



PRPG | Pré-Reitoria de Pós-Graduação  
PIBIC/CNPq/UFPG-2009

## Definição do método de Semeadura para a Elaboração da Curva Padrão de Crescimento a Bactéria *Escherichia coli*

Amanda Lemos Barros Martins<sup>1</sup>, Marcelo Sampaio de Alencar<sup>2</sup> Fausy Solino Dias<sup>3</sup>

### RESUMO

Este presente trabalho tem como primeiro objetivo determinar a curva padrão de crescimento da *Escherichia coli*, sendo que para tal é necessário a definição do método de Semeadura da bactéria para a execução do estudo dos efeitos da radiação não ionizante sobre o crescimento das cepas de E.coli. Para a definição do método, há três tipos de contagens de viáveis em placas: Técnica de Espalhamento em Superfície “Speed-Plate”, a Técnica de Espalhamento em Profundidade “Pour-Plate” e a técnica por Estrias. A técnica escolhida foi a de Espalhamento Superficial.

**Palavras-chave:** semeadura; espalhamento superficial; *Escherichia coli*

Elaboration of Laboratorial Infrastructure for Non-Ionizant Radiation at *Escherichia coli* bacteria

### ABSTRACT

This work has as its main objective to determine the *Escherichia coli* development pattern curve but it requires a swiing method definition to execute this study on the Effects of Non-Ionizant Radiation at the development of E.coli stumps. To make this method definition there are three kinds of count: Spead-Plate, Pour-plate and Grooves. The one that was chosen was Spead-Plate.

**Keywords:** swiing; Speadd-Plate; *Escherichia coli*

### INTRODUÇÃO

Tendo em vista o fato de inúmeros efeitos fisiológicos terem sido caracterizados em estudos com sistemas celulares submetidos a irradiação em níveis de energia eletromagnética absorvida que demonstraram causar elevações de temperatura corporal acima de 1 a 2 °C, suspeitou-se dos efeitos deletérios da irradiação e a atenção da comunidade científica voltou-se para este tema .

Esses efeitos incluem alterações em funções neurais e neuromusculares, aumentos de permeabilidade na barreira hematoencefálica, dano ocular, (opacidade da lente e anormalidades da

<sup>1</sup> Aluna de Curso de Medicina, CCBS, UFPG, Campina Gande , PB, E-mail: [amandinhalbmartins@hotmail.com](mailto:amandinhalbmartins@hotmail.com)

<sup>2</sup> Engenheira Elétrica, Prof. Doutor, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: [malencar@dee.ufcg.edu.br](mailto:malencar@dee.ufcg.edu.br)

<sup>3</sup> Engenheira Elétrica, Doutorando, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: [fausydias@yahoo.com](mailto:fausydias@yahoo.com)

córnea), mudanças no sistema imunológico associadas ao estresse, mudanças hematológicas, mudanças reprodutivas (redução na produção de esperma), teratogenia e mudanças na morfologia, no conteúdo de água e de eletrólito, e nas funções da membrana das células. Sob condições de exposição parcial do corpo a campos intensos, pode ocorrer um dano térmico significativo em tecidos sensíveis, tais como encontrados nos olhos e nos testículos [1].

O estudo pioneiro nesse tema no Brasil, cujos resultados foram divulgados em agosto de 2000, foi conduzido pela Universidade Federal da Paraíba. Os pesquisadores concluíram que, entre as anomalias observadas nos ratos de laboratório expostos à radiação na frequência de 2,45 GHz, se destacam os efeitos sobre a fertilidade. Houve queda de 26% no nível de fertilidade das cobaias nascidas de pais e mães expostos à radiação. O mesmo estudo concluiu que a exposição à RNI altera os níveis de aprendizado dos animais.

Portanto é necessária a escolha do melhor método para a sementeira das cepas de *Escherichia coli* para elaboração da curva de crescimento padrão pois isso influencia diretamente na eficiência da contagem do número de colônias, na necessidade de utilização de determinados materiais e meios de cultura e, portanto, na fidelidade da informação do estudo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Radiação Não-ionizante, localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Campina Grande – PB.

