

**SENSITIVIDADE À RADIAÇÃO GAMA DE *Escherichia coli*  
EM TRÊS SUBSTRATOS E ESTUDO DAS SUAS ALTERAÇÕES  
AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO**

**MARIA ELISABETH NEVES FISCHER CERRI**

**Orientador: Prof. Dr. Darcy Martins da Silva**

**Dissertação apresentada à  
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"  
da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do grau de Mestre em Agronomia.**

**Área de Concentração:  
Energia Nuclear na Agricultura.**

**PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Outubro, 1984**

Aos meus pais  
pela oportunidade

Aos meus sogros  
pelo incentivo

Ao Leandro, e meus filhos  
Mauro e Carlos Eduardo pe-  
lo estímulo, compreensão e  
ajuda.

## AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho e em especial:

Ao Dr. Darcy Martins da Silva, pela valiosa orientação e estímulo no decorrer do trabalho.

Ao Dr. Antonio Joaquim de Oliveira, pela eficiente orientação e apoio recebido.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Eneas Salati, onde o presente trabalho foi realizado.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pelo apoio financeiro durante o Curso de Pós-Graduação.

À Dra. Neusa de Lima Nogueira, Maria das Graças Ongarelli, Ilza Maria Sittolin, pela amizade e ajuda na obtenção das eletrofotomicrografias.

Ao José Elias Gomes, técnico do setor, pela amizade e pelo auxílio na revelação e ampliação das eletrofotomicrografias.

Ao Edmilson dos Santos Araújo pela excelente ajuda nos trabalhos experimentais.

Aos colegas da Seção de Microscopia Eletrônica, pelos bons momentos passados juntos e pela ajuda quando foi necessária.

Aos Professores, funcionários, colegas e amigos do CENA, pela ajuda e incentivo.

## ÍNDICE

RESUMO -----	vi
SUMMARY -----	viii
1. INTRODUÇÃO -----	1
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	4
2.1. <i>Escherichia coli</i> -----	4
2.2. Efeito da radiação gama e radiosensitividade das células bacterianas -----	7
2.3. Efeito da radiação gama nas células bacterianas -----	10
3. MATERIAL E MÉTODO -----	15
3.1. Preparação do material para Determinação da Dose Mínima Inativante - DMI - -----	15
3.1.1. Preparo da suspensão bacteriana ----	15
3.1.2. Tratamento da <i>Escherichia coli</i> IZ-1982 com radiação gama -----	16
3.1.3. Contagem dos sobreviventes e análise estatística -----	18
3.2. Estudo comparativo do efeito da radiação gama nas células de <i>E. coli</i> IZ-1982 desenvolvidas em diversos substratos, a nível de <u>microscopia eletrônica</u> -----	19
3.2.1. Preparo do espécime para <u>microscopia eletrônica</u> -----	19
3.3. Teste de Tukey: comparação dos diâmetros das bactérias tratadas e não tratadas ----	23
4. RESULTADOS -----	24
4.1. Determinação da Dose Mínima Inativante-DMI	24
4.1.1. Teste de sobrevivência de bactérias submetidas à radiação gama de $^{60}\text{Co}$	24
4.1.2. Análise estatística não paramétrica: Teste Binomial para determinação do DMI -----	28

4.2. Observação das eletrofotomicrografias de <i>E.coli</i> IZ-1982 submetida à radiação gama, nos seguintes meios nutritivos :	
4.2.1. Leite bovino -----	32
4.2.2. Extrato líquido de soja -----	34
4.2.3. Meio nutriente -----	36
4.3. Resultados do Teste de Tukey de avaliação do tamanho das células <i>E.coli</i> IZ-1982 -----	38
5. DISCUSSÃO -----	41
6. CONCLUSÕES -----	46
7. LITERATURA CITADA -----	48
APÊNDICE -----	53

RESUMO

SENSITIVIDADE À RADIAÇÃO GAMA DE *Escherichia coli* EM TRÊS SUBSTRATOS E ESTUDOS DAS SUAS ALTERAÇÕES AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO

MARIA ELISABETH NEVES FISCHER CERRI

Orientador: Dr. DARCY MARTINS DA SILVA

*Escherichia coli* é uma bactéria de grande importância pois o fato de habitar o trato intestinal do homem e dos animais e de se multiplicar facilmente em meio de cultura simples, pode servir como indicadora de outros patógenos intestinais em alimentos, bem como, provocar distúrbios no homem.

O uso da radiação ionizante vem se tornando um método eficiente na esterilização e conservação dos alimentos.

Geralmente, tratamento térmico, como também a radiação ionizante requeridos para destruição dos microrganismos são influenciados pelo substrato no qual o microrganismo se encontra.

Neste trabalho o método proposto por ARAUJO (1978) foi utilizado para se determinar a dose mínima inativante (DMI) de radiação para *Escherichia coli* IZ-1982, cres

cida em três substratos: leite bovino, extrato líquido de soja e meio nutriente (DIFCO).

O valor da DMI encontrado para a *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvida em leite bovino foi 0,6 Mrad. Para *E. coli* IZ-1982 crescida tanto em extrato líquido de soja como também em meio nutriente, o valor da DMI foi de 0,5 Mrad.

Também foram feitas observações ao microscópio eletrônico da célula bacteriana, desenvolvida nos três substratos, e submetida a diferentes doses de radiação gama.

Através das eletrofotomicrografias obtidas verificou-se que as células são morfologicamente diferentes quando crescidas em substratos diferentes. Além disto, o desenvolvimento da bactéria e os danos causados pela radiação nos três meios não são os mesmos.

A comparação entre o tamanho das células desenvolvidas nos diferentes substratos foi comprovada através do Teste de Tukey.

SUMMARY

RADIOSENSITIVITY TO GAMMARADIATION OF *Escherichia coli* IN THREE DIFFERENT SUBSTRACTS AND STUDY OF THE ALTERATIONS IN THE ELECTRONIC MICROSCOPE

MARIA ELISABETH NEVES FISCHER CERRI

Orientador: Dr. DARCY MARTINS DA SILVA

*Escherichia coli* is an important bacteria because it is always present in the intestinal tract of men and animals, and because it is easily multiplied in simple broth culture, as well as it can be a very good indicator of other intestinal bacterias in food and it is capable of producing disturbs in men.

The use of ionizing radiation is becoming an efficient sterilizing method for food preservation.

Generally thermal treatment, as well as ionizing radiation necessary for the destruction of microorganisms are influenced by the substract in which such microorganism is found.

In this work the method for determination of the minimum inactivating dose of radiation (MID) proposed by ARAUJO (1978) was used. The MID for *E. coli* IZ-1982 was

determined in three different substrate: cow milk, liquid extract of soybean and nutrient broth (DIFCO).

The MID values found for *E.coli* IZ-1982 developed in cow milk was 0.6 Mrad. For *E.coli* IZ-1982 grown in liquid extract of soybean as well as in the nutrient broth, the value of MID was 0.5 Mrad.

Observations on electronic microscope of the bacterial cells were also made in the three substracts and submitted to different dose of gamma radiation.

Electrophotomicrographies obtained showed that cells are morphologically different when different substract is used. The production of the bacteria and the damage caused by the radiation to the cells grown in the three different media used is not the same.

The Tukey's Test was used to stablish the significance of the difference in the size of the cells grown in the three substrate.

## 1. INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é uma bactéria largamente distribuída na natureza e faz parte do grupo coliforme. Sua presença nos alimentos é de grande importância por duas razões: a) em alimentos não processados, indicam que estes podem ter sido expostos à contaminação direta ou indiretamente por fonte fecal, isto porque, o habitat natural de muitas bactérias coliformes é o trato intestinal do homem e de muitos animais. Desta maneira, a presença de *E. coli* nestes alimentos, pode indicar a existência de outros patógenos intestinais como salmonelas, shigelas, parasitas intestinais, viroses e organismos causadores da febre tifóide. b) Nos alimentos processados, a sua importância como indicadora da possível presença de patógenos intestinais torna-se pouco segura. Ênfase maior tem sido dado ao seu valor como indicadora de condições de manuseio não higiênico, sendo esta, uma das mais prováveis fontes de contaminação.

Muitos estudos foram feitos quanto a estrutu

ra, funções e processos biossintéticos da célula bacteriana, mas pouco ainda é conhecido quanto às mudanças primárias induzidas nas bactérias expostas ao calor úmido e radiação ionizante.

Resultados têm sido publicados e muitas especulações têm sido feitas quanto à natureza do mecanismo de inativação celular pelas radiações ionizantes (ZIMMER,1961).

A inativação das bactérias pela radiação se dá por ação direta nas partes sensíveis da célula e por ação indireta através de radicais químicos reativos e produzidos no líquido celular. No caso da ação direta, supõe-se que uma enzima, uma molécula de DNA ou outro constituinte celular seja afetado destruindo ou mudando, significativamente, um caráter de importância para a subsistência celular. Considera-se que danos desse tipo possam, em muitos casos, ser a razão da inativação completa de um organismo viável. Outro efeito da radiação, pode ser a modificação da membrana celular pelo qual sua função vital é profundamente perturbada e alterada ou, talvez, a função respiratória seja afetada ou mesmo a mitose seja impedida.

