



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

## A IMPORTÂNCIA DA MONTAGEM DE UM LABORATÓRIO E DE CURVAS DE CRESCIMENTO NA ELABORAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA O ESTUDO DA RADIAÇÃO NÃO-IONIZANTE SOBRE A BACTÉRIA *ESCHERICHIA COLI*

Silvio Leite de Macedo Neto<sup>1</sup>, Marcelo Sampaio de Alencar<sup>2</sup> Fausy Solino Dias<sup>3</sup>

### RESUMO

Em um estudo do crescimento bacteriano existe a necessidade de se cultivar, em condições de ambiente, meio de cultura, químicas e físicas variáveis, como as fontes de nutrientes, osmolaridade, ausência ou presença de oxigênio e temperatura incubatória. A comparação entre gráficos e planilhas serve de subsídio para elaboração de hipóteses sobre o comportamento do crescimento da bactéria, dos valores de resistência e temperatura analisados

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

### THE IMPORTANCE OF CREATING AN LABORATORY AND GROWTH CURVES FOR AN ELABORATION OF A PROCEDURE FOR THE STUDY OF NON-IONIZING RADIATION AT THE *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA.

### ABSTRACT

In a study of bacterial growth there is the necessity of cultivating, in environment conditions, culture environment, chemicals e physicals varieties, as nutrients provident, osmolarity, situation of oxygen and temperature of incubator. The study between graphics is great for elaboration of hypothesis over the behavior of the bacterial growth, resistance values and temperature annualized.

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

### INTRODUÇÃO

Para a elaboração do procedimento para o estudo da radiação não-ionizante sobre a bactéria *E. coli* é necessária a montagem de um laboratório com materiais e equipamentos específicos. Curvas de crescimento em condições normais e específicas são indispensáveis para que se possa fazer a comparação com a curva criada posteriormente à radiação da amostra.

Em um estudo do crescimento bacteriano existe a necessidade de se cultivar, em condições de ambiente, meio de cultura, químicas e físicas variáveis, essas como as fontes de nutrientes, osmolaridade, ausência ou presença de oxigênio e temperatura incubatória.

Uma das maneiras mais comuns de se abordar o estudo de crescimento bacteriano é a obtenção de curvas de crescimento. São representações gráficas do aumento do número de indivíduos por um determinado período de tempo. Uma linha passando pelos pontos do gráfico se torna uma curva exponencial e cada ponto dessa linha representa o número teórico de células, em um determinado tempo.

Levando em consideração os ambientes naturais e também as condições experimentais, a disponibilidade limitada de nutrientes, algum fator desfavorável em um determinado momento, qualquer nutriente essencial que se torne escasso, acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo e concentrações inibitórias, limitações do espaço, quaisquer dessas situações, em conjunto ou isoladamente, inibem a

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

<sup>2</sup> Engenheiro Elétrico, 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> Engenheiro Elétrico, Doutorando, Centro de Engenharia Elétrica e Informática, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: [fausydias@yahoo.com](mailto:fausydias@yahoo.com)

divisão celular, causando um declínio no número de células viáveis na população até que se extingam completamente.

É muito importante a elaboração de um laboratório para eficiente manipulação da bactéria *Escherichia coli* para estudo dos possíveis efeitos da radiação não-ionizante (RNI) sobre a colônia de bactérias. Diversos materiais e instrumentos são necessários para que se mantenham ambiente e condições adequadas para tal manipulação. Materiais como Erlenmeyer, estantes e suportes de tubo, lâminas de microscopia, tubos de ensaio, pipetas e autoclave são essenciais para guardar, transportar, diluir, armazenar e analisar os meios de cultura, cepas e colônias. Balanças de precisão e uma balança digital são fundamentais para preparação dos meios de cultura de maneira ótima para cultivo da bactéria, pois o meio utilizado deve ser diluído em água destilada, e posteriormente esse meio é esterilizado em autoclave, esperando assim que a bactéria cultivada seja o único organismo existente na amostra preparada. O relógio de tempo tem como função a medição do tempo para esterilização efetiva dos materiais e meio de cultura, fazer medições e análises a cada trinta minutos, durante as oito horas pesquisadas em todas as placas Petri. Luvas, máscaras e gaze devem ser utilizadas para proteção dos estudantes e orientadores, assim como para evitar contaminação das amostras e materiais. Um contador de colônias é indispensável para se fazer fotografias das placas Petri que posteriormente serão contadas por método visual humano e pelo programa criado e analisado neste mesmo projeto como um dos objetivos.

