

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/51604

IB/ 81854

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Marcelo Martins Escobar

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DO SOBRENADANTE DE
CULTURA DE *Serratia marcescens*
FITOPATOGÊNICA.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Marcelo Martins Escobar
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título
de mestre em Genética e
Biologia Molecular na área de
Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano
Co-orientadora: Profa. Dra. Gleize Villela Carbonell

2002

UNIDADE I.B./31304
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Es18a
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51604
PROC 16.83710
C _____ D X _____
PREÇO R\$ 14,00
DATA 15/11/02
Nº CPD _____

UM00176481-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Es18a **Escobar, Marcelo Martins**
Atividade citotóxica do sobrenadante de cultura de *Serratia marcescens* fitopatogênica/Marcelo Martins Escobar. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

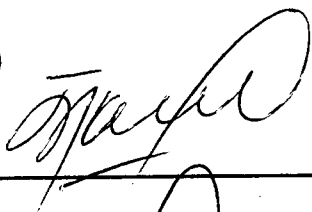
Orientador: Tomomasa Yano
Co-Orientadora: Gleize Villela Carbonell
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1.*Serratia marcescens*. 2.Plantas. 3.Citotoxinas. I.Yano, Tomomasa.
II. Carbonell, Gleize Villela. III.Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. IV. Título.

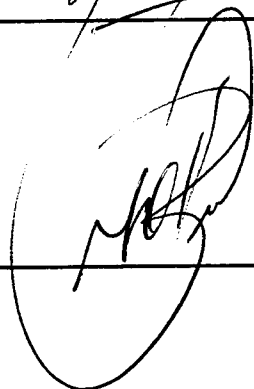
Campinas, 19 de setembro de 2002.

BANCA EXAMINADORA:

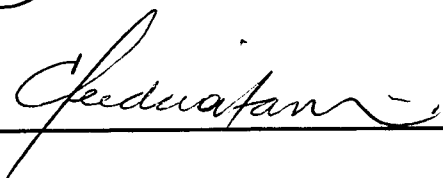
Prof. Dr. Tomomasa Yano (Orientador)



Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam



Profa. Dra. Cleide Ferreira Catani



Profa. Dra. Dirce Mithico Yamaoka Yano

*A minha família,
dedico!*

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Departamento de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Para sua realização nos foi concedida bolsa pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela sabedoria e ensinamentos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Gleize V. Carbonell, pelos ensinamentos e paciência.

Aos professores Dr. Domingos da Silva Leite, Dr. Wanderley Dias da Silveira, Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, Dra. Clarice Weis Arns e Dra. Lucila Costallat Ricci, pelos ensinamentos em microbiologia.

À minha família: minha mãe, meu pai, minhas irmãs, cunhados e sobrinhos, pelo amor, carinho e dedicação.

Aos colegas de laboratório Rosabel, Silvia Simi, Luciana Maria, Cleide, Márcia Tomy, Márcia Regina, Ana Claudia, Heloisa, Juan, Jane Martha, Patrícia, Luciano, Carol e Cláudio, pelas conversas e companherismo.

Aos outros colegas do Departamento de Microbiologia, pelos momentos de diversão.

Aos técnicos e colegas Ana Stella e Erivaldo, pela paciência e ajuda nos experimentos.

Ao meu amigo Mário Paulo Amante Penatti, pelos conselhos, ensinamentos e horas de diversão.

Ao Dr. Walter J. Siqueira do IAC, pelos ensinamentos e por ter permitido a realização dos experimentos em tecido vegetal em seu laboratório.

À técnica Raully M. R. Moreti do IAC, pela ajuda nos experimentos com tecido vegetal.

À técnica Ana Lúcia do laboratório de cultura celular, pela ajuda nos experimentos em cultura celular.

À secretária Maria de Lourdes, pela eficiência e ajuda.

ÍNDICE

Índice de figuras	ix
Resumo	x
Abstract	xii
Introdução	1
Objetivos	7
Material e Métodos	8
1. Amostras bacterianas.....	8
2. Meios e soluções utilizados.....	9
3. Preparo dos sobrenadantes de cultura bacteriana.....	12
4. Concentração do filtrado bacteriano.....	12
5. Preparo das células de origem animal e humana.....	13
6. Ensaio de citotoxicidade em células animais e humanas.....	14
7. Determinação da viabilidade celular.....	14
8. Ensaio da resistência térmica do sobrenadante de cultura.....	15
9. Ensaio de citotoxicidade em cultura de tecidos de alface.....	16
9.1. Desinfecção prévia das sementes.....	16
9.2. Germinação das sementes <i>in vitro</i>	16
9.3. Citotoxicidade em cultura vegetal.....	16
10. Ensaio de fitotoxicidade em bulbos de cebola.....	17
11. Ensaio de fitotoxicidade em plântulas de alface.....	18
12. Ensaio de soroneutralização.....	19

Resultados.....	20
1. Ensaio da citotoxicidade em células animais e humanas.....	20
2. Determinação da viabilidade celular.....	22
3. Ensaio da resistência térmica da atividade citotóxica.....	25
4. Ensaio de citotoxicidade em cultura de tecidos de alface.....	25
5. Ensaio de fitotoxicidade em bulbos de cebola.....	27
6. Ensaio de fitotoxicidade em plântulas de alface.....	27
7. Ensaio de soroneutralização.....	30
Discussão.....	31
Conclusões.....	35
Referências Bibliográficas.....	36
Apêndices.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efeito citopático em cultura de células Vero, CHO e HEp-2, após inoculação com sobrenadante filtrado de <i>S. marcescens</i> fitopatogênica e clínica.....	21
Figura 2. Gráfico da viabilidade celular das diferentes linhagens celulares, após inoculação com sobrenadante filtrado de <i>S. marcescens</i> fitopatogênica e clínica.....	23
Figura 3. Gráfico da resposta das linhagens celulares HEp-2, Vero e CHO à inoculação com filtrados de <i>S. marcescens</i> fitopatogênica e clínica, após diferentes períodos de tratamento.....	24
Figura 4. Citotoxicidade do sobrenadante filtrado de <i>S. marcescens</i> fitopatogênica e clínica em cultura de tecidos de alface.....	26
Figura 5. Toxicidade do sobrenadante filtrado de <i>S. marcescens</i> fitopatogênica e clínica a bulbos de cebola.....	28
Figura 6. Toxicidade do sobrenadante filtrado de <i>S. marcescens</i> fitopatogênica e clínica a plântulas de alface.....	29

RESUMO.

Serratia marcescens é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada no solo, água, ar, plantas e animais. Isolada de várias plantas, pode causar doenças em alface, cebola, feijão, tabaco, etc. A doença encontrada em alface e cebola apresenta sintomatologia extremamente semelhante àquela ocasionada por bactérias do gênero *Erwinia*. É considerada um importante agente etiológico de infecções hospitalares, especialmente em pacientes imuno-comprometidos e recém-nascidos. Recentemente foi demonstrado que isolados clínicos de *Serratia marcescens* produzem uma exotoxina termo-lábil, ativa em cultura de células animais e influenciada pelas condições de cultivo da bactéria. Várias outras características conhecidas como fatores de virulência em outras espécies bacterianas são encontradas em *Serratia marcescens*, entretanto, os mecanismos de patogenicidade desta bactéria, tanto para humanos quanto para plantas, ainda não estão esclarecidos. Neste trabalho, a atividade citotóxica de filtrados de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica foi avaliada em diferentes culturas de células. Os efeitos citopáticos e morte celular foram observados nas linhagens CHO (ovário de hamster chinês), Vero (rim de macaco verde africano) e HEP-2 (carcinoma de laringe humana), entretanto a linhagem HeLa (carcinoma de útero humano) permaneceu inalterada. A

viabilidade celular, pela técnica da coloração com Vermelho Neutro, mostrou que a linhagem CHO foi a mais sensível entre as células testadas. A atividade citotóxica dos filtrados de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica foi termo-sensível quando aquecida a temperaturas superiores a 60°C por 30 minutos, e foi neutralizada completamente por anti-soro policlonal, específico à citotoxina produzida por *S. marcescens* de origem clínica, sugerindo similaridade antigênica entre as citotoxinas produzidas por estes isolados. Ensaios em plantas mostraram que os filtrados de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica não provocaram alterações morfológicas visíveis nas plantas e não afetaram o seu crescimento. Em contraste, plantas tratadas com a suspensão bacteriana apresentaram sintomas de doença, tais como murcha e podridão em bulbos de cebola e plântulas de alface. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que *S. marcescens* fitopatogênica produz uma citotoxina similar à produzida por isolados clínicos e que é tóxica a diferentes linhagens de células animais em cultura. Estes resultados são especialmente importantes para a compreensão do papel biológico desta citotoxina.

ABSTRACT.

Serratia marcescens is a widely distributed bacteria in nature, and can be found in soil, water, air, plants and animals. In plants, can cause disease in lettuce, green onion, bean, tobacco etc, being the disease caused in lettuce and green onion very similar to those caused by Erwinia strains. *S. marcescens* has been considered an important nosocomial pathogen, specially in immuno-compromissed hosts and new-borns. Recently was demonstrated that clinical isolates of *Serratia marcescens* can produce a heat-labile extracellular cytotoxin, influenced by culture conditions, active on different animal cells in culture. Several virulence factors has been described to *Serratia marcescens*, however, the pathogenicity mechanisms of this bacteria, so for human as plants, remains to be clarified. In this work, was evaluated the cytotoxic activity of phytopathogenic *S. marcescens* culture filtrates in different animal cell cultures. Was observed cytopathic effect and cell death in CHO (chinese hamster ovarium), Vero (african green monkey kidney) and HEp-2 (human larinx cell carcinoma) lines, therefore the HeLa cells (human cervix carcinoma) remained unchanged. The cell viability, which was determinated by neutral red assay, showed that the CHO cells was most sensitive than the other cell lines tested. The cytotoxic activity of culture filtrates of phytopathogenic *S. marcescens* was heat-labile when heated at temperatures higher than 60°C for 30 minutes, and it was

completely neutralized by specific policlonal antiserum anti-cytotoxin produced by clinical *S. marcescens*, suggesting an antigenic similarity among these cytotoxins. When assayed on plants, the culture filtrates of phytopathogenic and clinical *S. marcescens* did not caused any visible morphological changes in plants and did not affect their growth. By contrast, the plants treated with bacterial suspension shown disease symptom, such as wilt and decay of stores bulbus in green onion and lettuce plantlets. The results obtained in this study suggests that phytopathogenic *S. marcescens* produced a cytotoxin antigenically similar to produced by clinical isolates, being toxic to different animals cell lines. These results are especially important to the comprehension of biological role of this cytotoxin.

INTRODUÇÃO.

Serratia marcescens, um bacilo Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, tem sido reconhecida como um importante agente etiológico de infecções hospitalares. É uma bactéria amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada no solo, água, plantas e trato digestivo de animais (FARMER, 1995).

Isolados de *S. marcescens* do meio ambiente geralmente produzem um pigmento avermelhado, denominado prodigiosina, que aparentemente está associado a um baixo nível de virulência. Por ser considerado originalmente um microrganismo não patogênico, *S. marcescens* foi frequentemente utilizada como um marcador biológico, devido ao fácil reconhecimento de suas colônias vermelhas. Em alguns experimentos, esta bactéria foi pulverizada em hospitais para se estudar a sua disseminação e fixação (YU, 1979).

A capacidade de produzir prodigiosina é característica de *S. marcescens* (GRIMONT & GRIMONT, 1984), porém a função deste pigmento permanece ainda não esclarecida, pois isolados clínicos são raramente pigmentados (CARBONELL *et al.*, 1996).

Infecções causadas por este microrganismo têm sido relatadas com certa frequência desde 1960 (DODSON, 1968). Atualmente, é considerada um importante patógeno hospitalar.

No homem, *S. marcescens* pode causar infecções no trato respiratório (MELTZ & GRIECO, 1973), trato urinário (OKUDA *et al.*, 1981), meningites (CAMPBELL *et al.*, 1992; ZAIDI *et al.*, 1981), artrites (NAKASHIMA *et al.*, 1987),

peritonites (BIZETTE *et al.*, 1995), endocardites (MILLS & DREW, 1976), bacteremias (VOLKOW-FERNANDEZ *et al.*, 1993) entre outras (BOLLMANN *et al.*, 1989; PAGANI *et al.*, 1994; SEKAMINOVA *et al.*, 1995).