Como todos os microrganismos possuem certa quantidade de água, a liberação de energia da radiação pode, também, conduzir a reações químicas pelas quais radicais livres de H, OH e moléculas de  $H_2O_2$  são formadas. Estas espécies, sendo altamente reativas quimicamente, podem

causar, indiretamente, danos letais em componentes vitais dos organismos.

Sendo a radiação de grande importância para a esterilização e conservação de alimentos, pareceu-nos interessante realizar experimentos visando conhecer a efetividade da radiação gama sobre *Escherichia coli* em diversos meios.

Assim sendo, procurou-se:

- 1 - Determinar a Dose Mínima Inativante (DMI) da radiação gama em *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvida nos seguintes meios : leite bovino, extrato líquido de soja e meio nutriente.
  
- 2 - Estudar, através de microscópio eletrônico, as modificações morfológicas e estruturais ocorridas na célula bacteriana, submetida a diferentes doses de radiação gama, nos três meios acima mencionados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Escherichia coli*

As bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*, são organismos que estão largamente distribuídos na natureza, e, normalmente, são encontrados no trato intestinal dos homens e dos animais.

Constituem um grupo grande da família *Enterobacteriaceae* e de acordo com o Manual de Bergey (BUCHANAN e GIBBONS, 1974) as diferentes espécies de *Escherichia* são as seguintes:

#### a) *Escherichia coli*

- não utiliza o citrato como fonte de carbono
- não produz sulfeto de hidrogênio

#### b) *Escherichia freundii*

- utiliza o citrato como fonte de carbono
- produz sulfeto de hidrogênio

c) *Escherichia intermedius*

- utiliza o citrato como fonte de carbono
- não produz sulfeto de hidrogênio

A *Escherichia coli* é um tipo de espécie com grande número de linhagens. Ocasionalmente, estes organismos têm sido associados com gastroenterite humana, devido à sua presença numerosa em alimentos contaminados. Foi isolada pela primeira vez por Escherich no ano de 1885 (BUCHANAN e GIBBONS, 1974) e foi caracterizada em 1886 (MERCHANT, 1950), denominada inicialmente de *Bacillus coli* e *Bacterium coli* (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

*Escherichia coli* geralmente é um bastonete curto, podendo ocorrer tanto isolada como aos pares, ou formando cadeias pequenas. Muitas linhagens podem formar cápsulas. São organismos não esporulados e possuem flagelos peritríquios (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

Em placas de Petri, com meio nutriente ágar, as colônias mais jovens dessas bactérias apresentam — se brancas, às vezes amareladas. Com o passar do tempo vão tornando-se escuras. Elas são úmidas, opacas, circulares de bordas lisas e tornam turvos os meios de cultura líquidos, com sedimentação e não formação de películas (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

Em meios ou substrato contendo glucose, lactose, frutose, galactose, maltose, arabinose, xilose, ramnose, e manitol, a *Escherichia coli* produz ácido e forma gás. Também pode, em alguns casos, fermentar a rafinose, glicerol, salicina, e outros compostos. Não fermenta a dextrina, o amido, o glicogênio e o inositol ( FRAZIER, 1967).

São microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos e exibem um bom crescimento mesmo em meios mais simples (FRAZIER, 1967).

A temperatura para *Escherichia coli* se desenvolver pode variar de 10<sup>0</sup> a 45<sup>0</sup> C sendo que seu ótimo se encontra na faixa de 30<sup>0</sup> a 37<sup>0</sup> C (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

*Escherichia coli* juntamente com *Aerobacter aerogenes* são os principais organismos pertencentes ao grupo coliforme (JAWETZ et alii, 1970) e são utilizados como indicadores de qualidade sanitária dos alimentos porque, além de estarem em grande número no trato intestinal, são de fácil isolamento, pois crescem em meios de cultura simples, são de fácil identificação, além de estarem altamente relacionados com os patógenos intestinais nos alimentos. Segundo FRAZIER (1967), como a *Escherichia coli* está normalmente presente no trato intestinal do homem e dos animais, e a *Aerobacter aerogenes* parece estar mais associada

aos vegetais (embora ocasionalmente seja encontrada no trato intestinal do homem e dos animais), é necessário que a incidência de ambas seja determinada em separado, através de testes bioquímicos. Essa determinação é importante quando se quer verificar se houve contaminação fecal em alimentos.

Segundo BARNARD (1981), os coliformes normalmente estão acompanhados de microrganismos psicrotróficos que podem contaminar o leite após pasteurização.

Desde o ano de 1968 a *Escherichia coli* tem sido apontada como uma das causas da diarréia no homem, em qualquer faixa de idade (SACK, 1975).

Entre os alimentos que podem abrigar grande número de enteropatogênicos, se não forem devidamente processados e/ou conservados, estão o leite e seus derivados, molhos congelados, etc.

## 2.2. Efeito da radiação gama e radiosensitividade das células bacterianas

Um importante aspecto da aplicação da radiação na preservação dos alimentos, é de dar segurança aos produtos alimentares disponíveis ao consumidor, sem riscos da presença de qualquer microrganismo patogênico.

Ao considerarmos uma dose de radiação que seja suficiente para livrar produtos alimentares de patógenos, é preciso que se tenha em mente, alguns fatores que podem influenciar a radiosensitividade de um microrganismo: presença ou não de oxigênio, presença de água, espécies, concentração dos organismos, estado físico do meio, composição do meio, tipo de radiação, pH e outros fatores. Entre os principais, está a composição do meio.

O substrato no qual células são expostas à radiação, tem notável influência na destruição destas. Proteína no meio de crescimento é protetor de células e, conseqüentemente, altos níveis de dose são requeridos para destruir células em presença de proteína do que em presença de solução buffer ou água destilada (DESROSIER et al., 1960).

RAYMAN e BYRNE (1957) também afirmam que os microrganismos são mais resistentes quando irradiados em um meio nutriente quando comparados com água destilada ou buffer.

De acordo com NIVEN (1958), conforme a complexidade do meio aumenta, há um aumento na resistência dos organismos.

Há uma grande variação nas doses esterilizantes para diferentes grupos, espécies e formas de microrganismos.

HOPMAN (1962) relata que para leveduras, a dose esterilizante é de 200 KR. SKULBERG (1970) trabalhando com esporos de *Clostridium botulinum* determinou que a dose esterilizante era 4,5 Mrad. Das bactérias não esporuladas, uma das mais resistentes é a *Antrobacter radiotolerans*, cuja dose esterilizante é ao redor de 1,0 Mrad (YOSHINAKA et alii, 1973).

A inativação das enterobactérias ocorre ao redor de 0,4 a 0,6 MR (TUMANIAN et alii, 1958).

ERDMAN et alii (1961) examinando e comparando resistências de bactérias de interesse para a saúde pública, concluíram que, em meio líquido, o *Streptococcus faecalis* foi mais resistente do que estafilococos, salmonelas, coliformes e *Micrococcus tuberculosis*.

DRYER et alii (1965) estudando diferentes espécies de bactérias desenvolvidas no meio "Hartsell's broth", obtiveram como dose mínima letal (MLD) de radiação gama para *Escherichia coli* 0,6 Mrad, sendo esta a mais resistente das bactérias por eles estudadas. *Proteus vulgaris* mostrou ser a menos resistente com a dose 0,3 Mrad. A resistência da bactéria *Streptococcus faecalis* foi semelhante à encontrada para as espécies de *Salmonella* (0,5 Mrad).

De acordo com PREVITE (1968), uma dose de 1,0 Mrad é o dobro da dose necessária para reduzir a zero o nú-

mero de células após irradiação de uma suspensão líquida de *Salmonella typhimurium*.

PLECEAS e ARIZAN (1969) estudando resistên—  
cia à irradiação com raios gama em *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus vulgaris* e *Salmonella typhimurium*, concluíram que *Proteus vulgaris* foi a mais sensível e *Streptococcus faecalis* foi a mais resistente de todas. A dose encontrada para *Salmonella typhimurium* foi semelhante à encontrada para *Escherichia coli*.

ARAUJO (1978) estudando *Salmonella typhimurium* desenvolvida em meio nutriente líquido, propôs um método para determinação da Dose Mínima Inativante (DMI) de radiação gama, que impedisse a célula de se multiplicar e, que ao mesmo tempo, sofresse o mínimo dano nas estruturas antigênicas. O valor encontrado para tal foi 0,55 Mrad.

### 2.3. Efeito da Radiação Gama nas Células Bacterianas

Embora radiações ionizantes de alta energia sejam eficientes na inativação de microrganismos quando estes são irradiados em uma suspensão líquida, considera-se importante que o efeito da radiação seja devido diretamente ou secundariamente a mudanças ocorridas nos fluidos circundantes ou intracelulares, particularmente formação de radicais livres com conseqüente desnaturação química de compos

tos da bactéria (AHN et alii, 1962).

Uma grande fração da célula é água e o efeito da radiação ionizante em água é de interesse primário. Está bem estabelecido que grande quantidade de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são produzidos por Raios-X ou gama somente em presença de oxigênio dissolvido. Os radicais HO e  $HO_2$  são considerados responsáveis pela maioria dos efeitos indiretos em materiais biológicos (BELLAMY, 1955).

