

Nota prévia sôbre ensaios de combate aos Planorbídeos por métodos biológicos e bioquímicos

por

Emmanuel Dias *

Prosseguem ativamente as pesquisas que, desde fins de 1952, vimos empreendendo sôbre as possibilidades da luta microbiológica contra os planorbídeos.²

Até há pouco tempo vínhamos empregando exclusivamente um bacilo de espóro terminal (BET), hoje denominado *Bacillus pinottii* CRUZ & DIAS (1), que isolamos de ovotestes de *Australorbis glabratus* por meio de técnicas descritas (2,3). Embora tenhamos obtido resultados animadores no Brasil (3) e no Egito (4), conseguindo com um único tratamento grande mortandade de moluscos em focos naturais, conforme mostra o exemplo abaixo, não foi ainda submetido o processo à aplicação em larga escala, cujo custo estamos tentando diminuir pela procura de um substituto útil e econômico da peptona. Por outro lado, encetamos há pouco, em Bambuí e no Rio de Janeiro, experiências com microorganismos diversos, oriundos ou não de caramujos, cultiváveis em meios constituídos por materiais baratos, e com sub-produtos e resíduos de indústrias, de baixo ou nulo custo, que podem ser empregados isoladamente ou em associação a culturas. Nestas condições, tornar-se-á econômico o tratamento intensivo de criadouros, mesmo quando forem relativamente elevadas as concentrações eficazes exigidas na prática. Em geral êstes processos visam produzir uma alteração profunda das condições ecológicas do meio aquático, de natureza bio-química variável e complexa, mais ou menos duradoura, que tanto quanto possível seja incompatível com a vida dos planorbídeos. Ao mecanismo de atuação sôbre o meio aliar-se-á, no caso ideal, uma ação residual prolongada, exercida direta e especificamente pelos micróbios contra os moluscos. Como quer que seja, o esclarecimento completo dos mecanismos íntimos de ação, em causa nos diferentes processos, terá que ficar para depois, o que não é de admirar, porquanto ainda hoje se ignoram os que entram em jôgo na ação dos planorbicidas químicos, há longos anos

* Chefe da Seccão de Inquéritos e Trabalhos de Campo, Divisão de Estudos de Endemias, e do Pôsto do Instituto Oswaldo Cruz em Bambuí, Minas Gerais.

empregados. Cumpre salientar que começa apenas a ser explorado o vastíssimo campo que o presente gênero de investigações oferece, e que se nos afigura como um dos mais promissores na busca de uma solução para o problema profilático das esquistossomoses, baseada na supressão dos respectivos agentes transmissores intermediários.

Constam da presente nota, além da observação sumária do foco mais importante tratado com *B. pinottii*, os primeiros resultados que temos obtido em experiências com outros novos processos. Ensaio mais variados e em maior escala, que planejamos fazer breve em colaboração com o Serviço Nacional de Malária, permitirão ajuizar o valor prático destas investigações e fixar eventualmente as técnicas empregáveis nos diferentes tipos de criadouros, em campanhas de larga envergadura.

Focos tratados com bactérias (Bambuí)

a) *Bacillus pinottii*

1 — *Foco 27* — A descrição do foco, do tratamento e dos resultados observados até 125 dias depois constam de trabalho anterior (3). Em resumo, trata-se de um açude (fig. 1) com três saídas d'água, oval, com diâmetros máximos de 60 e 30 metros, com volume calculado em 2.181.000 litros, altamente infestado por diversos moluscos, predominando de muito o *A. glabratus*. Prêviamente ao tratamento, foram recolhidas 10.057 carapaças antigas, para não prejudicar a observação dos resultados. Foi tratado uma única vez, em 19 de abril de 1953, com 1.943 litros de cultura de *B. pinotti* em água peptonada a 1%, aos quais no momento do uso foram adicionados 15 kg de peptona Geyer; a aplicação foi feita com bombas nas margens, sôbre a vegetação sobrenadante e no fundo do açude. Caramujos mortos começaram a aparecer no 3.º dia e seu número foi crescendo rapidamente; eram apanhados, deixados em tambor perfurado deixado imerso n'água (para evitar o desperdício de bactérias dos corpos em decomposição) depois de contados. A maioria das capturas foi feita uma vez por semana, até dezembro de 1953. O resultado das contagens, computado por mês, foi o seguinte:

<i>Mês</i>	<i>N.º de mortos</i>	<i>Total acumulado</i>
Abril	942	942
Maio	21.612	22.554
Junho	34.840	57.394
Julho	43.179	100.573
Agosto	71.771	172.344
Setembro	52.702	225.046
Outubro	49.256	274.302
Novembro	19.008	293.310
Dezembro	13.887	307.197

Até então as capturas eram feitas somente na superfície e nas margens. Observando o desaparecimento quase completo dos caramujos vivos (inclusive dos cursos d'água que se originam no açude), começou-se a fazer em janeiro a apanha das cascas do fundo, que era agitado com os pés ou com bambus, o que determinava o aparecimento de grande número de cascas submersas e de sempre raros vivos. Foram assim recolhidas 225.126 carapaças em janeiro e 120.524 em fevereiro, sendo tais capturas interrompidas em março, quando se voltou ao antigo processo de captura superficial. A partir de janeiro passaram a ser feitas contagens semanais de vivos e mortos, antes de se fazer a apanha por agitação, que se lhes seguia; as margens, de cerca de 150 metros, foram divididas em 5 zo-

nas, em cada uma das quais eram dados 100 golpes de capturador grande standard, ao acaso. Na última contagem de que temos resultado, feita em 13-3-54, foram capturados apenas 22 vivos e 549 mortos (96,1%). Os vivos são recolocados n'água. O total de mortos recolhidos nesse dia foi de 1.193, que, somado à captura precedente (1.658) e às anteriores, perfaz o total acumulado de 655.698 caramujos mortos apanhados. Não se observou mortandade de outros animais. O bacilo tem sido isolado da água, de peixes vivos, de caramujos mortos e vivos.

Do ponto de vista da transmissão da esquistossomose, acha-se virtualmente extinto este grande foco, cuja população de planorbídeos foi dizimada e há tempos se mantém em nível infimo. Tal resultado foi obtido com um único tratamento, cujos efeitos continuarão a ser observados. Se o foco vier a se extinguir completamente ou se se mantiver na atual situação por longo tempo, tornar-se-á compensador o custo do tratamento feito; de fato, atualmente parece impossível conseguir-se idêntico resultado, em focos semelhantes, com os moluscocidas químicos usuais cuja aplicação, embora menos custosa, tornar-se-á mais dispendiosa, em vista das repetições exigidas na prática para consecução e manutenção de um tal resultado.

b) Outros germes

Foram empregadas culturas de germes não esporulados, ainda em estudo, originários de ovoteste de caramujos afetados de séries mantidas no laboratório (cf. 2,3), cuja atividade foi muito reforçada, pelo acréscimo ao triturado dos caramujos de cada passagem, de pequenas quantidades de açúcar mascavo ou de farelo de arroz. Foram feitas as seguintes experiências, em focos de Bambuí infestados com *A. glabratus*.

2 — *Foco 48* — Volume inicial de 73 litros; tratado com 900 gr de açúcar mascavo e 500 cc de cultura (feita em farelo de arroz a 3%). Quatro dias depois não havia nenhum caramujo vivo, coletados 574 mortos. Surpreendeu o aspecto das carapaças, que se mostravam corroídas, fragmentadas e frágeis. Posteriormente ao único tratamento: 13 dias — colocados novos caramujos vivos no foco; 16 dias — todos mortos; devido às chuvas, o volume passou a 116 litros; introduzidos outros caramujos vivos; 17 dias — todos mortos; introduzidos vivos; as figs. 2 a 5 mostram o aspecto das cascas retiradas nesse dia; 18 dias — todos mortos; vivos colocados; volume 137 l.; 19 dias — 70% de mortos; 20 dias; vol. 159 l.; vivos colocados; 44 dias — extinto.*

3 — *Foco 49* — Volume inicial 46 l.; tratado com 500 cc da mesma cultura usada no foco anterior e 500 gr de farelo de arroz. No 5.º dia havia 266 moluscos mortos e 4 moribundos, que no 6.º dia estavam mortos; 13 dias — volume 90 l., colocados outros vivos; 19 dias — vol. 99 l.; 24 dias — todos mortos; vivos introduzidos; 43 dias — 1 vivo, 18 mortos; vol. 69 l.

