



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

ELABORAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA O ESTUDO DA RADIAÇÃO NÃO-IONIZANTE SOBRE A BACTÉRIA *ESCHERICHIA COLI*

Vanessa de Carvalho Bandeira¹, Marcelo Sampaio de Alencar² Fausy Solino Dias³

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo, determinar uma curva padrão de crescimento bacteriano para o estudo da radiação não-ionizante sobre a *Escherichia Coli*. Foram elaborados procedimentos de contagem de colônias pelo método da diluição, de semeadura por espalhamento superficial, registrando as contagens por meio do sistema automático das unidades formadoras de colônia e com análise da resistividade média e resistência equivalente. Os métodos de contagem realizados foram a contagem automatizada e a contagem visual.

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

ELABORATION OF PROCEDURE FOR THE STUDY OF NON-IONIZING RADIATION AT THE *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA

ABSTRACT

This work had the objective to determine a standard bacterial growth curve for the study of non-ionizing radiation at the *Escherichia Coli* bacteria. Procedures had been elaborated for the counting of colonies by dilution method, sowing by scattering surface, registering the counting by the automatic system of colony-forming units and average resistivity and equivalent resistance analysis. The methods of counting were made to visual counting and automated counting.

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

INTRODUÇÃO

Em procariotos⁴, o termo crescimento indica aumento do número de células ou aumento da massa de uma população, o que determina um crescimento populacional. Uma população bacteriana é um conjunto de indivíduos da mesma espécie que se originaram da divisão de células individuais. Uma população bacteriana pode existir na forma de células esparsas, em colônias ou formando biofilmes. Populações bacterianas constituídas de células livres ou de organismos multicelulares ocorrem na natureza em ambientes de água doce ou salgada em amplos espectros de temperatura e pressão hidrostática.

As bactérias são organismos altamente adaptáveis capazes de crescer utilizando um elevado número de distintas fontes de carbono e nitrogênio e de ocupar uma variedade inesgotável de nichos ecológicos. A chave para a adaptabilidade bacteriana é sua capacidade de expressar somente os genes para enzimas e vias bioquímicas que são requeridos para uma taxa máxima de crescimento no ambiente particular em que se encontram. Isto é possível por sua habilidade de reconhecer a composição química e

¹ Aluna de Curso de Medicina, CCBS, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: vanessabandeira@gmail.com

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

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

⁴ Procariotos são organismos unicelulares que não apresentam seu material genético delimitado por uma membrana. Estes seres não possuem nenhum tipo de compartimentalização interna por membranas, estando ausentes várias outras organelas, como as mitocôndrias, o complexo de Golgi e o fuso mitótico.

física de seu ambiente, percebendo sinais que emanam dele, por exemplo, a presença de um determinado açúcar, como a lactose. Esta faculdade é codificada por conjuntos de genes que somente se expressam quando necessário. Portanto, o crescimento bem sucedido de uma população bacteriana reflete seu grau de adaptação à composição física e química de um determinado ambiente.

Uma das abordagens mais comuns no estudo do crescimento bacteriano é a obtenção de curvas de crescimento.

A curva de crescimento microbiano apresenta quatro fases: fase de arranque, fase de crescimento exponencial, fase estacionária e a fase de morte.

A fase inicial do crescimento microbiano em cultura é caracterizada pela síntese de novos componentes celulares sem ocorrência de crescimento. Isto ocorre porque: as células podem estar envelhecidas e com depleção de ATP⁵, co-fatores essenciais, enzimas (por exemplo, as que participam na replicação do DNA) e ribossomos. Estes compostos têm de ser sintetizados antes que o crescimento possa começar; o novo meio pode ser diferente do meio em que o organismo estava, e novas enzimas terão que ser sintetizadas para utilizar novos nutrientes; nesta fase dá-se a replicação do DNA, a massa celular começa a aumentar e finalmente dá-se a divisão celular; a duração desta fase varia com a condição em que se encontra o microrganismo e com a natureza do meio. Longa, se o organismo provém de uma cultura velha ou refrigerada, ou se o novo meio for muito diferente do meio de onde as bactérias provêm. Curta ou praticamente inexistente, quando se transfere uma cultura jovem em fase de crescimento exponencial para um meio fresco de igual composição.