A capacidade de adquirir resistência a uma variedade de antibióticos faz com que *S. marcescens* seja selecionada e se estabeleça nos hospitais, dificultando o tratamento e complicando principalmente a recuperação dos pacientes imunodeficientes e recém-nascidos (CAMPBELL *et al.*, 1992). Além disso, *S. marcescens* é capaz de transferir esta resistência a bactérias do mesmo gênero ou de gêneros diferentes, através de plasmídios que codificam resistência aos antimicrobianos (ITO *et al.*, 1995; MAYER *et al.*, 1986), o que leva ao aparecimento de surtos de infecções hospitalares com diferentes espécies bacterianas contendo o mesmo plasmídio (MAYER, 1988).

S. marcescens tem grande habilidade em sobreviver e crescer sob condições extremas, incluindo desinfetantes (MARRIE & COSTERTON, 1981; PARMENT *et al.*, 1986), anti-sépticos (NAKASHIMA *et al.*, 1987), água bi-destilada (SZEWZYK *et al.*, 1993) e equipamentos médicos (DONOWITZ *et al.*, 1979).

Serratia marcescens tem sido encontrada em várias plantas, entre elas, alho, cebola, couve, alface, brócolis, tomate, cereja, coco, cenoura, entre outras (GRIMONT & GRIMONT, 1978).

As amostras de *S. marcescens* encontradas em plantas tem origem provavelmente do solo; entretanto, no caso de figos da variedade Calimyrna, observou-se que esta bactéria era carregada de uma planta a outra através da vespa do figo *Blastophaga psenes* (PHAFF & MILLER, 1961), o que indica que também pode haver uma contaminação através de insetos.

Trabalhos apresentados na literatura, indicam que esta bactéria pode ser patogênica para algumas plantas. Experimentos relatam o aparecimento de uma reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco e feijão que foram inoculadas com *S. marcescens* (LAKSO & STARR, 1970). Estas reações são caracterizadas por um rápido colapso e anasarca do tecido, seguido de necrose do tecido anasarcado. Também há experimentos que relatam a ocorrência desta bactéria em bulbos de cebola e folhas de alface, causando apodrecimento de tecidos e podridão mole, sintomatologia extremamente semelhante àquela ocasionada por bactérias do gênero *Erwinia* (BERIAM *et al.*, 1990). Apesar destes estudos, o seu mecanismo de patogenicidade em plantas ainda não está esclarecido.

Uma alternativa para o controle de insetos-praga tem sido o emprego, cada vez maior, de entomopatógenos. Porém, estes agentes microbianos de controle biológico, disponíveis na natureza, devem sempre ser analisados quanto à sua segurança ao homem, aos vertebrados, aos insetos úteis e às plantas, além de ser eficiente contra as pragas importantes (CAPALBO & MORAES, 1988).

Serratia marcescens é uma bactéria de reconhecida entomopatogenicidade. Em estudos realizados na África do Sul por HOEKSTRA e KFIR (1997), observou-se a morte de lagartas *Chilo partellus* e *Busseola fusca*, pragas de grande preocupação naquele país, devido à infecção por esta bactéria. No Brasil, ANDRADE *et al.* (1984) registraram a ocorrência, em condições de campo, de *S. marcescens* atacando larvas e pupas do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*, e na Rhodia Agro Ltda., em Paulínia, foi relatada a ocorrência de *S. marcescens* em lagartas do algodoeiro *Heliothis virescens*, causando a morte destas lagartas (ITO *et al.*, 1996).

Várias características conhecidas como fatores de virulência em outras espécies bacterianas são encontradas em *S. marcescens*. Entre elas, a capacidade de resistir a ação bactericida do soro humano (CARBONELL *et al.*, 1992; JOINER, 1985), a produção de hemolisina ligada à célula (CARBONELL & VIDOTTO, 1992), a presença de fímbria e aderência à células uroepiteliais (PARMENT *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1985) e a produção de vários produtos extracelulares, como uma quitinase (MONREAL & REESE, 1969), quatro proteases (MATSUMOTO *et al.*, 1984), nucleases e uma lipase (HINES *et al.*, 1988), e a produção de um agente surfactante, que ajuda na colonização de superfícies (MATSUYAMA *et al.*, 1985; MATSUYAMA *et al.*, 1992; MATSUYAMA *et al.*, 1986).

A produção de citotoxinas por espécies bacterianas tem sido muito investigada nos últimos anos, devido ao seu potencial papel na patogênese bacteriana (SEARS & KAPER, 1996). De uma maneira geral, as toxinas bacterianas podem causar dano no tecido superficial do hospedeiro, facilitando a penetração nos tecidos mais profundos, assim como também podem inibir ou anular a resposta imune do hospedeiro (FINLAY & FALKOW, 1989).

As citotoxinas bacterianas são detectadas baseando-se no grau de danos causados à diferentes linhagens celulares em cultura, os quais são usualmente evidenciados por alterações morfológicas das células. Certas toxinas bacterianas atuam seletivamente sobre um tipo de célula em cultura, em alguns casos devido à presença de receptores específicos sobre a superfície da célula (BOYD & LINDWOOD, 1989). Assim, a escolha das células alvo para testar uma nova toxina pode ser influenciada pelo órgão ou tecido que é colonizado ou infectado pela bactéria *in vivo* (THELESTAM & FLORIN, 1994).

Foi demonstrado recentemente que alguns isolados clínicos de *S. marcescens* produzem uma exotoxina termo-lábil, ativa em células animais em cultura e influenciada pelas condições de cultivo da bactéria, tais como pH inicial do meio de cultivo, aeração, temperatura de incubação, fontes de carbono e níveis de ferro no meio de cultivo, e que esta atividade tóxica não é mediada por plasmídios (CARBONELL, 1997). A toxina produzida por *S. marcescens* de origem clínica provoca um efeito citopático em diferentes linhagens de células crescidas *in vitro*: carcinoma de útero humano (HeLa), carcinoma de laringe humana (HEp-2), rim de macaco verde africano (Vero), ovário de hamster chinês (CHO) e rim de hamster (BHK-21). A linhagem de rim de macaco (MA104) foi a única das células estudadas resistente à toxina. As linhagens apresentaram diferentes graus de sensibilidade, sendo que as derivadas de humanos foram as mais sensíveis (CARBONELL, 1997).

A citotoxina produzida por *S. marcescens* mostrou não ter atividade letal quando inoculada intraperitonealmente em camundongos. Além disso, a análise histológica de rins, fígado, baço e pulmões dos animais tratados com a toxina não revela alterações (CARBONELL, 1997).

As exoenzimas produzidas por *S. marcescens* podem ser responsáveis pela patogenicidade à insetos, e com isso, vários estudos podem ser feitos para que seja utilizada no controle biológico de pragas. Porém, mecanismos de patogenicidade de *Serratia marcescens* precisam ser investigados, bem como possíveis relações entre amostras encontradas em insetos, plantas e humanos.

A investigação da habilidade de *Serratia marcescens* isolada de plantas em produzir citotoxina é importante para compreender a sua patogênese. Algumas caracterizações, tais como termo-labilidade, efeito citopático em várias linhagens

celulares e ensaio sorológico também contribuem para estabelecer possíveis relações com isolados clínicos.

OBJETIVOS.

- Verificar a atividade citotóxica em sobrenadantes de culturas de *Serratia marcescens* fitopatogênica.
- Caracterizar a citotoxina produzida por *Serratia marcescens* fitopatogênica em culturas de tecidos animais e vegetais.
- Comparar as toxinas produzidas por isolados fitopatogênicos e clínicos.
- Relacionar sorologicamente as citotoxinas fitopatogênicas com citotoxinas produzidas por *S. marcescens* de origem clínica.

MATERIAL E MÉTODOS.

1. Amostras bacterianas.

Foram utilizadas neste estudo amostras de *Serratia marcescens* fitopatogênicas, obtidas da coleção de culturas bacterianas do Instituto Biológico, Centro Experimental de Campinas (IBSBF). Os isolados fitopatogênicos foram obtidos de alface (números 5/6 e 6/5) e cebola (número 980), com sintomas de podridão mole. *Serratia marcescens*, isolada de infecção urinária (número 458) (CARBONELL, 1997), foi utilizada como amostra referência, produtora de citotoxina, e *Escherichia coli* K12/711 foi utilizada como controle negativo dos testes.

Tabela 1. Amostras bacterianas utilizadas.

Espécie	Número	Origem
<i>S. marcescens</i>	5/6 (coleção IBSBF)	alface
<i>S. marcescens</i>	6/5 (coleção IBSBF)	alface
<i>S. marcescens</i>	980 (coleção IBSBF)	cebola
<i>S. marcescens</i>	458	infecção urinária
<i>E. coli</i>	K12/711	

2. Meios e soluções utilizados.

2.1. Meio essencial mínimo Eagle (MEM).

O meio essencial mínimo EAGLE (MEM, Nutricell) foi utilizado para o cultivo e manutenção das culturas celulares. Preparado de acordo com as especificações do fabricante, com água deionizada, o pH foi ajustado para 7,2 com NaHCO_3 à 7,5% e esterilizado por filtração.

2.2. Solução Estreptomicina-Fungizona.

Esta solução foi implementada nos meios de cultura de células para prevenir a proliferação de fungos e bactérias.

Estreptomicina.....25 mg/mL

Fungizona.....1 mg/mL

As drogas foram dissolvidas em água destilada, esterilizadas por filtração em membrana filtrante de 0,22 μm (Millipore) e a solução estocada a 4°C.

2.3. Solução salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4.

Esta solução foi utilizada para lavagem da cultura celular, no seu preparo e manutenção, bem como em outros experimentos.

NaCl.....	8,0 g
KCl.....	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,12 g
Na ₂ HPO ₄ (anidro).....	0,91 g
H ₂ O destilada.....	1000 mL

2.4. Solução Tripsina-EDTA.

Utilizada para o descolamento das células em cultura, para repique das placas e utilização das células nos testes de citotoxicidade.

Tripsina.....	0,2 %
Versene-EDTA.....	0,02 %
PBS.....	100 mL

2.5. Corante Vermelho Neutro.

A solução estoque de Vermelho Neutro (2-amino-3-methyl-amino-phenazoniumchloride) foi diluída a 0,4 % em água deionizada estéril, centrifugada a

2.500 x g por 3 min e filtrada para remoção de precipitados do corante. Um dia antes do uso, a solução foi diluída na razão 1:80 em meio essencial mínimo EAGLE (MEM).

2.6. Solução formol-cálcio.

Utilizada para fixar as células coradas pelo Vermelho Neutro, nos ensaios de determinação da viabilidade celular.

Formaldeído 40 %.....10 mL

CaCl₂ 10 %.....10 mL

H₂O deionizada.....10 mL

2.7. Solução etanol-ácido acético.

Utilizada para liberar o Vermelho Neutro das células viáveis que captaram o corante, para determinação da viabilidade celular.

Ácido acético glacial.....1,0 mL

Etanol 50 %.....100 mL

3. Preparo dos sobrenadantes de cultura bacteriana.

As amostras de *Serratia marcescens* fitopatogênicas e clínica foram cultivadas em caldo Triptona de Soja (TSB) (Difco) por 24 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific CO., NJ, USA). As culturas bacterianas foram centrifugadas (12.000 x g, 15 min, 4°C) e os sobrenadantes de cultura coletados foram filtrados em membrana filtrante a 0,22 µm (Millipore) e mantidos a 4°C até a realização dos testes.

4. Concentração do filtrado bacteriano.

Os sobrenadantes de cultura de *S. marcescens* fitopatogênicas e clínica foram concentrados 10 vezes para a utilização em alguns testes. Em 100 mL de sobrenadante de cultura bacteriana, foi adicionado sulfato de amônio, numa saturação de 80%, para precipitação das proteínas. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 min e o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de salina tamponada fosfatada (PBS 0,01M) e dialisado contra mesmo tampão, durante 24 h.

5. Preparo das células de origem animal e humana.

As linhagens celulares de origem animal e humana utilizadas foram: carcinoma de útero humano (HeLa), rim de Macaco Verde Africano (Vero), carcinoma de laringe humana (HEp-2) e ovário de hamster chinês (CHO), obtidas do Laboratório de Culturas Celulares, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, Unicamp.

As células, mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas assepticamente para frascos de cultura de células (CORNING-USA), contendo o meio essencial mínimo EAGLE (MEM, Nutricell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% da solução de estreptomicina-fungizona. Os frascos de cultura foram então incubados em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após a formação de uma monocamada celular confluyente, o meio foi removido e as células foram lavadas com salina tamponada fosfatada (PBS 0,01M) e destacadas do frasco com 0,5 mL de uma solução de tripsina-EDTA. As células foram então ressuspensas em meio EAGLE acrescido de 10% de SFB, em um número estimado de 10⁵ células/mL. Volumes de 0,1 mL da suspensão celular foram pipetados em cada orifício de uma microplaca de 96 cavidades (COSTAR, CORNING, USA) e incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, por 24 h.

