

Otimização do cultivo do *Paramecium caudatum* para estudo em testes de toxicidade.

Optimization of cultivation of *Paramecium caudatum* to study in toxicity tests.

Manoel Messias Pereira Miranda¹ e Nicolas Fernandes Martins²

RESUMO - A deposição contínua de diversos poluentes no ambiente é uma preocupação cada vez maior devido aos potenciais efeitos, diretos ou indiretos, na ecologia dos ambientes e na saúde humana. Dentre os poluentes, os metais podem atingir concentrações nas quais podem ser altamente tóxicos para a biota local e, eventualmente, acumulados nos tecidos e transferidos pela cadeia trófica. Em baixas concentrações, que são denominados elementos-traço, ou micro nutrientes; dessa forma alguns metais são essenciais para o metabolismo celular ao exercerem diversos papéis como, por exemplo: co-fatores enzimáticos, ligantes ou precursores de moléculas vitais ou ainda participar da regulação enzimática. Na biota aquática, os protozoários são organismos unicelulares eucarióticos que estão no início da cadeia trófica e que são modelos apropriados para prever os efeitos de substâncias químicas em vários organismos presentes nesse ambiente. Eles têm sido utilizados em estudos toxicológicos e propostos como organismos teste para avaliar contaminações em meio aquático, devido à grande sensibilidade a alterações ambientais, ao curto ciclo de vida e pela facilidade de cultivo. No presente trabalho o protozoário ciliado *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 foi isolado da Represa do Monjolinho (São Carlos-SP) e mantido em cultura monoxênica. Foi verificado previamente, por meio de experimentos, que essa linhagem de *Paramecium caudatum* apresenta condição ótima de cultivo no escuro, em pH 8 e temperatura de 30°C. Nessas mesmas condições foi feita uma curva de crescimento a partir da qual foi determinado seu tempo de geração (5,3 horas) e a fase log (logarítmica) de crescimento.

Palavras-chave: toxicidade, bioensaios, ciliados, *Paramecium caudatum*.

ABSTRACT - The continuous deposition of pollutants in the aquatic environment has been a great concern because of their direct or indirect potential effects on human and environmental health. Among the diverse pollutants, metals can reach toxic concentrations to the local biota and can be bioaccumulated and transferred through the trophic chain. At low concentrations some metals are essential to the cellular metabolism because they can act as precursors of vital molecules or participate in the enzymatic regulation. The protozoa are unicellular organisms situated at the base of the trophic chain that have been used in toxicological studies and proposed as good biological indicators of aquatic pollution due to their eukaryotic nature, sensibility to environmental changes, short life time and easy cultivation. The object of the present work is the ciliated protozoan *Paramecium caudatum* isolated from the Monjolinho Reservoir (São Carlos – SP) and maintained in monoxenic. Experimentally, it was previously verified the optimal light regimen, temperature and pH for *Paramecium caudatum* cultivation, that was respectively dark, 30°C and pH 8. Using these culture conditions, it was obtained the growth curve, the log phase and the generation time (5,3 h.) for this protozoan.

Keywords: toxicity, bioindicator, bioassays, *Paramecium caudatum*.

INTRODUÇÃO

A preocupação com a poluição dos ambientes aquáticos, tem levado a comunidade científica a desenvolver métodos de monitoramento que podem ser utilizados como bioindicadores ambientais. Os protozoários fora um excelente organismos-teste, devido à sua sensibilidade a alterações ambientais, ao seu curto ciclo de vida, facilidade para cultivo e manutenção, sendo assim têm sido utilizados em estudos toxicológicos e propostos como indicadores biológicos de poluição aquática. A contaminação dos ambientes aquáticos por poluentes antropogênicos (causada pelo homem) tem sido um problema muito sério, principalmente por metais pesados encontrados nos esgotos industriais, domésticos e lixiviados de minerações.

