Ocorrência e distribuição de **Chromobacterium violaceum** (Schroeter) Bergonzini 1881, na Amazônia Central

Vera Lucia M. dos Santos Guarim (*)

Resumo

Foi estudada a ocorrência de **Chromobacterium violaceum** em 67 amostras de água superficial de rios, lagos e igarapés da Amazônia Central. Os corpos de água investigados representam os 3 tipos de água da região, propostos por Sioli (1965). Verificou-se a presença dessa bactéria em 45 (67,16%) das 67 amostras, distribuídas por 15 (75%) das 20 amostras de água clara, 21 (65,6%) das 32 amostras de água preta e 9 (60%) das 15 amostras de água branca.

Introdução

Chromobacterium violaceum é um microrganismo de gênero de filiação incerta da 8ª parte do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan & Gibbons, 1974). É um bastonete Gram-negativo, 0,6-0,9 por 1,5-3μm; possuindo motilidade flagelar, polar e lateral, não formando esporos. É essencialmente heterotrófica, utilizando compostos orgânicos como nutrientes. Esse microrganismo é comum em água e solo de regiões tropicais e ocasionalmente causa infecções no homem. Na literatura estão registrados 16 casos fatais por *Chromobacterium violaceum*, 9 dos quais em crianças (Ognibene & Thomas, 1970).

Desenvolve-se muito bem em um meio comum de peptona, é anaeróbio facultativo, desde que haja disponibilidade de nutrientes adequados. Mesófilos, com ótimo de temperatura situado entre 30°C e 35°C, mínimo entre 10-15°C, máximo 40°C.

A falta quase completa de informações sobre a ocorrência e distribuição de *Chromobacterium violaceum* não deve ser devida à dificuldade no reconhecimento da mesma, pois esta bactéria é facilmente visualizada por formar colônias roxas, muito características. Essa ausência de dados parece ser, provavelmente, devida à falta de métodos adequados para o isolamento e também ao fato de que são poucos os que estudam e pesquisam o assunto, em áreas tropicais. Produz um pigmento, a violaceína, caracterizado por ser insolúvel na água e no clorofórmio porém solúvel em acetona e álcool etílico, dando uma solução violeta. O teste para comprovar a violaceína em cultura pura é simples e as reações obtidas são características, não se encontrando em qualquer outro pigmento bacteriano (Sneath, 1966).

Na bacia amazônica, *Chromobacterium violaceum* tem sido encontrada nos rios, lagos, igarapés e na água tratada de consumo das cidades.

Neste trabalho, procurou-se estabelecer a ocorrência e distribuição geográfica de *Chromobacterium violaceum* nas águas da Amazônia Central.

Material e métodos

Em 67 amostras de águas superficiais de rios, lagos e igarapés da Amazônia, foi estudada a ocorrência de *Chromobacterium violaceum*. As amostras foram classificadas como de água preta, branca ou clara, de acordo com as características físico-químicas

Baseado em resultados obtidos de uma série de experimentos anteriores (Skerman, (1967), foi usado o meio Plate Count Agar (Tryptone, Glucose Yeast Agar), que é um agar nutritivo onde o organismo cresce muito bem e cuja composição é: Glicose 1,0g, Peptona-Tryptone 5,0g, Yeast extract 2,5g, Agar 15,0g, água destilada 1000ml e pH7,0 ± 0,1.

A inoculação foi feita pelo método de filtração, usando filtros de membrana Sartorius SM 14005, 0(2 μ de porosidade e 50m de diâ-

(*) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

metro, ou com inoculação de 1 ml da amostra, diretamente sobre o meio de cultura nas placas American Public Health Association, (1971). As placas assim preparadas foram incubadas a 37°C e após 24 horas contavam-se as colônias de *Chromobacterium violaceum*, caracterizadas pela cor roxa intensa, forma circular, lisas, algumas vezes rugosas, não gelatinosas. Normalmente, as colônias apareceram isoladas .Em alguns casos, apareceram colônias contaminadas por outros microrganismos. Nestes casos, as amostras só foram consideradas positivas quando através de repiques era obtida uma cultura pura.