AHN et alii (1962) concluíram que a presença de água e oxigênio durante a irradiação pode ser utilizada para aumentar a taxa mitótica nas baixas doses de radiação, sem contudo, aumentar o dano nas enzimas respiratórias. Admitem também que em sistemas aquosos, a presença de oxigênio aumenta cerca de 300% o efeito do dano para uma determinada dose de irradiação, quando comparada ao dano no estado seco.

O efeito da radiação em uma célula animal é mostrado através de uma cadeia de eventos: a irradiação provoca uma seqüência de íons, os quais penetram na matéria indiscriminadamente e esses íons podem desorganizar átomos com progressivas alterações moleculares, as quais, dependendo da intensidade das modificações, podem provocar a morte dos microorganismos. Se a exposição nas células for de alto nível,

as mudanças estruturais poderão ser imediatas como: ruptura da membrana, vacuolização do citoplasma, inchamento e dissolução da mitocôndria, hipercromaticidade dos núcleos, fragmentação dos cromossomos, desnaturação de proteínas e fragmentação de enzimas (RUGH, 1968).

Como descrito anteriormente, o aumento do volume nuclear e citoplasmático em uma célula é um dos efeitos da radiação. Em bactérias, este fenômeno aparece com uma alongação das mesmas (KLEIN e FORSSBERG, 1954; PUCK e FISHER, 1956; MEISSEL, 1956). Estes autores descrevem este fato como sendo resultado de um dano na divisão celular.

Conforme CARLSON (1954), a radiação pode alterar a morfologia como também o número de nucléolos em insetos ou em células de mamíferos (SCHERER e RINGELB, 1954). O volume total do núcleo pode aumentar como resultado da irradiação, como frequentemente acontece com o volume do núcleo e os nucléolos podem tornar-se fragmentados ou vacuolizados.

É conhecido que o substrato no qual os microorganismos se desenvolvem, é um fator de grande importância na radiosensitividade das células bacterianas.

Vários são os trabalhos discutindo a influência da glucose no substrato em relação à resistência dos microorganismos à radiação (HOLLAENDER et alii, 1951; HOWARD-

-FLANDERS e ALPER, 1957; SARGENT, 1961; BIRGE e TOBIAS, 1954; WEEB, 1954; ADLER e ENGEL, 1961; STAPLETON e ENGEL, 1960).

A observação de que a bactéria *Escherichia coli* desenvolvida em meio nutriente contendo glucose é mais resistente do que quando desenvolvida em meio na ausência de glucose, é um interessante exemplo de como uma mudança relativamente pequena nas condições do meio pode implicar na alteração da sensibilidade da célula pela radiação (ADLER e ENGEL, 1961).

STAPLETON e ENGEL (1960), tentando estabelecer vários fatores que envolvem o fenômeno da resistência no meio com glucose, compararam células crescidas em glucose-peptona com células crescidas somente em peptona e mostrou que há correlação entre o pH do meio com a resistência da célula. Células que metabolizam glucose, levam o pH a um baixo valor, tornando-se resistentes.

As células desenvolvidas em peptona-glucose apresentam uma maior quantidade de DNA. A quantidade de RNA e proteína é maior nestas células desenvolvidas neste meio. Desta maneira, as células parecem apresentar um volume maior e há mais grânulos internos, podendo ser material armazenado (ADLER e ENGEL, 1961).

Uma hipótese para tentar explicar a influência da glucose na resistência das células crescidas neste

substrato, seria que a glucose pode favorecer a síntese de um sistema de proteção que pode ser um simples composto atuando como agente protetor químico ou um complexo sistema de enzimas que permitiriam à célula reparar ou desviar o dano causado pela radiação (ADLER e ENGEL, 1961).

STAPLETON e FISHER (1967) demonstraram que células crescidas em meio com glucose, continuam fabricar proteína em alta taxa após irradiação. A alta taxa de síntese de proteína pode ser concordante com o sistema de proteção ou recuperação.

A presença do oxigênio também influencia a resistência das células em meio com glucose.

Células crescidas em meio aeróbico contendo glucose, parecem ser mais resistentes do que culturas crescidas apenas em meios aeróbicos.

Células crescidas aerobicamente, requerem atividade da catalase e ou citocromo que, interagindo com o peróxido de hidrogênio produzido pela radiação em água, permite que o efeito da glucose seja manifestado (ADLER e ENGEL, 1961).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Preparação do material para Determinação da Dose Mínima Inativante (DMI)

A Dose Mínima Inativante de radiação (DMI) para *E.coli* foi determinada segundo a técnica modificada desenvolvida por ARAUJO (1978). Para tal utilizou-se *Escherichia coli* IZ-1982, da Micoteca do Departamento de Tecnologia Rural, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo.

##### 3.1.1. Preparo da suspensão bacteriana

Foram utilizados no preparo da suspensão bacteriana, 250 ml de leite bovino, 250 ml de extrato líquido de soja e 250 ml de meio nutriente, depositados, separadamente em Erlenmeyers, inoculados com a bactéria *Escherichia coli* IZ-1982 e, posteriormente, levados para incubar

durante 24 horas a  $32 \pm 0,5^{\circ}$  C.

O meio nutriente utilizado foi o seguinte:

Extrato de carne .....	0,3%
Peptona .....	1,0%
Glucose .....	1,0%

O leite bovino utilizado nos experimentos deste trabalho foi o leite pasteurizado do tipo B.

O extrato líquido de soja utilizado nos experimentos, foi o VITAL sem sabor, produzido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL - Campinas, São Paulo).

### 3.1.2. Tratamento da *Escherichia coli* IZ-1982 com radiação gama

Aliquotas de 5 ml de cada substrato contendo *Escherichia coli* IZ-1982 foram distribuídos em frascos de vidro de mesmo diâmetro, os quais foram irradiados, utilizando-se um irradiador Gammabeam-650, da Atomic Energy of Canada Commercial Products, emissor de raios gama proveniente de  $^{60}\text{Co}$ .

Foram realizados 10 experimentos utilizando-se oito doses de radiação gama para cada tratamento. As doses escolhidas foram: 0.0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6 ;

0.7; 0.8 Mrad. A taxa de dose foi, ao redor de 2.0 MR/hora.

As doses e a taxa de dose escolhidas basearam-se no trabalho de ARAUJO (1978), que através de estudos expondo *Salmonella typhimurium* a doses variando entre 0.00 e 2.00 concluiu que acima de 0,65 Mrad, não há sobreviventes. A taxa de dose foi de 2.0 MR/hora em função do curto tempo de irradiação, evitando desta maneira, a multiplicação de células bacterianas.

Após a irradiação, 0.5 ml do material de cada frasco foi distribuído em tubos de ensaio contendo 4.5 ml de meio esterilizado.

Para cada dose dos diferentes tratamentos, utilizou-se cinco tubos de ensaio contendo o meio de cultura já citado anteriormente. Os tubos foram incubados durante 48 horas a temperatura de 32<sup>o</sup> C.

Para se obter um controle no caso de contaminação durante o processo de inoculação dos tubos, foi utilizado 0.5 ml de solução salina tamponada, sugerida por LIMA e SILVA (1970) esterilizada em autoclave por vinte minutos a 1,25 atmosferas de pressão e colocadas em cinco tubos de ensaio, com o mesmo meio de cultura e incubadas nas mesmas condições. A solução salina (fisiológica) em tampão de fosfato era assim constituída:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	M/15 .....	40 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	M/15 .....	10 ml
NaCl	.....	8,5 g
Água destilada completando	.....	1 000 ml
pH ajustado para	.....	7,4

### 3.1.3. Contagem dos sobreviventes e análise estatística

A sobrevivência de células bacterianas era constatada pela turvação do meio cultivado. O número de tubos de ensaio onde havia presença de sobreviventes foi anotado com sinal + e a ausência de sobreviventes foi anotado com o sinal -.

Desta forma, obteve-se dados na forma dicotômica, isto é, duas classes de dados. Para análise estatística, utilizou-se o teste binominal, não paramétrico, com aproximação para a distribuição normal por terem sido utilizadas 50 amostras, conforme CAMPOS (1976).

3.2. Estudo comparativo do efeito da radiação Gama nas células de *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvida em diferentes substratos, a nível de microscopia eletrônica

A determinação da dose mínima inativante (DMI) neste trabalho, foi importante para a escolha das doses de estudo do efeito da radiação gama na morfologia da *Escherichia coli* IZ-1982.

Devido a pouca disponibilidade em se estudar à nível de microscopia eletrônica as células submetidas a todas as doses de radiação gama utilizadas na determinação da Dose Mínima Inativante (DMI), escolheu-se, além da testemunha, três doses que pudessem mostrar com evidência os efeitos da radiação gama numa célula bacteriana, ou seja, a dose mínima e a máxima empregada.

Desta maneira, as doses escolhidas foram: 0,1 Mrad, a DMI para os diferentes meios e a dose 0,8 Mrad.

3.2.1. Preparo do espécime para microscopia eletrônica

A preparação das bactérias e a irradiação das mesmas foram feitas de maneira semelhante à metodologia

aplicada na determinação da Dose Mínima Inativante (DMI).