A contaminação antropogênicos ambientes aquáticos causada por esgotos industriais e domésticos tem sido um sério problema nos últimos anos. A água é contaminada basicamente por dois tipos de resíduos: os orgânicos, e os inorgânicos que incluem os metais tóxicos. Os resíduos orgânicos mais abundantes normalmente têm origem animal ou vegetal e provêm dos esgotos domésticos e de diversos processos industriais ou agropecuários (ODUM, 2004).

Com a entrada contínua dos metais para o ambiente aquático, estes podem chegar a níveis tóxicos altos, tornando a água imprópria para o consumo e interferindo na ciclagem de carbono e nutrientes ao afetarem microorganismos, plantas e animais. Por outro lado, em concentrações baixas, os metais normalmente são essenciais para o bom funcionamento das células e são

Recebido em 09/01/2012 e aceito em 12/11/2012

¹ Graduado em Ciências Físicas e Biológicas pela UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. E-mail: messiasmpm@usp.br

² Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia –UFU/FACIP. E-mail: nicolas.scp@gmail.com

denominados de elementos traço. Os metais considerados essenciais são: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio. Segundo Irato e Piccinni (1996), as características e a intensidade dos danos dependem da natureza do metal (se é essencial ou não) e a concentração do mesmo. Assim, alguns metais são elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes tais como: cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel. Outros metais são considerados apenas como micro-contaminantes ambientais, sendo assim: o arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio; pois não serem exigidos pelo metabolismo celular e se mostram altamente tóxicos ao organismo; e são acumulativos (SALGADO, 1996).

Além disso, algumas propriedades do sedimento e da água, tais como o pH e conteúdo de matéria orgânica também afetam a disponibilidade dos metais nos tecidos vivos. A concentração de cada metal traço essencial para cada organismo sendo específica, ou seja, uma concentração elevada para uma espécie pode ser considerada baixa para outra. Assim, animais aquáticos são naturalmente expostos a uma variedade de metais, cuja forma química e concentração na água são governadas pela natureza dos processos geoquímicos e atividades antropogênicas (SALGADO, 1996).

A avaliação da toxicidade de vários compostos pode ser feita por meio dos organismos-teste, que são usados como modelos das respostas de outros seres vivos a esses compostos, devido à relação trófica existente. Experimentos de toxicidade “in vitro” podem ser feitos com a exposição direta dos organismos-teste a diferentes concentrações de reagentes químicos puros e misturas definidas dos mesmos, para verificar possíveis sinergismos ou antagonismos; ou misturas químicas indefinidas como amostras brutas de resíduos de diferentes indústrias (FENCHEL, 1987). Dentre os organismos que podem ser utilizados em avaliações de toxicidade destacam-se os protozoários, e dentre eles, especialmente os ciliados. Protozoários são organismos unicelulares, eucarióticos, que estão no início da cadeia alimentar ligando as bactérias aos níveis tróficos superiores no plâncton (SHERR et al., 1988).

Os protozoários ciliados são numerosos em ambientes aquáticos e em todos os tipos de sistemas de tratamento biológico de água e esgoto (MADONI et al., 1993, 1996; AMANN et al., 1998); exercem um papel importante na purificação e na regulação da comunidade aquática inteira e melhoram a qualidade dos efluentes em estações de tratamento de esgoto pela remoção da maioria das bactérias dispersas (CURDS et al., 1968; MADONI, 1994, 2002, 2003; SALVADÓ et al., 1995) pois são excelentes consumidores de detritos na água. Devido à sua sensibilidade e às alterações ambientais, ao seu curto ciclo de vida, facilidade para cultivo e manutenção, os protozoários têm sido utilizados em estudos toxicológicos e propostos como indicadores biológicos de poluição aquática (NICOLAU, MOTA, LIMA 1999; NALECZ-

JAWECKI; SAWICKI, 2002; DIAS, MORTARA, LIMA, 2003; NALECZ-JAWECKI, 2004).