As carapaças apresentaram as mesmas alterações observadas nas do foco 48, sendo observadas lesões perfurantes em caramujos ainda vivos.

É importante relatar que, em dois focos semelhantes aos dois anteriores e próximos a eles, não houve mortandade nem alterações de cascas até 19 dias. Eram focos testemunhas, que nenhum tratamento receberam. Por alagamento da região por chuvas fortes e posterior comunicação entre os focos, a partir de 22º dia começaram a aparecer lesões nas cascas dos moluscos destes focos testemunhas, seguida de mortalidade progressiva, que no 44º dia era de 98,8% num deles e de 90,0% no outro.

4 — *Foco 51* — Poço numa nascente, com pouca água de saída, volume de aproximadamente 7.250 l. Foi feito um tratamento diferente do comum, somente

* Alterações semelhantes das carapaças têm sido observadas em soluções de açúcar mascavo fermentadas, sem acréscimo de culturas.

de superfície, baseado no fato de que os moluscos são obrigados a freqüentar a tona. Cerca de 20 l. de farelo de arroz foram aplicados, a pequenos punhados, na superfície d'água, formando-se uma camada espessa sobrenadante que foi aspergida, em leque fino, com 12 litros de cultura. Até o 21º dia foram recolhidos 171 caramujos mortos (98,8%), sendo então encontrados apenas 2 vivos. A camada tornou-se enegrecida e com as chuvas foi muito fragmentada.

Para experimentar o princípio do tratamento de superfície, que é aplicável a focos de água estagnada, com a vantagem de não levar em conta o volume líquido, fizemos no Rio de Janeiro um tratamento usando agente químico fluante, o querosene, que foi aplicado cuidadosamente na tona de um poço com 92 litros de capacidade e 49 cm de profundidade; quatro dias mais tarde foram colhidos, lavados e contados 650 *Australorbis nigricans* (*A. immunis*) mortos, não restando nenhum vivo.

Focos tratados com levêdo (*Saccharomyces cerevisiae*), situados em Bambuí e infestados com *A. glabratus*:

5 — *Foco 20* — Volume inicial 44 litros; tratado com 500 gr de açúcar mascavo e 100 gr de levêdo úmido comprimido. Em 2 dias, 98 caramujos mortos e 2 moribundos que estavam mortos no 3.º dia; 13 dias — vol. 53 l., colocados planorbídeos vivos; 16 dias — todos mortos, novos vivos introduzidos; 19 dias — mortos; vivos colocados; vol. 75 l.; 26 dias — vol. 107 l.; 29 dias — restam 3 vivos, vol. 91 l.; 39 dias, nenhum vivo.

6 — *Foco 24* — “Cacimba”, vol. 473 l., tratada com 200 gr de levêdo e 5 kg de açúcar mascavo. 3 dias — 72 vivos muito afetados e 36 mortos; 5 dias — 418 mortos, 0 vivos; 15 dias — colocados caramujos vivos; 18 dias — todos mortos, vol. 1021 litros d'água.

7 — *Foco 50* — “Cacimba” ou poço, vol. 160 l., recebeu 1 rapadura (1.340 gr) jogada inteira e 100 gr de levêdo. 3 dias — 112 vivos, 48 mortos; 5 dias — mais 199 mortos e 5 moribundos; 10 dias — nenhum vivo; 15 dias — colocados caramujos vivos; 18 dias — 6 vivos e 89 mortos, vol. 326 l.

8 — *Foco 40* — Poço de volume aproximado de 21.500 litros, com entrada e saída d'água, tratado com 100 litros de cultura de levêdo (em açúcar e em água 1%) e 50 kg de açúcar mascavo, que ia sendo dissolvido na cultura e em água e aplicado com bomba nas margens, tona e fundo, mais nas margens. Até 22 dias depois do tratamento foram recolhidas 359 cascas, restando nesse dia 10 vivos (97,3% de mortalidade). Houve grande aumento da renovação da água devido às chuvas.