Após a irradiação, as amostras foram centrifugadas em solução salina três vezes e submetidas à fixação como se segue:

Fixação - A fixação das bactérias foi feita com glutaraldeído 6,5% em tampão cacodilato 0,125 M pH 7.2 durante 1 hora e quinze minutos a 4<sup>o</sup> C. O material foi centrifugado durante 10 minutos a 2000 rpm.

Lavagem - Após fixadas e centrifugadas, as amostras foram lavadas uma vez com buffer cacodilato 0,125 M pH 7.2 durante 10 minutos a 4<sup>o</sup> C e centrifugadas durante 10 minutos a 2000 rpm.

Pós-fixação - O material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 2 % em tampão cacodilato 0,125 M, pH 7.2 durante 1 hora a 4<sup>o</sup> C e centrifugado durante 10 minutos a 2000 rpm.

Em seguida a pós-fixação, as amostras foram incluídas em ágar 1,5 por cento. Foi depositada 1 gota de ágar em cada tubo de ensaio contendo as bactérias. Depois de solidificado, o material foi cortado em porções de mais ou menos 1 mm<sup>3</sup>, para facilitar as diversas porções de inclusões.

Pré-coloração - O material foi pré-colorido

em acetato de uranila 2% dissolvido em acetona 75% durante 1 noite a 4° C.

Desidratação - As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona. Em acetona 90%, foram submetidas a 2 tratamentos de 10 minutos cada. Com acetona 100%, as amostras foram submetidas a 3 tratamentos de vinte minutos cada.

Para auxiliar a penetração da resina, as peças foram colocadas em óxido de propileno, durante quinze minutos.

Infiltração - A infiltração das amostras com a resina EPON 812 (LUFT, 1961), obedeceu três etapas que representam gradientes de resina em óxido de propileno abaixo esquematizado:

- 1 - Epon + óxido de propileno 1:1 37° C - 2 horas
- 2 - Epon + óxido de propileno 2:1 37° C - 2 horas
- 3 - Epon puro 4° C - 24 horas

Inclusão - As amostras foram colocadas em moldes de borracha apropriados e preenchidos com resina pura a fim de se obter os blocos. Para polimerização da resina, estes foram levados às estufas de 37° C, 45° C e 60° C durante 8 horas, 15 horas e 24 horas, respectivamente.

Microtomia - Foram feitos cortes ultrafinos dos blocos contendo material tratado com as diversas doses, utilizando-se um ultramicrotomo de avanço mecânico Modelo MT-1, da SORVALL. Operou-se com navalhas de vidro cristal de 6 mm de espessura.

Os cortes ultrafinos com espessura entre 0,06 - 0,09  $\mu\text{m}$  foram colocados em grades de cobre de 400 "mesh" previamente cobertas com parlódio.

Coloração - A coloração dos cortes ultrafinos foi realizada com uma solução aquosa de acetato de uranila 2.5% durante 6 minutos. Estes cortes, ainda foram coloridos com uma solução de citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) sob atmosfera de  $\text{N}_2$  líquido durante 4 minutos e logo após examinadas ao microscópio eletrônico.

Exame dos espécimes - As grades contendo os cortes ultrafinos foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Elmiskop I A da SIEMENS, operando a 80 000 volts.

Os negativos fotográficos foram obtidos utilizando-se chapas de vidro tipo Projector Slide Plates da Kodak, de 6,5 x 9 cm.

3.3. Teste de Tukey: comparação dos tamanhos de bactérias tratadas e não tratadas

Através da análise das eletrofotomicrografias de *Escherichia coli* IZ-1982, observou-se consideráveis diferenças no tamanho das células bacterianas submetidas ou não à radiação gama nos diversos substratos.

Para se determinar a significância da diferença de tamanho das células desenvolvidas nos três diferentes meios, procedeu-se a análise estatística através do Teste de Tukey, utilizando-se as medidas do diâmetro de todas as células registradas nas eletrofotomicrografias.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Determinação da Dose Mínima Inativante - DMI

##### 4.1.1. Teste de sobrevivência de bactérias submetidas à radiação gama do $^{60}\text{Co}$

Nas TABELAS 1, 2 e 3, encontram-se os dados referentes às irradiações de *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvidas em leite bovino, extrato líquido de soja e meio nutriente, respectivamente.

TABELA 1 - Células de *Escherichia coli* IZ-1982 irradiadas com raios gama do <sup>60</sup>Co desenvolvidas em leite bovino com cinco repetições cada experimento

Doses Mrad	Experimentos de irradiação										Total			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	(+)	(-)		
0,00	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	50	00
0,10	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	50	00
0,20	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	50	00
0,30	5	0	3	2	5	0	5	0	4	1	4	1	31	19
0,40	0	5	2	3	0	5	0	5	1	4	1	4	09	41
0,50	0	5	0	5	0	5	0	5	2	3	1	4	04	46
0,60	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	00	50
0,70	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	00	50
0,80	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	00	50
C.C.	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	00	50

(+) Significa tubos com sobreviventes  
 (-) Significa tubos sem sobreviventes  
 C.C. Significa contaminação casual

TABELA 2 - Células de *Escherichia coli* IZ-1982 irradiadas com raios gama  $^{60}\text{Co}$  desen-  
volvidas em extrato líquido de soja, com cinco repetições cada experimento

Doses	Experimentos de irradiação										Total (+) (-)
	1 (+) (-)	2 (+) (-)	3 (+) (-)	4 (+) (-)	5 (+) (-)	6 (+) (-)	7 (+) (-)	8 (+) (-)	9 (+) (-)	10 (+) (-)	
0,00	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	50 00
0,10	5 0	5 0	5 0	5 0	4 1	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	49 01
0,20	5 0	5 0	5 0	4 1	4 1	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	48 02
0,30	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	4 1	4 1	4 1	47 03
0,40	5 0	1 4	2 3	4 1	5 0	0 5	0 5	2 3	3 2	2 3	24 26
0,50	0 5	0 5	0 5	0 5	1 4	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	01 49
0,60	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	00 50
0,70	0 5	0 5	0 5	1 4	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	01 49
0,80	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	00 50
C.C.	0 5	0 5	0 5	1 4	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	01 49

(+) Significa tubos com sobreviventes  
 (-) Significa tubos sem sobreviventes  
 C.C. Significa contaminação casual

TABELA 3 - Células de *Escherichia coli* IZ-1982 irradiadas com raios gama do  $^{60}\text{Co}$  desenvolvidas em meio nutriente com cinco repetições cada experimento

Doses	Experimentos de radiação										Total					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						
Mrad	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)		
0,00	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	50	00
0,10	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	50	00
0,20	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	50	00
0,30	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	50	00
0,40	5	0	5	0	5	0	4	1	4	1	3	2	4	1	35	15
0,50	0	5	3	2	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	03	47
0,60	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	00	50
0,70	1	4	1	4	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	02	48
0,80	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	00	50
C.C.	0	5	1	4	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	01	49

(+) Significa tubos com sobreviventes  
 (-) Significa tubos sem sobreviventes  
 C.C. Significa contaminação casual

4.1.2. Análise estatística não paramétrica: Teste binomial para determinação da Dose Mínima Inativante (DMI)

Para determinação da Dose Mínima Inativante (DMI) aplicou-se o teste binomial, devido a presença de duas classes de dados, ou seja, dicotômicos.

Para análise estatística foi utilizado o valor médio de contaminação casual nos diferentes meios, sendo este valor igual a 1.

Nas TABELAS 1, 2 e 3 tem-se:

$N = 50$  tubos

$B =$  número de tubos com sobreviventes

$B_c = 1 =$  tubos com contaminação casual

Portanto

$$\hat{p}_c = \frac{B_c}{N} = \frac{1}{50} = 0,02 \text{ ou seja } 2\% \text{ de contaminação casual}$$

Intervalo de confiança (I.C.) para contaminação casual:

( $\alpha = 0,05$ )

Como  $N > 20$  será usada a aproximação normal:

Então

$$I.C.: = \hat{p}_c \pm z_{\alpha/2} \cdot s(\hat{p}_c)$$

$z_{\alpha/2} = 1,96$  (limite superior da distribuição normal  
ao nível de 2,5% de probabilidade)

$$s(\hat{p}_c) = \sqrt{\frac{\hat{p}_c \cdot \hat{q}_c}{N}}$$

$$s(\hat{p}_c) = \sqrt{\frac{0,02 \cdot (0,98)}{50}} = 0,019$$

$$I.C. = 0,02 \pm 1,96 (0,019)$$

$$I.C. = 0,02 \pm 0,04$$

$$0,02 \leq \hat{p}_c \leq 0,06$$

Para maior segurança foi escolhida  $p_c = 0,04$  (4%) como sendo a proporção de casos em que ocorrem sobreviventes por contaminação no processo de inoculação das amostras e testou-se:

$$H_0: p = 0,04 \quad \text{vs} \quad H_a: p > 0,04$$

onde

$H_0$  é a hipótese da nulidade, e

$H_a$  é a hipótese alternativa

Se  $H_0$  for rejeitada admitir-se-á que a proporção ( $B/N = p$ ) é estatisticamente superior a 4% e, conseqüentemente, concluir-se-á que não está havendo 100% de mortalidade, ou seja, os sobreviventes detectados nos tubos não são devido apenas à contaminação.