A comunidade dos ciliados é um conjunto complexo de organismos, frequentemente incluindo espécies que são sensíveis, resistentes ou intermediárias em sua tolerância aos poluentes (MADONI, 2006). O estudo da sensibilidade dos protozoários ciliados, a um grande número de substâncias tóxicas, pode fornecer um padrão de medida para identificar a intensidade e o potencial de danos ecológicos causados por descargas antropogênicas de poluentes nas águas de superfície (MADONI; ROMEO, 2006).

A diversidade estrutural e funcional destas comunidades permite uma avaliação dos efeitos e do perigo que os metais tóxicos têm em diversos aspectos do ecossistema, tais como a heterogeneidade das espécies e o equilíbrio da dinâmica da cadeia alimentar (FERANDEZ-LEBORANS; NOVILLO, 1995). Neste contexto, os experimentos com ciliados se tornam uma ferramenta valiosa para se inferir sobre os possíveis distúrbios ambientais no meio aquático (CAIRNS; PRATT, 1989).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de *Paramecium caudatum* na represa Monjolinho na cidade de São Carlos-SP situada no campus da Universidade Federal de São Carlos (22° 01' 03"S e 47° 53' 27" W). Esse protozoário é mantido na coleção de cultura de protozoários do laboratório e foi escolhido, dentre outros, por ser de fácil manutenção em cultura e ser comum em sedimentos de ambientes aquáticos. Para seu isolamento, o protozoário foi identificado em amostras vivas do ambiente, coletado com rede de micro plâncton 22 µm de poro e identificado sob o microscópio ótico, e selecionado das amostras por meio de micro-capilares de vidro com 10 mm de espessura. Em seguida ele foi lavado sucessivamente com várias gotas de água mineral estéril (autoclavada) da marca Minalba® (composição: cálcio 17,14 mg.L-1; magnésio 9,83 mg.L-1; sódio 1,10 mg.L-1; cloretos 0,13 mg.L-1; nitratos 0,8 mg.L-1; sulfatos 0,2 mg.L-1; bicarbonatos 105,15 mg.L-1; fluoretos 0,05 mg.L-1; bário 0,024 mg.L-1 e estrôncio 0,020 mg.L-1, pH 8,3), antes de ser colocado em frascos de cultivo (tubos de ensaio) com o meio de cultura padrão utilizado no laboratório (descrito abaixo).

Os tubos foram mantidos em câmaras incubadoras a 25°C e o crescimento dos protozoários monitorado em lupa por vários dias. Posteriormente, a pureza da cultura foi verificada utilizando microscopia ótica. A linhagem utilizada nesse estudo foi obtida a partir de cinco indivíduos, capturados na cultura piloto.

Toda a vidraria utilizada para o cultivo dos protozoários foi lavada com ácido nítrico e enxaguada abundantemente com água deionizada antes da secagem em estufa. Para o meio de cultivo, foram preparados tubos de ensaio com ágar a 2% que foram esterilizados em autoclave e posteriormente inclinados. Em seguida, uma suspensão da bactéria *Enterobacter aerogenes*, na

concentração final de 106 organismos mL⁻¹ foi preparada utilizando-se uma alça padrão (108) e água mineral (Minalba®) autoclavada. Essa suspensão foi adicionada aos tubos até cobrir o ágar inclinado. Por último, um grão de arroz, com casca, fervido por 10 minutos e autoclavado, foi adicionado assepticamente em cada um desses tubos de ensaio. Esse meio de cultura padrão é adequado para protozoários bacterívoros, onde o

protozoário cultivado se alimenta de *Enterobacter aerogenes* que, por sua vez, utiliza o grão de arroz como alimento. Para a manutenção das linhagens em cultura é necessária a repicagem, pelo menos uma vez ao mês, para meios de cultura novos. A figura 1 abaixo representa o esquema do cultivo *Paramecium caudatum* em diferentes condições de temperatura, Ph, e intensidade luminosa.

