

ROSANGELA DALLEMOLE GIARETTA

**ALTERAÇÕES NA ADESÃO, VIABILIDADE E MORFOLOGIA DE
Pasteuria penetrans PELA EXPOSIÇÃO A DESINFETANTES E
ANTIBIÓTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

ROSANGELA DALLEMOLE GIARETTA

**ALTERAÇÕES NA ADESÃO, VIABILIDADE E MORFOLOGIA DE
Pasteuria penetrans PELA EXPOSIÇÃO A DESINFETANTES E
ANTIBIÓTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de março de 2003.

Prof. Silamar Ferraz
(Conselheiro)

Prof^a. Rosângela D'Arc de L. Oliveira
(Conselheira)

Prof^a. Maria Catarina M. Kasuya

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

A Deus ...

Ao meu esposo Gelmir Antônio

Aos meus pais Gabriel e Angelina

Ao meu irmão Adir

À minha cunhada Rosana

Ao meu sobrinho Lucas Henrique

Aos meus amigos

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

A todos os professores e funcionários da Instituição que contribuíram para a minha formação profissional, em especial ao professor e orientador Leandro G. Freitas pela orientação, pelo apoio, e por todos os conhecimentos repassados durante todo o tempo em que trabalhamos juntos.

Aos conselheiros prof. Silamar Ferraz e prof^a Rosângela D'Arc de Lima Oliveira pelas sugestões para elaboração deste trabalho.

Ao professor Kiyoshi Matsuoka pela ajuda na elaboração das fotos de microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Reginaldo da Silva Romeiro, pelo apoio e pelas sugestões para elaboração deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões para a correção deste trabalho.

À prof^a. Stela Maris Kulczynski pelo incentivo e pela amizade.

Aos amigos Fábio Ramos Alves, Ricardo Brainer Martins e Daiane Betiollo pela ajuda e pela amizade.

Aos colegas de laboratório Marcelo, Paulo Afonso, Deisy, Delaine, Vinícius, Everaldo, Cléia, Paulo Roberto e Daniel, pela amizade, ajuda e convívio.

Aos colegas de curso, em especial aos amigos Aderlan Gomes da Silva e Wânia S. Neves pela amizade verdadeira que construímos e a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram a realizar este trabalho, o meu sincero agradecimento.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO 1	
Ação de desinfetantes e antibióticos sobre a adesão e viabilidade de endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i> em <i>Meloidogyne javanica</i>	15
Resumo.....	15
Abstract	16
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 2	
Alterações na morfologia e adesão dos endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i> promovidas pelo hipoclorito de sódio	34
Resumo.....	34
Abstract	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	38

1. Tratamento dos endósporos de <i>P. penetrans</i> com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações de cloro ativo	38
2. Estudo morfológico dos endósporos de <i>P. penetrans</i> , após tratamento com hipoclorito de sódio	40
3. Determinação do período necessário para desinfestar materiais contaminados com endósporos de <i>P. penetrans</i> , em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
1. Tratamento dos endósporos de <i>P. penetrans</i> com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações de cloro ativo.....	42
2. Estudo morfológico dos endósporos de <i>P. penetrans</i> , após tratamento com hipoclorito de sódio.....	44
3. Determinação do período necessário para desinfestar materiais contaminados com endósporos de <i>P. penetrans</i> , em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CONCLUSÕES GERAIS	54

RESUMO

GIARETTA, Rosangela Dallemole. M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2003. **Alterações na adesão, viabilidade e morfologia de *Pasteuria penetrans* pela exposição a desinfetantes e antibióticos.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Conselheiros: Silamar Ferraz e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.

Avaliou-se a ação dos desinfetantes álcool 70%, detergente neutro 5%, formol 10%, hipoclorito de sódio 0,5% de cloro ativo e dos antibióticos penicilina 200 mg/mL, estreptomicina 200 mg/mL e cloranfenicol 200 mg/mL, sobre a adesão e a reprodução de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne javanica*. Bem como a ação direta de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações de cloro ativo, sobre a adesão e a morfologia dos endósporos e o período necessário para promover a desinfestação de placas contaminadas com endósporos da bactéria em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo. Os tratamentos com álcool, detergente neutro e antibióticos não impediram a adesão nem a reprodução de *P. penetrans*, e incremento de 277% e 169% na adesão dos endósporos nos tratamentos com álcool e detergente neutro respectivamente, com relação à testemunha. Formol a 10% não afetou a adesão dos endósporos porém inibiu seu desenvolvimento ao passo que o hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo impediu a adesão dos endósporos aos nematóides e, portanto, a multiplicação da bactéria. O pré-tratamento dos endósporos de *P. penetrans* com hipoclorito de sódio, em diferentes

concentrações de cloro ativo, afetaram drasticamente a adesão dos endósporos de *P. penetrans* aos juvenis de *M. javanica*, principalmente em concentrações a partir de 0,125%. O estudo morfológico mostrou que houve mudanças na estrutura dos endósporos, iniciando com a dissolução das fibras parasporais em hipoclorito de sódio a 0,125% e atingindo destruição total das mesmas a 0,5%. Quando placas contaminadas com endósporos da bactéria foram submersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo, 1 minuto de contato já foi o suficiente para promover a eliminação de 85% dos endósporos das placas e 15 minutos para completa desinfestação das mesmas. Conclui-se, portanto, que o hipoclorito de sódio é um potente agente inativante de endósporos de *P. penetrans* atuando num curto período de tempo, podendo ser recomendada a utilização de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo por 15 minutos para a desinfestação de vidrarias contaminadas com *P. penetrans*.

ABSTRACT

GIARETTA, Rosangela Dallemole. M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2003. **Alterations in the attachment, viability and morphology of *Pasteuria penetrans* by the exposure to disinfectants and antibiotics.** Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Committee members: Silamar Ferraz and Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.

The action of the disinfectants alcohol 70%, neutral detergent 5%, formol 10%, sodium hypochlorite 0,5% of active chlorine and of the antibiotics penicillin 200 mg/mL, streptomycin 200 mg/mL and chloranphenicol 200 mg/mL on the attachment and reproduction of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica* was evaluated. The direct action of sodium hypochlorite, in different concentration of active chlorine, on the attachment and morphology of the endospores was also evaluated, as well as the time required for disinfestation of glass petri dishes contaminated with the bacterial endospores in sodium hypochlorite at 5% of active chlorine. Treatments with alcohol, detergent and antibiotics did not impair the attachment or the reproduction of *P. penetrans*, and increments of 277% and 169% in the attachment of the endospores were observed in the treatments with alcohol and detergent, respectively. Formol 10% did not affect the attachment but inhibited the bacterial development while sodium hypochlorite at 5% of active chlorine impaired the attachment of the endospores to the nematode and, consequently, the multiplication of the bacteria. Pre-treatment of *P. penetrans* endospores with sodium hypochlorite in

different concentrations of active chlorine drastically affected the attachment to *M. javanica* juveniles, mainly in concentrations above 0,125%. The morphological study showed changes in the structure of the endospores, beginning with the dissolution of the parasporal fibers in sodium hypochlorite at 0,125% of active chlorine and reaching the total destruction of them at 0,5%. One minute of immersion of the contaminated petri dishes in sodium hypochlorite 0,5% of active chlorine was enough to eliminate 85% of the bacterial endospores and 15 minutes for a complete disinfestation of them.

INTRODUÇÃO GERAL

Os fitonematóides atacam todas as espécies de plantas cultivadas, mas pelo seu tamanho reduzido e muitas vezes por não causarem sintomas visíveis passam despercebidos pelos agricultores (Tihohod, 1993), causando sérios danos à agricultura, com perdas econômicas em torno de 100 bilhões de dólares anualmente (Sasser e Freckman, 1987).

As medidas, tradicionalmente utilizadas para o controle de fitonematóides, são a rotação de cultura, o uso de variedades resistentes e o controle químico (Ferraz e Santos, 1985). Recentemente, com a retirada de muitos nematicidas do mercado, por serem altamente tóxicos e causarem sérios riscos à saúde humana e ao meio ambiente, métodos alternativos, como o controle biológico, têm despertado um maior interesse por parte dos pesquisadores, por serem métodos mais seguros para o controle desses fitoparasitas (Dickson e Oostendorp, 1990; Stirling, 1991; Dickson et al., 1994).

Dentre os vários antagonistas de nematóides, apenas alguns inimigos naturais, como as bactérias do gênero *Pasteuria* Metchnikoff, 1888, têm apresentado um grande potencial como agente biocontrolador em condições de campo (Kerry, 1987; Dickson et al., 1994).

As bactérias do gênero *Pasteuria*, parasitas obrigatórias de fitonematóides, são gram-positivas formadoras de endósporos e pseudo-micélio septado (Starr e Sayre, 1988). Três espécies de *Pasteuria* são

parasitas de nematóides, *Pasteuria thornei* Starr e Sayre, 1988, que parasita o nematóide das lesões das raízes *Pratylenchus brachyurus* Godfrey, 1929 (Starr e Sayre, 1988), *Pasteuria nishizawae* Sayre, Wergin e Starr, 1991, que parasita os nematóides formadores de cistos, *Heterodera elachista* Ohshima, 1974, *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 e *Globodera rostochiesnsis* Behrens, 1975 (Sayre et al., 1991) e *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) Sayre e Starr, 1985 parasita de *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 e de outras espécies desse gênero (Sayre e Starr, 1985). Essa espécie foi classificada, anteriormente, por Thorne (1940) como *Dubosqia penetrans* e como *Bacillus penetrans* por Mankau 1975a e b.

Além do nematóide hospedeiro, o tamanho e o formato dos endósporos distinguem esses fitoparasitas. Os endósporos de *P. thornei* e *P. nishizawae* são elipsoidais, quase elípticos em corte, porém os esporângios de *P. nishizawae* são em forma de xícara, com diâmetro médio de 5 μm , enquanto que os de *P. thornei* são rombóides com diâmetro médio de 3,3 μm . Já os endósporos de *P. penetrans* são amplamente elípticos em corte e apresentam esporângios também no formato de xícara (Figura 1), mas com diâmetro médio de 4,2 μm (Sayre et al., 1991).

Das três espécies parasitas de fitonematóides, *P. penetrans* é a mais estudada e sua potencialidade no controle biológico de fitonematóides já foi observada tanto em casa de vegetação como em campo, nas diferentes espécies do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1889 (Stirling, 1984; Brown e Smart, 1985; Chen et al., 1996; Weibelzahl-Fulton et al., 1996; Tateishi, 1998; Freitas et al., 2000a e b). Esse antagonista apresenta dois modos de ação no controle desses fitoparasitas. O primeiro ocorre quando juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp., ao se movimentarem em solos infestados pela bactéria, entram em contato com os endósporos, que são altamente adesivos e se fixam firmemente na cutícula do nematóide. Após a penetração do J2 na raiz e o estabelecimento do sítio alimentar, um tubo germinativo é emitido da base central do endósporo que perfura a cutícula do nematóide e se estabelece no pseudoceloma, onde se ramifica e dá origem a colônias vegetativas semelhantes a uma couve-flor. As terminações da colônia se engrossam

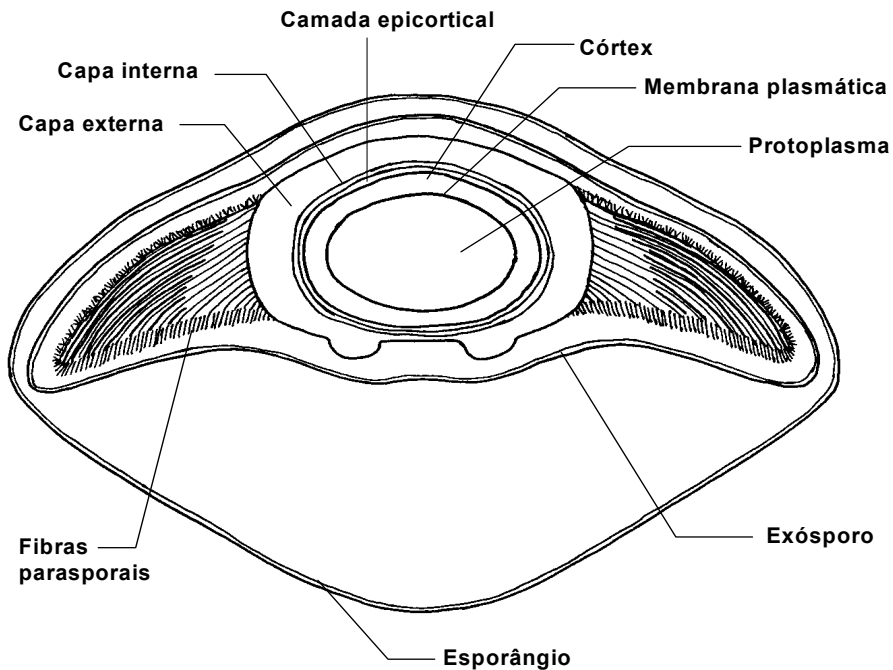


Figura 1 - Desenho esquemático da morfologia do endósporo de *Pasteuria penetrans* (Freitas e Carneiro, 2000).

durante a formação do endósporo no seu interior. Após a esporulação, ocorre a separação das células-mãe do restante da colônia. A membrana celular recebe o nome de esporângio (Figura 1), que será rompido com o dessecamento ou degradado por microrganismos, liberando assim o endósporo para se aderir à cutícula do nematóide hospedeiro. O endósporo livre ainda apresenta uma membrana envoltória chamada exósporo, que não impede, mas prejudica a adesão. Essa membrana também é rompida por processos físicos ou biológicos. O endósporo, propriamente dito, possui fibras parasporais, responsáveis pela adesão, e o centro do espora é constituído de uma capa que confere resistência ao calor e dessecação do córtex, membrana plasmática e protoplasma (Figura 1) com os constituintes típicos de uma bactéria, como material genético e ribossomo.

Ao final do ciclo do nematóide, ao invés de ovos, cada fêmea de *Meloidogyne* spp. produz 2 milhões de endósporos da bactéria, aproximadamente (Mankau, 1975a; Sayre e Wergin 1977). Portanto, sua ação

traduz na inibição da reprodução do nematóide. Com a decomposição do sistema radicular e dessas fêmeas, esses endósporos são liberados para o solo, que se aderem a outros J2, reiniciando assim um novo ciclo da bactéria (Mankau, 1975a; Chen e Dickson, 1998). Com o passar dos anos, o número de endósporos no solo tende a aumentar e, quando um grande número de endósporos se aderirem à cutícula dos J2, estes têm a mobilidade e a penetração no sistema radicular prejudicada (Stirling, 1984; Davies et al., 1990), tornando, então, o solo supressivo (Dickson et al., 1991; Chen et al., 1996; Weibelzahl-Fulton et al., 1996; Freitas et al., 2000b). Desta forma, o segundo modo de ação é caracterizado pelo impedimento da penetração do nematóide nas raízes das plantas.

