



ANÁLISE COMPARATIVA DA RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS AMBIENTAIS E PATOGÊNICAS EM CONDIÇÕES EXTREMAS SIMULADAS EM LABORATÓRIO

Comparative analysis of the environmental and pathogenic bacteria resistance in extreme conditions simulated in the laboratory

Alice de Moura Emílio¹, Marcia Zorello Laporta², Priscila Reina Siliano³

¹⁻³Centro Universitário Fundação Santo André. Santo André – SP.

Resumo

Ambientes inóspitos e suas condições extremas limitam e/ou impossibilitam o aparecimento de grandes comunidades microbianas. O objetivo desse trabalho foi analisar o comportamento dos microrganismos obtidos das amostras ambientais de solos argiloso e arenoso, além das amostras patogênicas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em ambientes hostis simulados em laboratório. Foram realizados testes com ultravioleta, jarra de anaerobiose, micro-ondas, agentes químicos, pH, salinidade e calor com as amostras de bactérias. Todas as amostras bacterianas se mostraram resistentes aos tratamentos exceto àquelas submetidas aos testes de micro-ondas em potência máxima e ao de pH ácido, evidenciando a resistência dos seres procariotos a alterações ambientais extremas.

Palavras-chave: Bactérias patogênicas. Bactérias ambientais. Fatores abióticos. Resistência bacteriana.

Abstract

Inhospitable environments and their extreme conditions limit and / or prevent the appearance of large microbial communities. The objective of this work was to analyze the behavior of microorganisms obtained from environmental samples of clayey and sandy soils, in addition to the pathogenic samples of *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in hostile environments simulated in the laboratory. Tests were performed with ultraviolet, anaerobic jar, microwave, chemical agents, pH, salinity and heat with the bacteria samples. All bacterial samples were resistant to treatments except those submitted to microwave tests at maximum potency and acid pH tests, showing the resistance of prokaryotic beings to extreme environmental changes.

Keywords: Pathogenic bacteria. Environmental bacteria. Abiotic factors. Bacterial resistance.

Introdução

A astrobiologia é a ciência que busca entender o surgimento e evolução da vida na Terra e a influência do ambiente nesse processo, além disso, estuda a possibilidade de haver vida em outros planetas (OBSERVATÓRIO ABRAHÃO DE MORAES, 2011). Organismos extremófilos são objeto de estudo da astrobiologia porque ocorrem em locais com condições físico-geoquímicas extremas. (LABORATÓRIO DE BIOLOGIA SISTÊMICA DE MICROORGANISMOS, 2011; PANSPERMIA-THEORY, 2016). O presente trabalho veio complementar os estudos sobre bactérias patogênicas e bactérias do solo relativo à resistência a habitats adversos à vida, contribuindo para a divulgação da importância desses microrganismos para outros seres vivos e para o conhecimento científico com enfoque na astrobiologia. No presente estudo foram utilizadas cepas de bactérias



patogênicas gram-negativas, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*, e gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2004). Além disso, foram usadas amostras de solos argiloso, possuindo vegetação e sem vegetação, e arenoso, úmido e seco.

Método

Para a realização dos testes foram utilizadas cepas de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella typhi*, e amostras bacterianas isoladas de solo, coletadas no Centro Universitário Fundação Santo André, Santo André e da praia de Embaré, Santos. Após obtenção das colônias isoladas, elas foram semeadas em caldo nutriente e incubadas a 37°C, por 24 - 48 horas. Das amostras de solo foram isolados bacilos gram-positivos e estes foram testados.

No teste da radiação ultravioleta, cada amostra foi semeada em cinco placas de ágar Mueller-Hinton, numeradas de 1 a 5. A seguir, as placas 1 a 4 foram submetidas à radiação ultravioleta, respectivamente, por 15, 30, 60 e 120 minutos. A placa 5 constituiu o controle. Ao término de cada tempo, as placas foram incubadas a 37°C, por 24 - 48 horas. No teste da jarra de anaerobiose, as amostras foram semeadas em duplicata em placas de ágar nutriente pelo método de esgotamento. Uma placa de cada amostra foi cultivada em jarra de anaerobiose (ausência de O₂) e as duplicatas constituíram o grupo controle. Todas as placas foram incubadas a 37°C, por 24 - 48h. No teste de radiação com micro-ondas, as amostras foram semeadas em caldo nutriente em tubos e submetidas ao forno micro-ondas, em potência máxima, durante 30 e 60 segundos e, em potência média, durante 30 segundos. A seguir, as amostras foram semeadas em placas de ágar nutriente e incubadas a 37°C, por 24 - 48 horas.