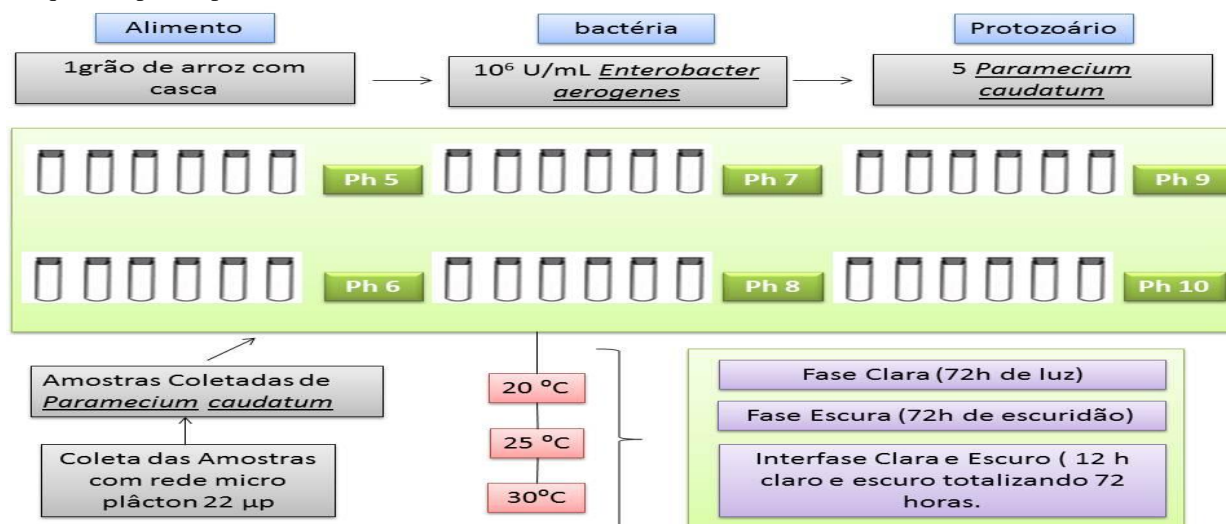


Figura 1: Modelo esquemático da otimização do cultivo do protozoário *Paramecium caudatum* em diferentes variáveis.

Para cada condição experimental testada, três tubos de ensaio (tréplicas) foram inoculados, cada um com cinco microrganismos previamente separados a partir de uma cultura estoque, utilizando micropipeta sob microscopia ótica. Estes frascos foram incubados por três dias nas condições experimentais pré-definidas e, ao final desse período, três alíquotas de um mL de cada frasco, após suave agitação, foram fixadas com solução saturada de cloreto de mercúrio (HgCl₂), coradas com solução 0,04% de azul de bromofenol (Pace; Orcutt, 1981), e estocadas até a contagem. Posteriormente, todas as alíquotas foram contadas integralmente sob microscópio óptico, em aumento de 100X, utilizando câmaras de Sedgewick-Rafter de 1mL de volume. Nos primeiros experimentos foram testadas cinco condições de pH (pH6, pH7, pH8, pH9, e pH10) sob três diferentes temperaturas 20°C, 25°C e 30°C. Para essas análises, a água mineral Minalba®, durante o preparo dos meios de cultivo, teve seu pH ajustado com o uso de um pHmetro (Micronal modelo B374), aos valores desejados acrescentando-se uma solução 1 molar de HCl ou de NaOH até a obtenção dos cinco diferentes valores de pH desejados. Para cada pH e temperatura foram preparados três tubos de ensaio (tréplicas) com 5 organismos inoculados. O pH foi monitorado por meio de tiras indicadoras de pH Machery-Nagel (pH-Fix 0-14), em cada tubo de ensaio, de 12 em 12 horas, a partir de 24 horas do inóculo, até o final da incubação que durou 72 horas.