Os mecanismos que envolvem a adesão dos endósporos de *P. penetrans* à cutícula de J2 ainda não são bem compreendidos (Davies et al., 1992). Davies e Danks (1993) sugerem que carboidratos presentes na superfície da cutícula dos nematóides interagem com moléculas de N-acetilglucosamina na superfície dos endósporos de *P. penetrans*, que, por sua vez, estão ligadas a outras proteínas ou peptídeoglicanos que são extensão da parede celular de *P. penetrans*. Davies et al. (1996) destacam também uma glicoproteína, a fibronectina, responsável na adesão dos endósporos. Essas interações entre os endósporos e a superfície dos J2 é de fundamental importância para se entender a especificidade do nematóide hospedeiro com a bactéria.

O processo de adesão dos endósporos aos J2 pode ser afetado por fatores como temperatura, pH, dessecação, ação microbiana e outros que possam romper ou degradar o esporângio e o exósporo, com exposição das fibras parasporais, o que promove um melhor contato à cutícula do nematóide hospedeiro (O'Brien, 1980; Stirling et al., 1986; Davies et al., 1988; Stirling et al., 1990; Hatz e Dickson, 1992).

A capacidade adesiva dos endósporos de *P. penetrans* a organismos vivos se restringe somente ao nematóide hospedeiro (Gives et al., 1999), característica importante no controle biológico, pois, assim, não afeta outros microrganismos do solo. Outros atributos favoráveis de *P. penetrans*, como agente de biocontrole de fitonematóides, são a grande capacidade de dispersão (Freitas et al., 2000b), a viabilidade dos endósporos por vários anos

durante o armazenamento (Mani, 1988; Giannakou et al., 1997) e a resistência de endósporos a temperaturas extremas (Stirling et al., 1986; Bird et al., 1989; Giannakou et al., 1997).

Entretanto, em razão da capacidade adesiva dos endósporos de *P. penetrans*, essa bactéria pode causar problemas de contaminações em utensílios laboratoriais como vidrarias, tubos plásticos, peneiras e vasos cerâmicos, entre outros, e com isso contaminar outros experimentos que não envolvam *P. penetrans*.

A esterilização desses materiais muitas vezes é dificultada em função da natureza do objeto, além disso, bactérias produtoras de esporos são conhecidas por serem extremamente resistentes ao calor, radiação e muitos produtos químicos utilizados como desinfetantes (Enomoto et al., 1997). Essa resistência a muitos agentes químicos ocorre por causa da relativa impermeabilidade da membrana protoplasmática e também da camada externa da capa do esporo, o que faz com que ocorra uma lenta penetração do produto para o centro do esporo (Setlow, 1994).

Vários são os trabalhos encontrados na literatura, sobre diferentes tipos de agentes químicos, testados para inativar bactérias produtoras de endósporos (Gorman, et al., 1983; Gorman, et al., 1984; Bloomfield e Arthur, 1992; Vardaxis et al., 1977; Angelillo et al., 1998; Netscher e Duponnois, 1998; Hobson e Seal, 2000; Domonici et al., 2001; Motta et al., 2001), sendo que a eficiência de cada um varia de acordo com o produto e o método utilizados.

Vardaxis et al. (1977), ao avaliarem o efeito de soluções de formol a 10%, álcool absoluto ou etílico a 70%, ou a 50% sobre esporos de *Bacillus* spp. Cohn, 1872, observaram que a solução com o formol a 10% promoveu a morte de 100% dos esporos da bactéria em menos de 24 horas e o tratamento com o álcool não inativou os esporos da bactéria, mesmo após 14 dias de imersão nas respectivas concentrações. Domonici et al. (2001), ao testarem soluções de formol a 10% em esporos de *Bacillus*, constaram que a inativação dos mesmos ocorreu somente após um período de sete dias. Netscher e Duponnois (1998), ao avaliarem o efeito inativante do álcool 90% sobre endósporos de *P. penetrans*, constataram que o desinfetante não afetou a adesão dos endósporos, porém os autores não avaliaram qual o efeito do álcool na infectividade dos mesmos.

O desinfetante hipoclorito de sódio (NaOCl) é um dos agentes químicos mais testados contra esporos de bactérias e apresenta bons resultados mesmo em baixas concentrações de cloro ativo (Gorman, et al., 1983; Gorman, et al., 1984; Bloomfield e Arthur, 1992; Motta et al., 2001). Para *P. penetrans*, Netscher e Duponnois (1998) também relataram brevemente que a utilização de soluções com hipoclorito de sódio é uma alternativa simples e econômica para esterilizar materiais contaminados com endósporos dessa bactéria.

Angelillo et al. (1998), ao avaliarem a eficácia de duas substâncias antimicrobianas, glutaraldeído a 2 % (Asporin) e peroxygen a 1 % (Virkon) para desinfestação de instrumentos dentários contaminados por *B. subtilis* (Ehrenberg, 1835), também constataram que o agente químico glutaraldeído foi mais eficiente e que houve completa eliminação da bactéria, quando os instrumentos permaneceram por um período de 4 a 5 horas expostos ao desinfetante. Por outro lado, peroxygen necessitou de um período aproximado de 20 horas para completa eliminação de *B. subtilis*.

Apesar de desinfetantes à base de glutaraldeído apresentarem bons resultados nos testes realizados com *Bacillus* sp., Hobson e Seal (2000) citam que esses germicidas apresentam odores fortes, o que requer o uso de sala com ventilação especial para a sua manipulação. Além disso, certos equipamentos requerem períodos longos de exposição ao glutaraldeído para a esterilização.

Por isso, quando se escolhe um desinfetante específico para a esterilização, devem ser considerados alguns fatores como alta eficiência, rapidez e estabilidade do produto, baixos danos aos instrumentos, custo e toxicidade a seres humanos (Angelillo et al., 1998).

Outra dificuldade quando se trabalha com *P. penetrans*, por apresentar parasitismo obrigatório, é a produção massal de inóculo. Até o momento, a fonte de inóculo dessa bactéria é obtida pelo método descrito por Stirling e Wachtel (1980), o qual consiste em inoculações de J2 de *Meloidogyne* spp. aderidos com a bactéria, em plantas hospedeiras. Ao final de 45 e 60 dias, as raízes são moídas, obtendo-se assim um pó de raiz ou através de extrações de fêmeas contaminadas pela bactéria e mantidas em suspensão aquosa (Mankau e Prasad, 1977). Apesar de os dois métodos não permitirem a produção de grandes quantidades de inóculo, várias pesquisas foram

realizadas para maximizar a produção (Stirling et al., 1990; Sharma e Stirling, 1991; Davies et al., 1991; Freitas et al., 1999; Gomes et al., 1999), dentre elas, a adição do esterco de curral no substrato (Gomes et al., 1998; Gomes, 2001).

Quando se adiciona qualquer tipo de esterco ao substrato, há dúvida quanto a presença de resíduos quimioterápicos nos mesmos, como por exemplo antibióticos, e se esses produtos poderão ou não afetar a multiplicação de *P. penetrans*. A presença de antibióticos no esterco é devido a sua utilização terapêutica nos animais e, também, porque esses estão sendo utilizados em doses subterapêuticas, na ração, para promover o crescimento e melhorar a eficiência da conversão alimentar (Pelczar et al., 1996).

Após a absorção e a difusão de alguns antibióticos pelos tecidos, esses são eliminados quase que totalmente, sob forma ativa, não sofrendo alterações metabólicas importantes. Outros, porém, sofrem metabolização nos tecidos, sendo eliminados parcialmente, sob forma natural, ativa, e, em parte, como metabólitos, os quais podem ou não sofrer atividade antimicrobiana (Tavares, 1986).

A ação dos antibióticos sobre os agentes infecciosos provoca dois tipos de efeitos, desde que o organismo seja sensível à droga, a morte do agente ou a parada do seu crescimento e reprodução. O mecanismo de ação de substâncias ditas antibióticos é exercido essencialmente por interferência na síntese da parede celular; alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática; interferência na replicação do DNA e interferência na síntese protéica (Tavares, 1986; Pelczar et al., 1996).

Apesar de não haver estudos sobre o papel de *P. penetrans* como agente contaminante de materiais laboratoriais, o que é, sem dúvida, um problema real, conforme relatado por pesquisadores e técnicos, informalmente, a contaminação de *P. penetrans*, em experimentos de outra natureza que não a de controle biológico, pode interferir nos resultados e invalidar conclusões. É importante que se realizem testes laboratoriais através de contaminações controladas desses materiais e se façam estudos sobre a eficiência de diferentes soluções desinfetantes, para que possam ser utilizadas rotineiramente e evitar contaminações indesejadas. Também é necessário avaliar a ação de alguns antibióticos sobre a adesão e a reprodução de *P. penetrans*.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de diferentes soluções desinfetantes e de antibióticos sobre a adesão e a reprodução de *P. penetrans*; a ação direta de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações de cloro ativo, sobre a adesão e estrutura dos endósporos de *P. penetrans*; e o tempo necessário para desinfestar vidrarias com endósporos da bactéria em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELILLO, I.F., BIANCO, A., NOBILE, C.G.A., PAVIA, M. Evaluation of the efficacy of glutaraldehyde and peroxygen for disinfection of dental instruments. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.292-296. 1998.
- BIRD, A.F., BONIG, I. e BACIC, A. Factors affecting the adhesion of microorganisms to the surfaces of plant-parasitic nematodes. **Parasitology**, v.98, p.155-164. 1989.
- BLOOMFIELD, S.F., ARTHUR, M. Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine-T. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.166-172. 1992.
- BROWN, S.M., SMART, G.C.Jr. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.17, n.2, p.123-126. 1985.
- CHEN, Z.X., DICKSON, D.W. Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. **Journal of Nematology**, v.30, n.3, p.313-340. 1998.
- CHEN, Z.X., DICKSON, D.W., McSORLEY, R., MITCHELL, D.J., HEWLETT, T.E. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, v.28, n.2, p.159-168. 1996.
- DAVIES, K.G., AFOLABI, P., O'SHEA, P. Adhesion of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) inhibited by fibronectin: a study of electrostatic and hydrophobic interactions. **Parasitology**, v.112, p.553-559. 1996.

- DAVIES, K.G., DANKS, C. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.39, p.53-64. 1993.
- DAVIES, K.G., FLYNN, C.A., LAIRD, V., KERRY, B.R. The life-cycle, population dynamics and host specificity of a parasite of *Heterodera avenae*, similar to *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, v.13, n.3, p.303-309 1990.
- DAVIES, K.G., KERRY, B.R., FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, v.112, p.491-501. 1988.
- DAVIES, K.G., LAIRD, V., KERRY, B.R. The mobility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, v.14, n.4, p.611-618. 1991.
- DAVIES, K.G., ROBINSON, M.P., LAIRD, V. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.59, p.18-23. 1992.
- DICKSON, D.W., MITCHELL, D.J., HEWLETT, T.E., OOSTENDORP, M., KANNWISCHER-MITCHELL, M.E. Nematode-suppressive soil from a peanut field. **Journal of Nematology**, v.23, n.4, p.526. 1991. (Abstract).
- DICKSON, D.W., OOSTENDORP, M., GIBLIN-DAVIS, R.M., MITCHELL, D.J. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D., BENNETT, F.D., CAPINERA, J.L. (Ed.) **Pest management in the subtropics. Biological control - A Florida perspective**. London: Intercept, 1994. p.575-601.
- DICKSON, D.W., OOSTENDORP, M. Biological control of nematodes with *Pasteuria* spp.. **Nematology Circular**, n.175. 1990.
- DOMINICI, J.T., ELEAZER, P.D., CLARK, S.J., STAAT, R.H., SCHEETZ, J.P. Disinfection/sterilization of extracted teeth for dental student use. **Journal of Dental Education**, v.65, n.11, p.1278-1280. 2001.
- ENOMOTO, A., NAKAMURA, K., HAKODA, M., AMAYA, N. Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.3, n.3, p.305-307. 1997.
- FERRAZ, S., SANTOS, M.A. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.3, p.283-314. 1995.
- FREITAS, L.G., CARNEIRO, R.M.D.G. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria* spp.. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Controle biológico V. 2**, Jaguariúna-SP, 2000. p. 91-125.

- FREITAS, L.G., DICKSON, D.W., MITCHELL, D.J., McSORLEY, R. Suppression of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans* in the field. **Nematologia Brasileira**, v.24, n.2, p.147-156. 2000a.
- FREITAS, L.G., GOMES, B.C., TOMÉ, L.G.O. Produção massal de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.345. 1999. (Resumo).
- FREITAS, L.G., NEVES, W.S., CARMO, D.N., SILVA, G.S. First case of induction of soil suppressiveness to root-knot nematode by *Pasteuria penetrans* in large areas in the field in Brazil. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 2000, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: Sociedade Brasileira de Nematologia, p.129. 2000b.
- GIANNAKOU, I.O., PEMBROKE, B., GOWEN, S.R., DAVIES, K.G. Effects of long term storage and above normal temperatures on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, v.43, p.185-192. 1997.
- GIVES, P.M., DAVIES, K.G., MORGAN, M., BEHNKE, J.M. Attachment tests of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of plant and animal parasitic nematodes, free living nematodes and *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Helminthology**, v.73, p.67-71. 1999.
- GOMES, C.B. **Influência de alguns fatores na multiplicação de *Pasteuria penetrans* "in vivo"**. Viçosa, MG: UFV, 2001. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- GOMES, C.B., FREITAS, L.G., NETO, A.R. Efeito da matéria orgânica sobre a produção de endósporos de *Pasteuria penetrans* em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.305. 1998. (Resumo).
- GOMES, C.B., FREITAS, L.G., TOMÉ, L.G.O. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras conduzidas em dois tipos de vasos. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.345-346. 1999. (Resumo).
- GORMAN, S.P., HUTCHINSON, E.P., SCOTT, E.M., McDERMOTT, L.M. Death, injury and revival of chemically treated *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.54, p.91-99. 1983.
- GORMAN, S.P., SCOTT, E.M., HUTCHINSON, E.P. Hypochlorite effects on spores and spore forms of *Bacillus subtilis* and on a spore lytic enzyme. **Journal of Applied Bacteriology**, v.56, p.295-303. 1984.
- HATZ, B., DICKSON, D.W. Effect of temperature on attachment, development, and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v.24, n.4, p. 512-521. 1992.