Na fase de crescimento exponencial, os microrganismos crescem e dividem-se a uma taxa máxima. Como a taxa de crescimento é constante, eles dividem-se em intervalos regulares de tempo e a biomassa duplica nesses intervalos. A uniformidade populacional e bioquímica permite o uso das culturas em fase exponencial em estudos fisiológicos e bioquímicos dos microrganismos.

Na fase estacionária, o crescimento populacional cessa e a curva de crescimento torna-se horizontal. Nesta fase, geralmente é atingida quando a população bacteriana se aproxima de 10⁹ células por ml. A densidade populacional depende da disponibilidade de nutrientes e do tipo de microrganismo que está em cultura. O número total de microrganismos viáveis mantém-se constante, como resultado de um equilíbrio entre divisão celular e morte celular, ou pelo fato da população parar de se dividir embora ficando metabolicamente ativa.

Por fim, na fase de morte, as alterações ambientais como a falta de nutrientes e o aumento de produtos tóxicos provenientes do metabolismo celular conduzem a um declínio no número de células viáveis que é característico da fase de morte.

Para se estudar o crescimento de uma bactéria é preciso cultivá-la, como cultura pura, em meios de cultura e condições ambientais que variam em condições químicas e físicas, tais como fontes de nutrientes, osmolaridade, pH, presença ou ausência de oxigênio e temperatura de incubação. Por exemplo, a bactéria *E. coli* crescendo em um meio de cultura rico e sob condições aeróbicas, atinge uma concentração final de 2 a 5 X 10⁹ células por mililitro em cerca de 12 a 18 horas.

Vários fatores podem afetar o crescimento de uma população bacteriana, incluindo o tipo de ambiente, número de indivíduos na população, interações dinâmicas com outras populações bacterianas, presença de outros microrganismos predadores, fatores químicos e físicos tais como disponibilidade de nutrientes essenciais, temperatura, pH, osmolaridade, pressão hidrostática, concentração de oxigênio, luz, radiação ionizante ou ultravioleta, presença de metabólitos tóxicos resultantes do metabolismo das células da população em crescimento ou presença de agentes antimicrobianos tais como bacteriocinas e antibióticos. Os microrganismos podem viver em um grande número de ambientes; para praticamente qualquer mudança ambiental há algum microrganismo que pode sobreviver.

Devido à ação no crescimento de uma população bacteriana, a radiação não-ionizante e seus possíveis efeitos no processo de fisiologia e divisão celular têm sido assuntos de interesse pelos cientistas, pela mídia e vêm causando preocupação acerca de danos hipotéticos às células humanas.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Material

Foram utilizados no LabRNI os seguintes materiais:

⁵ Diminuição excessiva da quantidade de ATP no organismo.

- 1) Materiais de consumo:
 - Meio de cultura TSB⁶ e EMB⁷;
 - Água destilada;
 - Desinfetantes;
 - Cepas controle L/B liofilizadas de *Escherichia coli* derivada ATCC 25922.

- 2) Vidrarias:
 - Tubos de ensaio;
 - Béqueres;
 - Pipetas;
 - Baquetas;
 - Erlemeyer.

- 3) Equipamentos:
 - Estufa;
 - Autoclave Phoenix;
 - Banho-maria;
 - Pipeta automática 50µl;
 - Multímetro
 - Balança de precisão;
 - 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;
 - Geladeiras;
 - Estantes e suportes de tubo;
 - 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;

⁶TSB - Tripton Soja Caldo– usado para crescimento de bactérias em geral, inclusive pneumococos.

⁷ EMB – Eosina Azul de Metileno Agar - meio para isolamento e identificação de coliformes e outras enterobactérias. Permite diferenciar microrganismos que fermentam a lactose ou a sacarose, dos microrganismos não fermentadores. Os microrganismos lactose (+) e/ou sacarose (+) produzem colônias violeta escuro por acidificação do meio, que podem ser acompanhadas de um reflexo metálico. Os microrganismos não fermentadores produzem colônias incolores ou ligeiramente rosa. A presença de dois corantes inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas.

- 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 homogeneização⁸;
- Prepara-se sete 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, 12h, até o início da turvação⁹.

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 (3,6 g para cada 100 ml 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.

Técnica de Semeadura em Superfície

- Coloca-se o caldo do EMB na placa de Petri pequena, de forma a preencher toda a superfície (20 ml);
- 50 µl 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±1) °C, sendo mantidas, por 10 horas, para desenvolvimento das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Medidas ambientais

⁸ A homogeneização é realizada com movimentos suaves em forma de oito (cerca de 20 vezes)

⁹ 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.