Foram testadas cepas encontradas no sistema de distribuição de água das cidades de Manaus e Belém, para verificar a resistência ao sulfato de alumínio e cloro. Para o teste de resistência ao sulfato de alumínio e cloro, utilizou-se uma solução-estoque de 2% de sulfato de alumínio (Usina Colombiana), em diluição de

$$\frac{1}{10}, \frac{1}{100}, \frac{1}{1000} \text{ e } \frac{1}{10000}.$$

Para o cloro, utilizou-se o HTH cloro seco (Olin Química Ltda.) em diluição de

$$\frac{1}{10}, \frac{1}{100}, \frac{1}{1000} \text{ e } \frac{1}{10000}.$$

Para verificar o efeito do pH do substrato sobre o crescimento bacteriano, foram feitos experimentos triplicados em Nutrient broth, basic nutrient media (Cowan & Stell, 1965), com pH variando de 3,5-8,5. Utilizou-se 10ml por tubo da solução nutritiva, esterilizada e os tubos inoculados em estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, os tubos foram analisados, relacionando o índice de crescimento com a absorção de luz em electrofotômetro ELKO II, com filtro S42E. Para zeragem do aparelho, utilizou-se o meio estéril e as diferenças de absorção e transmitância foram relacionados com crescimento e pH.

Foi determinado o pH das águas pelo pH meter-Model LS, Sargent Welch e anotado o tipo de água de todas as amostras na ocasião da coleta, segundo as características dadas por Sioli (1965).

Resultados e discussões

A maior percentagem de amostras positivas foi encontrada na *água clara*, seguindo-se a *água preta* e com menor índice, a *branca*. Na Tabela I são apresentados os resultados das contagens de colônias de *Chromobacterium violaceum* (Fig. 1) nas 67 amostras de águas estudadas.

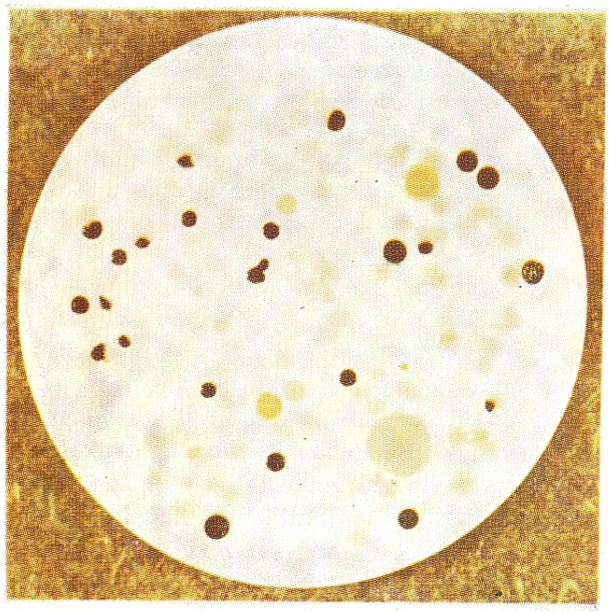

Fig. 1 — Aspecto das colônias de **Chromobacterium violaceum** em filtro de membrana.

Verifica-se em primeiro lugar, a presença de *Chromobacterium violaceum* em 45 (67,16%) das amostras, sendo que 15 (75,00%) das 20 amostras de água clara, 21 (65,625%) das 32 amostras de água preta e 9 (60,00%) das 15 amostras de água branca apresentavam a referida bactéria.

A Fig. 2 mostra comparativamente o efeito de água sobre o percentual de amostras positivas. Paralelamente, o número de colônias de *Chromobacterium violaceum* encontrado nas amostras de água, apresenta maior número na água clara, com uma média de 6,7 colônias por ml, seguindo-se a água preta com uma média de 6,1 colônias por ml e por último, a água branca que apresenta uma média de 3,1 colônias por ml (Fig. 3).

TABELA I — Ocorrência de Chromobacterium violaceum **em 67 amostras de água nos corpos d'água do Amazônia Central**