- HOBSON, D.W., SEAL, L.A. Evaluation of a novel, rapid-acting, sterilizing solution at room temperature. **AJIC Am. J. Infect. Control**, v.28, n.5, p.370-375. 2000.
- KERRY, B.R. Biological control. In: BROWN, R.H., KERRY, B.R. (Ed.) **Principles and practice of nematode control in crops**. London: Academic Press, 1987. p.233-263.
- MANI, A. Studies on the bacterial parasite *Pasteuria penetrans*: I. Spore viability after storage II. Culture on citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans*. International Nematology. **Network Newsletter**, v.5, n.2, p. 24-25. 1988.
- MANKAU, R. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.26, p.333-339. 1975a.
- MANKAU, R. Prokaryote affinities of *Duboscqia penetrans* Thorne. **Journal of Protozoology**, v.22, n.1, p.31-34. 1975b.
- MANKAU, R., PRASAD, N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v.9, n.1, p.40-45. 1977.
- MOTTA, P.G., FIGUEIREDO, C.B., MALTOS, S.M., NICOLI, J.R., SOBRINHO RIBEIRO, A.P., MALTOS, K.L., CARVALHAIS, H.P. Efficacy of chemical sterilization and storage conditions of gutta-percha cones. **International Endodontic Journal**, v.34, n.6, p.435-439. 2001. (Abstract).
- NETSCHER, C., DUPONNOIS, R. Use of aqueous suspensions for storing and inoculating spores of *Pasteuria penetrans*, parasite of *Meloidogyne* spp.. **Nematologica**, v.44, p.91-94. 1998.
- O'BRIEN, P. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.12, n.4, p.234. 1980.
- PELCZAR Jr, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. Antibióticos e outros agentes quimioterápicos. In: PELCZAR Jr, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. (Ed.) **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Vol. II 2^a ed. São Paulo, 1996. p.111-140.
- SASSER, J.N., FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J., DICKSON, D.W. (Ed.) **Vistas on nematology: a commemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists**. Hyatsville: The Society of Nematologists, 1987. p.7-14.
- SAYRE, R.M., STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.52, n.2, p.149-165. 1985.

- SAYRE, R.M., WERGIN, W.P. Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, v.129, n.2, p.1091-1101. 1977.
- SAYRE, R.M., WERGIN, W.P., SCHMIDT, J.M., STARR, M.P. *Pasteuria nishizawae* sp. nov., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. **Research in Microbiology**, v.142, p.551-564. 1991.
- SETLOW, P. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores *Bacillus* species. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v.76, p.49-60. 1994.
- SHARMA, R.D., STIRLING, G.R. *In vivo* mass production systems for *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.37, p.483-484. 1991.
- STARR, M.P., SAYRE, R.M. *Pasteuria thornei* sp. nov. and *Pasteuria penetrans* sensu stricto emend., mycelial and endospore-forming bacteria parasitic, respectively, on plant-parasitic nematodes of the genera *Pratylenchus* and *Meloidogyne*. **Annals of the Institute Pasteur of Microbiology**, v.139, p.11-31. 1988.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, v.74, n.1, p.55-60. 1984.
- STIRLING, G.R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. Wallingford: CAB International. 1991. 282p.
- STIRLING, G.R., BIRD, A.F., CAKURS, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. **Revue de Nématologie**, v.9, n.3, p.251-260. 1986.
- STIRLING, G.R., SHARMA, R.D., PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. **Nematologica**, v.36, p.246-252. 1990.
- STIRLING, G.R., WACHTEL, M.F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. **Nematologica**, v.26, p.308-312. 1980.
- TATEISHI, Y. Suppression of *Meloidogyne incognita* and yield increase of sweet potato by field application of *Pasteuria penetrans*. **Japanese Journal of Nematology**, v.28, n.1/2, p.22-24. 1998.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos - para o estudante de medicina**. 3^a ed. Rio de Janeiro, 1986. 374p.

- THORNE, G. *Dubosqia penetrans* n. sp. (Sporozoa: Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.7, p.51-53. 1940.
- TIHOHOD, D. Importância Econômica dos Fitonematóides. In: TIHOHOD, D. (Ed.) **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: Funep, 1993. p.2-3.
- VARDAXIS, N.J., HOOGEVEEN, M.M., BOON, M.E., HAIR, C.G. Sporicidal activity of chemical and physical tissue fixation methods. **Journal of Clinical Pathology**, v.50, n.5, p.429-433. 1997.
- WEIBELZAHN-FULTON, E., DICKSON, D.W., WHITTY, E.B. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. **Journal of Nematology**, v.28, n.1, p.43-49. 1996.

CAPÍTULO 1

Ação de desinfetantes e antibióticos sobre adesão e viabilidade de endósporos de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne javanica*

Resumo - Avaliou-se a ação de álcool 70%, detergente neutro 5%, formol 10%, hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo e dos antibióticos penicilina, estreptomicina e cloranfenicol na concentração de 200 mg/mL cada sobre adesão e reprodução de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne javanica*. Placas de vidro contaminadas artificialmente com 2 mL de uma suspensão de 1×10^6 endósporos/mL e secas ao ar em temperatura ambiente de laboratório (aproximadamente 23°C) foram colocadas em contato com os desinfetantes ou antibióticos por 30 minutos, depois enxaguadas e receberam em seu interior suspensão com 1.000 J2 de *M. javanica* por placa. Após, aproximadamente, uma hora em repouso, contou-se o número de endósporos aderidos em 20 J2, escolhidos ao acaso, e procedeu-se à inoculação em tomateiros em casa de vegetação. Os tratamentos com álcool, detergente e antibióticos não afetaram negativamente a adesão nem a reprodução de *P. penetrans*. Já o hipoclorito de sódio e formol impediram a reprodução da bactéria, embora a adesão não tenha sido afetada no tratamento com o formol. O hipoclorito de sódio atuou como um desinfetante eficiente para a eliminação de *P. penetrans*.

Palavras-chave: *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne javanica*, desinfetantes, antibióticos, adesão, endósporos.

**The effects of disinfectants and antibiotics on the attachment and viability
of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica***

Abstract - The action of the disinfectants alcohol 70%, neutral detergent 5%, formol 10%, sodium hypochlorite 0,5% of active chlorine and of the antibiotics penicillin 200 mg/mL, streptomycin 200 mg/mL and chloranphenicol 200 mg/mL on the attachment and reproduction of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica* was evaluated. Glass Petri dishes artificially contaminated with 2 mL of 1×10^6 endospores/mL suspension and air dried at room temperature (approximately 23°C) were exposed to different disinfectants and antibiotics for 30 minutes, rinsed and received each a suspension of 1000 *M. javanica* J2. After one hour, the number of endospores attached was counted in 20 randomly chosen J2 per dish, and the suspensions used to inoculate tomato plants in the greenhouse. Treatments with alcohol, detergent and antibiotics did not affect negatively the attachment or the reproduction of *P. penetrans*. Sodium hypochlorite at 5% of active chlorine and formol 10% impaired the bacterial reproduction, but formol did not affect the attachment. Sodium hypochlorites act as an efficient disinfectant for the elimination of *P. penetrans*.

Key words: *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne javanica*, disinfectants, antibiotics, attachment, endospores.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Pasteuria penetrans* (ex Thorne 1940) Sayre e Starr, 1985, parasita obrigatória de nematóides, é um dos antagonistas mais estudados pelo seu grande potencial no controle de nematóides formadores de galhas, *Meloidogyne* spp. (Weibelzahl-Fulton et al., 1996; Freitas et al., 2000a e b). *Pasteuria penetrans* também apresenta algumas vantagens como especificidade ao hospedeiro (Gives et al., 1999), alta capacidade de dispersão (Freitas et al., 2000b), longevidade (Giannakou et al., 1997), resistência à dessecação (Stirling e Wachtel, 1980), temperaturas extremas (Bird et al., 1989) e nematicidas (Mankau e Prasad, 1972; Stirling, 1984), atributos importantes no controle biológico.

Apesar de a resistência, persistência e dispersão de *P. penetrans* serem pontos positivos para o controle biológico, a dificuldade de se trabalhar com essa bactéria se deve a capacidade adesiva de seus endósporos, pois eles se aderem facilmente em vidraria e outros utensílios laboratoriais, o que pode causar sérios problemas de contaminação de experimentos (Hewlett e Serracin, 1996) e assim espalhar-se rapidamente em culturas mantidas livres de *P. penetrans* em casa de vegetação (Giannakou et al., 1997).

Esterilizações desses materiais são necessárias para que não ocorram contaminações indesejadas. Produtos desinfetantes como o álcool, hipoclorito de sódio (NaOCl) e formol já foram avaliados quanto a ação esporicida em *Bacillus* spp. Cohn, 1872, (Gorman, et al., 1983; Sisco et al., 1988; Choudhuri et al., 1990; Bloomfield e Arthur, 1992; Vardaxis, et al., 1997; Motta et al., 2001; Dominici et al., 2001).

Vardaxis et al. (1997), ao estudarem a exposição de esporos de *Bacillus* em solução de formol a 10%, observaram que o desinfetante preveniu o crescimento da bactéria em menos de 24 horas. Motta et al. (2001) relatam que apenas 5 minutos de contato de materiais contaminados artificialmente com *Bacillus* com solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo foram suficientes para inativar essa bactéria. Netscher e Duponnois (1998), ao testarem o efeito do álcool a 90% e de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo sobre endósporos de *P. penetrans*, constataram que o álcool não afetou a adesão aos J2 de *M. incognita*. Quanto ao tratamento com hipoclorito de sódio,

os autores apenas relataram que é um método simples e econômico para inativar endósporos dessa bactéria, porém não relataram qual o efeito desses desinfetantes sobre a infectividade e adesão dos endósporos de *P. penetrans*.

Outra dificuldade quando se trabalha com *P. penetrans*, em razão do seu parasitismo obrigatório, é a produção massal de inóculo. Apesar de muitas tentativas de cultivo *in vitro* já terem sido realizadas até o momento (Williams et al., 1989; Bishop e Ellar, 1991), a produção de inóculo de *P. penetrans* ainda se baseia na técnica descrita por Stirling e Wachtel (1980), que consiste em inocular juvenis de *Meloidogyne* spp. infestados com endósporos da bactéria, em plantas hospedeiras mantidas em casa de vegetação. Ao final do ciclo de vida da bactéria, os sistemas radiculares são colhidos, secos e moídos para se obter um pó fino que serve como fonte de inóculo da bactéria para aplicações em campo.

Mesmo que essa técnica não permita a produção de grandes quantidades de inóculo, muitos estudos visam otimizar a sua produção *in vivo* (Stirling et al., 1990; Sharma e Stirling, 1991; Davies et al., 1991; Freitas et al., 1999; Gomes et al., 1999), dentre eles a adição do esterco de curral ao substrato (Gomes et al., 1998; Gomes, 2001). Porém, esterco de curral podem apresentar resíduos quimioterápicos, como antibióticos, decorrente da utilização dos mesmos em doses terapêuticas nos animais ou em doses subterapêuticas na ração para promover o crescimento e melhorar a eficiência da conversão alimentar (Pelczar, et al., 1996). Então, caso se utilize esterco de curral contaminados com antibióticos, para produção *in vivo* de *P. penetrans*, fica a dúvida se resíduos dessas drogas poderão afetar a multiplicação da bactéria. Segundo Tavares (1986) e Pelczar et al. (1996), a ação de antibióticos sobre os agentes infecciosos pode provocar a morte do agente ou a parada do seu crescimento e da reprodução, caso o organismo seja sensível à droga.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação de diferentes soluções desinfetantes e de antibióticos sobre a adesão e reprodução de *P. penetrans* para desinfestar materiais contaminados com endósporos dessa bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa-MG (UFV), no Laboratório de Nematologia, localizado no Núcleo de Biotecnologia aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia.

Obtenção do inóculo de *Pasteuria penetrans*. O inóculo de *P. penetrans* (P 25), proveniente da Flórida, EUA, foi multiplicado em *Meloidogyne javanica*, parasitando plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) Santa Cruz 'Kada' em casa de vegetação. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, fêmeas do nematóide infectadas com a bactéria foram retiradas das raízes, colocadas em tubos de ensaio contendo água, e maceradas para obtenção da suspensão de endósporos. Posteriormente, com o auxílio de câmara de Newbauer e microscópio ótico, fez-se a calibragem da suspensão para 1×10^6 endósporos/mL, que, em seguida, foi armazenada em geladeira a 8°C até a sua utilização.

Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica*. Utilizou-se como inóculo uma população de *M. javanica* mantida em plantas de tomate Santa Cruz 'Kada', em vasos, em casa de vegetação. Cortes perineais e eletroforese de isoenzimas foram realizados para confirmação da identidade do inóculo antes de sua multiplicação. Os juvenis de segundo estágio (J2), utilizados nos ensaios, foram obtidos através da extração de ovos das raízes de tomateiros infectadas por *M. javanica* (Hussey e Barker, 1973), e incubados a 26°C em câmara de eclosão, montada com uma peneira previamente revestida com papel-toalha sobre um prato com água. A cada 24 horas, a água foi passada em peneira de 0,025mm de malha (500 mesh) e, com auxílio de jatos fortes de água de uma pisseta, os juvenis foram recolhidos em um becker e submetidos à aeração forçada com bomba de aquário para mantê-los ativos até o momento de sua utilização.

Montagem do ensaio. O ensaio constou de nove tratamentos com seis repetições cada, implantado em delineamento inteiramente casualizado:

1) álcool 70%; 2) detergente neutro 5%; 3) formol 10%; 4) hipoclorito de sódio 0,5% de cloro ativo; 5) penicilina; 6) estreptomicina; 7) cloranfenicol; 8) água (testemunha) e 9) testemunha, sem *P. penetrans*. Mediu-se o pH dos respectivos tratamentos. A unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri previamente autoclavada por uma hora, que recebeu 2 mL da suspensão de endósporos de *P. penetrans* de 1×10^6 endósporos/mL. Posteriormente, as placas foram mantidas em temperatura ambiente de laboratório ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para secagem da suspensão, obtendo-se desta forma placas infestadas com endósporos de *P. penetrans*. Após 18 horas, as seis placas de cada tratamento foram imersas vagarosamente em potes de plástico, contendo 500 mL das respectivas soluções desinfetantes ou de água no tratamento testemunha, e permaneceram submersas por aproximadamente 30 minutos. Para os tratamentos com antibióticos, foram feitas as aplicações direta sobre as placas. Cada placa recebeu 1 mL com 200 mg/mL do respectivo antibiótico, permanecendo também por 30 minutos. Posteriormente, as placas foram enxaguadas, individualmente, por oito vezes com jatos de água de torneira para remoção dos desinfetantes e antibióticos.