### Material

- Vidrarias (tubos de ensaio, béqueres, pipetas, baquetas, Erlemeyer)
- Estufa;
- Autoclave Phoenix;
- Banho-maria;
- Pipeta automática 50µl;
- Meio de cultura TSB e EMB;
- Multímetro
- Balança de precisão;
- Incinerador;
- Termômetro eletrônico;
- Termômetro a laser;
- Termômetro de bulbo
- Extrator de amostra;
- Contador de colônias (UFC) Phoenix;
- Câmera fotográfica digital Cannon 5Mpixel;
- Luvas de procedimento, máscaras;
- Água destilada;
- Geladeiras;
- Estantes e suportes de tubo;
- Desinfetantes;
- Cepas controle L/B liofilizadas de *Escherichia coli* derivada ATCC 25922;
- Placas de Petri pequenas (20ml) e grandes(150ml)

### Procedimento de preparação e utilização do TSB

Para garantir a existência de apenas a *E. Coli* nas cepas a serem desenvolvidas, utilizar-se da Técnica do Enriquecimento. Esta é uma interfase até se chegar à fase onde realmente se realiza a contagem das colônias. Para isto, prepara-se o meio de cultura com TSB, que é um meio para crescimento não seletivo de outros microrganismos, da seguinte forma:

- Esteriliza-se um aparelho de tenho volume de 1000 ml, além de outros auxiliares (pipeta, bastão, etc.);
- Calcula-se a massa para o volume desejado e, utilizando uma balança de precisão, de preferência sempre a mesma do início ao fim do experimento, tira-se a massa necessária do recipiente do TSB do LabRNI.

- De posse desta massa, ela deve ser bem diluída em água destilada nova, de forma a solução torna-se visivelmente homogênea. No experimento, a expectativa que devem ser utilizados 500 ml por semana de cultura TSB;
- Leva-se a solução à autoclave conforme descrito no subitem Preparação do Meio de Cultura TSB do item 2.5.1;
- Após retirá-lo da autoclave, tamponar com papel alumínio e deixar em temperatura ambiente. Com padronização deste experimento, a cultura só pode ser utilizada quando estiver em temperatura ambiente.

A partir deste ponto, passa-se a preparar o caldo com TSB. O seguinte procedimento deve ser realizado:

- Coloca-se 10 ml do TSB em um tubo de ensaio;
- No mesmo tubo e utilizando uma pipeta automática, acrescenta-se 50 µl de solução contendo a cepas controle *E. Coli*, realizando a homogenização<sup>4</sup>;
- Prepara-se 7 tubos de ensaio (sete matrizes para diluições) dessa mesma maneira;
- Os tubos devem ser fechados, enumerados e levados para a estufa a (37±1) °C por, no mínimo, 12 h, até o início da turvação<sup>5</sup>.

### Procedimento de Diluição

Inicialmente, sete tubos de ensaio com o preparado de TSB e *E. Coli* foram denominados matrizes. Utilizou-se 100 µl da solução do tubo 1 (matriz) para o procedimento de diluição que constituiu-se de:

- tubo 1.1 (100 µl da solução matriz + 9ml de soro fisiológico)
- tubo 1.2 (100 µl da solução 1.1 + 9ml de soro fisiológico)
- tubo 1.3 (100 µl da solução 1.2 + 9ml de soro fisiológico)
- tubo 1.4 (100 µl da solução 1.3 + 9ml de soro fisiológico)
- tubo 1.5 (100 µl da solução 1.4 + 9ml de soro fisiológico)
- tubo 1.6 (100 µl da solução 1.5 + 9ml de soro fisiológico)

### Procedimento de preparação e utilização do EMB

Antes de iniciar o procedimento de semeadura das bactérias, é necessário a preparação do meio de cultura EMB, o qual é específico para a *E. Coli* gram negativa. Para isto, seguem-se as operações:

- Esteriliza-se um aparelho de tenho volume de 1000 ml, além de outros auxiliares (pipeta, bastão, etc.);
- Calcula-se a massa para o volume desejado para semeadura (3,6g para cada 100ml de água destilada), utilizando-se uma balança de precisão (sempre a mesma do início ao fim do experimento) tira-se a massa necessária do recipiente do EMB do LabRNI.
- Leva-se a solução à autoclave e quando atingida a temperatura de 120°C, deve-se esperar 15 minutos para desligar o aparelho;
- Após retirá-la da autoclave, deve-se tamponar com papel alumínio e deixar em temperatura ambiente.

