

# Comparação entre métodos de detecção da concentração bacteriana com fins a determinar o valor de radioresistência da mesma

Lyara Aparecida Biadolla, Fernanda Barna e Monica Beatriz Mathor  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

## INTRODUÇÃO

O valor de radioresistência pode ser chamado de valor D10, é medido em kilogray (kGy) e é a dose necessária para inativar 90% da população existente no momento inicial.

Esse valor é determinado por uma regressão linear simples. A cinética da morte microbiana está diretamente relacionada com as doses de irradiação aplicadas. Observando que a fração de sobrevivência de microrganismos é inversamente proporcional à dose absorvida [1].

Os microrganismos podem ser destruídos por agentes físicos ou químicos e essa inativação segue uma lei exponencial. A probabilidade finita de sobrevivência pode ser calculada em função do número de espécies existentes no produto, da letalidade do processo de esterilização e em alguns casos levando em consideração o ambiente em que vivem os microrganismos [3].

## OBJETIVO

Esse trabalho tem como objetivo a determinação do melhor método para detecção da concentração bacteriana com fins a determinar o valor de radioresistência da mesma.

Foi utilizada cepa de E.coli ATCC para esse estudo. Elas foram inoculadas em caldo TSB e no dia seguinte foi medida a densidade óptica do meio de cultura por um espectrofotômetro para que pudessemos determinar a concentração inicial.

Posteriormente, irradiamos as amostras no acelerador de elétrons. A partir disso, três diferentes métodos foram testados: contagem em placa, microdiluição e InCell Analyzer.

Na contagem em placas as bactérias foram inoculadas em 3 placas de ágar Müller Hinton da maior diluição e da anterior, correspondente a cada dose de irradiação. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e depois foram lidas manualmente, contando o número de colônias.

Na microdiluição temos em uma placa de 96 poços com meio TSB e amostra na concentração conhecida nos primeiros poços correspondentes a diluição zero foi feita a diluição seriada para os outros poços até a diluição  $10^{-3}$ . Essa placa foi incubada a 37°C por 24 horas sob agitação. Depois foi feita a leitura por um espectrofotômetro de placas nos comprimentos de onda 490 nm e 540 nm.

No método InCell Analyzer, a uma placa de 96 poços foi adicionado DPBS e amostra. Posteriormente, foi adicionada uma solução de calceína e Iodeto de Propídeo para que as bactérias vivas sejam coradas de verde e as bactérias mortas de laranja. Essa placa foi colocada no equipamento InCell Analyzer, onde foi incubada por 12 horas e fotografada microscopicamente a cada 30 minutos. Com esses dados foi possível a elaboração dos gráficos e a comparação dos métodos de análise.

Após a utilização dos três métodos descritos para a determinação da

concentração bacteriana podemos observar os seguintes resultados.

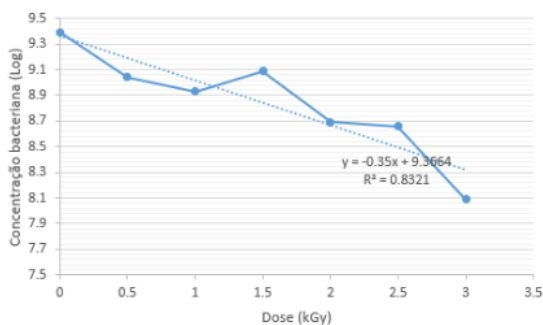


Figura 1. Concentração bacteriana (UFC.log) das diferentes doses de radiação absorvida inoculadas em placas de ágar Müller Hinton após 24 horas incubadas.

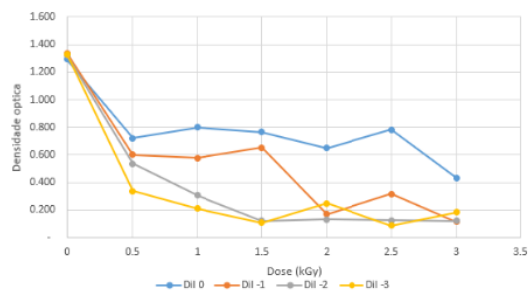


Figura 2. Leitura da densidade óptica da placa de 96 poços produzida pelo método de microdiluição.

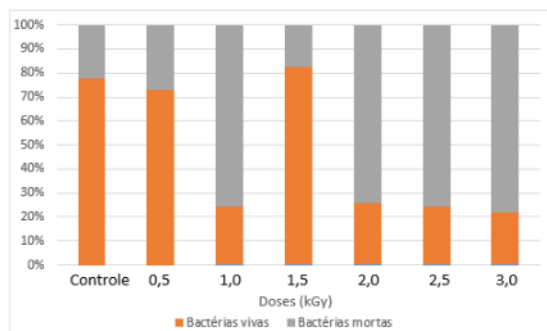


Figura 3. Leitura da placa de 96 poços pelo equipamento *InCell Analyzer* e tratamento dos dados pelo software Fiji.

O teste mais utilizado para quantificação microbiológica é a contagem padrão, o resultado é expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro [2]. Porém se comparado com os outros dois métodos é o mais demorado. Sendo que outro obstáculo é a questão de diluições

necessárias para que as placas sejam contáveis.

O método de microdiluição é sensível até a diluição  $10^{-1}$ , como podemos analisar no gráfico as retas referentes ao controle e a diluição  $10^{-1}$  se comportam de maneira semelhante, já as maiores diluições não acompanham.

Quando os resultados dos três métodos são comparados podemos observar que são semelhantes, onde podemos notar que na dose de radiação de 1,5 kGy temos um aumento na população bacteriana que foi reproduzido em todos os métodos.

Os métodos de determinação da concentração bacteriana após a irradiação diferem no tempo e na quantidade de insumos utilizados. O método mais rápido e sensível dentre os analisados neste trabalho foi o da utilização do equipamento *InCell Analyzer*, porém é necessária a obtenção do equipamento e dos corantes, assim como o treinamento para a utilização do mesmo, aumentando assim o custo desse método. O método tradicional de inoculação e leitura em placas é o mais conhecido e utilizado, por ser um método de baixo custo, porém que demora pelo menos 24 horas para a obtenção do resultado.

[1] AQUINO, K. A. S.; Sterilization by Gamma Irradiation, InTech, 2012

[2] BRITO, M. A. et al. Contagem de bactérias. EMBRAPA, 2021.

[3] PINTO, T. J. A. et al. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 3 a Ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

CNPq