Após este procedimento, colocaram-se em seguida, em cada placa, 7 mL de uma suspensão aquosa, contendo 1.000 J2 de até oito dias de idade de *M. javanica* e, posteriormente, as placas foram levemente agitadas por mais ou menos dois minutos e deixadas em repouso por aproximadamente uma hora, período suficiente para a adesão de cerca de dez endósporos/J2 observados em alguns juvenis no tratamento *P. penetrans* em água. Decorrido este período, em cada repetição, o número de endósporos aderidos/J2 foi contado em 20 J2 escolhidos ao acaso, com auxílio de microscópio de objetiva invertida no aumento de 400X.

Posteriormente, cada suspensão com 1.000 nematóides foi distribuída sobre o solo ao redor de uma planta de tomate Santa Cruz 'Kada' de, aproximadamente, 10 cm de altura, mantidas em casa de vegetação, em copos plástico de 500 mL de capacidade, sobre uma mistura de solo e areia (1:1, v:v), previamente tratados com brometo de metila.

Setenta dias após a inoculação, as plantas foram colhidas, separando-se o sistema radicular de cada planta de sua parte aérea. A seguir, as raízes foram lavadas e avaliadas quanto ao número de ovos, número de galhas e

percentagem de fêmeas parasitadas por *P. penetrans* por sistema radicular. A extração de ovos foi realizada conforme o método descrito por Hussey e Barker, 1973, modificado para agitação manual durante 3 minutos, e a quantificação foi feita em câmara de Peters. Após a extração de ovos, os sistemas radiculares foram mantidos em geladeira a 8°C até a contagem das galhas e a extração, ao acaso, de 50 fêmeas de cada sistema radicular. Ao proceder à extração com o auxílio de pinça e estilete, cada fêmea foi esmagada entre lâmina e lamínula com uma gota de azul de algodão e observada em microscópio ótico para determinação de presença e estágio de desenvolvimento de *P. penetrans*. Os dados, quanto ao número de endósporos/J2 e de fêmeas com ovos ou infectadas com a bactéria, foram submetidos à análise estatística descritiva por não seguirem a distribuição normal. O número de ovos, transformados em $\log x+1$, e os índices de galhas foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa Sistema de Análise de Estatística e Genética SAEG (Euclides, 1983), e as médias comparadas entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O maior número de endósporos aderidos ocorreu no tratamento com álcool 70% (Figura 2) com uma média de 49 endósporos/J2, seguido do tratamento com detergente neutro a 5% em água, com 35 endósporos/J2. Os demais tratamentos, formol 10% e antibióticos, apresentaram médias semelhantes à testemunha com *P. penetrans*. O menor índice de adesão ocorreu no tratamento com hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo, que não diferiu da testemunha sem *P. penetrans*.

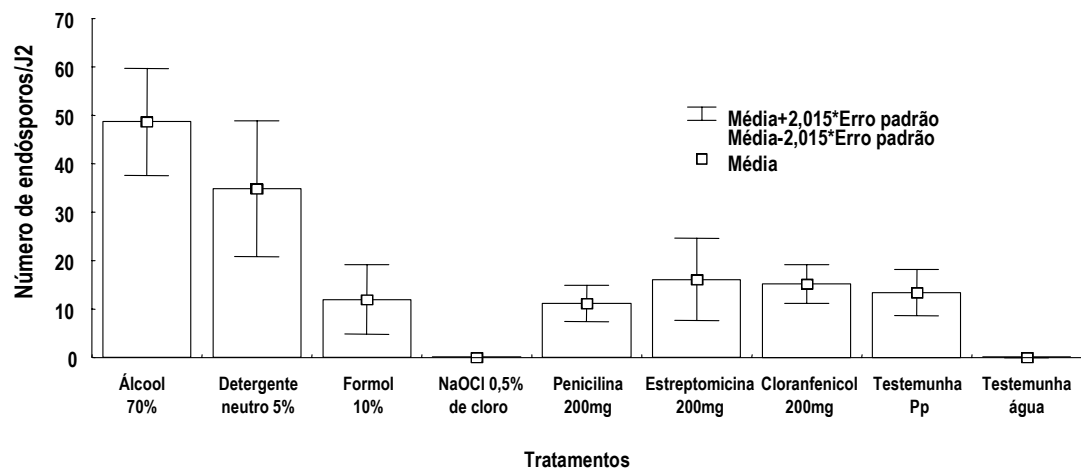


Figura 2 - Número médio de endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos em juvenis de *Meloidogne javanica* após serem expostos por 30 minutos a diferentes desinfetantes e antibióticos. (Médias de seis repetições. Em cada repetição, a contagem foi feita em 20 juvenis, observados ao acaso).

A adesão de endósporos de *P. penetrans* à cutícula do nematóide hospedeiro é a primeira fase do processo de infecção da bactéria ao nematóide hospedeiro (Stirling e Wachtel, 1980). Vários autores citam que, além dos fatores bioquímicos que envolvem a adesão de endósporos à cutícula dos nematóides, fatores físicos e químicos também influenciam o mecanismo de adesão (O'Brien 1980; Stirling et al., 1986; Davies e Danks, 1993; Davies et al.,

1988). O aumento na adesão, após a dessecação e a sonificação de endósporos, também foi observado em *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita* (O'Brien, 1980; Netscher e Duponnois, 1998; Stirling et al., 1986) em função da remoção do esporângio e do exósporo, o que fez com que houvesse a exposição das fibras parasporais (Figura 1), responsáveis pela adesão dos endósporos. Isto, possivelmente, ocorreu neste estudo, no tratamento com álcool 70% associado à dessecação ao ar por 18 horas a 23°C, e associados, talvez, a outros fatores envolvidos na adesão, como a limpeza da superfície dos endósporos promovida pelo álcool. Segundo Duponnois et al. (1997), o álcool promove apenas a desinfestação de endósporos de *P. penetrans*, eliminando a microbiota associada à bactéria, pois não houve diferenças na adesão de endósporos de *P. penetrans* tratados e não-tratados com álcool 97% e incubados com *M. graminicola*. Já Netscher e Duponnois (1998), ao avaliarem o efeito do álcool 90% em endósporos secos de *P. penetrans*, que foram mantidos uma noite em contato com o desinfetante até a sua completa evaporação e, posteriormente, ao compararem a adesão com endósporos dessecados, e sem tratamento com álcool com endósporos sempre mantidos em suspensão aquosa, observaram que o tratamento com o álcool não afetou a adesão, mas com o dessecação foi significativo.

Neste experimento, o segundo maior valor de endósporos aderidos nos J2 de *M. javanica* ocorreu no tratamento com detergente neutro 5% (Figura 2) cujo valor foi maior que o dobro de endósporos/J2, em relação à testemunha com *P. penetrans*, que apresentou apenas 13 endósporos/J2. A grande quantidade de endósporos aderidos possivelmente tenha ocorrido pelo rompimento do esporângio e do exósporo dos endósporos, quando esses foram dessecados, expondo assim as fibras parasporais responsáveis pela adesão, associado talvez ao pH da água. O aumento na adesão também tem sido observado após o processo de sonificação dos endósporos (Davies et al., 1988; Orui, 1997), favorecido pelo pH entre 6 e 8 (Orui, 1997). Segundo Davies et al. (1988), em pH neutro, os endósporos geralmente aderem-se em grande quantidade ao nematóide hospedeiro, o que provavelmente deve ter ocorrido neste ensaio quando se utilizou detergente neutro. Contudo, talvez o fator mais relevante pelo incremento da adesão com o uso de detergente, assim como no tratamento com álcool, seja uma provável limpeza que a

superfície dos endósporos sofreu durante a ação do produto, o que não ocorreu com a testemunha com *P. penetrans* apenas em água.

O menor número de endósporos aderidos aos juvenis de *M. javanica* ocorreu no tratamento com hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo (Figura 2); apenas um endósporo foi observado aderido a um J2. Essa redução, na adesão, provavelmente tenha ocorrido por causa da ação do desinfetante sobre as proteínas específicas na superfície dos endósporos de *P. penetrans*, que estão envolvidas no mecanismo de adesão do endósporo à cutícula do hospedeiro (Davies et al., 1992; Esnard, et al., 1997). O hipoclorito de sódio remove proteínas da camadas de esporos de *Clostridium bifermentans*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (Wyatt e Waites, 1975 e Bloomfield e Arthur, 1992) e de peptidoglicano do córtex de *B. subtilis* (Bloomfield e Arthur, 1992), o mesmo deve ter ocorrido com os endósporos de *P. penetrans* ao serem tratados com hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo, impedindo a adesão aos J2 de *M. javanica*.

A diminuição da adesão dos endósporos de *P. penetrans*, em função da desnaturação dos componentes do endósporo como glicoproteínas e peptidoglicanos, também já foi sugerida por Davies e Danks (1993), após pré-tratarem endósporos de *P. penetrans* com proteinase K. As proteinases desnaturam glicoproteínas e peptidoglicanos, que são componentes diretamente envolvidos na adesão do endósporo à cutícula.

Neste ensaio, também, observou-se que somente o tratamento com o hipoclorito de sódio promoveu a remoção de praticamente todos os endósporos da superfície das placas. Apenas algumas carcaças de fêmeas infectadas foram observadas quando se avaliou a adesão, o que interferiu na adesão nos J2. Essas carcaças, que são cutículas retorcidas e secas, provenientes do maceramento de fêmeas de *Meloidogyne* spp. para a obtenção de endósporos, podem ter promovido a proteção para alguns endósporos quando estes foram submetidos ao tratamento com o desinfetante. Portanto, foi confirmada a eficácia do hipoclorito de sódio como agente inativante.

O pré-tratamento dos endósporos com formol 10% ou com os antibióticos não afetou a adesão nos J2 de *M. javanica*, quando comparou-se com a testemunha com água e *P. penetrans* (Figura 2). Esses resultados sugerem, portanto, que o tratamento com formol, bem como com os

antibióticos, não afetou as proteínas específicas presentes na superfície dos endósporos, responsáveis pela adesão à cutícula dos J2 (Davies et al., 1992; Esnard, et al., 1997), o que, provavelmente, deve ter ocorrido no tratamento com o hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo.

As menores médias de número de galhas por sistema radicular (Tabela 1) ocorreram nos tratamentos com o álcool 70% e com o antibiótico estreptomicina. A redução da infectividade nos tratamentos deve-se ao alto nível de adesão de *P. penetrans* aos J2, prevenindo, assim, a penetração destes no sistema radicular (Stirling, 1984 Davies et al., 1990), sendo que 15 endósporos aderidos à cutícula dos J2 já são suficientes para haver redução na infectividade (Brown e Smart, 1985) e, conseqüentemente, resultar num menor número de galhas (Mankau, 1980; Freitas et al., 2000a).

A maior média, com 657 galhas por sistema radicular, ocorreu no tratamento com o antibiótico cloranfenicol, porém não diferiu dos tratamentos com hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo, penicilina e testemunha com água sem *P. penetrans*.

Esse alto índice de galhas no tratamento com o antibiótico cloranfenicol, comparado com os demais tratamentos, foi devido às raízes das plantas apresentarem galhas separadas, ou seja, quando se fez as extrações das fêmeas a maior parte dessas apresentavam apenas uma fêmea, o que não ocorreu nos demais tratamentos, isto possivelmente deve ter ocorrido em razão de alguma ação ainda desconhecida de resíduos do antibiótico sobre o nematóide hospedeiro, o que deve ser melhor investigado em estudos futuros.

Para que ocorra a infecção de *P. penetrans* em J2 de *Meloidogyne* sp., basta que apenas um endósporo germine, porém são necessários no mínimo de 3 a 5 endósporos aderidos para garantir a infecção, pois apenas 20 a 30% germinam (Sayre e Wergin, 1977; Stirling, 1984) e com isso garantem que as fêmeas que são infectadas não produzam ovos (Mankau, 1980). Tal fato ocorreu nos tratamentos com antibióticos, álcool e detergente neutro, confirmando, portanto, que *P. penetrans* não é sensível a essas drogas, pois não afetou a adesão nem a reprodução da bactéria (Tabela 1; Figuras 2 e 3). Duponnois et al. (1997) também constataram que a reprodução de *P. penetrans* não foi afetada, quando endósporos foram tratados com álcool

Tabela 1 - Número de galhas e ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiro, inoculados com 1000 J2 com endósporos de *P. penetrans* aderidos, após serem tratados por 30 minutos com diferentes desinfetantes e antibióticos.

Tratamento	Nº galhas/sist. radicular	Nº ovos/sist. radicular
Álcool 70%	307 c	18.185 c
Detergente neutro 5%	392 bc	28.239 bc
Formol 10%	456 bc	96.848 a
NaOCl 0,5% de cloro ativo	503 abc	116.575 a
Penicilina 200mg	470 abc	31.167 bc
Estreptomicina 200mg	309 c	25.404 bc
Cloranfenicol 200mg	657 a	40.867 b
Testemunha <i>Pp</i>	414 bc	25.029 bc
Testemunha água	560 ab	88.070 a

Médias obtidas de seis repetições. Médias dentro da coluna seguida pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste Duncan ($P \leq 0,05$). Médias originais são apresentadas na tabela. Médias do número de ovos foram transformadas para $\log x+1$ para análise estatística.

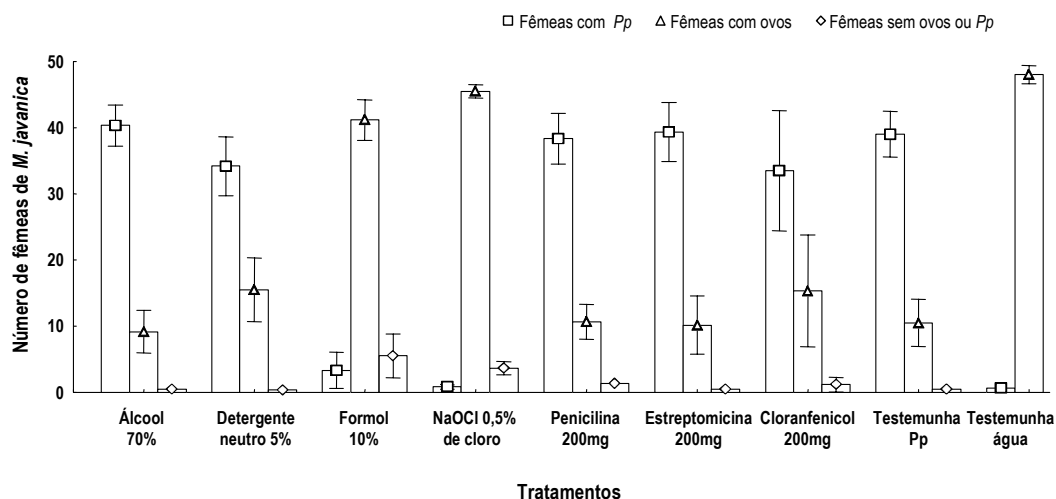


Figura 3 - Número médio de fêmeas de *Meloidogyne javanica* com ovos, infectadas com *P. penetrans*, ou sem ovos ou *P. penetrans*. (Médias de seis repetições; intervalo de confiança = $\pm 2,015^*$ erro-padrão).