O correto funcionamento dos equipamentos hidráulicos, mecânicos e eletrônicos é indispensável para eficiente esterilização, contagem, pesagem, diluição, preparo e registro dos dados relacionados ao meio de cultura, materiais, colônias e extratos relacionados a este experimento.

A manutenção desses materiais como autoclave, balanças, contador de colônias, máquina fotográfica e termômetro digital, estufas e a garantia da integridade da vidraria foi acompanhada ao longo de todo o procedimento. Reparos na afiação, trocas de borrachas vedantes, limpeza dos pratos das balanças, reinicialização dos termômetros, troca da lâmpada do contador de colônia são alguns dos procedimentos realizados para que se mantenha a qualidade do experimento.

A coleta dos dados ao final de cada dia, temperatura, número de colônias, umidade, resistência, é muito importante, pois é a partir desses números que os resultados do trabalho são obtidos e analisados. Sugere-se que esses dados sejam registrados com caneta em papel, para evitar efeitos negativos que uma queda de energia poderia causar no caso de se usar um computador eletrônico. Posteriormente esses dados são passados para um programa de computador capaz de elaborar planilhas e gráficos.

A comparação entre gráficos e planilhas serve de subsídio para elaboração de hipóteses sobre o comportamento do crescimento da bactéria, dos valores de resistência e temperatura analisados.

Grupos de estudo e análise devem ser formados para se encontrar um melhor procedimento para realização das medidas de RNI sobre a bactéria *E. coli*.

## **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 TSB<sup>4</sup> e EMB<sup>5</sup>;
- Multímetro
- Balança de precisão;
- Incinerador;
- Termômetro eletrônico;

---

<sup>4</sup>TSB - Tripton Soja Caldo– usado para crescimento de bactérias em geral, inclusive pneumococos.

<sup>5</sup> 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.

- 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 homogeneização<sup>6</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>7</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)

<sup>6</sup> A homogeneização é realizada com movimentos suaves em forma de oito (cerca de 20 vezes)

<sup>7</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.

- 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.

### 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

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>8</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>9</sup>

<sup>8</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 ativas. O acúmulo destes compostos leva à alterações mensuráveis. O tempo de detecção ocorre quando a concentração de células atinge valores superiores a 10<sup>6</sup> células/ml. A curva resultante determina a presença de microrganismos.

<sup>9</sup> Sistema automático das Unidades Formadoras de Colônia

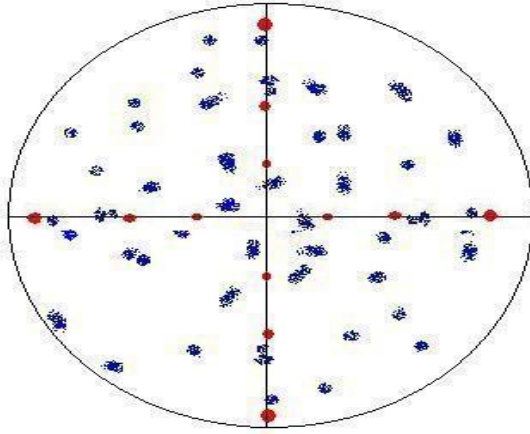


Fig. 1: Esquema de medida da impedância nas cepas

### 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>10</sup>
- No Incinerador as Placas de Petri foram submetidas a uma temperatura de 200°C por 2 horas.

