoxibiônicos. Segundo esta terminologia, o *D. congolensis* é um germe oxibiônico microaerófilo. Além de não ser capaz de crescer no meio líquido sob vácuo, ele é produtor de catalase, reforçando a nossa afirmação de que ele é oxibiônico obrigatório pois, como dizem Dean e Hinshelwood (1966), "a catalase parece intimamente associada com o crescimento aeróbio, estando geralmente ("universally") presente em aeróbios e ausente em anaeróbios obrigatórios".

O *D. congolensis* é incapaz de reduzir nitrato a nitrito. Ele não faz aquilo que Stanier *et al.* (1970) chamam de respiração anaeróbia, isto é, utilizar o oxigênio de nitrato como receptor de elétrons.

Mesmo sendo oxibiônico (metabolicamente aeróbio), o *D. congolensis* necessita, para iniciar crescimento, de uma tensão de oxigênio mais baixa que a existente na superfície do meio em contato com o ar atmosférico, como se vê nos tubos onde o inóculo foi pequeno. Mesmo com o meio apresentando uma faixa rósea na superfície, a vegetação ocorria logo abaixo, mostrando que o microrganismo não cresce em Eh acima de 0,150 V.

O crescimento na superfície, nos tubos com inóculo grande, deve-se ao fato de um aglomerado substancial (atividade e produtos metabólicos de grande número de células) ser capaz de baixar o potencial de redox. Essa exigência de um Eh baixo para iniciar crescimento ocorre em alguns microrganismos oxibiônicos, como por exemplo o *Vibrio fetus* (Cohn 1962).

REFERÊNCIAS

- Atalaia, V.M. & Mario, R.O. 1968. Contribuição para o estudo do *Actinomyces dermatonomus*. Vet. Moçamb., Lourenço Marques, 1(1):31-37.
- Bentlinck-Smith, J., Fox, F.H. & Baker, D.W. 1961. Equine dermatitis (cutaneous streptothricosis) infection with *Dermatophilus congolensis* in the United States. Cornell Vet. 51(3):334-349.
- Bridges, H.C. & Romane, W.M. 1961. Cutaneous streptothricosis in cattle. J. Am. vet. med. Ass. 138(3):153-157.
- Bugyaki, L. 1959. Dermatose contagieuse des ruminants et du cheval (Streptothricose, Actinomyose cutanée). Bull. Off. int. Epizoot. 51(5-6):237-251.
- Bull, L.B. 1929. Dermatocystosis of the sheep (Lumpy or matted wool) due to *Actinomyces dermatonomus* (n. sp.). Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 6(Part 4):301-314.
- Chodnik, K.S. 1956. Mycotic dermatitis of cattle in British West Africa. J. comp. Path. Therap. 66(3):179-186.
- Cohn, E.G. 1962. Behavior of *Vibrio fetus* in relation to O₂: Development of an O₂-gradient plate method for primary isolations. Anais Microbiol. 10:147-171.
- Dean, A.C.R. & Hinshelwood, C.N. 1966. Growth, function and regulation in bacterial cells. Oxford Univ. Press, Great Britain. 439 p.
- Egerton, J.R. 1964. Mycotic dermatitis of cattle. Aust. vet. J. 40(4):144-147.
- Gordon, M.A. 1964. The genus *Dermatophilus*. J. Bact. 88(2):509-522.
- Hartman, P.A. 1968. Miniaturized microbiological methods. Academic Press, New York. 227 p.
- Hewitt, L.F. 1950. Oxidation-reduction potencial in bacteriology and biochemistry. 6th ed. Livingstone, E.S. Edinburgh. 215 p.
- Hudson, J.R. 1937. Cutaneous streptothricosis. Proc. Royal Soc. Med. 30(12):1457-1460.
- Lebert, F. & Tardieux, P. 1952. Technique d'isolement et de détermination des bactéries anaérobies. Facomhy, S.A.R.L., Paris. 55 p.
- Mason, J.H. & Bekker, J.G. 1934. Further notes on lumpy wool in South Africa. Onderstepoort J. vet. Sci. anim. Ind. 3(1):211-216.
- McBee, R.H., Lamanna, C. & Weeks, O.B. 1955. Definitions of bacterial oxygen relationships. Bact. Rev. 19(1):45-47.
- Nicolet, J., Klingler, K. & Fey, H. 1967. "*Dermatophilus congolensis*" agent de la streptothricose du chamois. Path. Microbiol. 30(6):831-837.
- Nisbet, D.I. & Bannatyne, C.C. 1955. A dermatitis of sheep associated with an organism of genus *Actinomyces*. Vet. Rec. 67(38):713-715.
- Pier, A.C., Neal, F.C. & Czsewski, S.J. 1963. Cutaneous streptothricosis in Iowa cattle. J. Am. vet. med. Ass. 142(9):995-1000.
- Flowright, W. 1958. Cutaneous streptothricosis of cattle in Nigeria. II. The aerobic *Actinomycete* (*Nocardia* sp.) associated with the lesions. J. comp. Path. Therap. 68(2):133-147.
- Portugal, M.A.S.C. 1970. Estreptothricose em bovinos. Ocorrência e isolamento do agente. Arqs Inst. Biol., S. Paulo, 37(2):143-156.
- Roberts, D.S. 1957a. Some features of the mycotic dermatitis organism. Aust. vet. J. 33(6):141-143.
- Roberts, D.S. 1957b. An ecological study of the mycotic dermatitis organism. Aust. vet. J. 33(9):233-236.
- Roberts, D.S. 1961. The life cycle of *Dermatophilus dermatonomus*, the causal agent of ovine mycotic dermatitis. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 39(Part 5):463-476.
- Society of American Bacteriologists. 1957. Manual of microbiological methods. Conn, H.J. ed. McGraw-Hill, New York. 315 p.
- Stanier, R.Y., Duodoroff, M. & Adelberg, E.A. 1970. The microbial world. 3th ed. Prentice-Hall, New Jersey. 873 p.
- Thompson, R.E.M. 1954. A species of *Rhizobium* isolated from strawberry foot-rot in the sheep. J. Path. Bact. 68(2):445-452.

ABSTRACT.- Cruz, L.C.H.da [*Dermatophilus congolensis*. III. Behaviour in relation to oxygen]. *Dermatophilus congolensis*. III. Comportamento em relação ao oxigênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1975) 10, 21-24 [Pt, en] UFRRJ, Km 47, Rio de Janeiro, RJ, ZC-26, Brazil.

The sensibility of *Dermatophilus congolensis* to oxygen and its redox potential were studied using "shake tubes" with brain and heart infusion agar. The microbe was shown to be microaerophilic, not growing under strictly anaerobic conditions. It was verified, starting with small inoculations, that the microorganism did not grow when the Eh was above 0.150 v.

Additional index words: Influence of redox-potential over the growth, catalase production, nitrate reduction.