97% por 12 horas, igualando-se aos endósporos não-tratados em adesão. A ineficiência do álcool, como agente inativante de bactérias formadoras de esporos, também pode ser observado por Sisco et al. (1988) e Vardaxis et al. (1997) em trabalhos com *Bacillus* sp. *B. stearothermophilus* e *B. subtilis* não se mostraram sensíveis ao álcool absoluto ou álcool etílico a 70% ou 50%, respectivamente. Segundo Melo (2002), o álcool é um agente bactericida muito usado na maioria dos casos de desinfecção e seu mecanismo de ação, para esse efeito, se faz por meio de desnaturação protéica. No entanto, contra esporos de bactérias, o álcool etílico é pouco eficiente por não penetrar em material muito rico em proteína, o que provavelmente ocorreu com os endósporos de *P. penetrans*.

O pré-tratamento dos endósporos de *P. penetrans* com antibióticos não afetou sua reprodução (Figura 3), o que nos leva a crer que a utilização de esterco de curral no substrato, possivelmente com resíduos de antibióticos, para multiplicação de *P. penetrans*, não irá afetar o desenvolvimento e a reprodução da bactéria. Segundo Tavares (1986), a resistência de bactérias a determinados antibióticos pode ser natural, devido ao microrganismo apresentar uma determinada estrutura celular que impede o antibiótico de agir ou quando lhe falta o sítio de ação da droga. Essa resistência natural faz parte das características biológicas do microrganismo, estando presente nos indivíduos que compõem uma determinada espécie, como é observado em *Pseudomonas aeruginosa* por se mostrar impermeável ao antibiótico estreptomicina (Tavares, 1986). Isso provavelmente deve ter ocorrido também com os endósporos de *P. penetrans* pela presença da capa que protege a célula bacteriana (Figura 1). Talvez, a insensibilidade de *P. penetrans* a esses antibióticos esteja associada também à lavagem que os endósporos sofreram após 30 minutos de contato, tempo que pode ter sido insuficiente para a penetração do antibiótico.

Segundo Tavares (1986), os valores de concentração inibitória mínima (bacteriostática) e bactericida sofrem variações muito grandes em função da cepa do microrganismo estudado. Os antibióticos derivados de penicilinas são antibióticos bactericidas e atuam contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, espiroquetas e actinomicetos, o que interfere na síntese da parede celular bacteriana em crescimento, causando a lise osmótica do microrganismo

(Reese e Betts, 1995; Tavares, 1986). Como a parede celular de *P. penetrans* exposta à penicilina não estava mais em crescimento, o que ocorre no interior do nematóide, e como a parede celular é protegida pela capa do endósporo, é compreensível que esse antibiótico não tenha causado danos à bactéria. A estreptomicina age em bactérias metabolicamente ativas por provocar alterações ribossomais, de tal modo que a formação das proteínas bacterianas se faz de maneira anormal, levando a lesões irreversíveis da célula bacteriana. Parece agir, ainda, no ciclo de Krebs, interferindo na respiração celular, e atua sobre bacilos Gram-negativos e em alguns cocos Gram-positivos (Lacaz, 1975; Tavares, 1986; Reese e Betts, 1995). Como os endósporos tratados estavam em fase de dormência, também faz sentido a falta da atuação de estreptomicina sobre *P. penetrans*. O mesmo ocorreu com o cloranfenicol, que é um antibiótico de amplo espectro ativo contra muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, Rickétsias, Clamídias e Micoplasmas (Reese e Betts, 1995) e possui ação bacteriostática, com inibição da síntese protéica. Esse antibiótico impede a ligação do RNA-mensageiro ao ribossoma, por fixar-se ao ribossoma, em competição com o ácido nucléico. O cloranfenicol parece também inibir reações enzimáticas de formação dos polipeptídeos (Tavares, 1986).

A presença de fêmeas infectadas com *P. penetrans* no controle, sem a bactéria (Figura 3), confirma a grande capacidade de contaminação dos endósporos de *P. penetrans*, como relatado por Hewlett e Serracin (1996) e Giannakou et al. (1997), apesar de o máximo de assepsia e cuidado serem tomados na montagem e na avaliação dos ensaios.

Os tratamentos com formol 10%, hipoclorito de sódio 0,5% de cloro ativo e a testemunha sem *P. penetrans* resultaram nos maiores números de ovos, o que caracterizou, portanto, a eficácia desses produtos em impedir a reprodução de *P. penetrans* (Tabela 1 e Figura 3). A ação esporicida de formol a 10%, em bactérias produtoras de esporos como *Bacillus stearothermophilus* e *B. subtilis*, também foi observado por Vardaxis et al. (1997) e Domonici et al. (2001), evitando em 100% o crescimento das bactérias. Segundo Vardaxis et al. (1997), esporos dessas bactérias, quando imersos na solução, foram inativados em menos de 24 horas. Neste ensaio, observou-se o mesmo efeito em apenas 30 minutos no formol, porém, mesmo mortos, os endósporos não

perderam a capacidade de adesão, o que é altamente indesejável, pois podem interferir nos resultados de experimentos contaminados por *P. penetrans*, reduzindo a penetração dos J2 nas raízes. A eficiência de hipoclorito de sódio também foi demonstrada em *B. stearothermophilus*, que promoveu a inativação da bactéria, e com isso sua eficácia em curto período de tempo (Motta et al., 2001). Wyatt e Waites (1975) sugerem que o hipoclorito de sódio promova a ruptura da parede dos esporos em *Clostridium bifermentans*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*, inativando o mecanismo de germinação. Gorman et al. (1983) e Bloomfield e Arthur (1992), ao utilizarem o hipoclorito de sódio, obtiveram 100% de morte de *B. subtilis* à concentração de 200 ppm de NaOCl, em apenas 5 minutos de contato. Gorman et al. (1984) sugerem que o efeito letal do hipoclorito de sódio sobre o esporos de *B. subtilis* envolve, primeiramente, a degradação da parede do esporo seguido da remoção do material do protoplasma.

Então, nos resultados obtidos neste ensaio, também conclui-se a eficiência de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo sobre os endósporos de *P. penetrans*, considerado, neste caso, o desinfetante mais efetivo que impediu a adesão dos endósporos aos nematóides, conseqüentemente, a multiplicação da bactéria. Assim a presença de resíduos dos antibióticos testados no substrato, provavelmente, não irão afetar multiplicação de *P. penetrans*, pois não afetaram a adesão e nem a reprodução da bactéria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRD, A.F., BONIG, I., BACIC, A. Factors affecting the adhesion of micro-organisms to the surfaces of plant-parasitic nematodes. **Parasitology**, v.98, p.155-164. 1989.
- BISHOP, A.H., ELLAR, D.J. Attempts to culture *Pasteuria penetrans in vitro*. **Biocontrol Science and Technology**, v.1, p.101-114. 1991.
- BLOOMFIELD, S.F., ARTHUR, M. Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine-T. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.166-172. 1992.
- BROWN, S.M., SMART, G.C.Jr. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.17, n.2, p.123-126. 1985.
- CHOUDHURI, M., McQUEEN, R., INOUE, S., GORDON, R.C. Efficiency of skin sterilization for a venipuncture with the use of commercially available alcohol or iodine pads. **American Journal of Infection Control**, v.18, n.2, p.82-85. 1990. (Abstract).
- DAVIES, K.G., DANKS, C. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.39, p.53-64. 1993.
- DAVIES, K.G., FLYNN, C.A., LAIRD, V., KERRY, B.R. The life-cycle, population dynamics and host specificity of a parasite of *Heterodera avenae*, similar to *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, v.13, n.3, p.303-309. 1990.
- DAVIES, K.G., KERRY, B.R., FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, v.112, p.491-501. 1988.
- DAVIES, K.G., LAIRD, V., KERRY, B.R. The mobility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, v.14, n.4, p.611-618. 1991.
- DAVIES, K.G., ROBINSON, M.P., LAIRD, V. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Invertebrate Pathology** v.59, p.18-23. 1992.
- DOMINICI, J.T., ELEAZER, P.D., CLARK, S.J., STAAT, R.H., SCHEETZ, J.P. Disinfection/sterilization of extracted teeth for dental student use. **Journal of Dental Education**, v.65, n.11, p.1278-1280. 2001.

- DUPONNOIS, R., NETSCHER, C., MATEILLE, T. Effect of the rhizosphere microflora on *Pasteuria penetrans* parasiting *Meloidogyne graminicola*. **Nematologia Mediterranea**, v.25, p.99-103. 1997.
- ESNARD, J., McCLURE, M.A., DICKSON, D.W., HEWLETT, T.E. ZUCKERMAN, B.M. Effects of monoclonal antibodies, cationized ferritin, and other organic molecules on adhesion of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, v.29, n.4, p.556-564.1997.
- EUCLYDES, R.F. **Sistema para análise estatística genética**: SAEG. Viçosa, MG: UFV, 1983. 57p.
- FREITAS, L.G., DICKSON, D.W., MITCHELL, D.J., McSORLEY, R. Suppression of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans* in the field. **Nematologia Brasileira**, v.24, n.2, p.147-156. 2000a.
- FREITAS, L.G., GOMES, B.C., TOMÉ, L.G.O. Produção massal de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.345. 1999. (Resumo).
- FREITAS, L.G., NEVES, W.S., CARMO, D.N., SILVA, G.S. First case of induction of soil suppressiveness to root-knot nematode by *Pasteuria penetrans* in large areas in the field in Brazil. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 2000, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: Sociedade Brasileira de Nematologia, p. 129. 2000b.
- GIANNAKOU, I.O., PEMBROKE, B., GOWEN, S.R., DAVIES, K.G. Effects of long term storage and above normal temperatures on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, v.43, p.185-192. 1997.
- GIVES, P.M., DAVIES, K.G., MORGAN, M., BEHNKE, J.M. Attachment tests of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of plant and animal parasitic nematodes, free living nematodes and *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Helminthology**, v.73, p.67-71. 1999.
- GOMES, C.B. **Influência de alguns fatores na multiplicação de *Pasteuria penetrans* "in vivo"**. Viçosa, MG: UFV, 2001. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- GOMES, C.B., FREITAS, L.G., NETO, A.R. Efeito da matéria orgânica sobre a produção de endósporos de *Pasteuria penetrans* em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.305. 1998. (Resumo).
- GOMES, C.B., FREITAS, L.G., TOMÉ, L.G.O. Desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em diferentes plantas hospedeiras conduzidas em dois tipos de vasos. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.345-346. 1999. (Resumo).

- GORMAN, S.P., HUTCHINSON, E.P., SCOTT, E.M., McDERMOTT, L.M. Death, injury and revival of chemically treated *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.54, p.91-99. 1983.
- GORMAN, S.P., SCOTT, E.M., HUTCHINSON, E.P. Hypochlorite effects on spores and spore forms of *Bacillus subtilis* and on a spore lytic enzyme. **Journal of Applied Bacteriology**, v.56, p.295-303. 1984.
- HEWLETT, T.E., SERRACIN, M. *Pasteuria* spp. agente de control biológico de nemátodos fitoparasitos: Manual de técnicas. **Corbana** v.21, n.46, p.151-161. 1996.
- HUSSEY, R.S., BARKER, K.R. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028. 1973.
- LACAZ, C.S. **Antibióticos**. 3^a ed. São Paulo, 1975. p. 1-54.
- MANKAU, R. Biological control of *Meloidogyne* populations by *Bacillus penetrans* in West Africa. **Journal of Nematology**, v.12, n.4, p.230. 1980.
- MELO, J.R.C. Por que o álcool 70% é o mais indicado para conservar material zoológico e para desinfetar hospitais? **Ciência Hoje**, v.30, n.180, p.6-7. 2002.
- MOTTA, P.G., FIGUEIREDO, C.B., MALTOS, S.M., NICOLI, J.R., SOBRINHO RIBEIRO, A.P., MALTOS, K.L., CARVALHAIS, H.P. Efficacy of chemical sterilization and storage conditions of gutta-percha cones. **International Endodontic Journal**, v.34, n.6, p.435-439. 2001. (Abstract).
- NETSCHER, C., DUPONNOIS, R. Use of aqueous suspensions for storing and inoculating spores of *Pasteuria penetrans*, parasite of *Meloidogyne* spp.. **Nematologica**, v.44, p.91-94. 1998.
- O'BRIEN, P. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.12, n.4, p.234. 1980.
- ORUI, Y. Effect of spore sonication on attachment and host-attachment range of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode. **Applied Entomology Zoology**, v.32, n.1, p.101-107. 1997.
- PELCZAR Jr, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. Antibióticos e outros agentes quimioterápicos. In: PELCZAR Jr, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. (Ed.) **Microbiologia: conceitos e aplicações** Vol. II 2^a ed. São Paulo. 1996, p.111-140.
- REESE, R.E., BETTS, R.F. **Manual de antibióticos**. 2^a ed. Rio de Janeiro, 1995. 633p.

- SAYRE, R.M., STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.52, n.2, p.149-165. 1985.
- SAYRE, R.M., WERGIN, W.P. Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, v.129, n.2, p.1091-1101. 1977.
- SHARMA, R.D., STIRLING, G.R. In vivo mass production systems for *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.37, p.483-484. 1991.
- SISCO, V., WINTERS, L.L., ZANGE, L.L., BRENNAN, P.C. Efficacy of various methods of sterilization of acupuncture needles. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v.11, n.2, p.94-97. 1988. (Abstract).
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, v.74, n.1, p.55-60. 1984.
- STIRLING, G.R., BIRD, A.F., CAKURS, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes, **Revue de Nématologie**, v.9, n.3, p.251-260. 1986.
- STIRLING, G.R., SHARMA, R.D., PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. **Nematologica**, v.36, p.246-252. 1990.
- STIRLING, G.R., WACHTEL, M.F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. **Nematologica**, v.26, p.308-312. 1980.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos - para o estudante de medicina**. 3^a ed. Rio de Janeiro, 1986. 374p.
- VARDAXIS, N.J., HOOGEVEEN, M.M., BOON, M.E., HAIR, C.G. Sporicidal activity of chemical and physical tissue fixation methods. **Journal of Clinical Pathology**, v.50, n.5, p.429-433. 1997.
- WEIBELZAHN-FULTON, E., DICKSON, D.W., WHITTY, E.B. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. **Journal of Nematology**, v.28, n.1, p.43-49. 1996.
- WILLIAMS, A.B., STIRLING, G.R., HAYWARD, A.C., PERRY, J. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). **Journal of Applied Bacteriology**, v.67, p.145-156. 1989.
- WYATT, L.R., WAITES, W.M. The effect of chlorine on spore *Clostridium bifermentans*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. **Journal of General Microbiology**, v.89, p.337-344. 1975.