Após a definição das melhores condições de pH e temperatura, foram feitos experimentos utilizando essas condições pré-determinadas em duas intensidades luminosas diferentes. Três tubos de ensaio foram incubados no escuro total por 72 horas e outros três foram feitos com o foto-período de 12 h claro: escuro e posteriormente verificada a densidade dos ciliados em câmara de Sedgewick-Rafter.

Em seguida, foi feito um último experimento para a verificação do efeito do volume dos frascos de cultivo na densidade total de protozoários obtida utilizando a condição ótima pré-determinada nos experimentos anteriores (pH, temperatura e luz). Nesse ensaio foram comparados o desempenho do crescimento de *Paramecium caudatum* em três tubos de ensaio (com ágar 2% inclinado, um grão de arroz e 10 mL de suspensão bacteriana) e em três erlenmeyers (com 30 mL de suspensão bacteriana e três grãos de arroz sobre uma camada de ágar 2%). Nesse experimento foram inoculados quinze protozoários em cada um dos erlenmeyers e cinco protozoários em cada um dos três tubos de ensaio, nas mesmas condições de pH, temperatura e intensidade luminosa.

A melhor condição de cultivo encontrada foi utilizada para a realização do experimento posterior que foi a realização da curva de crescimento para a obtenção do tempo de geração da linhagem de *Paramecium caudatum*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento do protozoário apresentou os melhores resultados à temperatura de 30°C, e pH 8 ; inoculados no escuro total. Os ensaios inoculados à temperatura de 20°C apresentaram o pior desempenho, provavelmente devido às exigências das condições de cultivo da bactéria *Enterobacter aerogenes* que tem um cultivo ideal em temperatura de 30°C. O pH 8 apresentou uma ótima condição para todos os ensaios e a temperatura de 25°C foi boa, porém não foi a melhor. Na temperatura de 20°C, em todos os pHs testados, o crescimento do *Paramecium caudatum* foi inferior ao obtido na temperatura de 25°C, que foi, por sua vez, inferior ao obtido a 30°C (Figuras 1, 2 e 3). Portanto, considerando apenas temperatura, a de 30°C foi a que resultou no melhor crescimento populacional dos protozoários. O pH foi monitorado a partir de 24 horas após o inóculo, usando o mesmo pHmetro, com intervalos de 12 horas até 72 horas e os resultados variaram no máximo entre pH 6,5 e 7,5 com um pH médio de 7,0 ao final de 72 horas, havendo pouca variação entre as medidas de pH. Portanto, nas condições de intensidade luminosa, no escuro total, na qual foi realizada essa primeira série de experimentos, as melhores condições encontradas para temperatura e pH foram, respectivamente 30°C e pH 8. Na Figura 6 são sumarizadas esses resultados. Após a determinação de pH e temperatura, foram realizados os testes para verificar a influência da intensidade luminosa, os testes foram realizados ao pH 8 e 30 °C, e no escuro total; conforme previamente determinado. Nos ensaios realizados em diferentes condições de luminosidade, que tiveram duração de 72 horas, os resultados obtidos mostram um excelente crescimento no escuro total, a 30°C, por todo o tempo do experimento em comparação ao experimento exposto à iluminação na interface 12 horas claro e 12 horas no escuro, pode se verificar que o crescimento na interface de intensidade luminosa é aproximadamente a metade que aquela apresentada no escuro total, na Figura 5 estão os resultados apresentando o crescimento celular por mL⁻¹ claro e escuro.

