

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE CHROMOBACTERIUM *

CLEOMENES REIS ** JOSÉ RAFAEL ROSITO COIRO *** ADOLFÖ
BRUNNER JUNIOR *** MARIA DO ROSARIO RODRIGUES ****

RESUMO

Tendo sido isolada uma possível nova espécie de *Chromobacterium*³, foram feitas muitas observações em microscopia ótica, não tendo sido possível salientar semelhanças e diferenças entre as células da nova amostra e as amostras "padrões" de *Chromobacterium violaceum* e *C. lividum*.

Pelos métodos usuais de coloração foi difícil a observação de flagelos. Pela microscopia eletrônica, tornou-se possível a verificação de organelas e da ultra-estrutura celular desta nova amostra e a comparação com as espécies conhecidas destes microrganismos.

Em nível de ultra-estrutura, não houve diferenças marcantes, embora a amostra recém isolada tenha mostrado uma parede celular bem típica, e, separada, por pequeno espaço, da membrana plasmática; e flagelos monotríquios, enquanto a maioria das células das amostras conhecidas *C. viola-*

ceum e *C. lividum* apresentam-se com flagelos peritríquios.

INTRODUÇÃO

Chromobacterium violaceum e *Chromobacterium lividum*, segundo Wilson e Miles⁶, são bastonetes Gram negativos não esporulados, móveis, possuindo 2 flagelos polares e flagelos laterais. Todavia, algumas células possuem um flagelo único e polar, que se cora com dificuldade e tem relativamente, um grande comprimento de onda; e outras, além deste, possuem flagelos subpolares ou laterais, que se coram mais facilmente e tem um curto comprimento de onda. Os flagelos laterais são formados mais abundantemente em culturas jovens, em agar; e raramente, em culturas em meio líquido. Sneath⁵, descreve que as bactérias do gênero *Chromobacterium* tem a maioria das suas cé-

* Trabalho realizado nos Laboratórios de ME do Instituto Butantan e Hospital do Servidor, em São Paulo.

** Prof. Titular — Dept^o. de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás.

*** Pesquisadores Chefes do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Butantan, em São Paulo — Brasil.

**** Prof^o. Auxiliar de Ensino do Dept^o. de Microbiologia do IPT-UFGo.

lulas flagelos peritríquios (polares e laterais) sendo que, quando há um só flagelo, ele se insere no topo, é flagelo polar; e, quando há flagelos peritríquios (frequentemente de 3 a 6) estes não se inserem dentro da célula, e é frequente a inserção lateral. O flagelo polar é longo e ondulado, os laterais são curtos, mas, também, ondulados.

Tendo sido isolada uma amostra de **Chromobacterium**, que, pelos seus caracteres culturais e bioquímicos, se mostrou diferente destas espécies descritas, tentou-se a observação destas organelas, primeiramente pelos métodos usuais de coloração para microscopia ótica. Como os resultados não foram satisfatórios, promoveu-se uma observação em microscopia eletrônica.

Não sendo conhecidos resultados de publicações acerca da ultra-estrutura das amostras já padronizadas, fez-se um estudo comparativo entre elas e a nova amostra isolada em Goiás.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas 2 amostras de **Chromobacterium violaceum** (provenientes do Instituto Pasteur de Paris e Public Health Service de Atlanta, Georgia — U.S.A.), uma de **Chromobacterium lividum** (do Instituto Pasteur de Paris) e a amostra individualizada de **Chromobacterium**, isolada em Goiás.

A microscopia eletrônica foi realizada através de dois métodos diferentes: (1,2,4).

a) Resuspensão das bactérias em tampão Millonig (pH 7,3) —

0,26 M e gotejamento sobre as lâminas cobertas com filme de colódio. A fixação foi efetuada com vapores de tetroxido de ósmio em ambiente fechado, por duas horas. Depois, fez-se a transferência dos filmes para grades metálicas e sombreamento metálico com paládio.

b) Fixação dupla em glutaraldeído (1%), em tampão Millonig (pH 7,3), isotônico (0,26 M) seguida de tetróxido de ósmio (1%) e inclusão em Polylyte 8001-P. Os corantes eletrônicos utilizados foram a uranila e o citrato de chumbo.

Para os cortes, foi utilizado o ultramicrotomo Porter-Blum do tipo MT 2. O material foi examinado nos microscópios Siemens EI e Zeiss EM — 9 S 2, com potencial da aceleração de 60 Kv.