No teste do pH, as amostras foram semeadas em caldo nutriente com pH 2 e pH 10 e incubadas a 37°C, por 24 - 48 horas. A seguir, foram semeadas em placas de ágar nutriente, e incubadas também a 37°C, por 24 - 48 horas. No teste da salinidade, as amostras foram semeadas em caldos com concentrações de NaCl de 40%, 10% e 5%, e incubadas a 37°C por 24 - 48 horas. A seguir, foram semeadas em placa de ágar nutriente, sendo incubadas também a 37°C, por 24 - 48 horas. No teste do agente químico, as amostras foram semeadas em caldo nutriente ao qual foi adicionado 1 mL de hipoclorito de sódio a 13%, e mantidas nesse meio durante cinco minutos. A seguir, foram semeadas em placa de ágar Nutriente, sendo incubadas a 37°C, por 24 - 48 horas. No teste da fervura, as amostras foram cultivadas em caldo nutriente e então submetidas à água fervente durante 5 minutos. Durante o teste, a temperatura foi medida, tendo atingido o valor final de 86°C. A seguir, as amostras foram semeadas em placas de ágar Nutriente, e incubadas a 37°C por 24 - 48 horas.

Resultados e Discussão

Os resultados do presente estudo foram comparados àqueles verificados por Noé e Siliano (2016), que isolaram microrganismos do chorume e os submeteram a diversos tratamentos para estudar a inibição: ultravioleta, fervura, jarra anaeróbia e hipoclorito de sódio. No presente estudo, os tratamentos foram similares, mas realizados com amostras bacterianas diversas. Noé e Siliano (2016) verificaram a inibição de suas amostras bacterianas apenas com a utilização do hipoclorito nas concentrações 1:1 até 1:10. As amostras bacterianas investigadas no presente estudo foram resistentes ao hipoclorito e aos outros ensaios, exceto à radiação com micro-ondas em potência máxima, em qualquer dos tempos adotados.



O tratamento com radiação ultravioleta não inibiu o crescimento da maioria das amostras, exceto no caso do bacilo Gram positivo isolado de solo arenoso úmido, submetido a esse tratamento durante 120 min. É preciso ressaltar que essa amostra apresentou esporos, visíveis nas análises microscópicas, confirmando assim a resistência dessas estruturas, como é o caso dos esporos do gênero *Bacillus* frente a radiação ultravioleta, segundo Nicholson e Galeano (2003).

No teste com a jarra de anaerobiose, ou seja, em ambiente sem oxigênio, todas as amostras apresentaram crescimento, mostrando que esses micro-organismos podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, utilizadas no presente estudo, são aeróbias facultativas (MADIGAN et al., 2016). No teste com forno micro-ondas em potência máxima, nos dois tempos utilizados, todas as bactérias foram inibidas. Em potência média, apenas a bactéria do solo arenoso úmido mostrou-se resistente. Em pH alcalino (pH = 10), houve maior crescimento de colônias, enquanto em pH ácido (pH = 2) nenhuma amostra conseguiu se desenvolver. No teste com hipoclorito de sódio a 13%, apenas duas amostras ambientais não foram inibidas, as amostras de solo com vegetação e da areia úmida.

No teste frente a diferentes salinidades, em NaCl a 5%, somente o bacilo gram-positivo isolado do solo argiloso com vegetação foi inibido. A concentração de 10% de NaCl não inibiu o bacilo da amostra solo argiloso com vegetação, solo arenoso seco e o *Staphylococcus aureus*. Porém na concentração de 40% de NaCl, houve o crescimento apenas da amostra de *Staphylococcus aureus*, o que está de acordo com o descrito na literatura: Pinilla (2016) e Roohi et al. (2014) descrevem espécimes do gênero *Staphylococcus* em diversos ambientes salinos, como locais na caatinga e em minas salinas, respectivamente, caracterizando essa bactéria como halotolerante.

Os únicos microrganismos que resistiram ao teste da fervura foram os bacilos das amostras de solo argiloso com vegetação, e arenoso úmido, e a *Escherichia coli* que apresentou alterações na forma de sua colônia.