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 a laser).

Medida de impedância¹⁰ 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 SAUFC¹¹

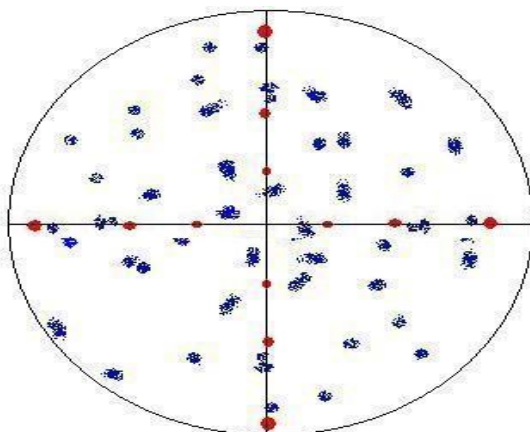


Fig. 1: Esquema de medida da impedância nas cepas

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 850 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 Incinerador¹²

¹⁰ 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 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.

¹¹ Sistema automático das Unidades Formadoras de Colônia

¹² Aparelho utilizado na para descontaminação bacteriana;

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados

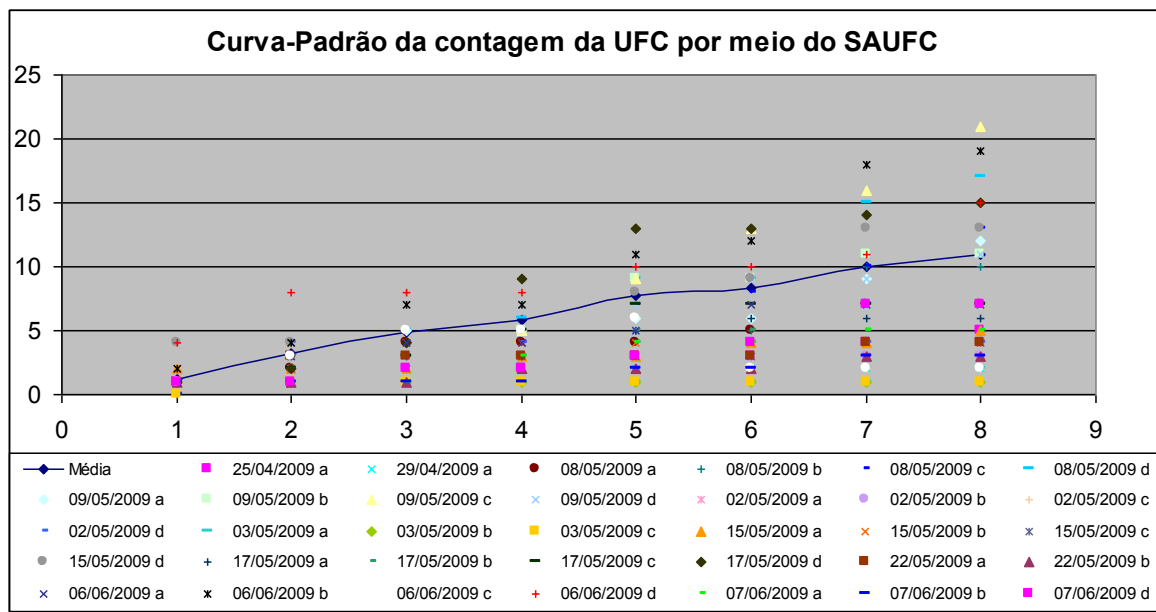


Gráfico 01: Curva-padrão da contagem da UFC por meio da SAUFC

O Gráfico 01 mostra o crescimento linear do crescimento das UFC, com relação ao número de horas, pelo método automatizado da diluição 1.3.