Pela aproximação normal do teste binomial, para  $N = 50$  e considerando-se um nível de significância de  $\alpha = 5\%$ , rejeita-se  $H_0$  se:

$$B^* = \frac{B - N p_c}{\sqrt{N p_c q_c}} \cdot z_\alpha \dots\dots\dots (1)$$

ou:

$$B > z_\alpha \sqrt{N p_c q_c} + N p_c \dots\dots\dots (2)$$

onde:

$B$  = número de tubos com sobreviventes para determinada dose

$N$  = número total de tubos examinados para determinada dose

$p_c$  = proporção admitida por contaminação casual(0,02)

$z_\alpha$  = limite superior da tabela de distribuição normal ao nível

$\alpha$  = nível de significância considerado (5%)

Aplicando-se os valores na equação (2)

$$B \geq 1,645 \sqrt{50 (0,04) (0,96)} + 50 (0,04)$$

$$B \geq 2,3 + 1,5 = 3,8 \quad 4$$

$$B \geq 4$$

Se  $B \geq 4$  rejeitar-se-á  $H_0$  ou seja, admitir-se-á que a proporção de sobreviventes é superior a 4%, ou seja, não se trata de contaminação casual.

Através das tabelas 1, 2 e 3, verifica-se que:

1. Na Tabela 1, onde o substrato utilizado foi o leite bovino, encontrou-se para B o valor 4 na dose 0,5 Mrad. Entretanto, para maior segurança, escolheu-se a dose 0,6 Mrad como sendo o valor para dose mínima inativante (DMI).
2. Na Tabela 2, onde o substrato utilizado foi o extrato líquido de soja, nota-se que doses maiores e iguais a 0,5 Mrad apresentam  $B < 4$ . Portanto, tomou-se a dose 0,5 Mrad como sendo a dose mínima inativante (DMI).
3. Na Tabela 3 utilizou-se como substrato o meio nutriente. Encontrou-se que doses maiores e iguais a 0,5 Mrad apresentam  $B < 4$ . Com isto o valor escolhido como dose mínima inativante foi a dose 0,5 Mrad.

4.2. Observação das eletrofotomicrografias de *Escherichia coli* IZ-1982 nos seguintes meios nutritivos

4.2.1. Leite bovino

Comparando células de *Escherichia coli* IZ - 1982 irradiadas com 0,1 Mrad (Figura 1 B) e a testemunha (Figura 1 A), observou-se algumas alterações que se manifestaram da seguinte maneira:

1) Cerca de 50% das células irradiadas com 0,1 Mrad, apresentaram retração do citoplasma tornando-se mais eletrodense e homogêneo. A parede celular mostrou-se descolada e bastante frouxa.

2) Aproximadamente 15% das células perderam parcial ou totalmente a parede celular, ficando o citoplasma com regiões claras e escuras.

3) Algumas células tiveram seu citoplasma retraído, tendo a parede celular acompanhando esta retração.

Observando células que receberam a dose 0,6 Mrad - DMI (Figura 1 C), notou-se as mesmas modificações ocorridas com a dose 0,1 Mrad, apenas com uma frequência menor: cerca de 20% das células sofreram retração do citoplasma e descolamento da parede celular e apenas 5% perderam parcial ou totalmente a parede da célula.

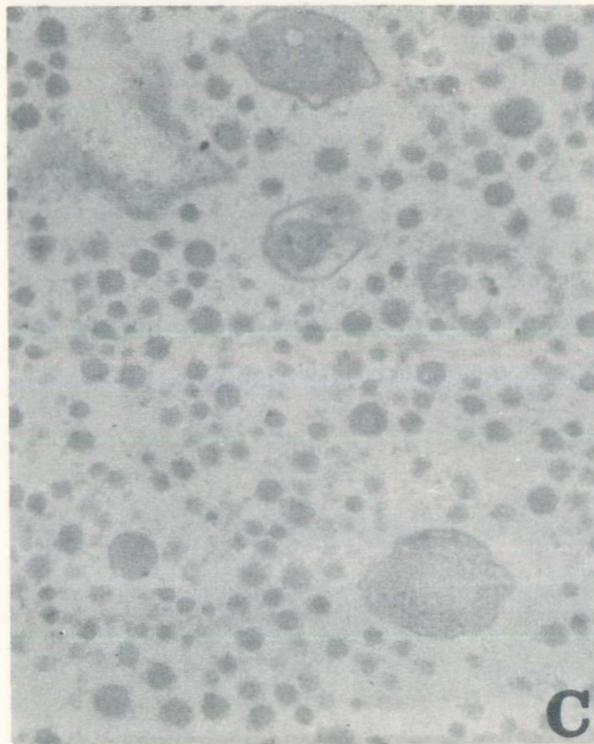
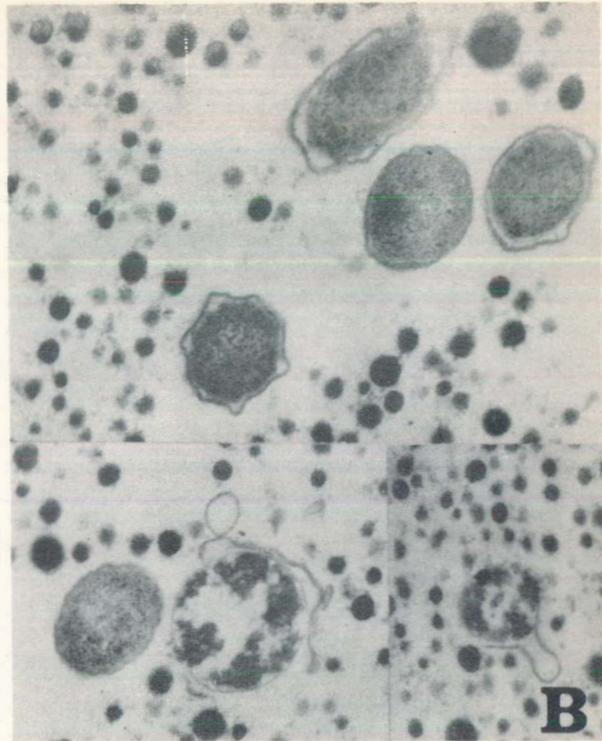
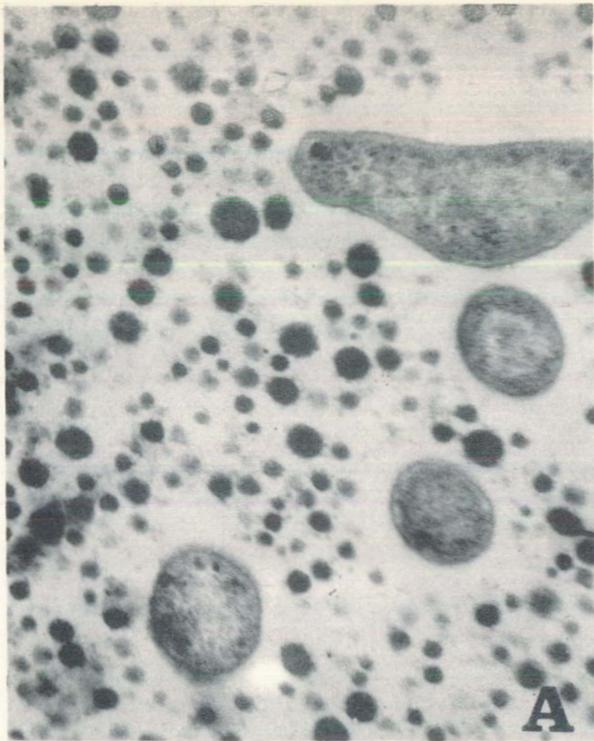


FIGURA 1 - Eletrofotomicrografias de *Escherichia coli* IZ-1982 cultivadas em leite bovino e submetidas à radiação gama: A- Testemunha; B- 0.1 Mrad; C- 0.6 Mrad (DMI); D- 0.8 Mrad.  $\longleftarrow$   $\longrightarrow$  = 1  $\mu$ m

O exame das eletrofotomicrografias de células irradiadas com 0,8 Mrad (Figura 1 D) mostra que, morfologicamente, não há diferença entre esta dose e a testemunha. Entretanto, no exame ao microscópio eletrônico, constatou-se que o número de células tratadas com a dose 0,8 Mrad era bem menor do que o número de células da testemunha.

Vale ressaltar que, em todas as células cultivadas neste substrato, o citoplasma pareceu ser bem homogêneo.

#### 4.2.2. Extrato líquido de soja

Observando células bacterianas irradiadas com 0,1 Mrad (Figura 2 B) e comparando-as com a testemunha (Figura 2 A) notou-se uma mudança muito marcante na forma da célula. Em algumas destas células, pode-se notar formações semelhantes a vacúolos em certas regiões não específicas da célula.

Nas células de *Escherichia coli* IZ-1982 submetidas a dose 0,5 Mrad - DMI (Figura 2 C), nota-se que aproximadamente 50% das células apresentam a mesma formação vacuolar encontrada na dose anterior. Em alguns casos, esta formação vacuolar aparece bem maior e sem forma regular. Com relação à forma da célula, esta parece ser normal.