6. Ensaio de citotoxicidade em células animais e humanas.

Este ensaio foi realizado segundo KONOWALCHUCK *et al.* (1977). Após a formação da monocamada celular, o meio foi substituído por 0,1 mL de meio essencial mínimo EAGLE contendo 1% de Ciprofloxacina e diferentes concentrações do sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica. Para titulação, os sobrenadantes de cultura foram diluídos na razão 2, iniciando-se em 1:4. Como controle negativo, foram utilizados filtrados de sobrenadante de cultura de *E. coli* K12/711 ou somente meio TSB, e como controle positivo, sobrenadante filtrado de cultura de *S. marcescens* 458 (origem clínica). As placas permaneceram incubadas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C. A morfologia da monocamada celular foi observada em microscópio invertido (Nikon) para determinação dos efeitos citopáticos, durante 3 dias.

7. Determinação da viabilidade celular.

O teste de viabilidade celular por coloração com Vermelho Neutro foi realizado como descrito previamente por BORENFREUND & PUERNER (1984). Após intervalos de tempo de 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 24 h de aplicação do sobrenadante de cultura bacteriano nas células, o meio foi removido e a cultura lavada com salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4. Para cada cavidade, foram adicionados 0,2 mL de meio EAGLE contendo 50 µg/mL do corante Vermelho Neutro e a placa incubada

por 3 h a 37°C, para captação do corante pelos lisossomos das células viáveis. Após a incubação, o meio contendo o corante foi removido e as cavidades foram lavadas rapidamente com solução de formol-cálcio para remoção do corante não incorporado pelas células. Finalmente, 0,2 mL de solução de etanol-ácido acético foram adicionados a cada cavidade e a placa foi mantida por 15 min à temperatura ambiente para remoção do corante das células viáveis. O corante foi quantificado em espectrofotômetro (Titertek Multiskan model 340) a 540 nm. Duas cavidades na primeira coluna receberam meio sem o corante Vermelho Neutro para servir como branco. Como controle, algumas cavidades não receberam os filtrados de cultura bacteriana. A viabilidade celular foi determinada por comparação dos valores de absorbância obtidos por cavidades controle (sem sobrenadante de cultura bacteriana), os quais foram considerados como 100% de viabilidade celular.

8. Ensaio da resistência térmica do sobrenadante de cultura.

Foram distribuídos 1,0 mL de sobrenadante de cultura em tubos com tampas de rosca e incubados em banho-maria, controlados termostaticamente, por 30 min nas seguintes temperaturas: 30, 40, 50, 60, 70 e 100°C. A atividade citotóxica foi determinada em cultura de células CHO e o efeito citopático observado por 72 h em microscópio invertido (Nikon).

9. Ensaio de citotoxicidade em cultura de tecidos de alface.

9.1. Desinfecção prévia das sementes.

As sementes de alface comercial foram desinfectadas através da imersão em álcool 70°GL, por 1 min, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, por 20 min (CASALE, 1996). Após a desinfecção, as sementes foram lavadas três vezes em água deionizada estéril.

9.2. Germinação das sementes *in vitro*.

As sementes foram colocadas em placas de Petri contendo o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), previamente esterilizado. As placas foram colocadas em sala de cultura a $25^{\circ}\text{C} \pm 3$, em fotoperíodo de 14 h de luz, até o desenvolvimento das plântulas.

9.3. Citotoxicidade em cultura vegetal.

Assepticamente, as plântulas crescidas foram retiradas das placas, e os cotilédones foram destacados, cortados transversalmente e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura MS, acrescido dos filtrados de sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica, em diferentes diluições:

- 20 mL de meio MS (0%);
- 18 mL de meio MS + 2 mL de filtrado de cultura bacteriana (10%);
- 16 mL de meio MS + 4 mL de filtrado de cultura bacteriana (20%);
- 14 mL de meio MS + 6 mL de filtrado de cultura bacteriana (30%);
- 12 mL de meio MS + 8 mL de filtrado de cultura bacteriana (40%).

Foram inoculados 10 explantes por placa. Como controle negativo foi utilizado meio MS somente e filtrado de sobrenadante de cultura de *E. coli* K12/711. Após a inoculação dos explantes, as placas foram mantidas em sala de cultura a $25^{\circ}\text{C} \pm 3$, em fotoperíodo de 14 h de luz, para observação do desenvolvimento de calos. A avaliação foi feita após 15 dias de crescimento, utilizando-se como parâmetros a seguinte classificação:

- 1 – ausência de calos;
- 2 – calo pequeno, em alguns pontos do explante;
- 3 – calo pequeno, em toda periferia do explante;
- 4 – calo bem desenvolvido, envolvendo todo o explante.

10. Ensaio de fitotoxicidade em bulbos de cebola.

Uma alíquota de 1,0 mL de sobrenadantes filtrados de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica e 1,0 mL de sobrenadantes filtrados de cultura,

concentrado 10 vezes com sulfato de amônio, foram inoculados na parte superior (pescoço) de bulbos de cebola inteiramente formados (maduros), utilizando-se uma seringa hipodérmica. Após as inoculações, os bulbos foram mantidos com as raízes mergulhadas em água, a temperatura ambiente. Como controle negativo foi injetado água deionizada estéril e como controle positivo, cultura bacteriana de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica, numa proporção estimada de 10^8 UFC. Após 5 dias, os bulbos foram abertos ao meio para análise quanto ao apodrecimento das escamas.

11. Ensaio de fitotoxicidade em plântulas de alface.

Sementes de alface desinfectadas, como descrito anteriormente (item 9.1), foram colocadas em cavidades de uma placa de 24 cavidades (COSTAR, CORNING, USA) contendo ágar (1%) e colocadas em sala de cultura a $25^{\circ}\text{C} \pm 3$, em fotoperíodo de 14 h de luz, para germinação e desenvolvimento das plântulas. Após este período, foi colocado em cada cavidade 0,5 mL dos sobrenadantes filtrados de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica e 0,5 mL dos sobrenadantes filtrados, concentrados 10 vezes com sulfato de amônio. Como controle negativo, foi colocado somente água deionizada estéril e como controle positivo, cultura de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica. Após 7 dias de incubação em sala de cultura, as plântulas foram analisadas em lupa.

12. Ensaio de soroneutralização.

O ensaio de neutralização da atividade citotóxica foi feito misturando-se, em uma microplaca de 96 cavidades (COSTAR, CORNING, USA), 0,1 mL de diferentes diluições de soro policlonal, iniciando-se em 1:4, na razão 2, obtido em coelhos imunizados com citotoxina purificada de *S. marcescens* clínica (CARBONELL *et al.*, manuscrito em preparo), com 0,1 mL dos sobrenadantes filtrados de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica, diluído a 1:4 em meio essencial mínimo Eagle. Depois da incubação a 37°C por 1 h, 0,1 mL da amostra da mistura soro-sobrenadante de cultura foi inoculado em outra microplaca contendo monocamada de cultura de células CHO. Como controle, algumas cavidades receberam somente o soro policlonal e outras receberam somente o sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica. A placa foi incubada a 37°C, 5% de CO₂, por 72 h, e a observação do efeito citopático foi feita diariamente em microscópio invertido (Nikon).

RESULTADOS.

1. Ensaio de citotoxicidade em células animais e humanas.

Os efeitos citotóxicos, tais como alterações na morfologia da célula (arredondamento) e descolamento do tapete celular, foram observados para as linhagens celulares Vero, HEp-2 e CHO (Figura 1). A linhagem HeLa não apresentou alterações na sua forma celular característica. A maior sensibilidade foi observada nas linhagens CHO e HEp-2, com efeito citopático obtido logo nas duas primeiras horas de incubação e destruição da monocamada celular dentro de 24 h, até o título de 1:16. As células Vero mostraram efeito citopático com 24 h, e destruição da monocamada celular após 72 h de incubação, para títulos de 1:4. Em contraste, nos orifícios inoculados apenas com o filtrado de *E. coli* K12/711, considerados como controle negativo, as células permaneceram com sua morfologia característica, não apresentando alterações.

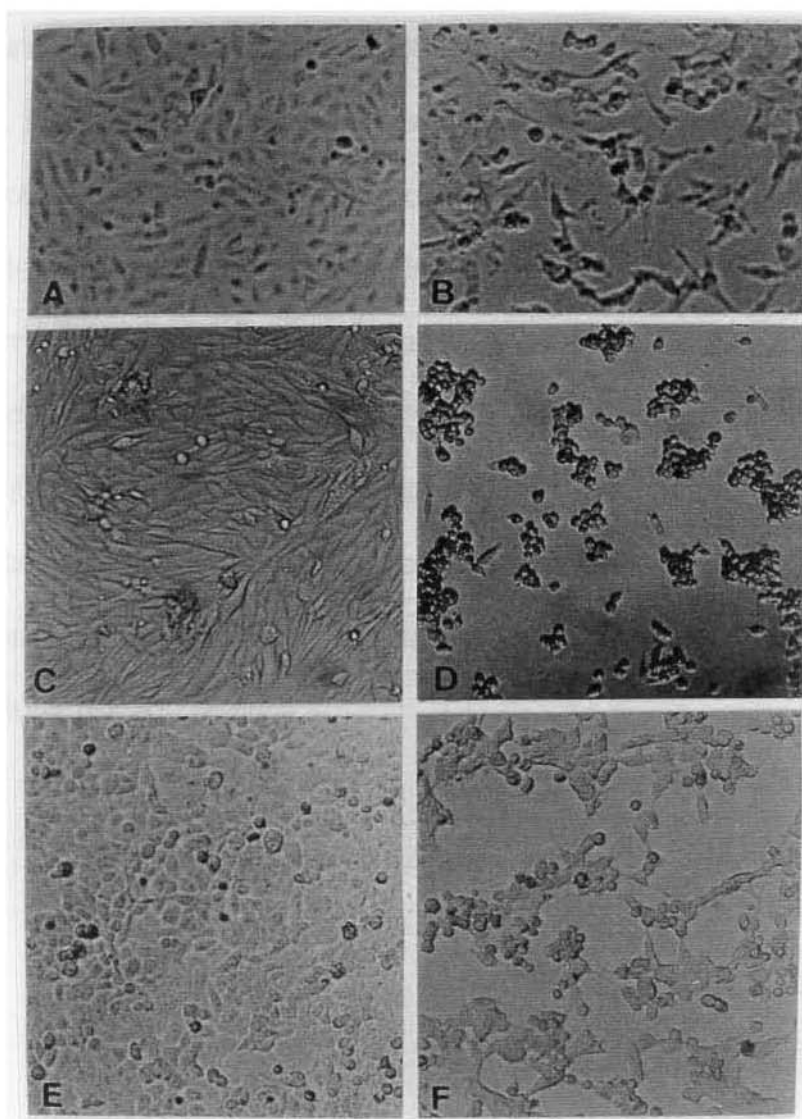
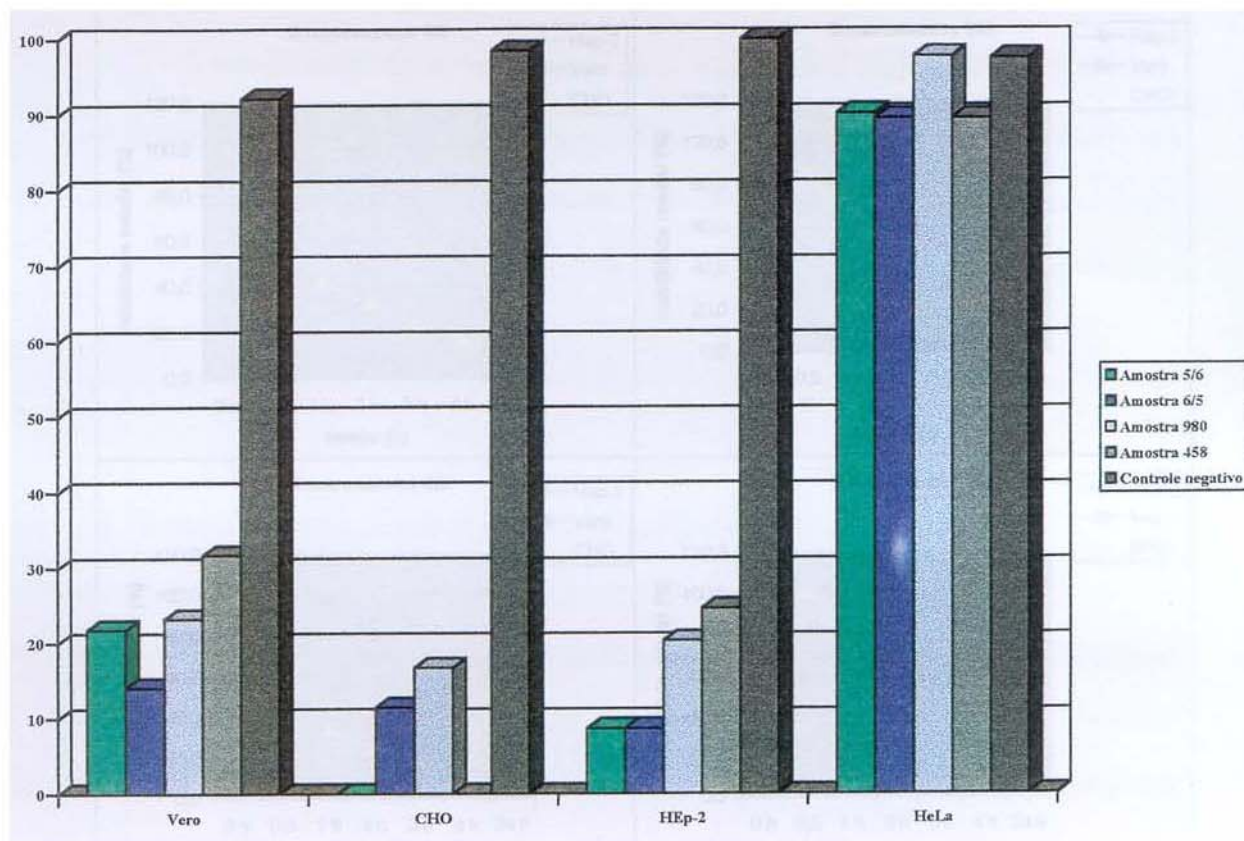


Figura 1: (B,D,F) Efeito citopático em cultura de células Vero, CHO e Hep-2, respectivamente, após 24 h de inoculação com sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica. (A,C,E) Controle negativo em células Vero, CHO e Hep-2, respectivamente.