Focos situados em Jacarepaguá, Distrito Federal, infestados com *A. nigricans* (*A. immunis*):

9 — Vala medindo 16,10 m por 1,0 m e 0,44 m de profundidade média, vol. aproximado de 7.084 litros, com água correndo pouco na parte inferior, proveniente de uma vala de agrião infestada; a entrada d'água, no outro extremo, estava interrompida. Foi tratada com 70 kg de açúcar refinado (à falta de ordinário) e 40 l. de levêdo, em dia quente. Três horas depois era franco o desenvolvimento da fermentação. Um e dois dias depois, superfície tôda recoberta por espessa camada espumosa (fig. 6), vendo-se numerosos caramujos e peixinhos mortos. No 4.º dia, aspecto muito diverso, água quase límpida e sem espuma, como se houvesse sido renovada, embora os agricultores informassem que não haviam aberto a entrada d'água; 20 dias após o tratamento, contados 74 caramujos vivos e 9.200 mortos (99,3%).

10 — Vala de agrião tremendamente infestada, com duas entradas d'água que ficaram fechadas provisoriamente, foi parcialmente tratada, numa superfície de 43 m², com 64 litros de melaço diluídos numa cultura de levedo (preparada em melaço a 5%). No dia imediato observava-se grande desenvolvimento da cultura *in loco* e era grande a massa de caramujos mortos, havendo morrido também sangue-sugas e peixes. No 2.º dia foi feita uma coleta de caramujos em

diversos pontos, sendo contados 10.800 mortos e 20 moribundos que, deixados em água limpa, no dia seguinte estavam mortos. Morreram também exemplares de *Ampullaria* que haviam sido postos na vala logo depois do tratamento. As figuras 7 e 8 mostram aspectos do foco no 2.º dia e a n.º 9 o mesmo sendo observado pelos Drs. MÁRIO PINOTTI e G. M. OLIVEIRA CASTRO nesse dia.

11 — Poço (Fig. 10) — com vol. de cerca de 5.000 l., tratado com 50 kg de açúcar cristal e 50 l. de cultura (em açúcar mascavo a 5%) de fermento Fleishmann. Três dias depois, mortalidade de 95,5% em 375 caramujos coletados, bem como mortandade de peixes. 5 dias — 32 mortos e 16 vivos; 7 dias — vistos alguns vivos.

Experiências no laboratório mostraram que o açúcar e o levêdo atuam lentamente sobre os caramujos, ao passo que agem rapidamente quando associados, em consequência da fermentação.

Focos tratados com vinhôto ou calda de destilaria (Jacarepaguá):

As caldas de destilarias são produtos residuais da indústria do álcool, cujas propriedades e efeitos nocivos sobre a fauna aquática são conhecidos. “Êsses resíduos, que orçam por toneladas de líquido grosso e de fácil fermentação, rapidamente decompõem o ambiente líquido em que são lançados, alterando, destarte, as condições do meio onde vivem as várias e abundantes espécies existentes nas águas doces” (5).

12 — A primeira experiência foi feita num poço de cerca de 3.000 litros d'água automaticamente renovada, que serve para irrigação de horta, sendo usada a calda numa concentração de 56% (no mesmo dia de sua produção). No dia seguinte, todos os caramujos e peixes estavam mortos (*A. nigricans*), estando a água turva e bolhosa. No 3.º dia foram contados 994 moluscos mortos. O pH da água era de 6,0.

13 — Outro poço (fig. 11), de volume aproximado de 2.200 litros e com a mesma serventia que o anterior, foi tratado com 22 litros de calda. Nos dias que se seguiram não se observaram moluscos vivos, sendo contados 431 mortos no 3.º dia após o tratamento.

Ensaio de laboratório, ainda em curso, mostraram que em séries de diluições ao dôbro, partindo de calda pura, houve 100% de mortalidade de *A. nigricans* até à diluição de 3,125% nas primeiras 24 horas, na diluição de 0,78% nas primeiras 48 horas e na de 0,39% em 5 dias. Quando em mistura com igual diluição de melaço, morreram todos em 4 dias na diluição de 0,19%. Quanto ao melaço puro, numa das dosagens houve mortalidade total em 6 dias nas diluições a 0,019%, 0,0048% e 0,0024% e 7 dias a 0,0097%; em outra, ella não atingiu senão às diluições de 0,039% e 0,019% em 16 dias.