Amostra	Mês	Local	Rio principal	Tipo de água	Colônias de **C. violaceum** por ml	pH
1	Fevereiro	Lago Anamã	Solimões	preta	2	5.6
2	"	" Anori	"	"	0	5.2
3	"	" Bacuri	Negro	"	1	6.2
4	"	" Caapiranga	Solimões	"	0	6.0
5	"	" Calado	"	"	0	6.2
6	"	" Cacau-Pirera	Negro	"	3	5.8
7	"	" Guedes	"	"	5	4.8
8	"	" Grande de Manacapuru	Solimões	"	0	5.4
9	"	" Jacaré	"	clara	0	6.8
10	"	" Jaraqui	Negro	preta	6	4.6
11	"	" Miriti	Solimões	clara	0	6.8
12	"	Rio Moju	Curuá-Una	preta	7	5.4
13	"	Lago Muratu	Solimões	"	0	4.8
14	"	" Mururé	Purus	"	0	5.5
15	"	" Pacova	Solimões	branca	2	7.1
16	"	" Passarinho	"	"	3	6.9
17	"	" Piranha	"	"	0	7.0
18	"	Rio Purus	"	"	3	5.0
19	"	" Tarumã-mirim	Negro	preta	1	4.4
20	"	Lago Surara	Purus	"	0	4.6
21	"	" Xiborema	Solimões	branca	2	7.0
22	Março	Rio Curuá-Una	Amazonas	clara	2	6.4
23	"	" Jutaí	Solimões	preta	0	6.0
24	"	" Juruá	"	branca	0	7.1
25	"	" Mojuí	Curuá-Una	preta	1	5.6
26	"	" Solimões	Amazonas	branca	2	7.5
27	"	" Tefé	Solimões	preta	0	6.6
28	"	" Uarini	"	"	6	6.1
29	Abril	Lago Cristalino	Negro	clara	6	5.3
30	"	Rio Aripuanã	Madeira	"	3	6.7
31	"	" Aripuanã (depois da cachoeira das Andorinhas)	"	"	12	7.2
32	"	Córrego da cachoeira das Andorinhas	"	"	3	7.1
33	"	Rio Aripuanã (depois da cachoeira de Dardanelos)	"	"	Incontáveis	7.1
34	"	" Aripuanã (igapó)	"	"	7	7.1
35	"	" Aripuanã (igarapé)	"	preta	10	6.6
36	"	" Aripuanã (baía)	"	"	4	6.8
37	"	Córrego da Floresta na estrada da Pocilga	Aripuanã	clara	37	7.2
38	"	Cachoeira que é captada para a Pocilga	"	"	9	7.3
39	"	Igarapé Cuxiual	"	"	1	7.0
40	"	Lago Grande do Manaquiri	Solimões	branca	0	6.9
41	Junho	" S. Sebastião	"	preta	3	8.1
42	Julho	Rio Cuieiras	Negro	"	0	5.8
43	"	Lago Manacapuru	Solimões	clara	1	6.6
44	"	Rio Negro	Amazonas	preta	28	6.2
45	Agosto	Lago Aleixo	"	branca	12	6.8
46	"	" Baixio	Solimões	"	0	6.5
47	"	Rio Camanau	Negro	preta	3	4.8
48	"	Lago Grande Jutaí	Solimões	clara	0	6.3

TABELA I — (Continuação)

Amostra	Mês	Local	Rio principal	Tipo de água	Colônias de **C. violaceum** por ml	pH
49	"	" Jacaretinga	"	branca	0	6.4
50	"	" Janauari	Negro	"	1	5.5
51	"	Rio Jau	"	preta	0	5.0
52	"	Lago Muru-muru	Solimões	clara	0	6.5
53	"	" Patos	"	"	0	6.3
54	"	" Tupé	Negro	preta	8	5.8
55	Setembro	Rio Abonari	"	"	20	4.5
56	"	Igarapé do Acará	"	"	9	4.8
57	"	" Barro Branco	"	"	4	4.9
58	"	Rio Branquinho	"	branca	2	6 5
59	"	" Jundiá	"	preta	1	4.9
60	Outubro	Lago Água Preta	Guamá	clara	5	5.6
61	"	" Bolonha	"	"	3	6.0
62	"	" Estábulo	"	"	4	5.8
63	"	Rio Guamá	Amazonas	"	3	6.2
64	"	Lago dos Reis	"	branca	0	6.6
65	Dezembro	" Aruaú	Negro	preta	3	4.8
66	"	" Castanho	Solimões	branca	1	7.3
67	"	Igarapé do Paraná da Terra Preta	Negro	preta	5	4.5