Este estudo privilegiou a microbiologia clássica com métodos dependentes de cultivos e cepas de microrganismos potencialmente patogênicos. Estudos na área das Astrobiologia geralmente utilizam bactérias e arqueas ambientais, isoladas em regiões extremas, como *Deinococcus radiodurans* e *Haloferax volcanii*, abordados como modelos para experimentos em laboratórios (LAGE et al., 2012) e, até mesmo, organismos eucariotos, como fungos isolados de vulcão na região do Atacama, Chile (PULSCHEN et al. (2015). O presente estudo inovou ao utilizar *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella typhi*, usualmente estudadas na área da saúde, podendo abrir novos caminhos e contribuir para os conhecimentos a respeito da resistência dos microrganismos a inúmeros agentes físicos e químicos.

Conclusão

No presente trabalho se buscou analisar o comportamento de microrganismos nos mais diversos testes que simularam possíveis condições ambientais em laboratório. Foi verificado que as diferentes amostras estudadas se comportaram de formas distintas no decorrer dos testes a que foram submetidas, e a maioria demonstrou ser resistente à radiação ultravioleta, baixa concentração de O₂, pH básico e à concentração de NaCl a 5%. Quanto à radiação micro-ondas, nenhuma bactéria se desenvolveu após ser exposta à potência máxima.

As amostras que mostraram ser mais resistentes foram as obtidas do solo, principalmente o argiloso com vegetação. Isso pode ser resultante de seleção em ambiente em constante contato com radiação, calor, frio e outros fatores físico-geoquímicos. Das amostras patogênicas, a mais resistente



foi *Staphylococcus aureus*, microrganismo responsável por causar diversas infecções, e que pode ser considerado halotolerante e até mesmo halofílico extremo por resistir em concentrações superiores a 35% de salinidade.

Mas entre os dois tipos de amostras, ambientais e patogênicas, as ambientais foram as que resistiram ao hipoclorito de sódio 13% em diluição de 1:4, comumente considerado um ótimo bactericida, e também à fervura, suportando temperaturas de até 86°C.

O estudo mostra, como já descrito na literatura, que a capacidade de resistência bacteriana é extraordinária, evidenciando o poder de sobrevivência e evolução de cada espécie, em diferentes habitats e expostos a diferentes fatores abióticos.

Referências

- LABORATÓRIO DE BIOLOGIA SISTÊMICA DE MICROORGANISMOS. Extremófilos. 2011. Disponível em: <<http://labisismi.fmrp.usp.br/index.php/br/extremofilos>>. Acesso em: 2 nov. 2016.
- LAGE, C. A. S. et al. Mini-review: Probing the limits of extremophilic life in extraterrestrial environment-simulated experientes. International Journal of Astrobiology, v. 11, n. 4, p. 251-256, ago. 2012.
- MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- NICHOLSON, W. L.; GALEANO, B. UV resistance of *Bacillus anthracis* spores revisited: validation of *Bacillus subtilis* spores as UV surrogates for spores of *B. anthracis* Sterne. Applied and Environmental Microbiology, v. 69, n. 2, p. 1327-1330, fev. 2003.
- NOE, M. C.; SILIANO, P. R. Padronização de metodologia para desinfecção microbiana do chorume. Saúde em foco, Piauí, n.8, p. 54-61, 2016. Disponível em: <http://unifia.edu.br/revista_eletronica/revistas/saude_foco/artigos/ano2016/006_desinfec_chorume.pdf>. Acesso em: 8 nov. 2016.
- OBSERVATÓRIO ABRAHÃO DE MORAES - OAM. Astrobiologia. São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.observatorio.iag.usp.br/index.php/mppesq/astrobio.html>>. Acesso em: 02 mai. 2015.
- PANSPERMIA-THEORY. Extremophiles. 2016. Disponível em: <<http://www.panspermia-theory.com/extremophiles>>. Acesso em: 8 nov. 2016.
- PINILLA, M. P. P. Caracterização de bactérias halotolerantes isolados do bioma caatinga e avaliação da produção de biopolímeros. 2016. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- PULSCHE, A. A. et al. UV-resistant yeast isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. Microbiology Open, v. 4, n. 4, p. 574-588, mar. 2015.
- ROOHI, A. et al. Isolation and phylogenetic identification of halotolerant/halophilic bacteria from the Salt lakes of Karak, Pakistan. International Journal of Agriculture & Biology, v. 16, n. 3, p. 564-570. fev. 2014.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.