CAPÍTULO 2

Alterações na morfologia e adesão dos endósporos de *Pasteuria penetrans* promovidas pelo hipoclorito de sódio

Resumo - Avaliou-se a ação de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações de cloro ativo sobre os endósporos de *P. penetrans*. O pré-tratamento dos endósporos, em concentrações a partir de 0,125%, afetou drasticamente a sua adesão aos J2 de *M. javanica*. O estudo morfológico dos endósporos mostrou que houve mudanças nas camadas externas dos endósporos à concentração de 0,125%, degradação do esporângio, exósporo e das fibras parasporais a 0,25% e completa eliminação dos endósporos a 0,5% de cloro ativo. Quando placas contaminadas artificialmente foram submersas em uma solução de 0,5% de cloro ativo, houve uma eliminação de 85% dos endósporos a partir de um minuto de contato e a desinfestação total, após 15 minutos.

Palavras-chave: *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne javanica*, hipoclorito de sódio, adesão, endósporos, desinfestação.

**Alterations in the morphology and attachment of *Pasteuria penetrans*
endospores promoted by sodium hypochlorite**

Abstract - The direct action of sodium hypochlorite, in different concentration of active chlorine, on the attachment and morphology of the endospores was evaluated. Pre-treatment of *P. penetrans* endospores with sodium hypochlorite in different concentrations of active chlorine drastically affected the attachment to *M. javanica* juveniles, mainly in concentrations above 0,125%. The morphological study showed changes in the structure of the endospores, beginning with the dissolution of the parasporal fibers in sodium hypochlorite at 0,125% of active chlorine and reaching the total destruction of them at 0,5%. One minute of immersion of the contaminated petri dishes in sodium hypochlorite 0,5% of active chlorine was enough to eliminate 85% of the bacterial endospores and 15 minutes for a complete disinfestation of them.

Key words: *Pasteuria penetrans*, *Meloidogyne javanica*, disinfestation, sodium hypochlorite, endospores.

INTRODUÇÃO

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é um dos desinfetantes químicos mais usados por apresentar ampla ação antimicrobiana do componente Cl que atua contra vírus, algas, protozoários e bactérias (Hidalgo e Dominguez, 2000).

O efeito bactericida, bem como esporicida, do hipoclorito de sódio, em bactérias produtoras de esporos como *Bacillus subtilis*, já foi observado até mesmo em baixas concentrações de cloro ativo (Wyatt e Waites 1975; Bloomfield e Arthur, 1992), e o efeito letal sobre os esporos é exercido primeiramente pela degradação do córtex, seguido da remoção do material protoplasmático (Gorman et al., 1984).

A utilização do hipoclorito de sódio, como agente inativante em endósporos de *Pasteuria penetrans* (ex Thorne) Sayre e Starr, 1985, também foi relatado brevemente por Netscher e Duponnois (1998), por ser um método simples e econômico na inativação dessa bactéria.

Pasteuria penetrans é uma bactéria gram-positiva, formadora de endósporos e pseudo-micélio septado (Sayre e Starr, 1985) e muito estudada pelo seu grande potencial como agente de controle biológico do nematóide formador de galhas, *Meloidogyne* spp. (Stirling, 1984; Brown e Smart, 1985; Chen et al., 1996; Weibelzahl-Fulton et al., 1996; Tateishi, 1998; Freitas et al., 2000). Sua ação ocorre na esterilização de fêmeas, bem como na redução da infectividade dos juvenis nos sistemas radiculares de plantas hospedeiras (Mankau, 1975a; Sayre e Wergin 1977; Stirling, 1984; Davies et al., 1990).

Os endósporos dessa bactéria são estruturas unicelulares sem mobilidade, apresentam alta capacidade adesiva quando maduros e se fixam firmemente à cutícula, após o contato com o nematóide hospedeiro (Mankau, 1975; Stirling, 1991; Chen e Dickson, 1998).

Por apresentar alta capacidade adesiva, os endósporos também se aderem facilmente a vidros, plásticos e metais, o que pode provocar problemas de contaminações em utensílios laboratoriais (Hewlett e Serracin 1996), podendo contaminar outros experimentos livres de *P. penetrans* em casa de vegetação, caso esses endósporos não sejam devidamente inativados (Giannakou et al., 1997).

A inativação desses endósporos em materiais contaminados como vidrarias, peneiras de metal e pinças pode ser realizada através da autoclavagem (Hewlett e Serracin 1996). No entanto, esse método de esterilização não pode ser utilizado em materiais como tubos de plástico, peneiras e materiais graduados.

Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação direta de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações de cloro ativo sobre a adesão e a estrutura dos endósporos de *P. penetrans*, bem como o tempo necessário para desinfestar vidrarias contaminadas pela bactéria em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG, nos Laboratórios de Nematologia, Virologia, Patologia Florestal/Genética localizados no Núcleo de Biotecnologia aplicado à Agropecuária (BIOAGRO), Laboratório de Microscopia Eletrônica e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia.

Inóculo de *Pasteuria penetrans*. Foi utilizado como inóculo um isolado de *P. penetrans* (P 25), proveniente da Flórida, EUA, multiplicado em tomateiros infestados por *M. javanica*, cultivados em casa de vegetação. Fêmeas do nematóide infectadas por *P. penetrans* foram retiradas das raízes, colocadas em um tubo de ensaio contendo água, e maceradas com um bastão de vidro para obtenção de uma suspensão de endósporos que, posteriormente, foi calibrada com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio ótico para $8,1 \times 10^6$ endósporos/mL e armazenada em geladeira a 8°C até a sua utilização.

Inóculo de *Meloidogyne javanica*. Foi utilizada como inóculo uma população de *M. javanica* mantida em tomateiros, cultivados em casa de vegetação. Cortes perineais e eletroforese de isoenzimas foram realizados para confirmação do inóculo antes de sua multiplicação. Para obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2), utilizados nos ensaios, foi realizada a extração de ovos das raízes de tomateiros infectadas por *M. javanica* (Hussey e Barker, 1973), incubados em câmara de eclosão a 26°C e coletados a cada 24 horas.

1. Tratamento dos endósporos de *P. penetrans* com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações de cloro ativo

Neste ensaio, testou-se a ação direta do desinfetante hipoclorito de sódio P. A., 5 a 6% de cloro ativo sobre os endósporos de *P. penetrans* diluído em água a 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%, 0,03125%, 0,015625% e utilizou-se água destilada como testemunha. Também, avaliou-se o efeito do pH das respectivas soluções.

Para o tratamento dos endósporos, utilizaram-se, por tratamento, três tubos tipo Eppendorf com capacidade de 1,5 mL. Cada tubo recebeu 1 mL da suspensão aquosa de endósporos de *P. penetrans*, previamente calibrada, na concentração de $6,42 \times 10^6$ endósporos/mL. A suspensão foi centrifugada em microcentrífuga por 5 minutos a 14.000 g e, posteriormente, com o auxílio de uma pipeta automática, o sobrenadante de cada tubo foi descartado. O pelet de cada tubo, com os endósporos de *P. penetrans*, foi ressuscitado com 1 mL de hipoclorito de sódio em cada uma das concentrações. Para melhor homogeneização dos endósporos no respectivo tratamento, cada tubo foi agitado em agitador tipo vortex, em velocidade máxima, por aproximadamente dois minutos e, em seguida, homogeneizou-se também com pipeta automática até a completa diluição do pelet. Então, os tubos foram deixados em repouso, em contato com o desinfetante por 30 minutos.

A seguir, centrifugou-se novamente com a mesma velocidade e período de tempo, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de água destilada para fazer a lavagem dos endósporos, centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. O processo de lavagem dos endósporos foi repetido mais uma vez e, posteriormente, em cada tubo, os endósporos foram ressuscitados em 1 mL de água destilada.

O teste de adesão em J2 de *M. javanica* foi montado em placas de Petri de vidro com 5 cm de diâmetro, previamente autoclavadas por uma hora, em um delineamento inteiramente casualizado com sete repetições. Cada placa recebeu 6 mL de uma suspensão aquosa, contendo 1.000 J2 de *M. javanica* de até oito dias de idade e 0,52 mL da suspensão de endósporos previamente tratados na concentração de $2,48 \times 10^6$. A suspensão de cada placa com os J2 e endósporos foi agitada por três vezes com a pipeta automática e, manualmente, por mais ou menos um minuto foi deixada em repouso por, aproximadamente, 45 minutos. Então, o número de endósporos aderidos/J2 foi contado em 20 J2/placa escolhidos ao acaso, com auxílio de microscópio de objetiva invertida no aumento de 400X. As avaliações foram realizadas individualmente para cada tratamento com o objetivo de padronizar o período de repouso de 45 minutos/tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão não-linear (SAS System 8.0, SAS Institute, Cary, NC-USA).

2. Estudo morfológico dos endósporos de *P. penetrans*, após tratamento com hipoclorito de sódio

Para avaliar a ação do hipoclorito de sódio sobre a morfologia dos endósporos de *P. penetrans*, testou-se o produto P. A. 5 a 6% de cloro ativo diluído em água nas diluições de 0,5%, 0,25%, 0,125%, e utilizou-se apenas água destilada como testemunha. A pré-incubação dos endósporos de *P. penetrans* na solução do desinfetante foi realizada conforme descrita anteriormente, porém, apenas dois tubos tipo Eppendorf com capacidade de 1,5 mL, contendo 1 mL de $8,1 \times 10^6$ endósporos/mL, foram utilizados por tratamento e, após a última lavagem dos endósporos, o pelet de cada tratamento foi espalhado sobre quatro tiras de papel-filtro Whatman nº 1, de 4 x 7 mm e imersos imediatamente, em uma solução de tampão cacodilato de HCl 0,1M (pH 7,2) com 3% de glutaraldeído à temperatura de 4°C. Após 24 horas, cada amostra fixada foi lavada em solução tampão resfriada em geladeira de cacodilato por três vezes, durante 20 minutos cada e, em seguida, foi realizada a pós-fixação das amostras em solução tampão com 1% de tetróxido de ósmio por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Decorrido este período, as amostras foram lavadas três vezes durante 10 minutos cada, em solução tampão para remover o excesso do tetróxido de ósmio e, posteriormente, foram desidratadas em série alcoólica etanol de 30, 50, 70, 95 e 100% por 1 hora cada. A exposição ao etanol 100% foi repetida 3 vezes, porém, por apenas 45 minutos na última vez. Após a desidratação, as amostras foram imersas em hexamethyldisilane por 5 minutos e secas ao ar por 15 horas. Daí as amostras foram montadas em suportes de alumínio que receberam um revestimento de ouro, para posterior observação em microscópio eletrônico de varredura, onde avaliou-se a morfologia dos endósporos.

Para estudo sob microscópio ótico, os endósporos foram tratados conforme descrito anteriormente, porém o pelet de cada tratamento foi resuspenso em 0,5 mL de água e os endósporos, em suspensão, foram observados entre lâmina e lamínula, em microscópio ótico na objetiva de 100X em óleo de imersão. As imagens foram capturadas por uma câmara de vídeo acoplada ao microscópio e digitalizadas no computador.

3. Determinação do período necessário para desinfestar materiais contaminados com endósporos de *P. penetrans*, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo

Placas, artificialmente contaminadas com endósporos de *P. penetrans*, foram submersas em solução de hipoclorito de sódio, diluída a 0,5% de cloro ativo. Os períodos de imersão das placas foram: 1, 5, 10 e 15 minutos e a testemunha (sem imersão). Usou-se o experimento inteiramente casualizado com sete repetições.

Para promover a contaminação artificial das placas de vidro, previamente autoclavadas, foram colocados em cada placa 2,5 mL de uma suspensão de endósporos de *P. penetrans*, contendo 1×10^6 endósporos/mL e, posteriormente, as placas foram armazenadas dentro de bandejas e mantidas em temperatura ambiente de laboratório ($26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) até a secagem da suspensão. Após este período, as placas foram colocadas dentro de um recipiente de plástico com 500 mL da solução desinfetante de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo, e mantidas conforme o tempo preestabelecido para cada tratamento. Posteriormente, foram retiradas cuidadosamente da solução desinfetante, enxaguadas, individualmente, oito vezes com água corrente de torneira, para remoção do desinfetante e colocadas dentro de bandejas contendo papel-toalha para remover o excesso de água. Para o tratamento testemunha, as placas foram enxaguadas diretamente em água corrente de torneira.

Em seguida, cada placa recebeu 7 mL de uma suspensão aquosa, contendo 800 J2 de até três dias de idade, agitada manualmente, foi deixada em repouso por um período de 45 minutos. Decorrido este tempo, contou-se o número de endósporos aderidos/J2 em 20 J2 escolhidos ao acaso, com auxílio de microscópio de objetiva invertida no aumento de 400X. Os dados foram submetidos à análise de regressão não-linear (SAS System 8.0, SAS Institute, Cary, NC-USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Tratamento dos endósporos de *P. penetrans* com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações de cloro ativo

A exposição dos endósporos a baixas concentrações de cloro ativo, na forma de hipoclorito de sódio, entre 0,015625 e 0,0625%, resultou em altos valores de adesão entre 24 e 17 endósporos/J2 de *M. javanica*, semelhantes à média de adesão com endósporos tratados apenas em água (Figura 4). Porém, a adesão dos endósporos aos J2 de *M. javanica* foi afetada drasticamente, à medida que se aumentavam as concentrações de cloro ativo do desinfetante, a partir da diluição de 0,125%. Quase nenhum endósporo tratado com 0,25 e 0,5% de cloro ativo aderiu aos J2.