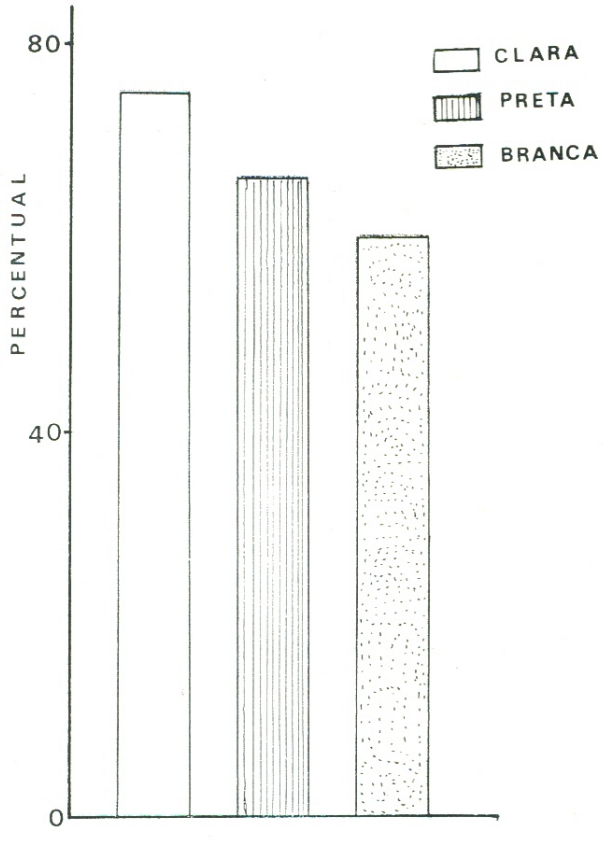

Fig. 2 — Efeito de tipos de águas na Amazônia na ocorrência de **Chromobacterium violaceum.**

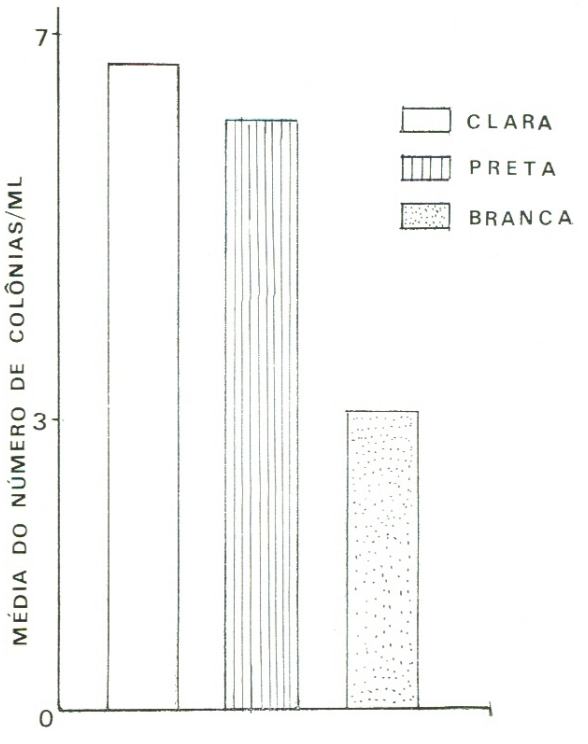

Fig. 3 — Média do número de colônias/ml de **Chromobacterium violaceum** encontrado nas águas da Amazônia

Chromobacterium violaceum não é uma bactéria muito exigente para desenvolver-se em meios de cultura e tolera valores variados de pH, crescendo em meios com pH variando desde 4,4 à 8,8, sendo que em 5,8, atinge o melhor crescimento (Fig. 4).

Das amostras de água coletadas, notou-se a presença de *Chromobacterium violaceum* nas águas com pH de 4,4 a 8,4, porém, o maior percentual de amostras positivas foi na faixa de 5,5 — 6,9 (Fig. 5).

Um outro resultado a comentar é a resistência da bactéria à presença de sulfato de alumínio e ao cloro, que são os elementos usados para o tratamento de águas nas cidades de Belém e Manaus. Verificou-se que a partir da diluição de $\frac{1}{100}$ da solução estoque de 2% de sulfato de alumínio, a bactéria começa a desenvolver-se, o mesmo ocorrendo com a diluição de cloro. Em soluções mais concentradas ($\frac{1}{1}$, $\frac{1}{10}$) não se obteve desenvolvimento observável.

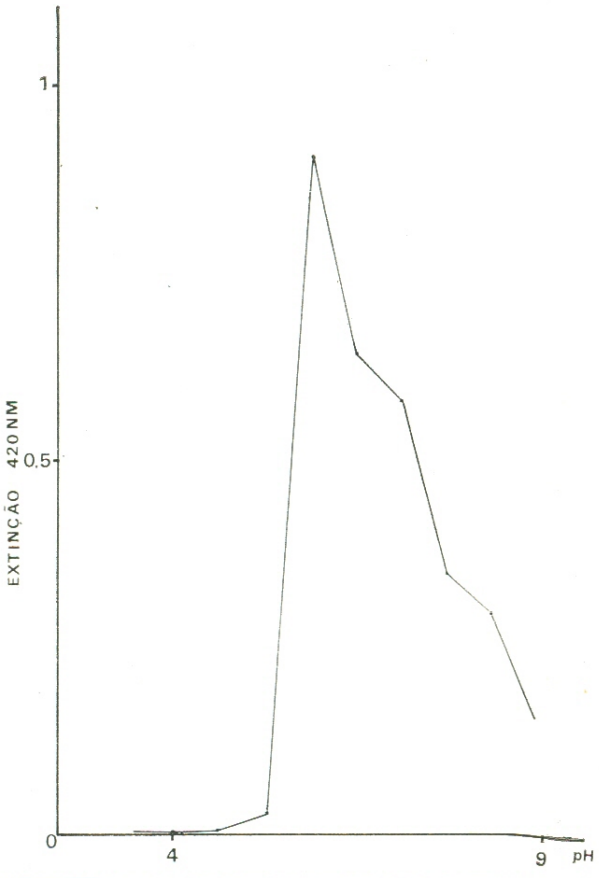

Fig. 4 — Relação do pH com a extinção dada pelo crescimento de **Chromobacterium violaceum** (média de três experimentos).