Conclusões

1 — Quase um ano após um único tratamento com cultura de *B. pinottii* e peptona (1.943 litros e 15 quilos respectivamente), acha-se quase extinto um grande foco de *A. glabratus* e outros moluscos, constituído por um açude com 2.181.000 litros d'água em constante renovação.

2 — Certas bactérias não esporuladas ainda em estudo, cultiváveis em açúcar e outros meios baratos, têm ação sobre os caramujos, que nos focos tratados apresentam profundas alterações da carapaça.

3 — Pode ser conseguida a extinção de focos de planorbídeos pela aplicação de *Saccharomyces cerevisiae* e açúcar ou melaço em concentrações relativamente altas, havendo um efeito residual que pode durar pelo menos 3 semanas, em água estagnada.

4 — Foi obtida a extinção rápida de dois focos de *A. nigricans* nos dois primeiros tratamentos feitos com calda de destilaria, em elevadas concentrações.

5 — É de grande importância a criação de diversos processos biológicos e bioquímicos para a erradicação dos planorbídeos, para se contornar o problema da possível formação de raças resistentes a agentes microbianos.

Agradecimentos

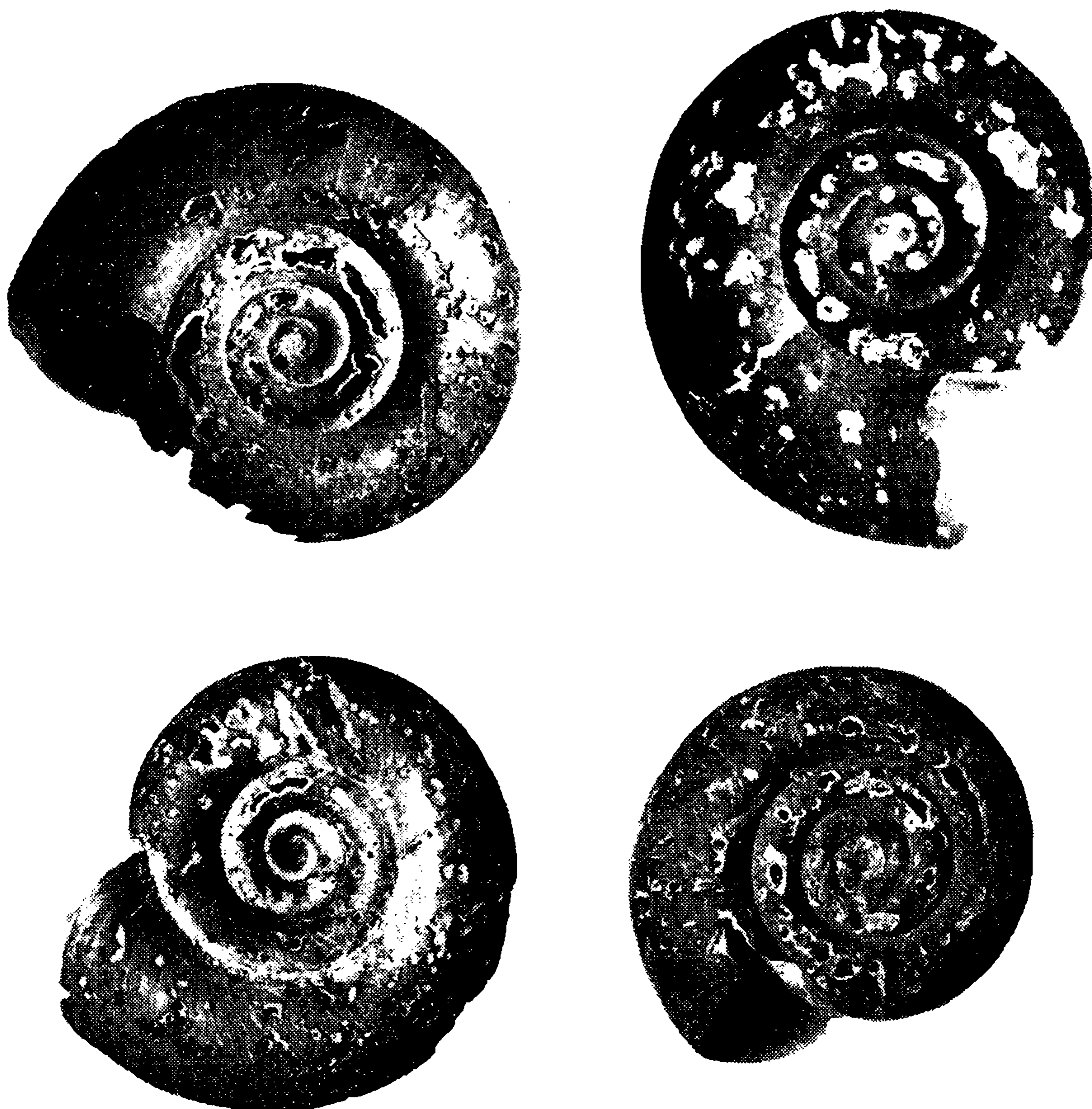
O autor agradece mui penhoradamente: ao Dr. MÁRIO PINOTTI, diretor do Serviço Nacional de Malária, pelo constante estímulo e pelas facilidades de trabalho que lhe tem proporcionado; ao Dr. JOSÉ GOMES DE FARIA, seu antigo mestre, do Instituto Nacional de Tecnologia, pelas valiosas sugestões e esclarecimentos; ao Dr. VITÓRIO PÔRTO, chefe do laboratório da Cia. Usinas Nacionais, pelas informações, literatura e materiais que lhe facilitou gratuitamente; ao Dr. NEWTON DESLANDES, do Serviço Especial de Saúde Pública, pela classificação de *A. nigricans* (= *A. immunis*); ao Sr. PÉRES, da Cia. Brahma do Rio e ao Sr. J. OELZE, da Cia. Antártica de Belo Horizonte, pelas amostras de levêdo; ao Sr. WANDER DE ANDRADE, Prefeito de Bambuí, pelo açúcar oferecido e outras facilidades que vem proporcionando ao Pôsto do Instituto daquela cidade; e a todos os seus auxiliares do Pôsto, pela dedicação a tôda prova com que o têm servido no decurso destas trabalhosas pesquisas.