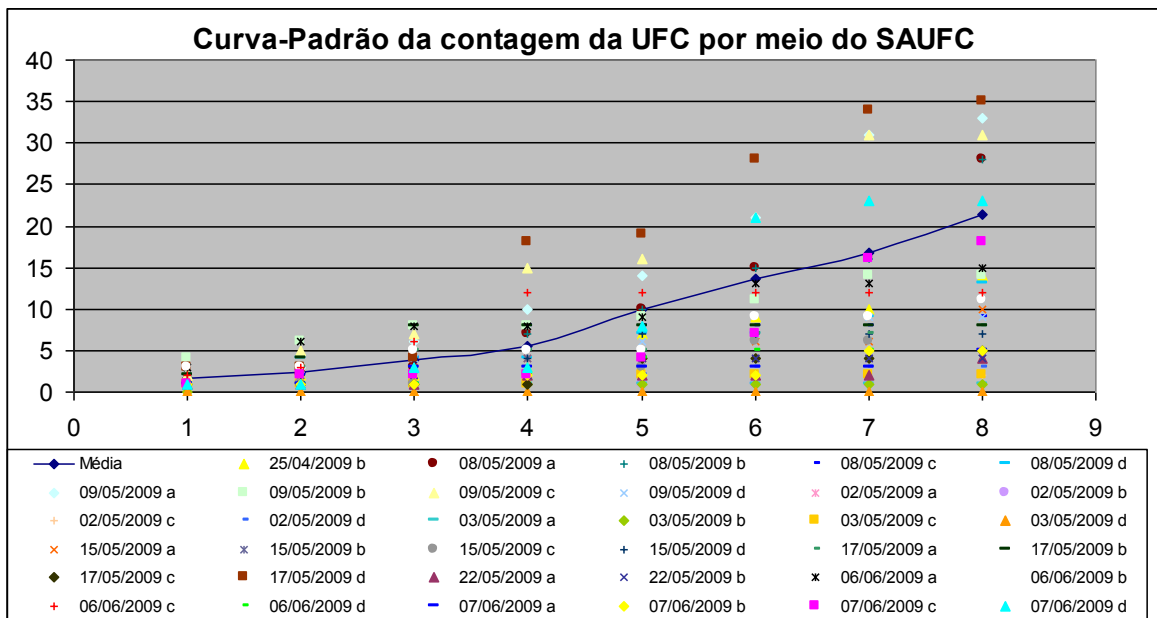


Gráfico 02: Curva-padrão da contagem da UFC por meio do SAUFC

O Gráfico 02 mostra o crescimento linear do crescimento das UFC, com relação ao número de horas, pelo método automatizado da diluição 1.4.