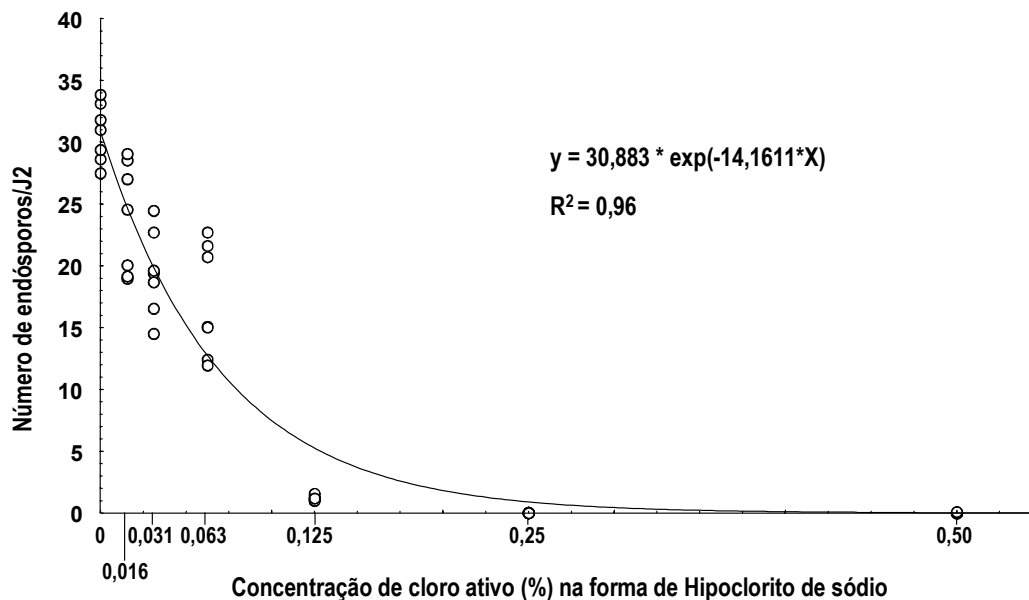


Figura 4 - Número de endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos em juvenis de *Meloidogyne javanica* após tratamento com hipoclorito de sódio, a diferentes concentrações de cloro ativo por um período de 30 minutos. (Dados de sete repetições provenientes de 20 J2 cada).

Essa redução na adesão dos endósporos de *P. penetrans* pré-tratados com hipoclorito de sódio, principalmente, entre 0,125 e 0,5% de cloro ativo, ocorreu, possivelmente, pela ação do cloro do desinfetante sobre as proteínas presentes na superfície dos endósporos de *P. penetrans*, envolvidas no mecanismo de adesão à cutícula do nematóide hospedeiro (Davies et al., 1992; Esnard, et al., 1997). A diminuição da adesão de endósporos de *P. penetrans*, em função da desnaturação de componentes do endósporo como glicoproteínas e peptidoglicanos já foi sugerida por Davies e Danks (1993), quando pré-incubaram endósporos de *P. penetrans* em proteinase K, e posteriormente colocaram em contato com J2 de *M. incognita*. Freitas et al. (1997) também sugeriram que a redução na adesão de endósporos de *P. penetrans* em *M. arenaria*, após serem expostos ao calor, foi devido à desnaturação ou a solubilização de N-Acetilglucosamina ou moléculas similares presentes nas superfícies dos endósporos responsáveis pela adesão.

A remoção de proteínas da camada de espora de outras bactérias como *Clostridium bifermentans*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* pela ação do cloro já foi relatada por Wyatt e Waites (1975), quando trataram esporos dessas bactérias em 1 mL de hipoclorito de sódio com 10 mg de cloro livre. Bloomfield e Arthur (1992) e Gorman et al. (1984) também relatam a extração de proteínas da camada do espora de *B. subtilis*, bem como de peptidoglicanos do córtex pela ação solubilizante do hipoclorito de sódio. Tal processo deve ter ocorrido neste ensaio e, provavelmente, também deve ter afetado a morfologia dos endósporos, quando eles foram pré-incubados nas concentrações entre 0,125 e 0,5% de cloro ativo, principalmente.

A diminuição na adesão dos endósporos de *P. penetrans* aos J2 de *M. javanica*, após o pré-tratamento em diferentes concentrações de cloro ativo, não está relacionada com a faixa de pH das respectivas soluções (Tabela 2).

As soluções de hipoclorito de sódio apresentaram pH entre 10,7 e 12,0, mesmo assim o pré-tratamento dos endósporos, em baixas concentrações de cloro ativo, resultaram em médias altas de adesão, semelhantes aos endósporos tratados somente em água (pH 5,8). Porém, quando se comparou o pH das soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações 0,0625 e 0,125% de cloro ativo, os valores de pH foram muito próximos (11,1 e 11,4,

Tabela 2 - Nível de pH das soluções de hipoclorito de sódio, com diferentes concentrações de cloro ativo, utilizadas para o tratamento dos endósporos de *Pasteuria penetrans*.

Tratamento (% de cloro ativo)	pH
0,5	12,0
0,25	11,8
0,125	11,4
0,0625	11,1
0,03125	11,1
0,015625	10,7
Testemunha água destilada	5,8

respectivamente), mas mesmo assim houve uma queda na redução da adesão de 45% para 96%, respectivamente, nas duas concentrações. Apesar de haver muitos trabalhos sobre os efeitos de pH na adesão dos endósporos de *P. penetrans* (O'Brien, 1980; Davies et al., 1988; Ratnasoma e Gowen, 1996; Orui, 1997), os resultados, quanto ao nível de pH ideal, para que ocorra o máximo de adesão, são diversos e difíceis de serem interpretados, o que nos leva a crer, portanto, que a diminuição da adesão dos endósporos aos J2 de *M. javanica*, após o pré-tratamento com o hipoclorito de sódio, não está relacionado com o pH das respectivas soluções, mas com o aumento da concentração do cloro ativo que afetou, gradualmente, a estrutura dos endósporos de *P. penetrans*.

2. Estudo morfológico dos endósporos de *P. penetrans*, após tratamento com hipoclorito de sódio

O estudo morfológico dos endósporos de *P. penetrans*, em microscópio óptico e de varredura, após o pré-tratamento em diferentes concentrações de cloro ativo, demonstrou que o desinfetante afetou drasticamente os endósporos de *P. penetrans*, principalmente a partir de 0,25% de cloro ativo (Figuras 5 e 6).

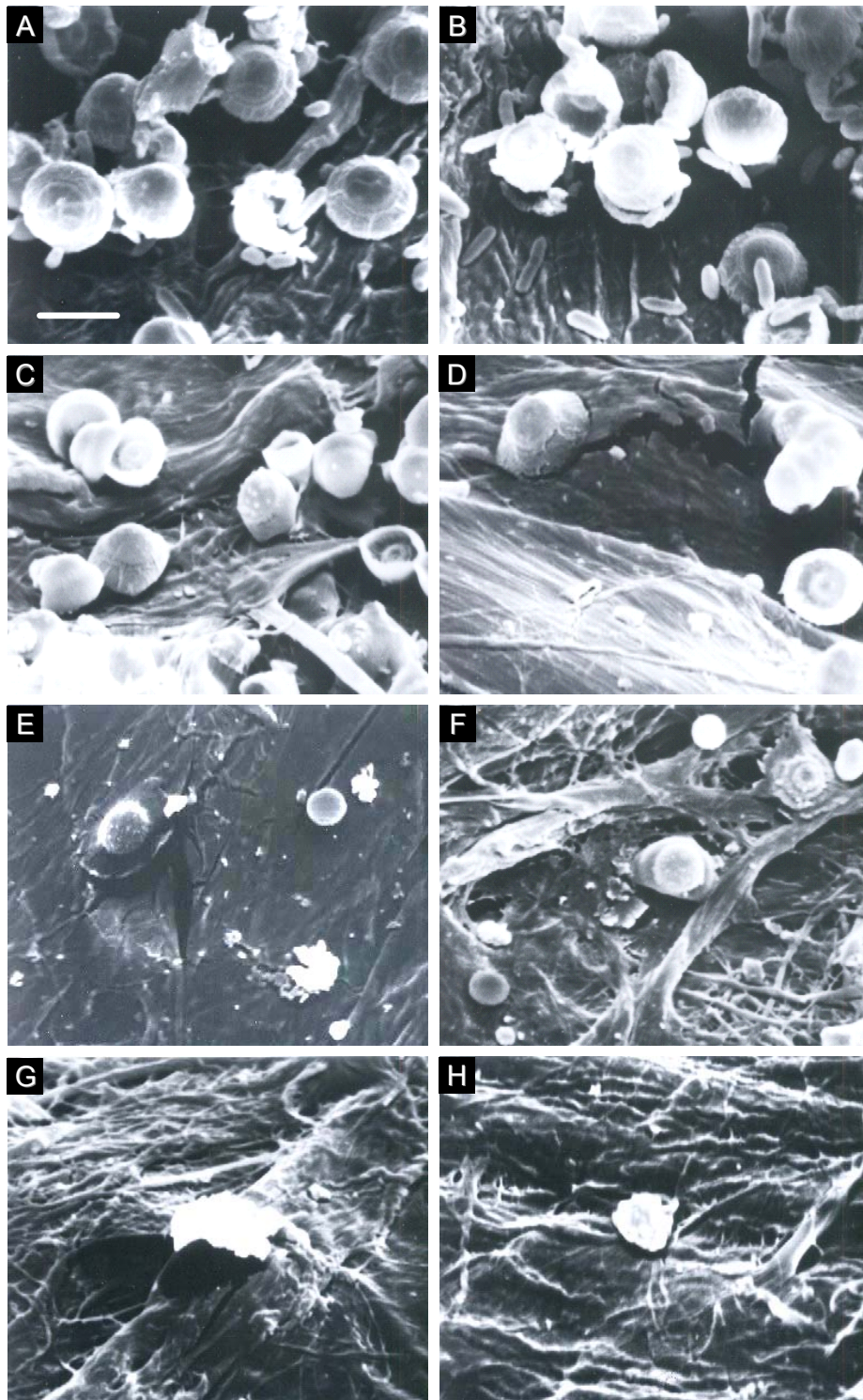


Figura 5 - Fotomicrografias de varredura de endósporos de *Pasteuria penetrans*, após o pré-tratamento por 30 minutos, em solução de hipoclorito de sódio com diferentes concentrações de cloro ativo. A/B: endósporos tratados somente em água; C/D, E/F, G/H: endósporos tratados com 0,125%, 0,25% e 0,5% de cloro ativo, respectivamente. A barra representa 2 μ m.

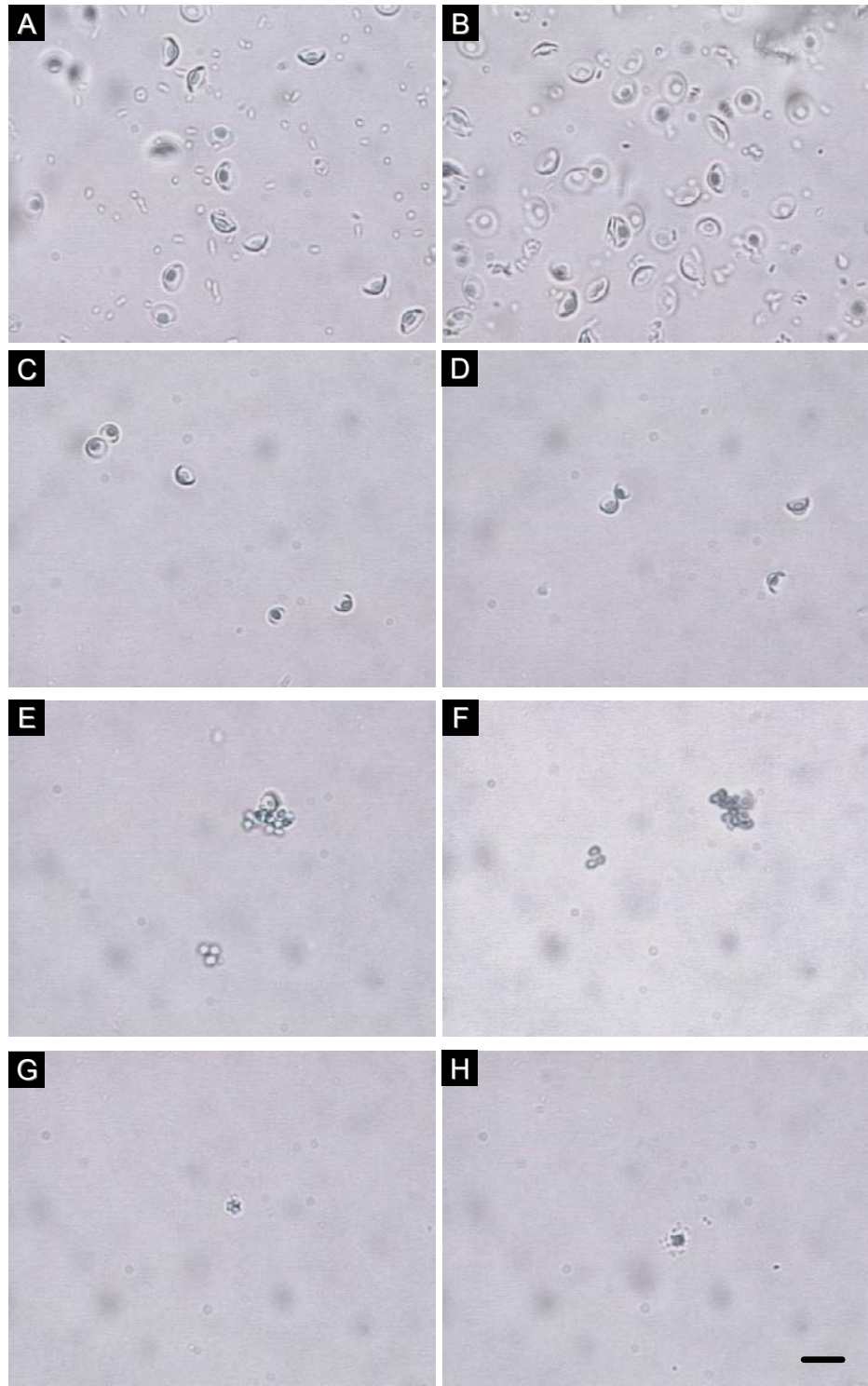


Figura 6 - Fotomicrografias ótica de endósporos de *P. penetrans*, após o pré-+ de cloro ativo. A/B: endósporos tratados somente em água; C/D, E/F, G/H: endósporos tratados com 0,125%, 0,25% e 0,5% de cloro ativo, respectivamente. A barra representa 2 μ m.

À medida que se aumentou a concentração de 0,125 para 0,25% de cloro ativo, observou-se, em microscopia ótica, que a maioria dos endósporos eram aparentemente menores e de coloração mais escura. A 0,5%, praticamente, nenhum endósporo foi observado aderido aos J2 de *M. javanica*. Tal fato foi confirmado quando foi feito o estudo morfológico dos endósporos em microscópio eletrônico de varredura, após o pré-tratamento dos mesmos, nas respectivas concentrações.

