



PRPG | Pós-Graduação
PIBIC/CNPq/UFPG-2009

Definição dos Equipamentos para a elaboração da curva de crescimento padrão no estudo da Radiação Não-Ionizante sobre a Bactéria *Escherichia coli*

Thales Portela Barbosa¹, Marcelo Sampaio de Alencar² Fausy Solino Dias³

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo definir os equipamentos para a elaboração da curva de crescimento padrão no estudo da radiação Não-Ionizante sobre a Bactéria *Escherichia coli*, avaliando vantagens e desvantagens dos equipamentos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Radiação Não-Ionizante, curva de crescimento bacteriano

ABSTRACT

This work has as an object make a definition of equipments to elaborate a standard Bacterian growth curve in the study of non ionizing radiation at *Escherichia coli*, evaluating advantages and disadvantages of equipments.

Keywords: *Escherichia coli*, Non-ionizing radiation, Bacterian growth curve

INTRODUÇÃO

Para montagem do laboratório de microbiologia para radiação eletromagnética sobre a bactéria *E.coli* é de fundamental importância que se adquira alguns elementos como: Microscópio 40x, Centrífuga, Espectrofotômetro e Geladeiras para realização de estudos dos efeitos da radiação não-ionizante (RNI) sobre esta bactéria.

O microscópio óptico é um instrumento usado para ampliar e regular com uma série de lentes multicoloridas e ultravioletas capazes de enxergar, através da luz, estruturas pequenas e impossíveis de se visualizarem a olho nu. Sendo muito importantes para melhor identificação e contagem das colônias.

A centrífuga é um equipamento que se aplica a força centrífuga relativa em determinado objeto gerada pela rotação em torno de um eixo, sendo usada para sedimentar sólidos em líquidos, ou líquidos imiscíveis de diferentes densidades separando-os. Podendo ser usada para quantificar as colônias avaliando um critério de biomassa.

Os espectrofotômetros são instrumentos de análise que permitem selecionar o comprimento de onda (λ) da radiação adequado à análise de um determinado componente, medir a intensidade I do feixe emergente que corresponde a um determinado feixe incidente I_0 , convertendo o sinal recebido no detector em medida de absorvância para o comprimento de onda da análise e determinar a concentração de uma espécie em solução a partir do gráfico da variação de absorvância em função da concentração de várias soluções-padrão.

¹ Aluno de Curso de Medicina, CCBS, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: thales_pb@hotmail.com

² Engenheira Elétrica, Prof. Doutor, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: malencar@dee.ufcg.edu.br

³ Engenheira Elétrica, Doutorando, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: fausydias@yahoo.com

A geladeira é fundamental para que se possa garantir a conservação das bactérias afim de que possam estar disponíveis para uma próxima semeadura e posterior radiação.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Material

Foram utilizados no LabRNI os seguintes materiais:

- Vidrarias (tubos de ensaio, béqueres, pipetas, baquetas, Erlenmeyer)
- Estufa;
- Autoclave Phoenix;
- Banho-maria;
- Pipeta automática 50µl;
- Meio de cultura TSB⁴ e EMB⁵;
- 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)

Métodos de determinação da biomassa

Através de uma amostra, coloca-se na centrífuga e separa-se a biomassa seca e úmida.
Principais características:

- È um método de contagem indireto
- Contam células vivas e mortas
- Mais adequado para amostras líquidas
- A amostra “não deve” possuir particulado
- População deve ser elevada
- Trabalhoso
- Resultados “imediatos”
- Resultados “imprecisos”

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 Impedância³ 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

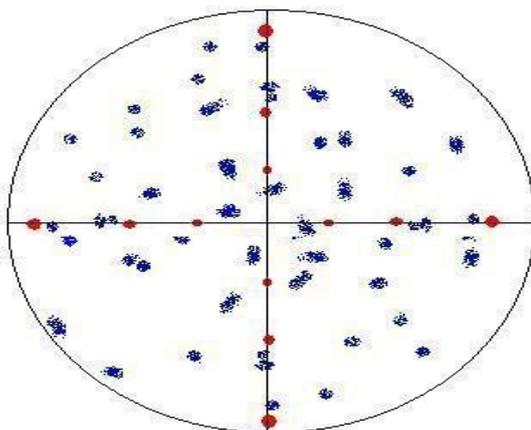


Fig. 1: Esquema de medida da impedância nas cepas

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 SAUFC⁴

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 Incinerador⁵
- No Incinerador as Placas de Petri foram submetidas a uma temperatura de 200°C por 2 horas.

³Medida da Impedancia: 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 ativas. 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.

⁴ Sistema automático das Unidades Formadoras de Colônia

⁵ Aparelho utilizado na para descontaminação bacteriana;

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que para a definição da curva padrão de crescimento da *E.coli* alguns aparelhos foram fundamentais e outros foram dispensáveis.

A estufa foi de grande importância pois além de ser um aparelho elétrico utilizado para dessecação ou secagem de substâncias sólidas e evaporações lentas de líquidos, foi utilizada como manenedora da viabilidade das cepas conservando-as em temperatura constante e ideal.

O Autoclave Phoenix foi muito útil para a esterilização dos aparelhos porém a sua desvantagem principal foi o extenso intervalo de tempo esperado para sua abertura após esterilização dos meios de cultura.

O banho Maria teve a vantagem de liquefazer o meio de cultura aquecendo-os de forma indireta, sem exposição direta a fogo e sem alteração das características do TSB e do EMB.

O microscópio não foi utilizado em nosso trabalho devido a sua não praticidade, seu alto custo e por demandar muito tempo.

A centrifuga que avaliaria a contagem por método de biomassa também teve uma classificação inferior quando comparado com o espalhamento superficial, também sendo um método de alto custo, não prático.

A balança de precisão foi muito importante para a medição exata da massa de meio de cultura a ser utilizada porém sua desvantagem foi o difícil manuseio por não ser digital.

O termômetro a laser teve a vantagem de possibilitar a medida da temperatura sem necessidade de entrar em contato com a cultura de *E.coli* o que foi de extrema importância para evitar colônias polimicrobianas.

CONCLUSÃO

A escolha dos equipamentos foi racional e com prioridade para a praticidade e funcionalidade de cada item escolhido, e isto foi de fundamental importância para a otimização do desenvolvimento da curva padrão de crescimento da *E.coli*.

Não foi necessário a obtenção de um microscópio de 40x visto que optou-se pelo sistema de contagem a olho nu e pelo sistema automático de contagem visto serem meios mais práticos e de menor custo.

A centrifuga não foi utilizada já que optou-se pelo sistema de espalhamento superficial tendo em vista também ser mais prático e de menor custo.

Está sendo realizado acordo entre o IECOM (Instituto de Estudos Avançados em Comunicações) e a engenharia agrícola para a utilização do Espectrofotômetro na próxima etapa do projeto. A Geladeira para realização de estudos dos efeitos da radiação não-ionizante foi cedida pelo CCBS (centro de ciências biológicas da saúde)

AGRADECIMENTOS

Ao Doutorando em Eng. Elétrico 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.