RESULTADOS

Com o primeiro método tivemos uma visão “panorâmica” das bactérias com o objetivo de se observar flagelos, mas não obtivemos informações detalhadas sobre a ultra-estrutura do microrganismo. Em contraposição, o segundo método permitiu uma evidência dos detalhes de ultra-estrutura.

As amostras de **Chromobacterium violaceum** (Pasteur e Atlanta) e **Chromobacterium lividum** não apresentaram diferenças quanto a maior frequência de flagelos (maioria das células, peritríquias) e em nível de ultra-estrutura não houve diferenças.

A amostra de **Chromobacterium** isolada em Goiás, também em nível de ultra-estrutura, não

apresentou diferenças marcantes das outras amostras examinadas, embora tenha mostrado uma parede celular bem típica e separada, por pequeno espaço, da mem-

brana plasmática.

A maioria das células desta última amostra apresenta um único flagelo polar (monotríquias) ver figura 1.



Fig. 1 — Microfotografia eletrônica da amostra de *Chromobacterium*, isolada em Goiás.

1 — *Chromobacterium* (Goiás) fixada através de vapores de tetróxido de ósmio e posterior sombreamento com paládio (f: flagelo; X 45.000).

2 — *Chromobacterium* (Goiás) fixada duplamente em glutaraldeído e tetróxido de ósmio e inclusão em Polylyte 8001. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo (pc: parede celular; mp: membranas plasmáticas; ec: ectoplasma, denso e granular; en: endoplasma, pouco denso e de natureza fibrilar; X 90.000).

COMENTÁRIOS

Embora já tivessem sido observadas diferenças quanto ao comportamento bioquímico das amostras de **Chromobacterium** (**C. violaceum** e **C. lividum**) e a nova amostra isolada em Goiás⁴, praticamente não houve diferenças no-

táveis em sua estrutura celular, através da sua observação em microscopia eletrônica.

Salientamos, todavia, ter encontrado nas células de **Chromobacterium** “Goiás”, em sua quase totalidade, flagelos únicos e polares (monotríquios); enquanto que na maioria das demais amostras,

encontram-se flagelos peritríquios (um flagelo ou dois, nos polos; e três a seis flagelos lateralmente).

Acresce-se que os flagelos da amostra de *Chromobacterium* "Goiás", não são tão ondulados quanto os das outras amostras, conforme foi descrito por Sneath⁵ e, observação feita no presente trabalho.

O espaço apresentado pela maioria das células desta nova amostra, existente entre a parede celular e a membrana plasmática, não foi observado em *Chromobacterium violaceum* e *Chromobacterium lividum*.

Este espaço, todavia, pode ser originado de algum artefato de técnica.

SUMMARY

Electron Microscope Study of four samples of *Chromobacterium* (*Chromobacterium violaceum* (proceeding Atlanta, U.S.A. and Institut Pasteur, Paris), *Chromobacterium lividum* (I.

Pasteur, Paris) and a probable new species, isolated from polluted water, in Goiás, not shown significant differences how large "flagellum" and cell ultra structure.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COIRO, J. R. R. & BRUNNER JR., A. — Behaviour of Polylyte 8001 with Plasticizing Additives. III Reunião da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro, Guanabara — 1973.
2. KELLEMBERGER, E.; RYTER, A. & SECHAUD, J. — Electron Microscope Study of DNA containing Plasmids. II. Vegetative and Mature Phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological state. J. Bioph. Bioch. Cytol. 4: 671, 1957.
3. REIS, C.; PEREIRA, E.; CAETANO DE SOUZA, O.; DINIZ, M.; MUNIZ, M. A. & KOLEILAT, M. N. M. — Isolamento de possível nova espécie de *Chromobacterium* em águas poluídas. Provável agente de surto septicêmico em suínos, Goiânia, Goiás, Fev. 72 — Rev. Pat. Trop. 2: 283-287, 1972.
4. REYNOLDS, E. S. — The use of Lead Citrate of High pH as an Electron Opaque Stain in Electron Microscopy. J. Cell. Biol. 17: 209, 1963.
5. SNEATH, P. H. Δ. In identification methods for Microbiologist, Gibbs, B. M. & Shapton, D. A. — Academic Press, New York, 1ª. ed. 1968.
6. WILSON, G. S. & MILES, A. A. — Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and immunity. Williams and Wilkins, Baltimore, 1957.