2. Determinação da viabilidade celular.

A figura 2 ilustra os resultados obtidos 24 h após a inoculação com os filtrados bacterianos. A linhagem celular mais sensível foi a CHO (ovário de hamster chinês), a qual chegou a ter uma taxa de morte de 100% das células, quando testada com os sobrenadantes filtrados das amostras isoladas de alface (5/6 e 6/5). Em seguida, vieram as linhagens HEp-2 (em torno de 90% de morte celular) e Vero (em torno de 80% de morte celular). A linhagem HeLa não apresentou morte significativa, indicando que não foi sensível aos filtrados de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica. As monocamadas de células tratadas com os filtrados de cultura exibiram uma resposta citotóxica que foi tempo-dependente e diferente para cada linhagem celular testada (Figura 3).

Viabilidade Celular (%)



Linhagens Celulares

Figura 2: Viabilidade celular das diferentes linhagens celulares, 24 h após inoculação com sobrenadante filtrado de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica.

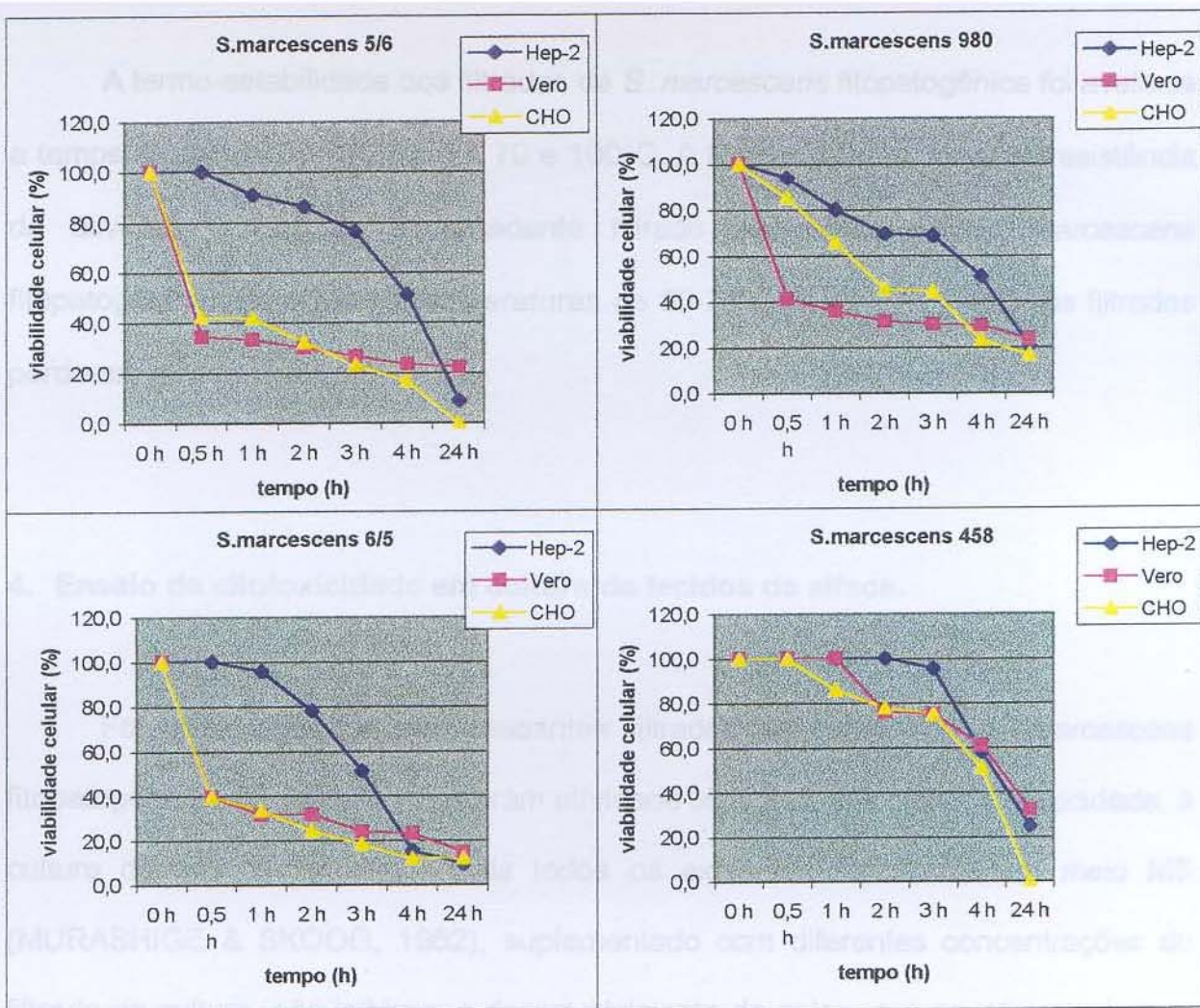


Figura 3: Resposta das linhagens células HEP-2, Vero e CHO à inoculação com filtrados de *Serratia marcescens* fitopatogênica e clínica, após diferentes períodos de tratamento. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio com Vermelho Neutro.

3. Ensaio da resistência térmica da atividade citotóxica.

A termo-estabilidade dos filtrados de *S. marcescens* fitopatogênica foi avaliada a temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 e 100°C. A temperatura máxima de resistência da atividade tóxica do sobrenadante filtrado de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica está entre as temperaturas de 60-70°C. A 70°C e 100°C, os filtrados perderam atividade tóxica.

4. Ensaio de citotoxicidade em cultura de tecidos de alface.

Foi observado que sobrenadantes filtrados de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica não mostraram atividade biológica, tais como citotoxicidade, à cultura de tecidos de alface, pois todos os explantes inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações do filtrado de cultura, não inibiram o desenvolvimento de calos, que envolveram todo o explante, por um período de observação de 15 dias (Figura 4).

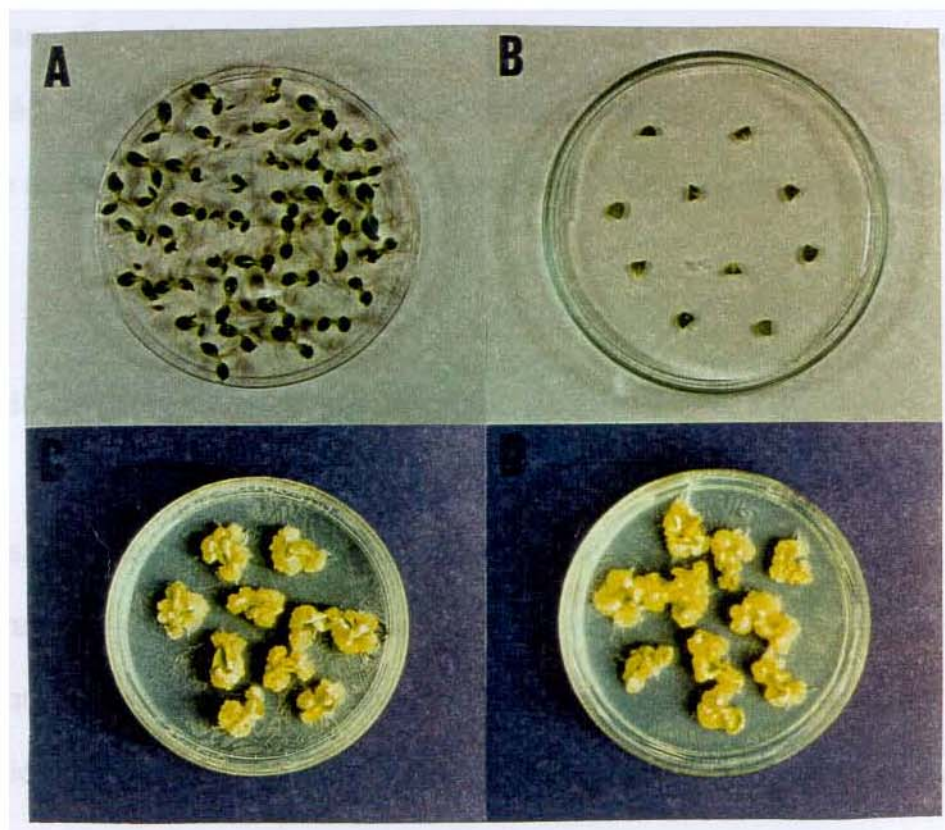


Figura 4: Citotoxicidade em cultura de tecidos de alface. (A) Plântula de alface. (B) Cotilédones de alface como fonte de explante. (C) Cultura de tecido de alface (calos) em meio MS suplementado com sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica, concentrado 10 vezes. (D) Controle negativo (sobrenadante de cultura de *E. coli* K12/711).

5. Ensaio de fitotoxicidade em bulbos de cebola.

Os sobrenadantes de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica não produziram alterações teciduais macroscópicas nos bulbos de cebola, por 5 dias de inoculação. Já as culturas bacterianas, tanto fitopatogênica como clínica, causaram podridão mole, caracterizada pelo apodrecimento das escamas (Figura 5).

6. Ensaio de fitotoxicidade em plântulas de alface.

Os filtrados de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica não provocaram alterações morfológicas visíveis nas plântulas de alface analisadas, mesmo quando se utilizou sobrenadante concentrado em até 10 vezes com sulfato de amônio. Em contraste, com a inoculação da suspensão bacteriana, observou-se o aparecimento de sintomas de patogenicidade logo no segundo dia, caracterizado com murcha da plântula e manchas necróticas nas folhas cotiledonares, que persistiram até o final do sétimo após a inoculação (Figura 6).