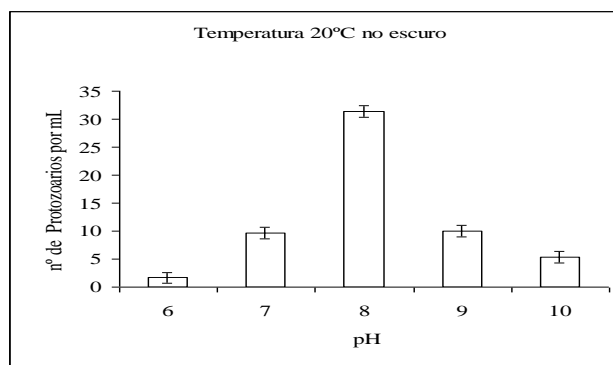


Figura 2: Cultivo de *Paramecium caudatum* à temperatura de 20°C, no escuro por 72 horas, em diferentes condições de pH.

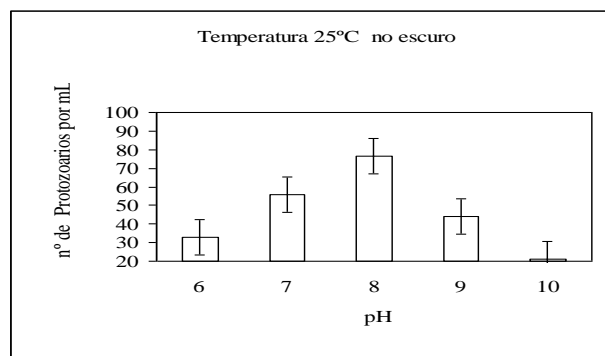


Figura 3: Cultivo de *Paramecium caudatum* à temperatura de 25°C, no escuro por 72 horas, em diferentes condições de pH.

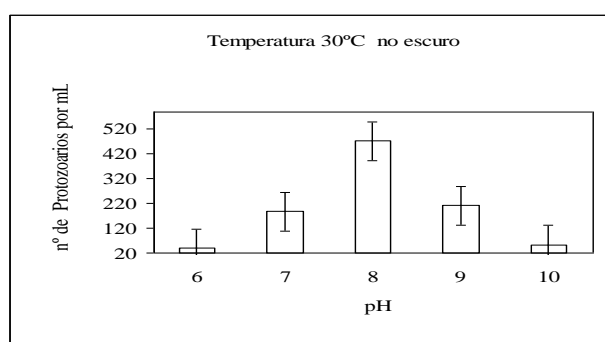


Figura 4: Cultivo de *Paramecium caudatum* à temperatura de 30°C, no escuro por 72 horas, em diferentes condições de pH.

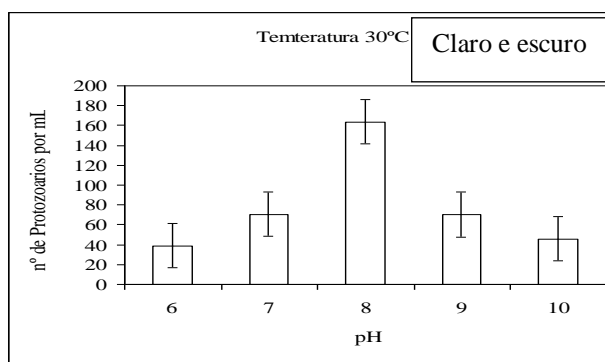


Figura 5: Densidade de *Paramecium caudatum*, após 72 horas de cultivo em regime de iluminação de 12 h. no claro e 12 h. no escuro a 30°C.