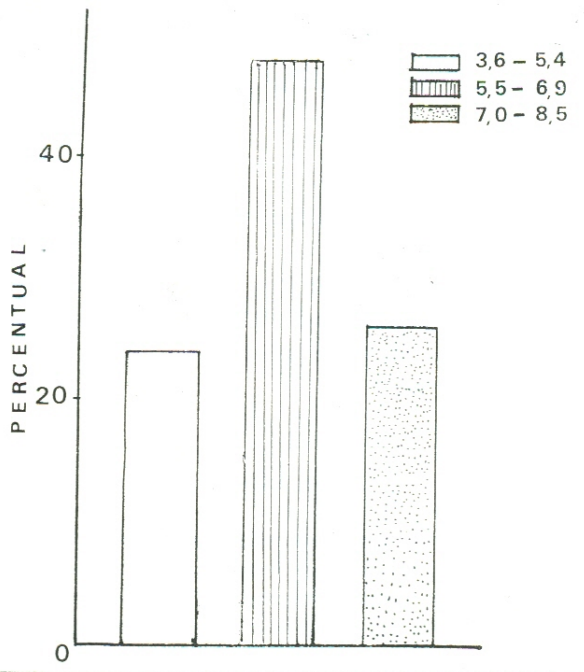

Fig. 5 — Efeito do pH na ocorrência de **Chromobacterium violaceum.**

Os dados apresentados no presente trabalho demonstram que realmente a bactéria ocorre nos corpos d'água da Amazônia Central, com bastante freqüência. De qualquer forma, o estudo da distribuição e ocorrência de *Chromobacterium violaceum* é de grande importância devido à capacidade desta bactéria de produzir um pigmento que tem sido objeto de estudos em vários campos da Biologia.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo preliminar permitem as seguintes conclusões:

a) a distribuição e ocorrência de *Chromobacterium violaceum* na Amazônia Central é bastante freqüente, provavelmente ligada às condições tropicais;

b) o maior número de colônias por ml nas amostras positivas, a maior percentagem de amostras positivas e o pH ótimo de *Chromo-*

bacterium violaceum convergem todos para os parâmetros estabelecidos para água clara, embora ela possa ocorrrer em qualquer corpo d'água.

Agradecimentos

Ao Dr. Ozório J. de M. Fonseca, pela orientação e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho, assim como pela correção do mesmo.

Summary

The occurrence of **Chromobacterium violaceum** was investigated in the surface waters of rivers, lakes and streams of the Central Amazon Region. The bodies of waters proposed by Sioli (1965). **Chromobacterium violaceum** was observed in 45 (67,16%) of the total 67 samples being in 15 (75,00%) of the 20 clearwater samples, 21 (65,6%) of the 32 black water samples and 9 (60,00%) of the 15 with water samples.

Bibliografia

American Public Health Association

1971 — **Standard Methods for the Examination of water and wastewater.** 13 ed. 874 p.

Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E.

1974 — **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 8 ed., Baltimore, Williams and Wilkins. 1246 p.

Cowan, S.T. & Steel, K.J.

1965 — **Manual for the identification of Medical bacteria.** Cambridge, University Press. 217 p.

Ognibene, A.J. & Thomas, E.

1970 — Fatal infection due to Chromobacterium violaceum in Vietnam. **American Journal of Clinical Pathology**, 54 : 607-610.

Sioli, H.

1967 — Studies in Amazonian Waters — IN: **Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica,** 3 (Limnologia) : 9-50.

Skerman, V.B.D.

1967 — **A guide to the identification of genera of Bacteria.** 2 ed. Baltimore, Williams and Wilkins. 303 p.

Sneath, P.H.A

1966 — Identification methods applied to Chromobacterium. In: Gibbs, B.M. & Skinner, F.A. eds. — **Identification Methods for Microbiologists,** part A. London and New York, Academic Press. p. 15-20.

(Aceito para publicação em 20/02/79)