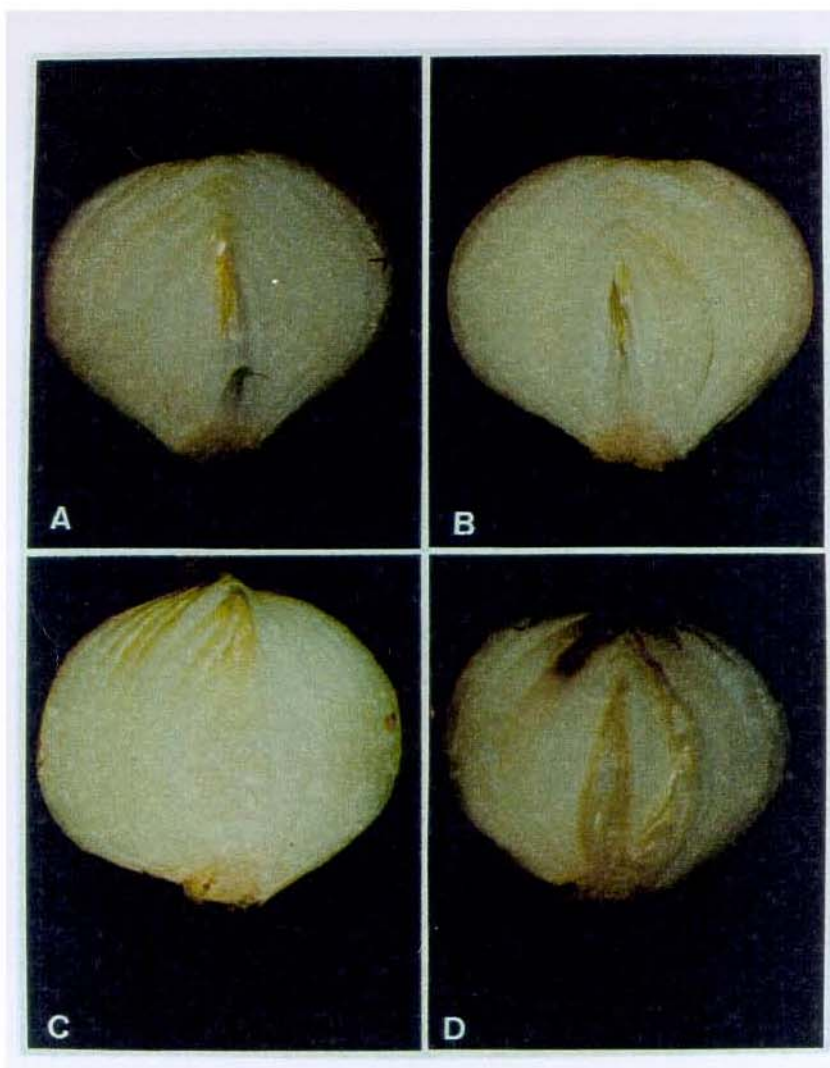


Figura 5: Toxicidade a bulbos de cebola. (A) Bulbo de cebola inoculado com sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica. (B) Bulbo de cebola inoculado com sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica, concentrado 10 vezes. (C) Controle negativo. (D) Bulbo de cebola inoculado com suspensão bacteriana.

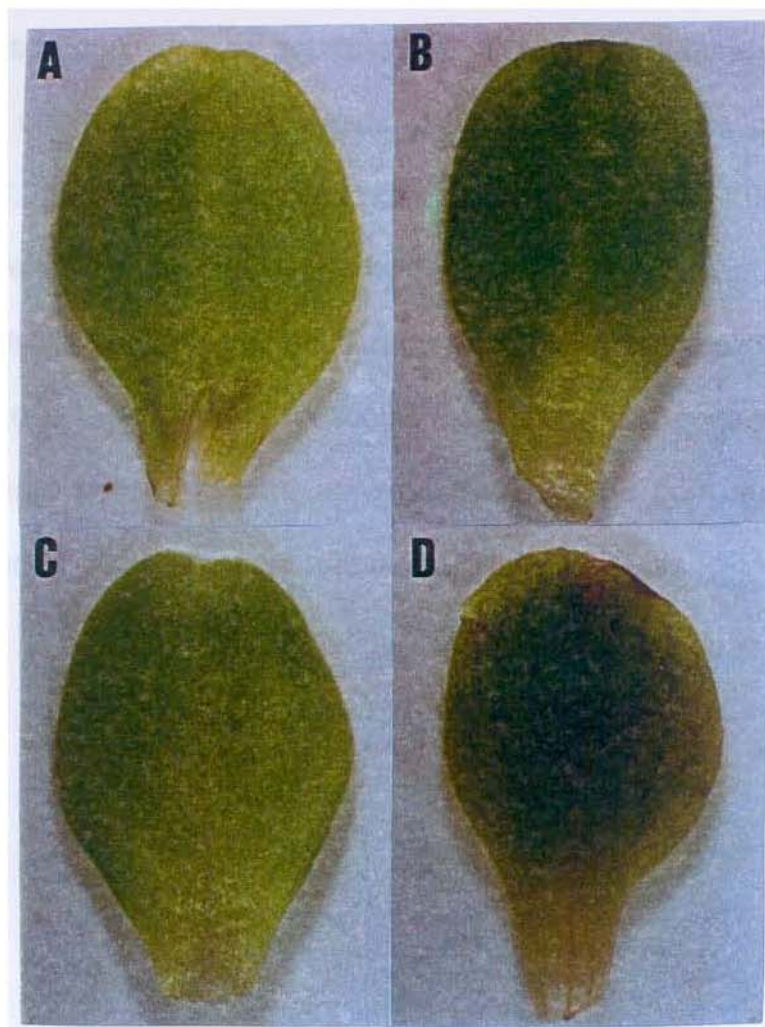


Figura 6: Toxicidade a plântulas de alface. (A) Cotilédone de alface inoculado com sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica. (B) Cotilédone de alface inoculado com sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica, concentrado 10 vezes. (C) Controle negativo. (D) Cotilédone de alface inoculado com suspensão bacteriana.

7. Ensaio de soroneutralização.

A atividade citotóxica de sobrenadante filtrado de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica sobre cultura de células CHO foi neutralizada por antissoro anti-citotoxina de *S. marcescens* de isolado clínico até um título de 1:64, onde não foram observados efeitos citopáticos. Nas cavidades onde a diluição era maior, e nas cavidades controle, somente com o filtrado bacteriano, as células apresentaram-se arredondadas e o tapete celular descolado da placa. Em contraste, as cavidades controle, somente com antissoro, apresentaram células com suas características normais, indicando que o antissoro não é citotóxico às células.

DISCUSSÃO.

A produção de citotoxinas por espécies bacterianas tem sido bastante investigada ultimamente, devido a esta característica ser considerada como um importante fator de virulência para diferentes bactérias, e é detectada com base no grau de danos causados a diferentes linhagens celulares, evidenciada por alterações morfológicas (THELESTAM & FLORIN, 1994).

Recentemente, a produção de uma citotoxina extracelular, ativa em diferentes linhagens de células em cultura, foi detectada em isolados de *Serratia marcescens* não pigmentada, de origem clínica, e está sendo relacionada como possível fator de virulência desta bactéria (CARBONELL, 1997). Entretanto, a ocorrência de citotoxinas em *S. marcescens* ambiental ainda precisa ser esclarecida.

Neste estudo, a sensibilidade de diferentes linhagens celulares ao sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica foi avaliada e comparada com isolados clínicos.

Os filtrados de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica induziram um efeito citopático nas linhagens celulares CHO, Vero e HEp-2 (Figura 1). As alterações morfológicas sobre as células sensíveis foram caracterizadas pelo arredondamento celular e descolamento do tapete celular, culminando na morte das células. Estas alterações foram observadas em todas as linhagens analisadas, exceto para HeLa, que não apresentou nenhuma alteração morfológica, inclusive para as amostras de origem clínica. As monocamadas de células tratadas com os filtrados de cultura exibiram uma resposta citotóxica que foi tempo-dependente e diferente para cada

linhagem celular testada (Figura 3). O mesmo padrão de efeito citopático foi descrito em células inoculadas com citotoxina produzida por isolados clínicos (CARBONELL, 1997).

As toxinas bacterianas podem produzir danos celulares, usualmente culminando em morte celular, sendo classificadas então como citotoxinas (SEARS & KAPER, 1996), ou apenas causarem alterações no formato da célula, como as toxinas de alteração do citoesqueleto (THELESTAM & FLORIN, 1994). Os dados obtidos neste estudo indicam que o sobrenadante de cultura de *Serratia marcescens* fitopatogênica pode ser classificado como citotóxico, pois provocou a morte das células. O critério utilizado para definir morte celular foi a perda da viabilidade celular medida pelo ensaio com Vermelho Neutro.

As alterações morfológicas sobre algumas linhagens celulares, observadas neste estudo, foram úteis para distinguir a citotoxina de *S. marcescens* fitopatogênica de outras toxinas bacterianas. O arredondamento celular visto em células CHO infectadas em resposta aos filtrados de *S. marcescens* fitopatogênica difere de outras, como enterotoxina termo-lábil de *E. coli* (SPANGLER, 1992), que resulta no alongamento das células CHO. O mesmo padrão de efeito citopático foi observado para as células Vero, o qual é diferente daqueles produzidos por fator necrotizante citotóxico (CNF) de *E. coli*, que induz formação de células gigantes e polinucleadas (GYLES, 1992). Deve-se levar em consideração o fato de que as linhagens celulares utilizadas neste estudo eram linhagens celulares estabelecidas, que podem perder muitos das suas propriedades originais e funções e o efeito observado *in vitro* pode não refletir o que ocorre *in vivo*.

Os resultados de viabilidade celular obtidos neste estudo mostraram-se similares aos obtidos para amostras de isolados clínicos (Figura 2). A linhagem celular mais sensível aos filtrados de sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica foi a CHO (ovário de hamster chinês). A linhagem HeLa (carcinoma de útero humano) não apresentou morte significativa. A resistência ao filtrado bacteriano apresentada pela linhagem HeLa pode representar a falta de receptores para esta toxina (BOYD & LINDWOOD, 1989).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que, a atividade citotóxica do filtrado bacteriano foi termo-sensível, isto é, aquecendo-o a uma temperatura maior que 60°C, por 30 minutos, o efeito citopático foi abolido, similar a citotoxina descrita por isolados clínicos de *S. marcescens* (CARBONELL, 1992).

Um dado importante obtido neste trabalho, foi que a atividade citotóxica do sobrenadante de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica em células CHO foi completamente neutralizada por antissoro policlonal, específico à citotoxina produzida por *S. marcescens* clínica, indicando que ocorre similaridade antigênica entre as citotoxinas produzidas por estes isolados.

Nos testes de citotoxicidade em plantas, pode-se observar que os sobrenadantes de cultura de *S. marcescens* fitopatogênica e clínica não provocam alterações morfológicas visíveis nas plantas analisadas, nem inibiram o crescimento de tecido vegetal em cultura de alface *in vitro*, mesmo quando utilizado sobrenadante concentrado em até 10 vezes com sulfato de amônio, enquanto que, com a utilização de suspensão bacteriana, tanto de origem clínica quanto fitopatogênica, observou-se o aparecimento de sintomas de doença como murcha e apodrecimento de escamas

em bulbos de cebola e cotilédones de alface, sintomatologia semelhante àquelas provocadas por bactérias do gênero *Erwinia* (BERIAM *et al.*, 1990).

A ocorrência de espécies bacterianas de origem clínica em vegetais e vice-versa é um fato conhecido. Outras espécies clínicas já foram detectadas causando patologia em vegetais, como é o caso de *Enterobacter cloacae* (RODRIGUES NETO, 1997), e de *Pseudomonas aeruginosa* (LEBEDA *et al.*, 1984).

Os resultados obtidos nos levam a acreditar que a citotoxina produzida por *S. marcescens* fitopatogênica e clínica não induz efeito tóxico às plantas, nas condições experimentais adotadas, ou que provavelmente há outro(s) fator(es) que determina(m) a doença nestas plantas.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que isolados clínicos e fitopatogênicos provavelmente produzem citotoxinas semelhantes, o que é de interesse para futuros estudos sobre a compreensão do papel biológico destas citotoxinas.

CONCLUSÕES.

- *Serratia marcescens* fitopatogênica produz citotoxina ativa em diferentes linhagens celulares animais em cultura.
- Termo-estabilidade e características biológicas da atividade citotóxica do sobrenadante de cultura de *Serratia marcescens* fitopatogênica são similares à *S. marcescens* de origem humana.
- Sobrenadante de cultura de *Serratia marcescens* fitopatogênica não apresentou atividade tóxica à tecidos vegetais, bulbos de cebola e plântulas de alface.
- Atividade citotóxica de *S. marcescens* isolada de plantas foi neutralizada completamente com anti-soro anti-citotoxina de *S. marcescens* de origem clínica, indicando similaridade antigênica entre as citotoxinas produzidas por estes isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ANDRADE, C.F.S.; PIEROZZI JUNIOR, I. & HABIB, M.E.M. Ocorrência natural de doenças infecciosas em populações do "bicudo", *Anthonomus grandis* Boheman, 1843. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 9., Londrina, **Sociedade Entomológica do Brasil**, p.154. 1984.

BERIAM, L.O.S.; SINIGAGLIA, C. & RODRIGUES NETO, J. *Serratia marcescens* associada a podridão de cebola armazenada. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**. v.18, (supl.), p.296. 1990.

BIZETTE, G.A.; LINDBERG, J.S. & FIGUEROA, J.E. *Serratia marcescens* peritonitis in a patient receiving chronic ambulatory peritoneal dialysis complicated by osteomyelitis. **J. La State Med Soc.**, 147: 64-67. 1995.

BOLLMANN, R.; HALLE, E.; SOKOLOWSKA-KOHLER, W.; GRAUEL, E.L.; BUCHHOLZ, P.; KLARE, I. & TSCHAPE, H. Nosocomial infections due to *Serratia marcescens*- clinical findings, antibiotic susceptibility patterns and fine typing. **Infection**, 17:294-300. 1989.