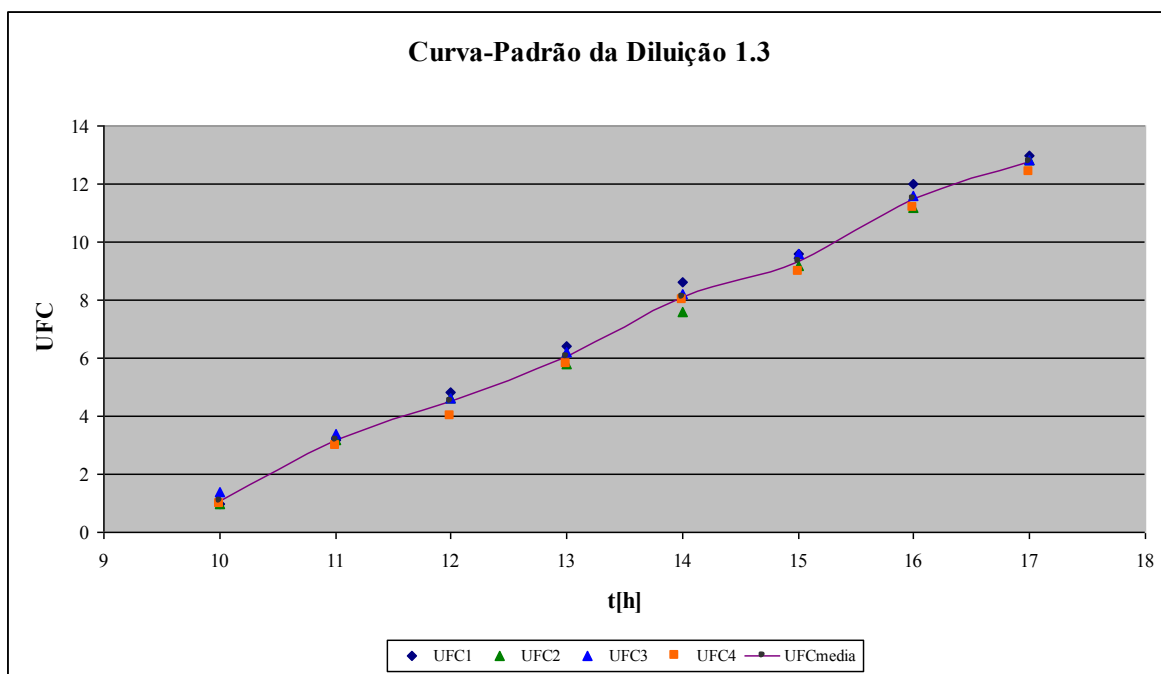


Gráfico 03: Curva-padrão da Contagem de UFC por meio do SAUFC

O Gráfico 03 mostra o crescimento linear da curva-padrão da contagem de UFC por meio do SAUFC, com relação ao número de horas, pelo método visual na diluição 1.3.

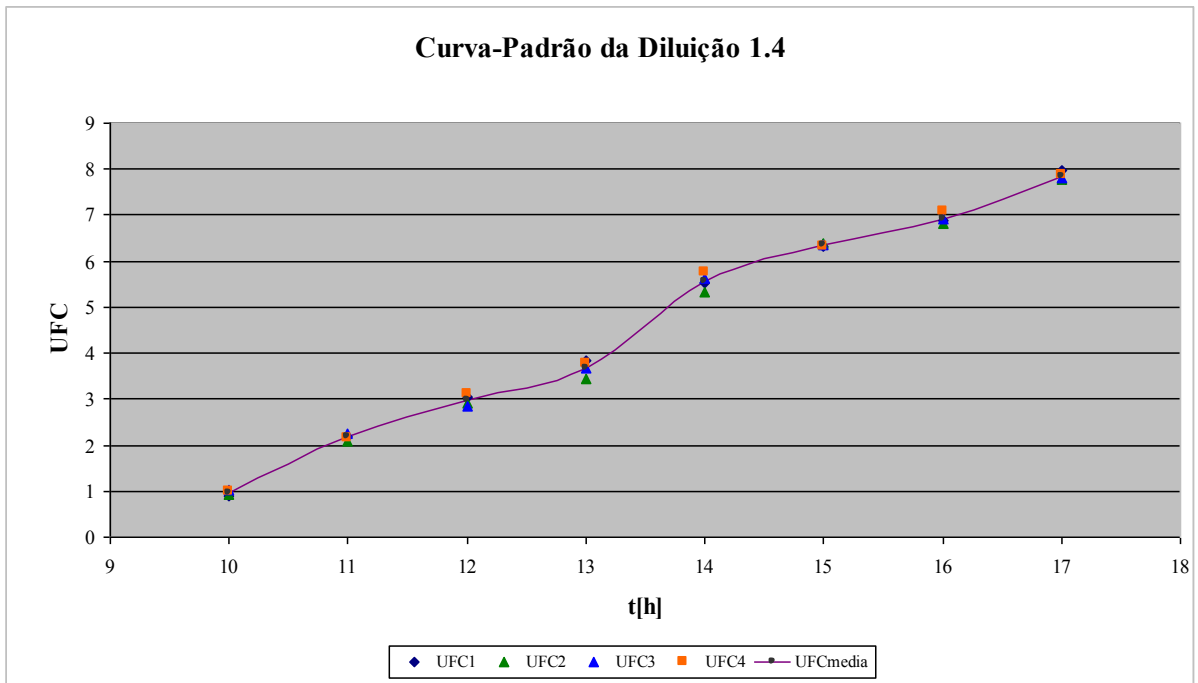


Gráfico 04: Curva-padrão da Contagem de UFC por meio do SAUFC

O Gráfico 04 mostra o crescimento linear da curva-padrão da contagem de UFC por meio do SAUFC, com relação ao número de horas, pelo método visual na diluição 1.4.