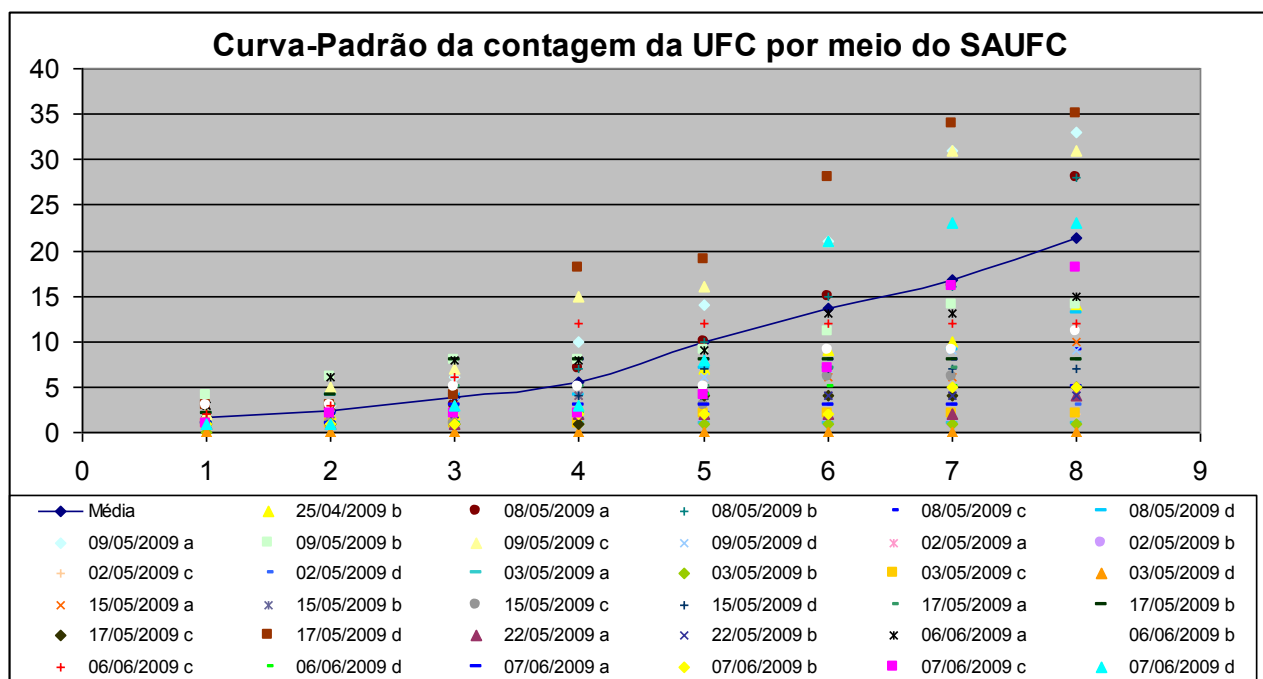
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o cultivo de bactérias em diversas placas Petri, em condições especiais de temperatura, umidade, meio de cultura específico, foi analisado o crescimento bacteriano e formulado um padrão de base para ser utilizado na segunda fase do projeto.

Com esses gráficos elaborados, a partir dos dados coletados, ter-se-á uma base padrão por onde se pode comparar as diferenças entre essas mesmas curvas e as curvas criadas após o alvo ser irradiado por RNI.

Foi-se constatado que não houve crescimento algum nas amostras irradiadas. Relacionando esse resultado ao crescimento de base padrão, descrito pelo gráfico abaixo, viu-se que houve prejuízo à estrutura biológica da bactéria ou às propriedades específicas do meio utilizado.

<sup>10</sup> Aparelho utilizado na para descontaminação bacteriana;



Na segunda fase do trabalho serão feitas outras irradiações por RNI em cepas de E. coli. A partir dessas novas medições serão elaboradas novas hipóteses sobre a ausência de crescimento bacteriano nessa amostra específica.

## CONCLUSÕES

As curvas de crescimento foram obtidas de acordo com o esperado seguindo os métodos propostos pelo trabalho, servindo assim como base para comparações em estudos futuros.

Detectou-se a grande importância da elaboração de um laboratório para adequado cultivo e análise das bactérias, pois ao se evitar contaminação e ao se manter condições ótimas de cultivo, existe uma maior fidedignidade no padrão da curva de crescimento obtido.

A manutenção dos aparelhos laboratoriais é imprescindível para continuidade e garantia da segurança e fidelidade dos dados obtidos.

Foi detectado que ao se submeter as placas Petri à radiação não-ionizante não houve crescimento das colônias de E. coli, podendo assim se concluir que houve dano à estrutura biológica da bactéria ou ao meio em qual foi cultivada. Tal resultado faz com que seja necessária nova análise e novas irradiações com RNI para que se elaborem hipóteses e se descubra a causa mais provável para o impedimento do crescimento dessas colônias. E assim também ver a possibilidade de erro nas propriedades necessárias ao cultivo da bactéria.

## AGRADECIMENTOS

Ao Doutorando em Eng. Elétrico Fausy Solino Dias, e ao CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kheifets, Leeka, Repacholi, Michael H., "ELF-EMF exposure and childhood leukemia", WHO, Geneva, Switzerland, 2002.
- [2] Da Silva, Heitor Evangelista, de Araújo, Adriano Caldeira, Asad, Nasser Ribeiro & Asad, Lídia M. B. de Oliveira, "Estudo dos mecanismos de reparação do DNA e sobrevivência bacteriana à radiação cósmica ionizante e ao UVA em ambiente de baixa gravidade", IB/UERJ, 2003.
- [3] Tavares, W. M. L., Radiação das Antenas do Serviço Móvel Celular e seu Tratamento na Legislação Brasileira e de Outros Países, Câmara dos Deputados, 2004.
- [4] Microbiologia, Saúde & Ambiente - Seção 1 Bacteriologia - Parte 4 Fisiologia - © 2007 Paulo E. Moretti.