BORENFREUND, E. & PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. **Journal of Tissue Culture Methods**, 9:7-9. 1984.

BOYD, S. & LINDWOOD, C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. **Nefron**, 51:207-10. 1989.

CAMPBELL, J.R.; DIACOVO, T. & BAKER, C.J. *Serratia marcescens* meningitis in neonates. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 11: 881-886. 1992.

CAPALBO, D.M.F. & MORAES, I.O. Aspectos da produção de *Bacillus thuringiensis*. In: Controle Biológico de Insetos. **Sociedade Entomológica do Brasil. Anais-2. Campinas, Fundação Cargill**. p.75-84. 1988.

CARBONELL, G.V. *Serratia marcescens* de origem hospitalar: sorotipagem, resistência à drogas antimicrobianas e fatores de virulência. **Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Londrina**. 1992.

CARBONELL, G.V.; LEVY, C.E. & VIDOTTO, M.C. *Serratia marcescens*: studies on normal human serum resistance, serogrouping and pathogenicity for mice. **Rev. Microbiol.**, 23:72-5. 1992.

CARBONELL, G.V. & VIDOTTO, M.C. Virulence factors in *Serratia marcescens*: cell-bound hemolysin and aerobactin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 25:1-8, 1992.

CARBONELL, G.V.; FONSECA, B.A.L.; DARINI, A.L.C.; FIGUEIREDO, L.T.M. & YANAGUITA, R.M. Conditions culture effect cytotoxin production by *Serratia marcescens*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 1996.

CARBONELL, G.V. Atividade de uma citotoxina produzida por *Serratia marcescens* em cultura de células e *in vivo*. São Paulo, 87p. **Tese (doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.** 1997.

CASALE, C.M. Regeneração somática *in vitro* em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) e aplicação no melhoramento genético. **Tese (mestrado). Universidade Estadual de Campinas.** p28-30. 1996.

DODSON, W.H. *Serratia marcescens* septicemia. **Arch. Intern. Med.**, **121**:145-150. 1968.

DONOWITZ, L.G.; MARIK, F.J.; HOYT, J.W. & WENZEL, R.P. *Serratia marcescens* bacteremia from contaminated pressure transducers. **J. Am. Med. Assoc.**, **242**:1749-53. 1979.

FARMER, J.J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: Murray, P. R. **Manual of Clinical Microbiology.** 6rd ed. Washington, DC, American Society for Microbiology Press, p.438-49. 1995.

FINLAY, B.B. & FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol. Review.**, **53**:210-30. 1989.

GRIMONT, P.A.D. & GRIMONT, F. The genus *Serratia*. **Ann. Review Microbiol.** **32**:221-48, 1978.

GRIMONT, P.A.D. & GRIMONT, F. Genus VIII. *Serratia*. In: Krieg N.R., Holt J.G. (eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, Williams and Wilkins. vol.1. 477-484. 1984.

GYLES, A.A. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Can. J. Microbiol.**, **38**:734-46. 1992.

HINES, D.A., SAURUGGER, P.N.; IHLER, G.M. & BENEDIK, M.J. Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, **170**:4141-4146. 1988.

HOEKSTRA, N. & KFIR, R. Microbial pathogens of the cereal stem borers *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae) in South Africa. **African Entomology**, **5(1)**: 161-163. 1997.

ITO, M.F.; PARADELA FILHO, O.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L.O.S.; LONGO, R.S.; SANTOS, J.M. Ocorrência de *Serratia marcescens* Bizio sobre lagartas de *Heliothis virescens* (Fabr.). **Bragantia**, **55(2)**:289-292. 1996.

ITO, H.; ANAKAWA, Y.; OHSUKA, S.; WASHATAYANKUN, R.; KATO, N. & OHTA, M. Plasmid mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene bla IMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39**:824-9. 1995.

JOINER, K.A. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing and the mechanism of action of bactericidal antibody. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **121**:99-133. 1985.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I. & STRAVIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Inf. Immun.**, **18**(3):775-779. 1977.

LAKSO, J.U. & STARR, M.P. Comparative injuriousness to plants of *Erwinia spp* and other *Enterobacteria* from plants and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, **33**(4):692-707. 1970.

LEBEDA, A.; KUDELA, V. & JEDLICKOVÁ, Z. Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* for plants and animals. **Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.**, **19**:271-284. 1984.

MARRIE, T.J. & CASTERTON, J.W. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. **Appl. Environ. Microbiol.**, **42**:1093-1102. 1981.

MATSUMOTO, K. ; MAEDA, H.; TAKADA, K. ; KAMATA, R. & OKAMURA, R. Purification and characterization of four proteases from a clinical isolate of *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, **157**: 225-232. 1984.

MATSUYAMA, T.; FUJITA, M. & YANO, I. Wetting agent producing by *Serratia marcescens*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **28**:125-129. 1985.

MATSUYAMA, T.; MURAKAMI, T.; FUJITA, M.; FUJITA, S. & YANO, I. Extracellular vesicle formation and bio-surfactant production by *Serratia marcescens*. **J. Gen. Microbiol.**, **132**:865-875. 1986.

MATSUYAMA, T.; KANEDA, K.; NAKAGAWA, Y.; ISA, K.; HARA-HOTTA, H. & YANO, I. A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, **174**:1769-1776. 1992.

MAYER, K.H.; HOPKINS, J.D.; GILLIECE, E.S.; CHAO, L. & O'BRIEN, T.F. Molecular evolution, species distribution and clinical consequences of an endemic aminoglycoside resistance plasmid. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **29**:628-33. 1986.

MAYER, L.W. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. **Clin. Microbiol. Review**, **1**:228-43. 1988.

MELTZ, D.J. & GRIECO, M.H. Characteristics of *Serratia marcescens* pneumonia. **Arch. Intern. Med.**, **132**:359-64. 1973.

MILLS, J. & DREW, D. *Serratia marcescens* endocarditis: a regional illness associated with intravenous drug abuse. **Ann. Intern. Med.**, **84**:29-35. 1976.

MONREAL, J. & REESE, E.T. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Can. J. Microbiol.**, **15**:689-696. 1969.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** **15**:473-497. 1962.

NAKASHIMA, A.K.; MCCARTHY, M.A.; MARTONE, W.J. & ANDERSON, R.L. Epidemic arthritis caused by *Serratia marcescens* and associated with a benzalkonium chloride antiseptic. **Journal Clinical of Microbiology** **25**:1014. 1987.

OKUDA, T.; ENDO, N. & OSADA, Y. Outbreak of nosocomial urinary tract infections caused by *Serratia marcescens*. **Journal of Clinical Microbiology**, **20**:691-695. 1981.

PAGANI, L.; LUZZARO, F.; RONZA, P.; ROSSI, A.; MICHELETTI, P.; PORTA, F. AND ROMERO, E. A outbreak of extended-spectrum beta-lactamase producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit. **FEMS Immunology Med. Microbiol.**, **10**:39-46. 1994.

PARMENT, P.A.; SVANBORG-EDEN, C.; CHAKNIS, M.J.; SAWANT, A.D.; HADBERG, L.; WILSON, L.A. & AHEARN, D.G. Hemagglutination (fimbriae) and hydrophobicity in adherence of *Serratia marcescens* to urinary tract epithelium and contact lenses. **Curr. Microbiol.** **25**:113-8, 1992.

PARMENT, P.A.; RONNERSTAM, R. & WALDER, M. Persistence of *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* and *E. coli* in solutions for contact lenses. **Acta Ophthalmol.**, **64**:456-462. 1986.

PHAFF, H.J. & MILLER, M.W. A specific microflora associated with fig wasp, *Bastophaga psenes* Linnaeus. **J. Insect Phatol.**, **3(3)**: 233-43. 1961.

RODRIGUES NETO, J. Estudo comparativo em linhagens de *Enterobacter cloacae* isoladas de plantas e de casos clínico-hospitalares. Campinas. SP. **Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas.** 1997.

SEARS, C.L. & KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.** **60**:167-215. 1996.

SEKANINOVA, G. ; KOLAROVA, M. ; SEMRADOVA, S.; TABORSKA, D. & ZAJICOVA, V. Nosocomial infections caused by selected gram-negative bacteria at the Anaesthesiology and Intensive Care Unit of the Teaching Hospital in Brno. **Cent. Eur. Journal Public Health**, 3:80-3. 1995.

SPANGLER, B.D. Structure and function of cholera toxin and related *E. coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Review**, 56:622-647. 1992.

SZEWZYK, U.; SZEWZYK, R. & STENSTROM, T.A. Growth and survival of *Serratia marcescens* under aerobic and anaerobic conditions in the presence of materials from blood bags. **J. Clin. Microbiol.**, 31:1826-30. 1993.

THELESTAM, M. & FLORIN, I. Assay of cytophagogenic toxins in cultured cells. **Methods in Enzymology**, 235:679-690. 1994.

VOLKOW-FERNANDEZ, P.; LÉON-ROSALES, S.P.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; CALVA-MERCADO, J.J.; RUIZ-PALACIOS, G.M. & CÉRBON, M.A. Epidemia de bacteremias primarias por una cepa endémica de *Serratia marcescens* en una unidad de terapia intensiva. **Salud Pública de México** 35:440-7. 1993.

YAMAMOTO, T.; ARIYOSHI, A. & AMAKO, K. Fimbria mediated adherence of *Serratia marcescens* US5 strain to human urinary bladder surface. **Microbiol. Immunol.**, 29:677-681. 1985.

YU, V.L. *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. **New Engl. J. Medical**, 300:887-91. 1979.

ZAIDI, M.; SIFUENTES-ORSONIO, J.; BOBADILHA, M.; MONCADA, D. & PONCE DE LÉON, S. Epidemic of *Serratia marcescens* bacteremia and meningitis in a neonatal unit in Mexico City. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, 10:14-20. 1981.

APÊNDICE

Vol. 43, No. 4
October - December, 2001
pp. 165 - 170

Cytotoxin production in phytopathogenic and entomopathogenic *Serratia marcescens*

M.M. Escobar,* G.V. Carbonell,* L.O.S. Beriam,** W.J. Siqueira*** and T. Yano*

ABSTRACT. In this work, culture filtrates of entomopathogenic and phytopathogenic *Serratia marcescens* strains induced cytotoxic effects on CHO, Vero and HEP-2 cell lines. Morphological changes on sensitive cells were characterized by cell rounding and detachment as soon as 30 min of incubation, culminating in cell death after 24 h. The cytotoxic effect was completely neutralized by specific antiserum indicating that occur antigenic similarity among cytotoxins produced by these strains. The toxicity assays on plants showed that the culture supernatants did not provoke any visible morphological change and did not affect their growth. By contrast, the plants treated with bacterial suspension showed disease symptom, such as shriveling and decay of stores bulbous in onion and lettuce plantlets. In conclusion, this study show that phytopathogenic and entomopathogenic *S. marcescens* may produce a cytotoxin similar to that produced by clinical isolates and it is toxic to different mammalian cell lines. These results are especially important for studies involving this bacterium as biological control agent.

Key words: *Serratia marcescens*, cell culture, cytotoxins, virulence factors.

INTRODUCTION

Serratia marcescens is a Gram-negative bacillus classified as a member of the family Enterobacteriaceae commonly found in soil, water, plants and animals.⁷ This bacterium has been recognized as an important nosocomial pathogen, causing urinary and respiratory tract infections,^{11,14} bacteremias,¹⁷ meningitis,² and septic arthritis.¹³

In plants, *S. marcescens* can be found on healthy plants or as a phytopathogen, such as in onion (*Allium cepa* L.), causing decay of stores bulbs.¹ The disease caused on vegetables like soft rot of potato, tomato, etc., is very similar to those caused by *Erwinia* strains.⁸

S. marcescens produces several exoenzymes such as gelatinase, lecithinase, proteinase and chitinase,⁹ that may be harmful to insects, and the pathogenicity depends on stress conditions affecting the host insect.¹⁰ A detailed study on the species and biotypes of *S. marcescens* associated with insects

RESUMEN. En este trabajo, filtrados del cultivo de cepas de *Serratia marcescens* entomopatógenas y fitopatógenas indujeron efectos citotóxicos sobre las líneas celulares CHO, Vero y Hep-2. Los cambios morfológicos sobre las células sensibles se caracterizaron por el redondeamiento de las células y el despegado de las placas, a partir de los 30 min de incubación y terminando a las 24 h, con la muerte celular. El efecto citotóxico fue neutralizado completamente por un antisuero específico, lo que sugiere que existe similitud antigénica entre las citotoxinas producidas por estas cepas. Los ensayos de toxicidad sobre plantas, mostraron que los sobrenadantes del cultivo no provocaron ningún cambio morfológico visible y no afectaron su crecimiento. Por el contrario, las plantas tratadas con la suspensión bacteriana mostraron síntomas de la enfermedad, tales como en plantas de cebolla y lechuga. En conclusión, este estudio muestra que *S. marcescens* entomopatógena y fitopatógena puede producir una citotoxina similar a la producida por aislados clínicos y que es tóxica a diferentes líneas celulares de mamíferos. Estos resultados son especialmente importantes para estudios que involucran esta bacteria como un agente de control biológico.