### Métodos Microbiológicos e Tipos de Contagem –

#### 1. Semeaduras em Placas

- a) Semeadura em profundidade ou "pour plate": depois de preparadas as diluições, estas são inoculadas em quantidades de 0,1 ou 1,0 mL em placas de Petri estéreis, utilizando-se duas placas para cada diluição. Deve-se selecionar as diluições de maneira que o número de colônias esperados se situem entre 30 e 300. Após colocar o material (amostra em estudo) na placa, agrega-se de 10 a 15 mL do

<sup>4</sup> A homogenização (homogeneização) é realizada com movimentos suaves em forma de oito (cerca de 20 vezes)

<sup>5</sup> A escala de Mac Farland consiste na aferição indireta de uma suspensão bacteriana pelo seu grau de turvação (turbidimetria), ou melhor, pela capacidade de dispersão da luz. Na prática, é de uso corrente o emprego de uma escala visual de turvação obtida pela mistura de quantidades variáveis de uma solução de cloreto de bário a 1% e de ácido sulfúrico a 1%. Normalmente, considera-se que o tubo número 1 da escala de Mac Farland corresponda a uma amostra com 300.000 bactérias por mililitro.

meio de cultura fundido e resfriado a temperatura de  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ , agitando-se em movimentos rotativos. As placas assim preparadas devem ser incubadas a temperatura e condições recomendadas, devendo estas serem colocadas em posição invertida na estufa, após incubação realizar a contagem, utilizando contador de colônias. Características desse tipo de sementeira:

- Não possibilita o uso de “meios opacos”
- Detecção difícil no interior do meio de cultura
- Existe choque térmico na adição do meio de cultura

b) Sementeira em superfície: após preparar as placas com meio de cultura (15 mL) e uma vez preparadas as diluições escolhidas semeia-se 0,1 mL de cada uma das diluições, utilizando-se também duas placas por cada diluição. A distribuição de toda a alíquota não foi realizada com a alça de Driglasky e sim por espalhamento do inoculo no meio por movimentos suaves<sup>4</sup>. Proceder incubação nas mesmas condições descritas acima. Características desse tipo de sementeira:

- Possibilita o uso de meios opacos
- Não existe choque térmico devido a presença cultura

## 2. Semeaduras em Estrias

a) Estrias: flamba-se a alça de platina no bico de Bunsen, depois de esfriada, introduz-se a alça no tubo ou placa contendo o microrganismo e retira-se um pequeno inóculo. Introduz-se a alça de platina na placa e desliza-se a mesma em vários sentidos sobre o meio de cultura sólida

Método de Espalhamento Superficial Realizado:

- Coloca-se o caldo do EMB na placa de Petri pequena, de forma a preencher toda a superfície (20 ml);
- 50  $\mu\text{l}$  da amostra diluída foram colocados na superfície do caldo, utilizando-se pipeta automática, sendo o espalhamento superficial;
- As placas de Petri devem ser fechadas, enumeradas na tampa e levadas para a estufa a  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ , sendo mantidas, por 10 horas, para desenvolvimento das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

## Medidas ambientais

Antes de iniciar as medidas de impedância a cada hora, foram registradas as temperaturas ambiente e umidade relativa do ar (máximas e mínimas); temperatura da estufa (verificada por meio de termômetro de bulbo) e temperatura das amostras (por meio de termômetro à laser).

## Medida de impedância<sup>6</sup> das cepas

Para a realização desta medida foi utilizado um multímetro. As pontas do instrumento devem ser introduzidas na cepa, sendo realizadas medidas nas posições conforme a figura 1. Considerando primeiramente o eixo das ordenadas na figura, as três primeiras medidas são os pontos em vermelhos. A primeira medida são nos dois pontos mais externos caminhando para o centro da placa de Petri. Estes pontos estão equidistantes, sendo os dois mais externos na borda interna da placa. A distância entre os pontos é de 2,0 cm, contando da borda para o centro. A medida na abscissa segue o mesmo esquema descrito para a ordenada. O valor é encontrado considerando a média ponderada dos valores encontrados para abscissa e ordenada. Os pesos das médias são as distâncias entre os pontos de medida.

Esse procedimento era repetido a cada hora, durante o intervalo de oito horas ininterruptas, para cada amostra (placa Petri com EMB + diluição específica). Com também a contagem de colônias pelo SAUFC<sup>7</sup>

<sup>6</sup> Medida de impedância: os microrganismos alteram a corrente elétrica de um meio de cultura devido às atividades metabólicas: Durante a reprodução, as moléculas grandes (proteínas, lipídeos) se transformam em moléculas menores como aminoácidos e ácidos graxos, que são quimicamente mais ativos. O acúmulo destes compostos leva à alterações mensuráveis. O tempo de detecção ocorre quando a concentração de células atinge valores superiores a 106 células/ml. A curva resultante determina a presença de microrganismos.