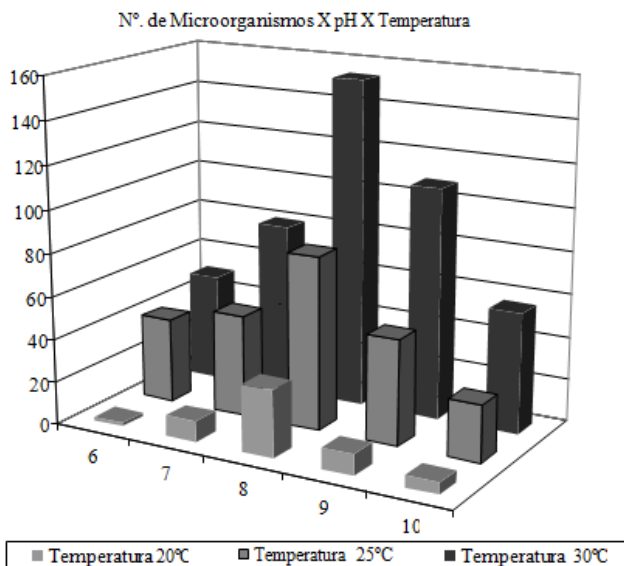


Figura 6: Crescimento de *Paramecium caudatum* nos ensaio de otimização do cultivo para as condições de temperatura e pH testados no escuro.

A curva de crescimento de *Paramecium caudatum*, obtida na condição ótima de cultivo determinada no experimento anterior (30°C, pH 8 e no escuro total), é mostrada no Figura 6. Após uma fase lag que durou aproximadamente 36 horas, o crescimento celular se iniciou de forma irregular e apresentou densidade máxima até 96 horas após o inóculo. O cálculo do tempo de geração está representado abaixo:

$N = 28500$ (protozoários presentes no final da fase log. com 102 horas.).
$N_0 = 5$ (protozoários presentes no início da fase log. com 36 horas). Temos: $28500 = 5 \times 2^n$; $2^n = 28500/5$
onde: $2^n = 5700$; sendo $n = 12,47675$ e $t = 102 - 36 = 66$ h e $g = t/n$; $g = 66/12,47675 = 5,3$ horas.

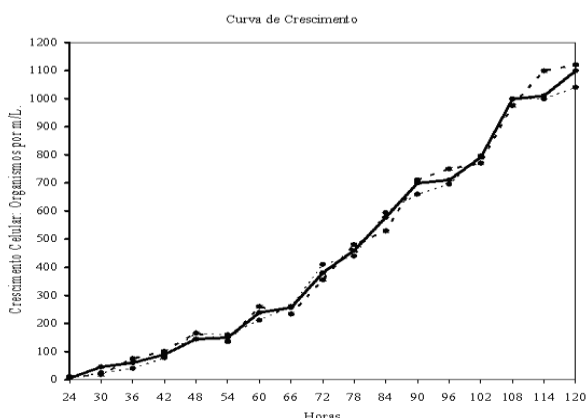


Figura 6: Curva de crescimento de *Paramecium caudatum* nas condições ótimas determinadas experimentalmente (temperatura de 30°C, pH 8 e no escuro) nos quatro ensaios realizados em datas diferentes.

CONCLUSÃO

O protozoário *Paramecium caudatum* apresentou melhores condições de crescimento em temperatura de 30°C e pH 8. O volume dos frascos não interfere no seu cultivo, porém seu crescimento é melhor no escuro total. A faixa de maior crescimento populacional foi entre 78 e 96 horas após o inóculo (fase log). Diante desses resultados prévios serão realizados testes de toxicidade com diferentes metais tóxicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERGONI V, PICCINI E. Biological response to trace metals and their biochemical effects. In: **Leppard GG (ed) Trace element speciation in surface waters and its ecological implications**. Plenum, New York, 159-175. (1983).

AMANN, R., LEMMER, H., WAGNER, M. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. **FEMS Microbiological Ecology** 25, 205-215. (1998).

CAIRNS, J., PRATT, J.R. The scientific basis of bioassays. **Hydrobiologia**; 188-189. (1989).

CURDS, C.R., Cockburn, A., Vandyke, J.M., An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated sludge process. **Wat. Poll. Contr.** 67, 312-329. 1968.

DIAS N.; MORTARA, R.A.; LIMA, N.; Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. **Toxicology in Vitro** 17: 357-366. 2003.

FENCHEL, T., **Ecology of Protozoa**. Springer-Verlag, Berlin. 1987.

FERNANDEZ-LEBORANS, G., NOVILLO, A. Protozoan communities and contamination of several fluvial systems. **Water Environment Research** 68: 311-319. 1996.