Palabras clave: *Serratia marcescens*, citotoxinas, factores de virulencia.

showed that the major group was the pigmented *S. marcescens* biotype A2a.⁷ Pigmented biotypes of *S. marcescens* are more frequently recovered from natural environments and are rarely responsible for an outbreak of nosocomial infection.²

Recently, it was demonstrated that clinical isolates of *S. marcescens* can produce a toxin active on epithelial cells grown *in vitro*.³ This cytotoxin is extracellular, heat-labile and culture conditions identified as optimal were incubation at temperatures ranging from 30 to 37°C for 24h, under shaking, in medium adjusted to pH 8.5.⁵

In the present study we investigated the ability of *S. marcescens* isolated from plants and insects to produce cytotoxins active on mammalian cell lines and to compare it with the cytotoxin produced by clinical isolates of *S. marcescens*. The effect of the toxin in plants and the serological relationship with cytotoxin produced by clinical *S. marcescens* were also evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains. The phytopathogenic *Serratia marcescens* strains isolated from lettuce (numbers 5/6 and 6/5) and onion (*Allium cepa* L.) (number 980) and the entomopathogenic strain isolated from *Heliotis virescens* worm (number 981) were obtained from the culture collection of the Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Expe-

* Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil.

** Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Centro Experimental, Instituto Biológico de São Paulo, Campinas, SP, Brasil.

*** Laboratório de Cultura de Tecidos, Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

rimental do Instituto Biológico de São Paulo, Campinas, Brasil. The previously characterized cytotoxin-producing *S. marcescens* (number 458) isolated from urinary infection³ was used as a reference strain.

Preparation of bacterial culture filtrates. *S. marcescens* strains were cultured in 10 ml of Trypticase Soy Broth (TSB, Difco Lab., Detroit, MI) at 37°C for 18 h, with shaking at 110 rpm. Bacterial cultures were centrifuged (10,000 x g for 10 min at 4°C) and the culture supernatants were filtrated through 0.2 µm filters. Alternatively, after centrifugation of bacterial culture, the supernatant was 10-fold fractionated with ammonium sulfate at 80% saturation and the pellet was extensively dialyzed with Tris-HCl buffer (pH 7.0).

Cytotoxicity assays. The cell lines HeLa (human cervix), Vero (African Green Monkey kidney), HEp-2 (human larynx) and CHO (Chinese hamster ovary) cells, obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) were tested for the cytotoxicity as previously described.³ Briefly, the cells were grown in tissue culture flasks in Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were detached from the flasks with trypsin-EDTA, resuspended to approximately 104 cells/ml in Eagle medium and 0.1 ml samples were pipetted into each well of a 96-well microtiter plate. Confluent monolayers were inoculated with bacterial culture filtrates and the plates incubated at 37°C in 5% CO₂ for 24 h. As negative controls some wells received only TSB medium or *E. coli* K12/711 supernatant filtrates, and as positive control, filtrates of *E. coli* H30 (producing verocytotoxin) and *S. marcescens* 458 were used. Cell monolayer morphology was observed under an inverted microscope and checked for cytotoxic effect daily for 3 days.

Determination of cell viability. Cellular viability was determined for assays with mammalian cells, as described previously.⁵ After cytotoxic assay (incubation with filtrates for 24 h), the media containing the bacterial filtrates were removed and cultures were washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS), 0.025 M, pH 7.4. To each well, 0.2 ml Eagle medium containing 50 µg/ml neutral red was added and the plate was incubated for 3 h at 37°C. The media containing the dye were removed and each well was washed for 2-3 min with formol-calcium solution (40% formaldehyde, 10% anhydrous calcium chloride) to remove unincorporated neutral red. Finally, 0.2 ml of an acetic acid-ethanol mixture (1.0 ml glacial acetic acid in 100 ml 50% ethanol) was added to each well and the plate was kept for 15 min at room temperature in order to remove the dye from the viable cells. Plates were transferred to a spectrophotometer (Titertek Multiskan model 340) and read with a 540 nm filter. Control cell cultures received medium without bacterial filtrates. Cell viability was determined by comparison to the absorbance values obtained for control wells (without toxin), which were taken as 100% cell viability.

Toxicity assays on lettuce tissue culture. Seeds of lettuce were surface-sterilized by immersion in 70% ethanol for 1 min, followed by 2.5% sodium hypochloride for 60 min and thoroughly rinsed in sterile distilled water. They were transferred to Petri dishes containing medium for germination (water-agar) and maintained in culture room at 25 ± 3°C. After 7 days, cotyledons of plantlets growth were removed, cut and inoculated on plates containing Murashige & Skoog (MS) medium¹² in the presence of culture filtrate of phytopathogenic, entomopathogenic and clinical *S. marcescens* two-fold serially diluted. Ten explants for each plate were inoculated and plates were incubated as described above, for observation of the callus formation. Evaluation was carried out after 15 days of growth, using as parameters: callus absence; small callus on some points of explants; small callus on all periphery of explants; callus more developed and involving all explants.

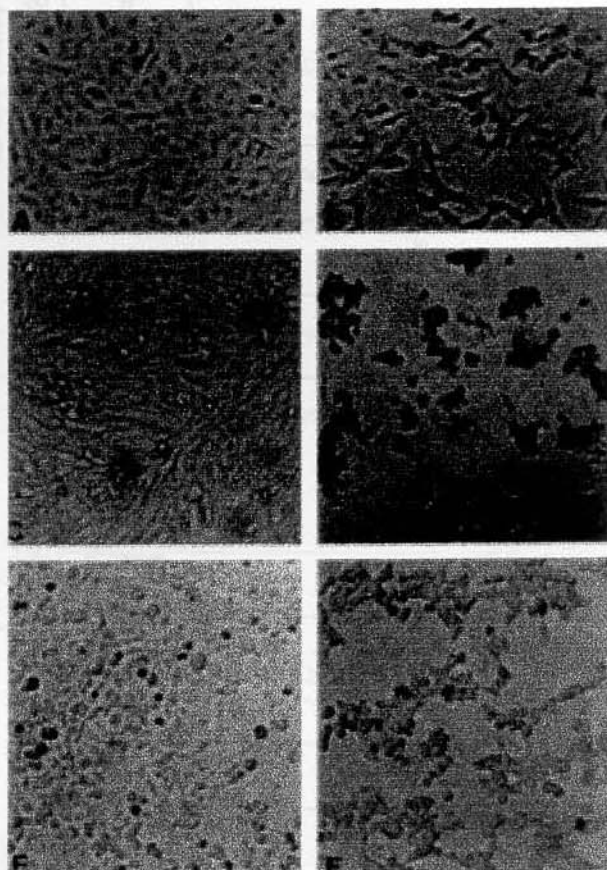


Figure 1. Effect of environmental *S. marcescens* supernatants number (980) on morphology of mammalian cells. (A) Untreated Vero cells; (B) Vero cells 24 h after treatment; (C) CHO negative control; (D) CHO cells 24 h after treatment; (E) Untreated HEp-2 cells; (F) HEp-2 cells 24 h after treatment.

Phytotoxicity on onion bulbs. The assay was carried out for all *S. marcescens* strains by injecting 1 ml of culture filtrates or 1 ml of the same filtrates concentrated 10-fold with ammonium sulfate (80%) in onion bulbs. The bulbs were maintained at room temperature during 5 days with the root immersed in water. As negative control were used bulbs treated with sterile distilled water and as positive control

suspension of *S. marcescens* (1×10^8 CFU/ml). After 5 days, the bulbs were sliced by half and observed for decay.

Phytotoxicity on lettuce plantlets. Seeds of lettuce were sterilized and put into 24 wells microplate, containing water-agar medium and placed in the culture room at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ until development of plantlets. After this period, to each well was applied 0.5 ml of culture filtrates of *S. marcescens* stra-

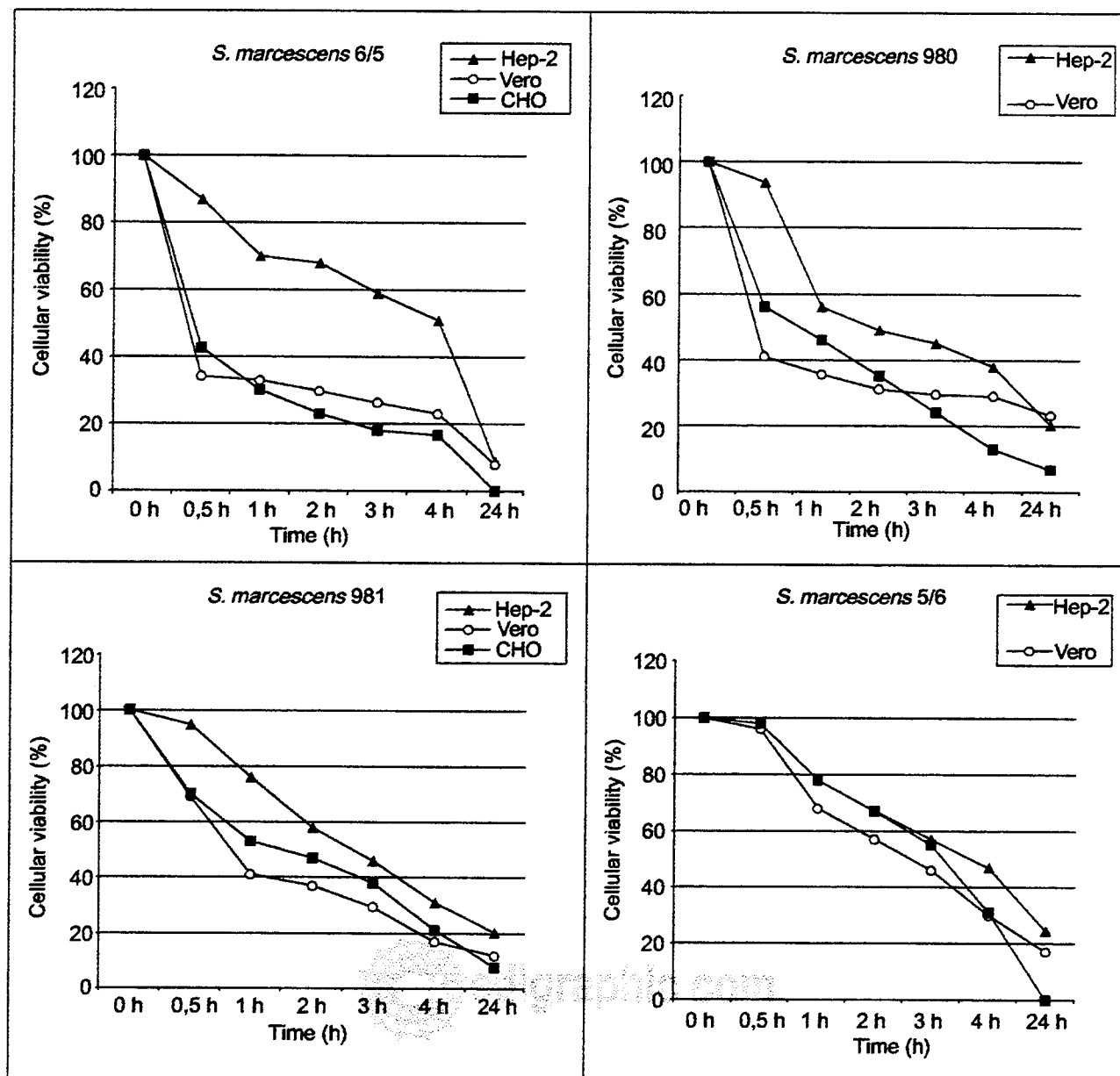


Figure 2.

ins 10-fold concentrated with ammonium sulfate (80%). Negative controls included seeds treated with TSB medium and as positive control, the seeds that received suspension of

phytopathogenic, entomopathogenic and clinical *S. marcescens*. After 7 days of incubation in culture room, the plantlets were analyzed with a magnifying glass lens.

Preparation of antiserum. Rabbits were injected intramuscularly with cytotoxin produced by the clinical strain. Samples of 50 μ l of purified cytotoxin (75 μ g/ml) were emulsified in an equal volume of complete Freund adjuvant, with subsequent injections in incomplete adjuvant. Animals were bled at 2-week intervals and checked for neutralizing titres. Antiserum obtained was inactivated at 56°C for 30 min.