REFERÊNCIAS

- 1 — CRUZ FILHO, O. & DIAS, E. — 1953
Bacillus pinottii sp. n.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 47 (6): 581-582.
- 2 — DIAS, E. — 1953
Nova possibilidade de combate aos moluscos transmissores das esquistossomoses.
Emprêsa Editôra "O Éco", Bambuí, 22 pp.
- 3 — DIAS, E. — 1953^a
Bacteriological warfare on the intermediate hosts of human schistosomiasis. Trabalho apresentado ao V Congr. Intern. Med. Trop. Mal., Istambul, agosto-setembro. Em impressão nos Anais e nas Mem. do Inst. Osv. Cruz.
- 4 — DIAS, E. & DAWOOD, M. M.
Ensaio preliminar, no Egito, de contrôle biológico de caramujos com *Bacillus pinottii*.
Em preparo.
- 5 — MATTOS, A. R. 45 — 1936
A questão das caldas de destilaria em Pernambuco.
Edição de "Brasil Açucareiro", 48 pp.



Figura 1 — Vista parcial do Foco 27.



Figuras 2 a 5 — Mostram o aspecto das carapaças de *A. glabratus* introduzidos no foco 48 16 dias depois do tratamento com cultura bacteriana e farelo de arroz e mortos no dia imediato.



Figura 6 — Aspecto de uma vala em Jacarèpaguá (9) 24 horas depois de tratada com açúcar na concentração de 1% e levêdo de cerveja.



Figuras 7 e 8 — Vala de agrião em Jacarèpaguá (10), 48 horas depois de tratada com melaço e levêdo de cerveja. Notar o aspecto espumoso da água e a enorme quantidade de caramujos mortos (*Australorbis*, *Ampullaria*).



Figura 9 — Dr. Mário Pinotti (centro), Dr. G. M. Oliveira Castro e o autor examinando caramujos mortos de vala de agrião (fig. 7 e 8).