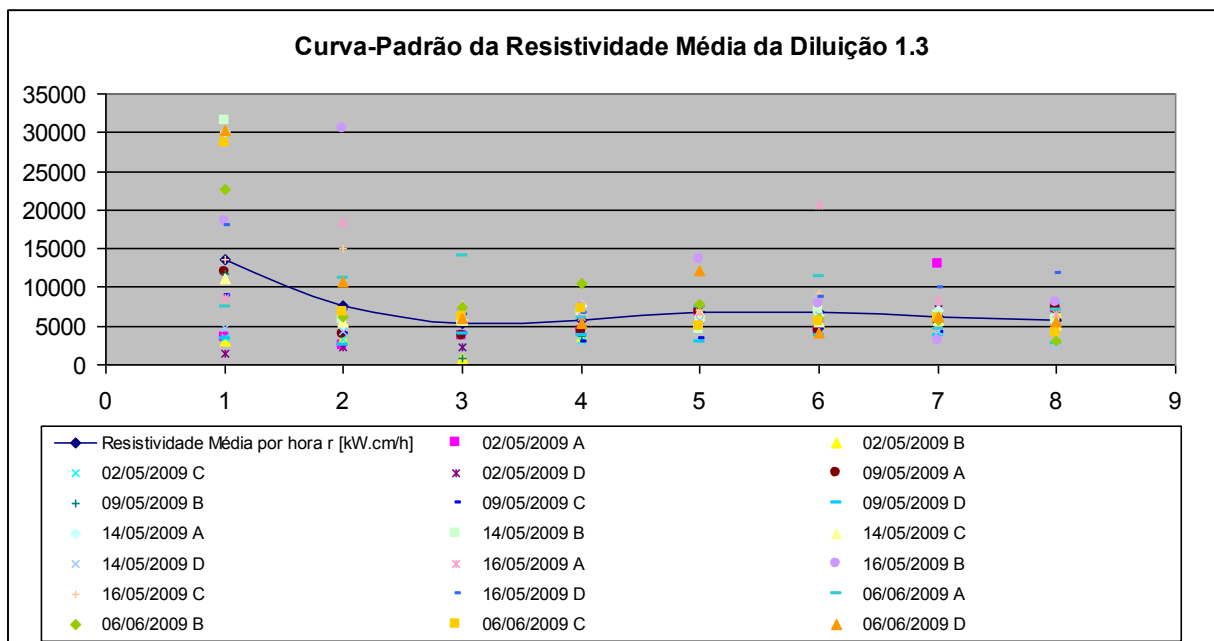


Gráfico 05: Curva-padrão da Resistividade Média da Diluição 1.3

O Gráfico 05 mostra a queda linear na curva-padrão de resistividade média, com relação ao número de horas, da diluição 1.3.