Seroneutralization assay. The seroneutralization assay was carried out as described previously,¹⁵ with antiserum produced in rabbits against purified cytotoxin produced by the clinical *S. marcescens* strain 458. Anti-cytotoxin sera were serially diluted in Eagle medium and mixed with filtrates of phytopathogenic and entomopathogenic *S. marcescens*. Negative controls with preimmune serum were also included. The mixtures were incubated for 1 h at 37°C prior to inoculation in CHO cells.

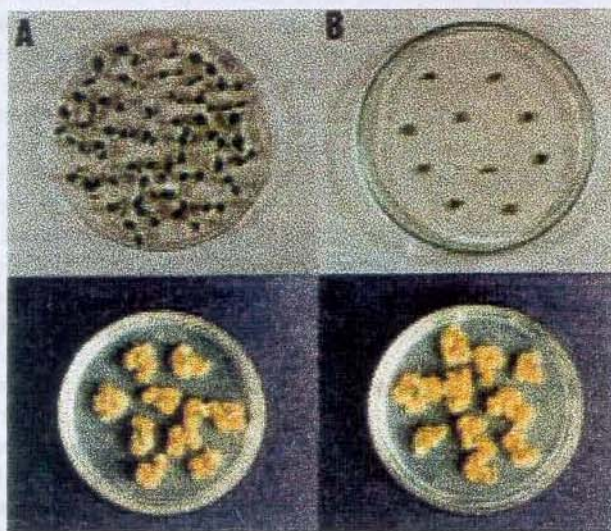


Figure 3.

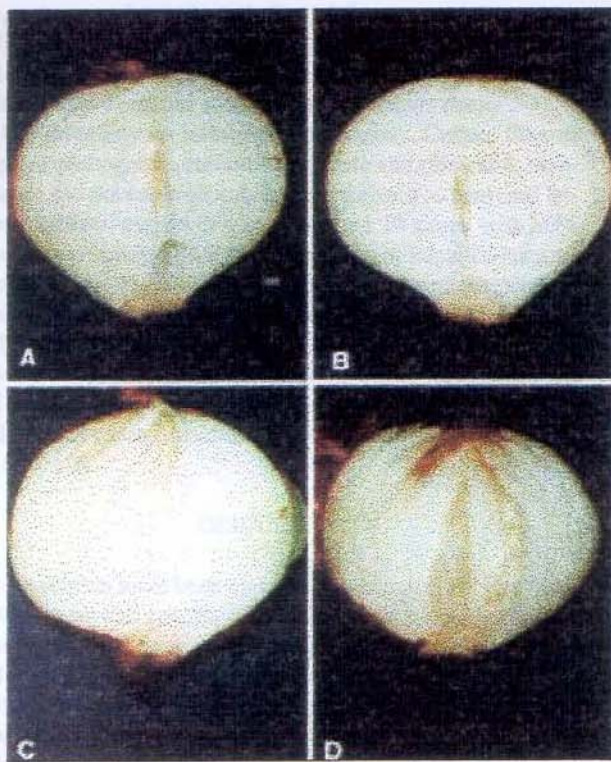


Figure 4.

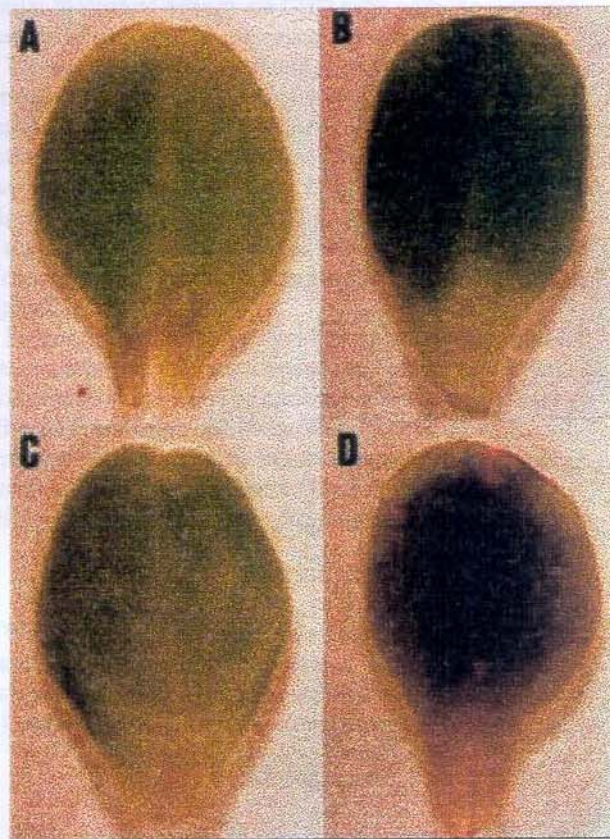


Figure 5.

RESULTS

Cytotoxicity assays on mammalian cells. Cytopathic effects were observed in CHO, Vero and HEp-2 cells treated with culture supernatant from phytopathogenic and entomopathogenic *S. marcescens*. After 24 h of incubation, there was a change from spindle-shaped cells characteristic of normal cells to round and shrivelled cells, and these changes were followed by gradual destruction of the monolayer (Fig. 1). The HeLa cells were unresponsive and did not exhibit cytopathic effects under conditions in which other cell lines did.

Determination of cellular viability. Cellular viability of the Vero, CHO and HEp-2 cells was determined for all *S. marcescens* strains and the results were closely similar. Figure 2 shows that cell death occurred rapidly, as early as 0.5 h after incubation with supernatant of 6/5, 5/6, 981 and 980 environmental strains. Toxicity assays on plant tissue culture. As shown in Figure 3, the culture filtrates of phytopathogenic, entomopathogenic and clinical *S. marcescens* were not toxic to lettuce seedling *in vitro*. All the explants inoculated in MS medium supplemented with several dilutions of supernatants filtrates showed callus development, involving all explants.

Phytotoxicity on onion bulbs assay. Figure 4 shows the results obtained with culture filtrates of phytopathogenic, entomopathogenic and clinical *S. marcescens* inoculated in onion bulbs. It can be observed that apparently did not cause any tecdual alteration, in contrast with bulbs inoculated with bacterial suspension, that shows decay .

Phytotoxicity on lettuce plantlets assay. Culture filtrates of phytopathogenic, entomopathogenic and clinical *S. marcescens* did not cause morphological changes on analyzed lettuce plantlets, even when concentrated 10 times with 80% ammonium sulfate. With the inoculation of bacterial suspension, it can be observed the appearance of symptoms such as shriveling and necrotic stains on plantlets cotyledons (Fig. 5).

Seroneutralization assays. The cytotoxic activity from phytopathogenic and entomopathogenic *S. marcescens* on CHO cells was completely neutralized by antiserum obtained against cytotoxin of the clinical *S. marcescens*, with titre of 1/128.

DISCUSSION

Cytotoxins have been considered as important virulence factors in several species of bacteria⁶ and are detected on the basis of the degree of the damage imposed to several mammalian cell lines, evidenced by morphological changes.⁶

Serratia marcescens isolated from clinical specimens can produce an extracellular cytotoxin active on epithelial cell lines in culture.⁵ However, as far as we know there are no data on cytotoxin production by environmental *S. marcescens*.

In this work, supernatants of the *S. marcescens* isolated from plants and insects were capable of damaging mammalian cell lines, *in vitro*. Morphological changes on the sensitive cell lines were characterized by cell rounding and detachment (Fig. 1), culminating in cell death. The cytopathic effect observed resemble those described in cells inoculated with cytotoxin produced by clinical isolates.³

The sensitivity of several cell lines to cytotoxin produced by entomopathogenic and phytopathogenic was compared in this study. Figure 2 shown that CHO, Vero and HEp-2 lines were similarly sensitive for all strains tested, with cytopathic effects observed as soon as 30 min of incubation with culture filtrates and it was confirmed by measured of the cellular viability ranging 40%. Moreover, the HeLa cells were resistant to all culture filtrates, as shown in cellular viability assays.

The cytotoxic activity of the supernatants obtained from culture of phytopathogenic and entomopathogenic *S. marcescens* on CHO cells was completely neutralized by specific polyclonal antiserum anti-cytotoxin produced by clinical *S. marcescens*. It indicates that these strains produces toxins antigenically related. Moreover, the cytotoxin shows similar biological activity on CHO cells with the cytotoxin produced by clinical *S. marcescens*.

The toxicity assays on plants shows that the culture supernatants not provoked any visible morphological changes and did not affect their growth. By contrast, the plants treated with bacterial suspension shown disease symptom, such as shriveling and decay of stores bulbus in onion (Fig. 4) and lettuce plantlets (Fig. 5). On the basis of these results, it appears that the extracellular factor capable of damaging cultured cells was not responsible by disease in plants.

In conclusion, this study shows that phytopathogenic and entomopathogenic *S. marcescens* may produces a cytotoxin similar to produced by clinical isolates and it is toxic to different mammalian cell lines. These results are especially important for studies involving this bacterium as biological control agent. At present, more detailed study of biological activity of this cytotoxin is in progress in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Raully Maximo Rabelo Moreti (Laboratório de Cultura de Células, Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agrônômico de Campinas, Brasil), for excellent technical support.

REFERENCES

1. Beniam, L.O.S., Siigaglia, C., and Rodrigues Neto, J. 1990. *Serratia marcescens* associada a podridão de cebola armazenada. Fitopatol. Bras. 18:296.

2. Campbell, J.R., Diacovo, T., and Baker, C.J. 1992. *Serratia marcescens* meningitis in neonates. *Ped. Infect. Dis. J.* 11:881-886.
3. Carbonell, G.V., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., Vidotto, M.C., Levy, C.E., Darini, A.L.C., and Yanaguita, R.M. 1997. Detection of cytotoxic activity on Vero cells in clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30:1291-1298.
4. Carbonell, G.V., Della Colleta, H.H.M., Yano, T., Darini, A.L.C., Levy, C.E., and Fonseca, B.A.L. 2000. Clinical relevance and virulence factors of pigmented *S. marcescens*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 28:143-149.
5. Carbonell, G.V., Fonseca, B.A.L., Figueiredo, L.T.M., Darini, A.L.C., and Yanaguita, R.M. 1996. Culture conditions affect cytotoxin production by *Serratia marcescens*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 16:299-307.
6. Finlay, B.B., and Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 53:210-230.
7. Grimont, P.A.D., Grimont, F., and Lysenko, O. 1979. Species and biotype identification of *Serratia* strains associated with insects. *Curr. Microbiol.* 2:139-142.
8. Ito, M.F., Paradela Filho, O., Rodrigues Neto, J., Beriam, L.O.S., Longo, R.S., and Santos, J.M. 1996. Ocorrência de *Serratia marcescens* Bizio sobre lagartas de *Heliothis virescens* (Fabr.). *Bragantia*, 55(2):289-292.
9. Kaška, M., Lysenko, O., and Chaloupka, J. 1976. Exocellular proteases of *Serratia marcescens* and their toxicity to larvae of *Galleria mellonella*. *Folia Microbiol.* 21:465-473.
10. Lysenko, O. 1976. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. *J. Invertebr. Pathol.* 27:385-386.
11. Meltz, D.J., and Grieco, M.H. 1973. Characteristics of *Serratia marcescens* pneumonia. *Arch. Int. Med.* 132:359-364.
12. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 5:473-497.
13. Nakashima, A.K., McCarthy, M.A., Martone, W.J., and Anderson, R.L. 1987. Epidemic arthritis caused by *Serratia marcescens* and associated with a benzalkonium chloride antiseptic. *J. Clin. Microbiol.* 25:1014.
14. Okuda, T., Endo, N., and Osada, Y. 1981. Outbreak of nosocomial urinary tract infections caused by *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* 20:691-695.
15. Parreira, V.R., and Yano, T. 1998. Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). *Vet. Microbiol.* 62:111-119.
16. Thelestam, M., and Florin, I. 1994. Assay of cytopathogenic toxins in cultured cells. *Methods Enzymol* 235:679-690.
17. Volkow-Fernández, P., León-Rosales, S.P., Sifuentes-Osornio, J., Calva-Mercado, J.J., Ruiz-Palacios, G.M., and Ma. Cérbon. 1993. Epidemia de bacteremias primarias por una cepa endémica de *Serratia marcescens* en una unidad de terapia intensiva. *Salud Pública de México* 35:440-7.

Correspondence to:

Gleize Villela Carbonell

Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB,
 Universidade Estadual de Campinas
 13081-970 Campinas, SP, Brasil.
 Phone: (55) 19 7887945, Fax (55) 19 7888190
 Electronic mail: gleize@yahoo.com