Figura 10 — Aspecto da água de um poço de Jacarèpaguá tratado com 1% de açúcar e cultura de fermento Fleishmann (11), no terceiro dia.

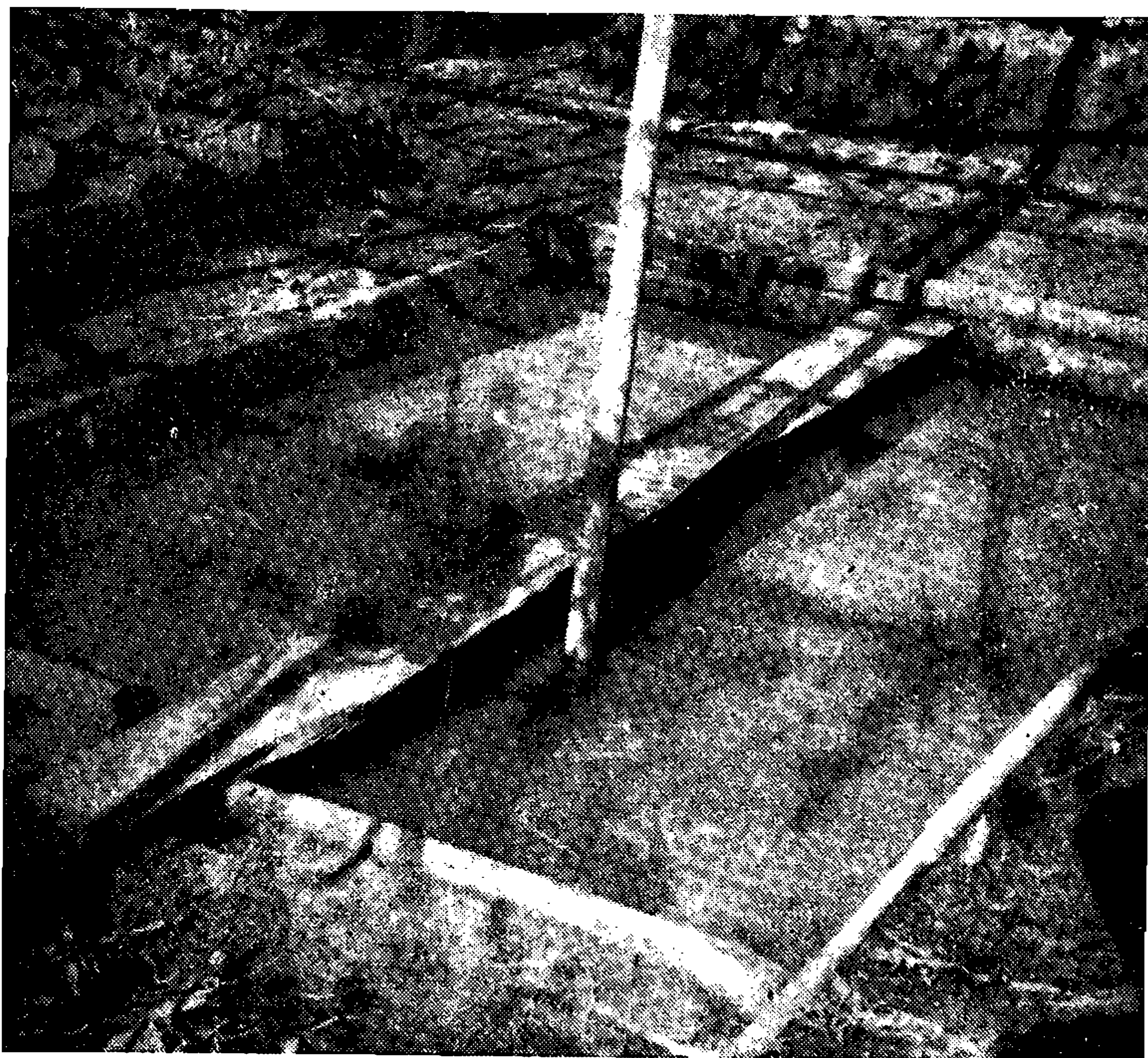


Figura 11 — Poço tratado com calda de distilaria na concentração de 1% (13), segundo dia após o tratamento.