Nas amostras de 0,25% de cloro ativo, observou-se que a quantidade de endósporos foi reduzida e a maioria apresentava somente a sua parte central (Figuras 5 e 6 E e F). Nos endósporos que ainda apresentavam as fibras parasporais, estas estavam retorcidas e menores que as dos endósporos da testemunha. Na concentração 0,5%, não se visualizou praticamente nenhum endósporo típico em microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, estruturas semelhantes a aglomerados de endósporos destruídos foram observadas (Figura 5 G e H), assim como em microscopia ótica (Figura 6 G e H). Já o pré-tratamento dos endósporos na concentração 0,125% de cloro ativo não diminuiu drasticamente o número de endósporos presentes nas amostras (Figuras 5 e 6 C e D), mas observou-se que o hipoclorito de sódio afetou os endósporos de *P. penetrans*, pois as fibras parasporais dos endósporos estavam levemente inclinadas e os endósporos eram menores, quando comparados aos endósporos não-tratados. Essas deformidades explicam porque a adesão dos endósporos, no ensaio anterior, a partir dessa concentração, foi reduzida drasticamente.

O hipoclorito de sódio, em concentrações menores do que 0,125% de cloro ativo, provavelmente não dissolveu ou desnaturou as proteínas específicas, presentes na superfície dos endósporos, a ponto de impedir a adesão dos mesmos. Nas concentrações mais elevadas de cloro ativo, entre 0,25 e 0,5%, ocorreu a ruptura do esporângio, exósporo e fibras parasporais, os quais compõem a camada externa do endósporo (Figura 5 E a H). Ao avaliar as amostras, observou-se que a total dissolução dos endósporos ocorreu na concentração 0,5%, o que explica a ausência dos mesmos nessa concentração, assim como a adesão dos endósporos aos J2 de *M. javanica*.

O efeito do hipoclorito de sódio sobre esporos de outras bactérias como *Clostridium bifermentans*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* já foi relatado

por Wyatt e Waites (1975). Gorman et al. (1984) avaliaram o efeito do hipoclorito de sódio sobre todos os componentes do esporo de *B. subtilis* e observaram que o hipoclorito de sódio, além de promover a degradação das camadas mais externas do esporo, provocou também a ruptura do córtex, fazendo com que ocorresse a remoção do material protoplasmático, o que inativou a germinação do esporo. A simples solubilização ou desnaturação das proteínas presentes nas superfícies dos endósporos, assim como a remoção da camada externa dos endósporos nas concentrações entre 0,125 e 0,25% de cloro ativo, já foram suficientes para reduzir drasticamente o número de endósporos/J2 de *M. javanica*. A adesão dos endósporos ao nematóide hospedeiro é a primeira fase do processo de infecção desta bactéria (Stirling e Wachtel, 1980), o que indica que o hipoclorito de sódio, mesmo em baixas concentrações, é um potente agente inativante dos endósporos de *P. penetrans*.

Apesar de o hipoclorito de sódio, nas concentrações 0,25 e 0,5% de cloro ativo, ter apresentado o mesmo efeito na redução da adesão dos endósporos de *P. penetrans*, a concentração 0,5% inativou todos os endósporos em todos os ensaios realizados nessa concentração, o que não ocorreu na concentração a 0,25%. A maior concentração apresenta mais segurança na hora de desinfestar materiais contaminados com *P. penetrans*. A 0,25% de cloro ativo, cutículas de fêmeas secas e retorcidas, abrigando endósporos no seu interior, possivelmente não são removidas e podem ser fonte de contaminação.

3. Determinação do período necessário para desinfestar materiais contaminados com endósporos de *P. penetrans* em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo.

Apenas 1 minuto de contato das placas contaminadas com a solução desinfetante foi suficiente para que 85% dos endósporos fossem eliminados, reduzindo, assim, a adesão, mas não por completo (Figura 7). A desinfestação total das placas ocorreu aos 15 minutos de contato com a solução desinfetante.

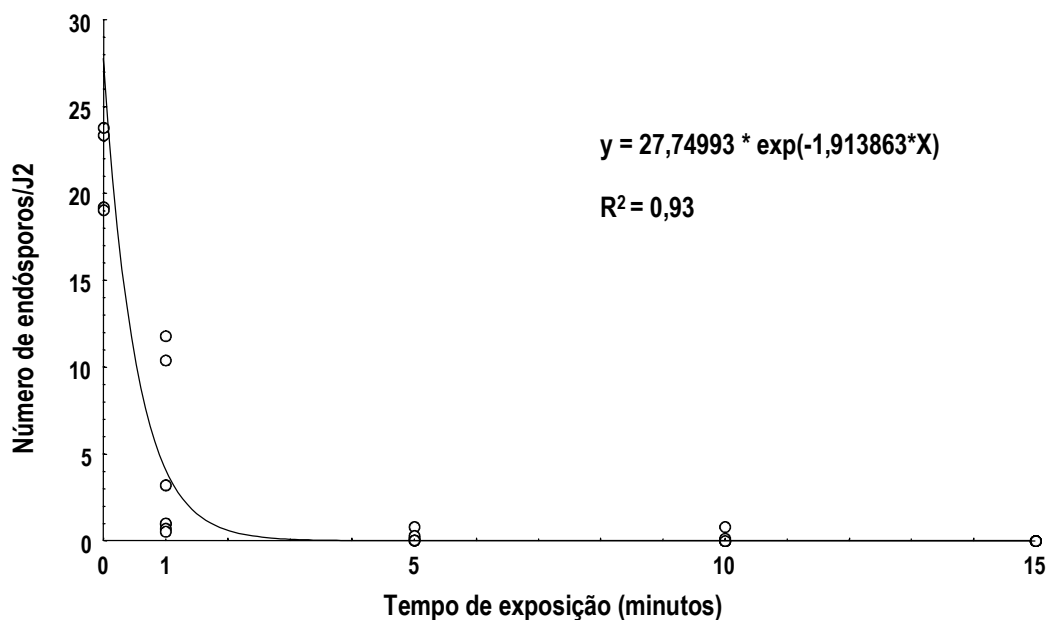


Figura 7 - Número de endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos em juvenis de *Meloidogyne javanica*, após serem submetidos ao desinfetante hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo por diferentes períodos de exposição. (Dados de sete repetições provenientes de 20 J2 cada).

A eficácia do hipoclorito de sódio, em promover a inativação em um curto período de tempo, foi relatada também por Motta et al. (2001), quando testaram o desinfetante em esporos de *B. stearothermophilus*. Bloomfield e Arthur (1992) constataram a morte de mais de 99% dos esporos de *B. subtilis*, após serem pré-tratados por apenas 5 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,002% de cloro ativo. A eliminação e, conseqüentemente, a redução na adesão dos endósporos de *P. penetrans* ter ocorrido depois de um minuto de contato apenas, na solução, possivelmente foi devido à solubilização ou desnaturação parcial das proteínas presentes na superfície dos endósporos. Segundo Matoba et al. (1985), o hipoclorito de sódio, entre as concentrações 0,005 e 0,5% de cloro ativo, promove a polimerização da proteína α_{s-1} caseína em apenas 5 minutos de contato. Esta polimerização foi mais rápida em função da maior concentração do produto e do tempo de exposição. Assim, neste experimento, é possível que 5 minutos devam ser necessários para que ocorra

a remoção da camada externa dos endósporos (Figuras 5 e 6 E a H), o que explica a redução na adesão aos J2 de *M. javanica*.

Apesar de Netscher e Duponnois (1998) já terem relatado brevemente que o hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo é uma ótima alternativa para desintestar materiais contaminados com endósporos de *P. penetrans*, os resultados obtidos neste ensaio demonstraram claramente quais foram os efeitos do hipoclorito de sódio sobre os endósporos de *P. penetrans*.

Conclui-se, portanto, que mesmo em baixas concentrações de cloro ativo, o hipoclorito de sódio é um potente agente inativante de endósporos de *P. penetrans*, uma vez que afetou a estrutura dos mesmos e, conseqüentemente, reduziu a adesão aos J2 de *M. javanica*, sendo que a concentração a 0,5% de cloro ativo é recomendada para desinfestar utensílios laboratoriais, contaminados com endósporos de *P. penetrans*, pois, além de dissolver os endósporos, promoveu também a total remoção de carcaças de fêmeas secas e retorcidas, que poderão abrigar endósporos no seu interior e, possivelmente, serem fontes de contaminação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOOMFIELD, S.F., ARTHUR, M. Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine-T. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.166-172. 1992.
- BROWN, S.M., SMART, G.C.Jr. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.17, n.2, p.123-126. 1985.
- CHEN, Z.X., DICKSON, D.W. Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. **Journal of Nematology**, v.30, n.3, p.313-340. 1998.
- CHEN, Z.X., DICKSON, D.W., McSORLEY, R., MITCHELL, D.J., HEWLETT, T.E. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, v.28, n.2, p.159-168. 1996.
- DAVIES, K.G., DANKS, C. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.39, p.53-64. 1993.
- DAVIES, K.G., FLYNN, C.A., LAIRD, V., KERRY, B.R. The life-cycle, population dynamics and host specificity of a parasite of *Heterodera avenae*, similar to *Pasteuria penetrans*. **Revue Nématologie**, v.13, n.3, p.303-309. 1990.
- DAVIES, K.G., KERRY, B.R., FLYNN, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, v.112, p.491-501. 1988.
- DAVIES, K.G., ROBINSON, M.P., LAIRD, V. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.59, p.18-23. 1992.
- ESNARD, J., McCLURE, M.A., DICKSON, D.W., HEWLETT, T.E., ZUCKERMAN, B.M. Effects of monoclonal antibodies, cationized ferritin, and other organic molecules on adhesion of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, v.29, n.4, p.556-564. 1997.
- FREITAS, L.G., DICKSON, D.W., MITCHELL, D.J., McSORLEY, R. Suppression of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans* in the field. **Nematologia Brasileira**, v.24, n.2, p.147-156. 2000.
- FREITAS, L.G., MITCHELL, D.J., DICKSON, D.W. Temperature effects on the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race1. **Journal of Nematology**, v.29, n.4, p.547-555. 1997.

- GIANNAKOU, I.O., PEMBROKE, B., GOWEN, S.R., DAVIES, K.G. Effects of long term storage and above normal temperatures on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, v.43, p.185-192. 1997.
- GORMAN, S.P., SCOTT, E.M., HUTCHINSON, E.P. Hypochlorite effects on spores and spore forms of *Bacillus subtilis* and on a spore lytic enzyme. **Journal of Applied Bacteriology**, v.56, p.295-303. 1984.
- HEWLETT, T. E., SERRACIN, M. *Pasteuria* spp. agente de control biológico de nemátodos fitoparasitos: **Manual de técnicas**. Corbana, v.21, n.46, p.151-161. 1996.
- HIDALGO, E., DOMINGUEZ, C. Growth-altering effects of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts. **Life Sciences**, v.67, p.1331-1344. 2000.
- HUSSEY, R.S., BARKER, K.R. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028. 1973.
- MANKAU, R. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.26, p.333-339. 1975.
- MATOBA, T., SHIONO, T., KITO, M. Cross-Linking of α_{s-1} casein by sodium hypochlorite. **Journal of Food Science**, v.50, p.1738-1741/1744. 1985.
- MOTTA, P.G., FIGUEIREDO, C.B., MALTOS, S.M., NICOLI, J.R., SOBRINHO RIBEIRO, A.P., MALTOS, K.L., CARVALHAIS, H.P. Efficacy of chemical sterilization and storage conditions of gutta-percha cones. **International Endodontic Journal**, v.34, n.6, p.435-439. 2001. (Abstract).
- NETSCHER, C., DUPONNOIS, R. Use of aqueous suspensions for storing and inoculating spores of *Pasteuria penetrans*, parasite of *Meloidogyne* spp.. **Nematologica**, v.44, p.91-94. 1998.
- O'BRIEN, P. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.12, n.4, p.234. 1980.
- ORUI, Y. Effect of spore sonication on attachment and host-attachment range of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode. **Applied Entomology Zoology**, v.32, n.1, p.101-107. 1997.
- RATNASOMA, H.A., GOWEN, S.R. Spore attachment of *Pasteuria penetrans* on juveniles of *Meloidogyne incognita* as affected by pH and organic matter. **Nematologia Mediterranea**, v.24, p.283-285. 1996.

]

- SAYRE, R.M., STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.52, n.2, p.149-165. 1985.
- SAYRE, R.M., WERGIN, W.P. Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, v.129, n.2, p.1091-1101. 1977.
- STIRLING, G.R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. Wallingford: CAB International, 1991. 282p.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, v.74, n.1, p.55-60. 1984.
- STIRLING, G.R., WACHTEL, M.F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. **Nematologica**, v.26, p.308-312. 1980.
- TATEISHI, Y. Suppression of *Meloidogyne incognita* and yield increase of sweet potato by field application of *Pasteuria penetrans*. **Japanese Journal of Nematology**, v.28, n.1/2, p.22-24. 1998.
- WEIBELZAHN-FULTON, E., DICKSON, D.W., WHITTY, E.B. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. **Journal of Nematology**, v.28, n.1, p.43-49. 1996.
- WYATT, L.R., WAITES, W.M. The effect of chlorine on spore *Clostridium bifermentans*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. **Journal of General Microbiology**, v.89, p.337-344. 1975.

CONCLUSÕES GERAIS

O desinfetante formol a 10% preveniu a reprodução de *P. penetrans*, mas os endósporos, mesmos mortos, aderiram-se aos J2 de *M. javanica*, o que pode afetar a infectividade dos J2 e, conseqüentemente, invalidar resultados em experimentos que não consideram a bactéria.

Os antibióticos Penicilina, Estreptomicina e Cloranfenicol a 200 mg/mL não afetaram a adesão nem a reprodução de *P. penetrans*, o que sugere, portanto, que a presença de resíduos desses antibióticos no substrato não irão afetar a multiplicação de *P. penetrans*.

O desinfetante mais efetivo foi o hipoclorito de sódio pois, mesmo em baixas concentrações de cloro ativo, mostrou-se um potente agente inativante de endósporos de *P. penetrans*, afetando a estrutura dos mesmos e reduzindo a adesão aos J2 de *M. javanica*.

Solução de hipoclorito de sódio, na concentração a 0,5% de cloro ativo, apresentou maior eficiência na desinfestação de utensílios com endósporos de *P. penetrans*, pois promoveu a total dissolução dos mesmos em apenas 30 minutos.

A utilização de solução hipoclorito de sódio para desinfetar materiais contaminados com endósporos de *P. penetrans* é uma ótima alternativa para ser utilizado rotineiramente em laboratórios que trabalham com essa bactéria, por ser um método simples seguro e econômico.