FERNANDEZ-LEBORANS, G., NOVILLO, A., Changes in trophic structure of a freshwater protozoan community subjected to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 25, 271-279. 1993.

IRATO, P., PICCINI, E. Effects of cadmium and copper on *Astasia longa*: metal uptake and glutathione levels. **Acta Protozool.** 35, 281-285. 1996.

MADONI P. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. **Environmental Pollution** 109 53-59. 2000.

- MADONI P., A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on microfauna analysis, **Water Res.** **28**, 67–75. 1994.
- MADONI P., D. DAVOLI, G. GORBI, Acute toxicity of lead, chromium and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **53**, 420–425. 1994.
- MADONI P., D. DAVOLI, G. GORBI, L. VESCOVI, Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. **Water Res.** **30** 135–141. 1996.
- MADONI P., DAVOLI D. & CHERICI E.; Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. **War. Res.** **27**, 1485-1491. 1993.
- MADONI P., G. ESTEBAN, G. GORBI, Acute toxicity of cadmium, copper, mercury and zinc to ciliates from activated sludge plants, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **49**: 900–905. 1992.
- MADONI, P.; ROMEO, M. G.; Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. **Environmental Pollution**, **141**: 1-7. 2006.
- NAŁECZ-JAWECKI G., J. SAWICKI. **Toxicity of Inorganic Compounds in the Spirotox Test: A Miniaturized Version of the *Spirostomum ambiguum* Test.** Archive Environmental Contamination and Toxicology v. 34, pag 1–5 (1998).
- NAŁECZ-JAWECKI, G. & SAWICKI, J. SPIROTOX- a new tool for testing the toxicity of volatile compounds. **Chemosphere** **38**: 3211-3218. 1999.
- NAŁECZ-JAWECKI, G. & SAWICKI, J. The toxicity of tri-substituted benzenes to the protozoan ciliate *Spirostomum ambiguum*. **Chemosphere** **46**: 333-337. 2002.
- NAŁECZ-JAWECKI, G. Spirotox- *Spirostomum ambiguum* Acute Toxicity Test- 10 years of experience. **Environmental Toxicology** **19**: 359-364. 2004.
- NICOLAU, A.; DIAS, N.; CARVALHO, G.S.; MOTA, M. & LIMA, N. **Os protozoários como ferramenta da monitorização biotecnológica da poluição: ensaios in vitro.** 10p. 1999.
- NICOLAU, A. MARTINS, M. J; MOTA, M. & LIMA, N. **Estudo da comunidade de protozoários exposta a tóxicos em estações de tratamentos de águas residuais.** 10p. 1999.
- ODUM, E.P.; **Fundamentals of Ecology**, 7ª edição– Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 928p. 2004.
- SALGADO, P. E. T. Metais em alimentos. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia.** São Paulo, 1996. cap. 5.2, p. 443-460.
- SALGADO, P. E. T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia.** São Paulo, 1996. cap. 3.2, p. 154-172.
- SHAKOORI AR, REHMAN A, Haq RU (2004) Multiple metal resistance in the ciliate protozoan, *Vorticella microstoma*, isolated from industrial effluents and its potential in bioremediation of toxic wastes. **Bull Environ Contam Toxicol** **72**:1046–1051.
- SHERR, B.F., SHERR, E.B., HOPKINSON, C.S. Trophic interactions within pelagic microbial communities: indications of feedback regulation of carbon flow. **Hydrobiologia** **159**, 19-26. 1988.
- SMITH, S. (1986) Chapter 5 in Hester, R. E. (ed) *Understanding Our Environment* (1st edition), Royal Society of Chemistry, London.
- YOSHIOKA, Y; OSE, Y & SATO, T. Testing for the toxicity of chemicals with *Tetrahymena pyriformis*. **Science of Total Environment** **43**: 149-157. 1999.