<sup>7</sup> Sistema automático das Unidades Formadoras de Colônia

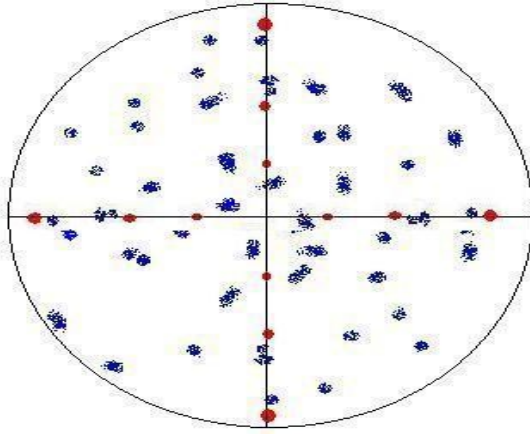


Fig. 1: Esquema de medida da impedância nas cepas

### **Irradiação das Cepas de *E. coli***

Baseado no estudo prévio das amostras de *E. coli* não irradiadas foram selecionadas as diluições 1.3 e 1.4 para serem submetidas à RNI durante 10 horas na estufa.

Foi introduzido na estufa um sinal eletromagnético com frequência de 650 MHz, por meio de uma antena bipolar, colocada a uma distância de 37 cm das placas Petri, sendo o posicionamento da antena perpendicular às cepas.

Após as 10 horas, foi realizado o procedimento de medida de impedância como acima descrito e contagem de colônias pelo SAUFC.

### **Expurgo das Cepas Utilizadas**

A Incineração das Amostras foi realizada na fase final de cada ciclo de Contagem caracterizando-se por:

- Recolhimento das amostras da estufa após o término da fase de contagem;
- As Placas Petri de material plástico foram fechadas hermeticamente com esparadrapo e desprezadas em lixo especial;
- As Placas Petri cujo material era vidro foram levadas ao Incinerador<sup>8</sup>
- No Incinerador as Placas de Petri foram submetidas a uma temperatura de 200°C por 2 horas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Baseados nos dados utilizados pôde-se verificar que o tipo de técnica de semeadura escolhido e utilizado no trabalho possibilitou maior eficácia e fidelidade dos dados da curva de crescimento da *E.coli* e consequentemente a confecção de uma curva padrão que poderá ser utilizada na segunda etapa do projeto.

Foi observado que o fato de os meios terem sido semeados por espalhamento em superfície possibilitou melhor disposição espacial da solução bacteriana em cima do meio de cultura.

## **CONCLUSÕES**

De acordo com o presente trabalho podemos concluir que o tipo de Método de Semeadura de colônias de utilizado neste estudo foi a Contagem de Viáveis em Placas por Técnica de Espalhamento Superficial (Spedy-Plate) pois a mesma apresenta várias vantagens tais como:

- Menor custo
- Maior agilidade e rapidez
- Possibilidade de contagem em meios opacos como o utilizado no estudo (EMB)
- Possibilidade de registro da imagem das placas petri através de câmera digital devido a utilização de meios opacos e contador de colônias

---

<sup>8</sup> Aparelho utilizado na para descontaminação bacteriana;

- Inexistência de choque térmico em decorrência da adição do meio de cultura

### **AGRADECIMENTOS**

Ao Doutorando em Engenharia Elétrica Fausy Solino Dias,

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Kheifets, Leeka, Repacholi, Michael H., “ELF-EMF exposure and childhood leukemia”, WHO, Geneva, Switzerland, 2002.
- [2] Hyland, G. J., “Relatório sobre Telefones Celulares e Saúde – Impactos potenciais adversos da telefonia móvel sobre a saúde”, Departamento de Física, Universidade de Warwick, Coventry – RU, 2000.
- [3] Agência Nacional de Telecomunicações, Anexo da Res. n° 303 de 2 de julho de 2002, Regulamento sobre Limitação da Exposição a Campos Elétricos, Magnéticos e Eletromagnéticos na Faixa de Radiofrequências entre 9 kHz e 300 GHz.