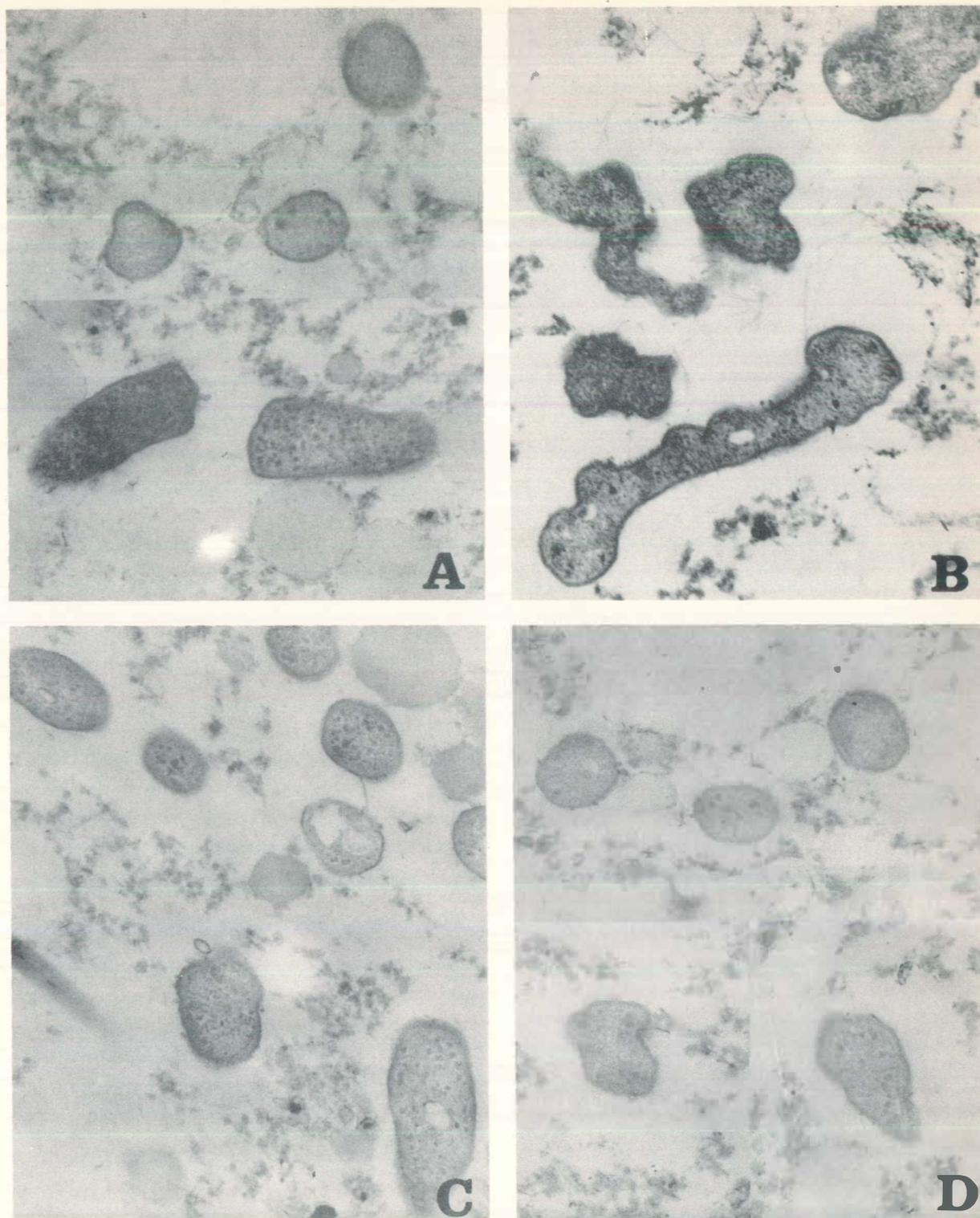


FIGURA 2 - Eletrofotomicrografias de *Escherichia coli* IZ-1982 cultivadas em extrato líquido de soja e submetidas à radiação gama: A- Testemunha; B-0.1 Mrad; C-0,5 Mrad (DMI); D-0.8 Mrad. — = 1  $\mu$ m

O exame das eletrofotomicrografias das células submetidas a dose 0,8 Mrad (Figura 2 D), mostra que morfologicamente, estas são semelhantes à testemunha. Entretanto, da mesma forma como com o substrato leite bovino, as células submetidas a dose 0,8 Mrad foram encontradas em menor número do que a testemunha.

A homogeneidade do citoplasma das células desenvolvidas neste substrato é evidente.

#### 4.2.3. Meio nutriente

As células de *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvidas em meio nutriente mostraram diferentes sensibilidades às diversas doses de radiação gama.

O material celular das células desenvolvidas neste substrato, parece ser bem diferente daquele das células crescidas nos outros dois meios. Pode-se notar que as células da testemunha desenvolvidas neste meio (Figura 3 A) apresentam citoplasma com granulações maiores do que a dos outros dois substratos (Figura 1 A, 2 A).

As células que foram submetidas à dose 0,1 Mrad (Figura 3 B), apresentaram ora lacunas entre o citoplasma e a parede celular, ora formações vacuolares em seu interior.

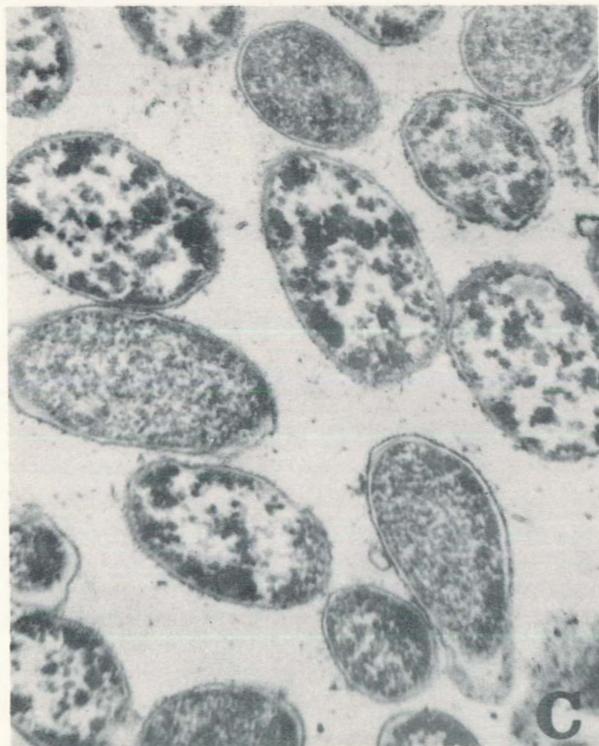


FIGURA 3 - Eletrofotomicrografias de *Escherichia coli* IZ-1982 cultivadas em meio nutriente e submetidas à radiação gama: A-Testemunha; B- 0.1 Mrad; C- 0.5 Mrad (DMI) ; D- 0.8 Mrad. ————— = 1  $\mu$ m

Nas células irradiadas com 0,5 Mrad - DMI (Figura 3 C) nota-se uma certa modificação citoplasmática que se manifesta de duas maneiras: algumas células apresentam granulações finas por todo o citoplasma, observando em certas células, espaços pronunciados entre o citoplasma e a parede celular. Outras células mostram granulações mais concentradas em alguns pontos, ficando com regiões claras e escuras.

Observando células de *Escherichia coli* IZ - 1982 irradiadas com a dose 0,8 Mrad (Figura 3 D), nota-se que as células, em sua maioria, parecem ter sua parede celular deformada, outras se apresentam arrebitadas com extravasamento do material citoplasmático. Quase todas as células sofreram danos.

#### 4.3. Resultados do Teste de Tukey de avaliação do tamanho das células de *Escherichia coli* IZ-1982

Na Tabela 4 encontram-se os dados referentes às médias dos diâmetros (em milímetros) das células de *Escherichia coli* IZ-1982 submetidas ou não à radiação gama. Os valores abaixo, representam as medidas obtidas nas eletrofotomicrografias ampliadas 29.100 x.

Tabela 4 - Média dos diâmetros de células de *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvidas em diferentes substratos e submetidas à radiação gama(em milímetro)

Substrato	Teste- munha	0,1 Mrad	DMI	0,8 Mrad
Leite bovino	21,64	20,74	20,79	19,33
Extrato líquido de soja	20,12	19,93	20,72	19,33
Meio nutriente	25,84	27,12	28,32	33,43

Através das medidas dos diâmetros das células de *Eschechiria coli* IZ-1982 (Tabela 4), infere-se dois tipos de resultados:

1 - Comparação do tamanho das células de *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvidas nos três substratos, entre as testemunhas, entre as doses 0,1 Mrad, 0,8 Mrad e respectivas DMI. Através da análise estatística (Apêndice 1), constatou-se que:

Houve significativa diferença no tamanho das células desenvolvidas no meio nutriente quando comparadas com as desenvolvidas tanto no leite bovino quanto no extrato líquido de soja. Porém, entre o leite bovino e extrato líquido de soja, não foram observadas tais diferenças.