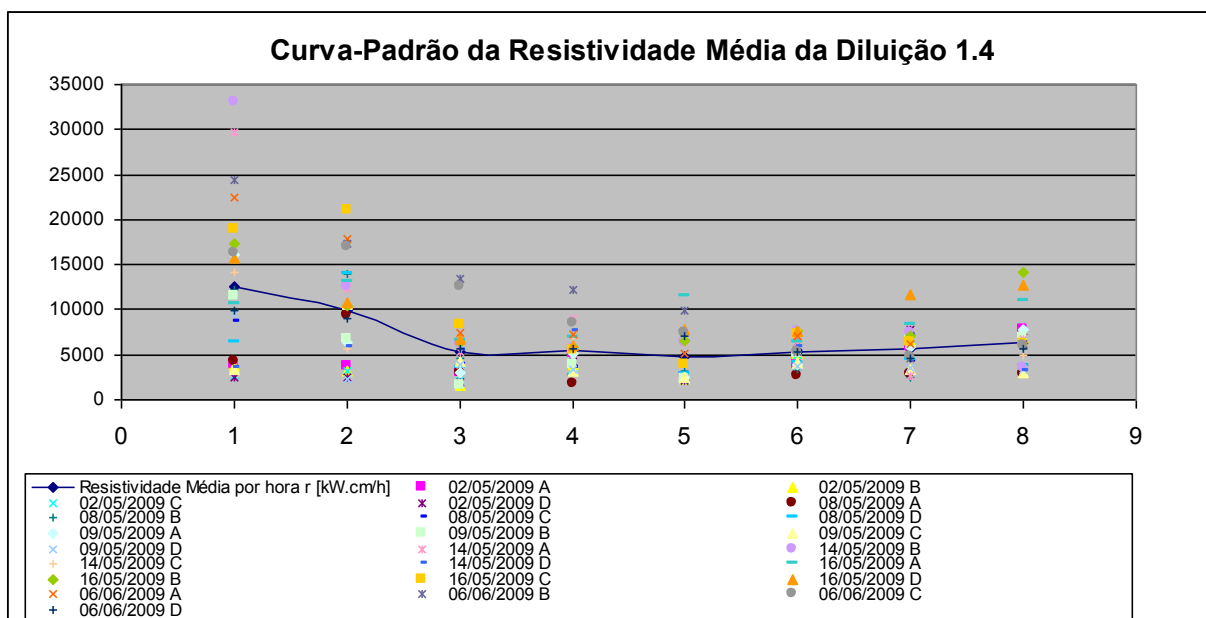


Gráfico 06: Curva-padrão da Resistividade Média da Diluição 1.4

O Gráfico 06 mostra a queda linear na curva-padrão de resistividade média, com relação ao número de horas, da diluição 1.4.

Para elaboração dos gráficos descritos foram utilizados dados obtidos de contagens visuais realizadas por quatro membros da equipe.

Discussão

Análise da Curva-Padrão da Contagem de UFC por meio do SAUFC

As contagens das UFC foram realizadas por meio de dois métodos: a contagem pelo contador automático e a contagem visual realizada pelos integrantes do grupo de pesquisa. A contagem automatizada apresentou curva padrão mais elevada que a da contagem visual. Por exemplo, a diferença na inclinação das curvas padrão para a diluição 1.3 pelos dois métodos foi calculada em 12°, o que representa cerca de mais de 50% de divergência.

Pela análise dos registros por meio do SAUFC, houve um desenvolvimento mais satisfatório das cepas 1.3 e 1.4, visto que as diluições mais concentradas (1.1 e 1.2) tiveram um número muito grande de colônias, acima de 300 UFCs, sendo inviáveis para contagem pelo método visual, e as amostras mais diluídas (1.5 e 1.6) tiveram desenvolvimento insatisfatório e contagem insuficiente por ambos os métodos.

Análise da Curva-padrão da Resistividade Média

A análise do gráfico de resistividade mostrou declínio da curva em relação ao número de horas em detrimento a curva de crescimento de UFC que se mostrou ascendente com o passar das horas. Este mesmo comportamento foi observado no gráfico da resistência equivalente. A diminuição nos valores de resistência em relação ao aumento no número de colônias deve-se ao fato de o meio de cultura alcalino (EMB), que proporciona elevada resistividade, tornar-se escasso com o crescimento das UFCs e assim, com a diminuição da alcalinidade sobrevém a acidez e a diminuição da resistividade. Acredita-se que o próprio crescimento bacteriano produza substâncias que auxiliariam no aumento da acidez desse meio e que meio colóide per si, proporcione dificuldade técnica para avaliação do seu pH.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa experimental, concluiu-se que:

- Pela análise dos registros pela SAUFC estabeleceu-se a utilização das diluições 1.3 e 1.4 para continuidade do experimento;

- A divergência em mais de 50% da inclinação das curvas-padrão para a diluição 1.3, mostrada nos gráficos 01 e 03; pode ser justificada pela contagem em pixels do método automático, sugerindo uma contagem mais minuciosa e precisa. Assim, a contagem automatizada será utilizada nas fases posteriores do experimento;
- Uma dificuldade encontrada na elaboração do projeto, foi a ausência de uma técnica eficaz e acessível para a análise do pH em meio colóide; sugeriu-se o cálculo do pH utilizando-se os valores da variação da resistência equivalente do meio de cultura;
- O estudo da resistividade média proporcionou um gráfico compatível com o estudo da resistência equivalente e assim, pela melhor técnica e facilidade de cálculo, priorizou-se a análise da resistividade média para a continuidade do experimento.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Moretti, Paulo E., Microbiologia. Saúde & Ambiente - Seção 1 Bacteriologia - Parte 4 Fisiologia 4ª edição, Guanabara Koogan. São Paulo, 2007.
- [2] ANSI – American National Standards Institute. IEEE “C95.1-1991: IEEE Standard for Safety Levels with Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic Fields, 3 kHz to 300 GHz”. The Institute of Electrical and Electronics Engineers, Inc., 345 East 47 Street, New York, NY 10017-2394, USA
- [3] Okuno, Emico, “Física para Ciências Biológicas e Biomédicas”, Harbra, 1986.
- [4] “Noções básicas de microbiologia geral” Disponível em: <http://www.esac.pt/abelho/MicroAmbiental/1.2Preambulo.pdf> Acessado em 12 de maio de 2009 4ª edição.