2 - Comparação do tamanho das células de *Escherichia coli* IZ-1982 submetidas a diversas doses e testemunha de cada substrato (Apêndice 2). Neste caso observou-se que:

Em leite bovino, não houve diferença significativa no tamanho das células quando se comparou a testemunha e as diversas doses de radiação.

Em extrato líquido de soja, não houve diferença significativa no tamanho das células quando se comparou a testemunha e as diversas doses de radiação.

Em meio nutriente houve diferença significativa quando se comparou:

- Testemunha com 0,8 Mrad
- Testemunha com 0,5 Mrad (DMI)
- 0,5 Mrad com 0,8 Mrad

No mesmo meio, não houve diferença significativa quando se comparou:

- Testemunha com 0,1 Mrad
- 0,1 Mrad com 0,5 Mrad (DMI)

## 5. DISCUSSÃO

O valor da Dose Mínima Inativante (DMI) de radiação gama encontrado para *Escherichia coli* IZ-1982, desenvolvida em leite bovino foi 0,6 Mrad. Para a mesma bactéria crescida tanto em extrato líquido de soja como em meio nutriente, a Dose Mínima Inativante de radiação gama foi 0,5 Mrad.

Considerando que, em meio líquido, a Dose Mínima Inativante para *Salmonella typhimurium* encontrada por ARAUJO (1978) foi 0,55 Mrad e que TUMANIAM (1958), DRYER et alii (1965), PREVITE (1968) em seus trabalhos encontraram doses semelhantes à encontrada nesta pesquisa pode-se considerar este resultado como significativo.

A literatura consultada apresenta vários trabalhos mostrando que um microrganismo pode ter diferentes sensibilidades à radiação gama, dependendo do substrato a que estiver submetido. Sabe-se por exemplo, que microrganismos são mais resistentes em meio nutriente do que em buffer ou água destilada, quando irradiados (RAYMAN e BYRNE, 1957). Entretanto, através dos resultados obtidos na determinação da Dose Mínima Inativante (DMI) de radiação gama, para *Escherichia coli* observou-se que quando esta bactéria é desenvolvida em leite bovino, extrato líquido de soja e meio nutriente, apresenta praticamente a mesma sensibilidade à radiação.

Quanto à metodologia utilizada, a opção pelo uso de tubos de ensaio ao invés de placas de Petri, diminuiu os casos de contaminação casual e reduziu significativamente o tempo entre cada repetição, tornando viável e rápida a pesquisa com os três tratamentos.

No estudo das eletrofotomicrografias de *Escherichia coli* IZ-1982 inoculadas em leite bovino e irradiadas com 0,1 Mrad (Figura 1 B), pode-se notar alterações morfológicas que provavelmente indicam uma seqüência de eventos, provocando ao final, total desagregação da célula bacteriana. Essa seqüência, em menor grau, foi observada nas células irradiadas com 0,6 Mrad. Já com a dose 0,8 Mrad, houve uma diminuição no número de células encontra-

das, podendo isto ser decorrente do alto grau de desintegração das células pela radiação.

O exame das eletrofotomicrografias de *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvidas em extrato líquido de soja, mostrou que neste tratamento, as células submetidas às diversas doses de radiação, bem como as não irradiadas, sofreram alterações bastante interessantes. Pelos resultados obtidos, pode-se observar a perda total da forma celular nas bactérias irradiadas com 0,1 Mrad (Figura 2 B). Além disto, há o aparecimento de uma formação vacuolar praticamente em todas as células irradiadas nas diversas doses.

Nota-se que até mesmo as bactérias não irradiadas apresentam forma irregular (Figura 2 A).

Desta maneira, é provável que o extrato líquido de soja contenha alguma substância responsável pela alteração na forma da célula bacteriana.

Pelos resultados obtidos com *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvida em meio nutriente (Figura 3 ), pode-se dizer que neste meio, a bactéria apresenta-se mais desenvolvida em vários aspectos como: tamanho celular, conteúdo citoplasmático e número de células.

Apesar dos trabalhos relacionados com danos na estrutura e morfologia das células serem escassos, pode-

-se tentar fazer algumas interrelações destes com o que foi observado neste trabalho.

RUGH (1968), constatou que células de mamíferos quando expostas à radiação, apresentam algumas mudanças estruturais imediatas. Algumas delas como ruptura de membrana, vacuolização do citoplasma, são observadas através dos resultados obtidos neste presente trabalho. Contudo, estes efeitos não aconteceram com todas as células bacterianas nos três tratamentos. Apesar de não ter sido possível encontrar na literatura específica trabalhos mostrando estes efeitos em microrganismos, pode-se considerar que estes danos aconteçam com quaisquer células de maneira geral.

O aumento do volume das células submetidas à radiação gama foi também observado no presente estudo. Entretanto, através da análise estatística, concluiu-se que apenas as células desenvolvidas em meio nutriente apresentam um aumento significativo no seu tamanho conforme se aumenta a dose de radiação gama. Todavia, até mesmo as células não irradiadas desenvolvidas neste meio são maiores que as células crescidas nos dois substratos.

A célula bacteriana desenvolvida em meio contendo glucose, apresenta maior quantidade de DNA, RNA e proteína. Há também mais grânulos internos no interior do

citoplasma e um aumento no volume celular (ADLER e ENGELS, 1961).

Observando as células de *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvidas em meio nutriente (Figura 3) nota-se que estas características parecem ter ocorrido: houve um aumento no volume celular e um aumento nos grânulos internos. Constatou-se também neste meio, um maior número de células quando comparadas com os outros tratamentos. Estes fatos, podem estar relacionados com o sistema protetor sintetizado em meio com glucose (ADLER e ENGEL, 1961), tornando o meio resistente à radiação e com isto continuando a sintetizar moléculas essenciais.

## 6. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos nesta pesquisa, podemos chegar às seguintes conclusões:

- O valor da Dose Mínima Inativante — DMI — de radiação gama encontrado para *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvida em leite bovino foi 0,6 Mrad. Em extrato líquido de soja e meio nutriente (DIFCO) o valor foi 0,5 Mrad.
- A sensibilidade da *Escherichia coli* IZ-1982 à radiação gama com relação aos danos morfológicos e estruturais foi influenciada pelo meio de crescimento.

- ~~- A radiação provocou aumento no tamanho das células de *Escherichia coli* IZ-1982 desenvolvidas em meio nutriente .~~  
Entretanto em extrato líquido de soja e em leite bovino es  
te aumento não foi observado.
- Os resultados encontrados na DMI para *Escherichia coli* IZ-1982, parecem evidenciar que a dose de radiação gama para destruição desse microrganismo, visando a conservação de alimentos, não foi afetada pela composição química dos substratos, considerando que, em termos práticos, a DMI é quase a mesma.

## 7. LITERATURA CITADA

- ADLER, H.I. e M.S. ENGEL, 1961. Factors influencing the survival of bacteria after exposure to ionizing radiation. J. Cell. Comp. Physiol., vol. 58, Suppl., 1, pp. 95-105.
- AHN, T. H.; H. NISHIHARA; C. M. CARPENTER e G. V. TAPLIN, 1962. Respiration of gamma irradiated Brucella abortus and Mycobacterium tuberculosis. Proc. Soc. Expt. Biol. & Med. 111: 771-773.
- ARAUJO, E.S., 1978. Utilização da radiação gama no processamento de vacinas bacterianas: um estudo com Salmonella typhimurium. Piracicaba, ESALQ/USP (Dissertação de Mestrado).
- BARNARD, S. E., 1981. Correcting coliform problems of pasteurized milk. Dairy Food Sanit., Ames, 1(1): 16-17.
- BELLAMY, W. D., 1955. Radiation effects on some isolated cell constituents. In: KELNER, Albert et alii., 1955. Symposium on radiation effects on cells and bacteria. Bacteriological Reviews, vol. 19:22-43.
- BIRGE, A. C. e C. A. TOBIAS, 1954. Radiation sensitivity of yeast cells grown in aerobic and anaerobic environments. Arch. Biochem. Biophys., 52: 388-393.
- BUCHANAN, R. E. e N. E. GIBBONS, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. edition. Baltimore, Williams & Wilkins.
- CAMPOS, H., 1976. Estatística experimental não paramétrica. 2a. edição. Piracicaba, ESALQ/USP, mimeografado.

- CARLSON, J. G., 1954. Immediate effects on division, morphology and viability on the cell. In: A. HOLLAENDER (ed.). Radiation Biology, vol. 1:763-824. New York, McGraw-Hill.
- DESROSIER, N. W. e H. M. ROSENSTOCK, 1960. Radiation Technology in food, agriculture and biology. Westport, Avi. p. 280.
- DRYER, J. K.; A. W. ANDERSON e PISAWAT DUTIYA BODHI, 1965. Radiation survival of food pathogens in complex media. Applied Microbiology, 14(1): 92-97.
- ERDMAN, I. E.; F. S. THATHER e K. F. MacQUEEN, 1961. Canadian Journal of Microbiology, 7: 199.
- FRAZIER, W. C., 1967. Food Microbiology. 2nd. edition. New York, McGraw-Hill. 537 p.
- HOLLAENDER, A.; G. E. STAPLETON e F. L. MARTIN, 1951. X-ray sensitivity of E. coli as modified by oxygen tension. Nature, 67: 103-104.
- HOPMAN, J., 1962. Radiation microbiology and immunology in the USSR. In: C. A. LEONE, Ionizing radiation on immune processes. New York, Gordon and Breach, pp. 455-504.
- HOWARD-FLANDERS, P. e T. ALPER, 1957. The sensitivity of microorganisms to irradiation under controlled gas conditions. Radiation Research, 7: 518-540.
- JAWETZ, E.; J. L. MELNICK e E. A. ADELBERG, 1970. Microbiologia Médica. 2a. edição. Rio de Janeiro, Guanabara, pp. 175-177.
- KLEIN, G. e FORSSBERG, 1954. Studies on the effect of X-rays on the biochemistry and cellular composition of ascites tumors. I. Effect on growth rate, cell volume,

- nucleic acid and nitrogen content in the Ehrlich ascites tumor. II. Changes in the pattern of glycine- $2^{14}\text{C}$  incorporation during the first two hours after irradiation in vivo. Exptl. Cell Research, 6: 211-220; 7: 480-497.
- LIMA, O. e W. D. SILVA, 1970. Imunologia, Imunopatologia, Alergia. Métodos. São Paulo, Editora Guanabara Koogan, 673 p.
- LUFT, H. H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. New York, 9:409-904.
- MEISSEL, M. N., 1956. Proceedings of the International Conference Peaceful Uses of Atomic Energy. Geneva, vol. II, pp. 227-243.
- MERCHANT, I. A., 1950. Veterinary Bacteriology and Virology. 4th. edition. The Iowa College Press, Ames, I. A.
- NIVEN, C. F. Jr., 1958. Microbiological aspects of radiation preservation of food. Ann. Rev. Microbiol., 12: 507-524.
- PLECEAS, M. e D. ARIZAN, 1969. Action of gamma rays on bacteria used as sanitary indicators. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol., 28(2-3): 587-590.
- PREVITE, J. J., 1968. Immunogenicity of irradiated Salmonella typhimurium cells and endotoxin. J. Bacteriol., 95: 2165-2170.
- PUCK, T. T. e H. W. FISHER, 1956. J. Exptl. Med., 104: 427-434, 615.
- RAYMAN, M. M. e A. F. BYRNE, 1957. Action of ionizing radiations on microorganisms, pp. 208-244. In: Radiation preservation of food. U. S. Army Quatermaster Corps, Washington.

- REYNOLDS, E. S., 1963. The use of the lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., New York, 17: 208-212.
- RUGH, R., 1968. Damage to cells by ionizing radiations. Atompraxis, 14: 13-17.
- SACK, R. B., 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic E. coli. Ann. Rev. Microbiol. Palo Alto, 28: 333-353.
- SARGENT, T., 1961. Effects of pH and anoxia on the cell morphology and X-ray sensitivity of E. coli. Radiation Research, 14: 323-336.
- SCHERER, E. e D. RINGELB, 1954. Strahlentherapie, 90: 41-52.
- SKULBERG, A., 1970. Toxins produced by Cl. botulinum and their radiosensitivity. In: IAEA-Radiation sensitivity of toxins and animal poisons, pp. 19-30.
- STAPLETON, G. E. e M. S. ENGEL, 1960. Cultural conditions as determinants of sensitivity of Escherichia coli to damaging agents. J. Bacteriol., 80: 544-551.
- STAPLETON, G. E. e W. D. FISHER, 1967. Macromolecular synthesis and radiosensitivity in Escherichia coli. Radiat. Res., 30: 173.
- TUMANIAN, M. A.; A. P. DUPLISCHEVA e T. S. SEDOVA, 1958. The effect of massive doses of  $\gamma$ -radiation on the immunogenic properties of bacteria of the intestinal group. J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. (USSR), 29: 497-505.

WEBB, J., 1954. A useful bacterial cell wall stain. J. Bacteriol., 67: 252-253.

YOSHINAKA, T.; K. YANO e H. YAMAGUCHI, 1973. Isolation of highly radioresistant bacterium, Arthobacter radiotolerans nov. sp. Agr. Biol. Chem., 37: 2269-2275.

ZIMMER, K. G., 1961. Studies on quantitative radiation biology. Oliver and Boyd, Ltd.

APÊNDICE 1

Título - TESTEMUNHA

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível	%
Tratamentos	2	309.858364	154.929182	13.36**		.001
Resíduo	55	637.750290	11.595459			
TOTAL	57	947.608654				

Coef. Variação = 14.6488919 %

QUADRO DE COMPARAÇÃO DE MEDIAS

Médias	1	2
3	**	NS
2	**	

MÉDIAS ORDENADAS

Tratamento com meio nutriente	25	25.84000	(1)
Tratamento com leite bovino	25	21.64960	(2)
Tratamento com extrato líquido de soja	8	20.12500	(3)

NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA

	1	2
3	.01	27.51
2	.00	

TÍTULO - dose 0.1

Causas da variação	G.L.	S. Q.	Q. M.	F	Nível %
Tratamentos	2	687.138962	343.569481	27.17**	.000
Resíduo	72	910.410034	12.644583		
TOTAL	74	1597.549000			

Coef. Variação = 15.828487 %

## QUADRO DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

Médias	1	2
3	**	NS
2	**	

## MÉDIAS ORDENADAS

Tratamento com meio nutriente	25	26.72000	(1)
Tratamento com leite bovino	25	20.74560	(2)
Tratamento com extrato líquido de soja	25	19.93040	(3)

## NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA

	1	2
3	.00	42.03
2	.00	

## Título - DMI

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q. M.	F	Nível %
Tratamentos	2	952.937679	476.468840	46.65**	.000
Resíduo	72	735.229813	10.211525		
TOTAL	74	1688.167490			

Coef. Variação = 13.7270512 %

## QUADRO DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

Médias	1	2
3	**	NS
2	**	

## MÉDIAS ORDENADAS

Tratamento com meio nutriente	25	28.32000 (1)
Tratamento com leite bovino	25	20.79760 (2)
Tratamento com extrato líquido de soja	25	20.72000 (3)

## NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA

	1	2
3	.00	93.18
2	.00	

Título - dose 0.8

Causas da Variação	G.L.	S. Q.	Q. M.	F	Nível %
Tratamentos	2	2269.499240	1134.749620	61.47**	.000
Resíduo	43	793.666245	18.457354		
TOTAL	45	3063.165490			

Coef. Variação = 15.9135262 %

## QUADRO DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

Médias	1	2
3	**	NS
2	**	

## MÉDIAS ORDENADAS

Tratamento com meio nutriente	25	33.43480 (1)
Tratamento com leite bovino	6	19.33333 (2)
Tratamento com extrato líquido de soja	15	19.33333 (3)

## NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA

	1	2
3	.00	100.00
2	.00	

APÊNDICE 2

TÍTULO - MEIO NUTRIENTE

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q. M.	F	Nível %
Tratamentos	3	830.922791	276.974264	16.58**	.000
Resíduo	96	1603.639560	16.704578		
TOTAL	99	2434.562350			

Coef. de Variação = 14.2514254 %

QUADRO DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

Médias	1	2	3
4	**	**	**
3	*	NS	
2	NS		

MÉDIAS ORDENADAS

Tratamento (0,8 Mrad)	25	33.43480	(4)
Tratamento (DMI)	25	28.32000	(3)
Tratamento (0,1 Mrad)	25	27.12000	(2)
Tratamento (Testemunha)	25	25.84000	(1)

NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA

	1	2	3
4	.00	.00	.00
3	3.44	30.18	
2	27.09		

## Título - LEITE ANIMAL

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível %
Tratamentos	3	29.527080	9.842360	1.13 ns	34.151
Resíduo	77	669.538849	8.695309		
TOTAL	80	699.065930			

Coef. Variação = 14.0847063 %

## QUADRO DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

Médias	1	2	3
4	NS	NS	NS
3	NS	NS	
2	NS		

## MÉDIAS ORDENADAS

Tratamento (Testemunha)	25	21.64960 (1)
Tratamento (DMI)	25	20.79760 (3)
Tratamento (0,1 Mrad)	25	20.74560 (2)
Tratamento (0,8 Mrad)	6	19.33333 (4)

## NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA

	1	2	3
4	8.80	29.54	27.81
3	31.02	95.04	
2	28.18		

## Título - EXTRATO DE SOJA

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível %
Tratamentos	3	19.150756	6.383585	.49ns	68.527
Resíduo	69	885.478012	12.833014		
TOTAL	72	904.628769			

Coef. Variação = 17.8229721 %

## QUADRO DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

Médias	1	2	3
4	NS	NS	NS
3	NS	NS	
2	NS		

## MÉDIAS ORDENADAS

Tratamento (DMI)	25	20.72000 (3)
Tratamento (Testemunha)	8	20.12500 (1)
Tratamento (0,1 Mrad)	25	19.93040 (2)
Tratamento (0,8 Mrad)	15	19.33333 (4)

## NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA

	1	2	3
4	61.53	61.14	24.00
3	68.38	43.84	
2	89.40		