

INFLUÊNCIA DA ESTERILIZAÇÃO POR AUTOCLAVAÇÃO OU FILTRAÇÃO DA
ÁGUA DO MAR NA SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI*

Humberto M. Barreto e Reinilson B. de Oliveira

ABSTRACT

The processes of sterilization usually adopted to study the survival of *Escherichia coli* in salt waters frequently include autoclavation at 121 °C/30 minutes or filtrations through membrane filters of small porosity. Such technics may modify by distinct forms the natural quality of seawater, changing some of its components and removing important compounds for the growth of microorganisms. In this work the survival of *E. coli* K12S in seawater was tested using filtered seawater through membrane filters of 0.22 µm or 0.45 µm or autoclavated seawater. The tested bacteria survived until 15 days in all conditions and it showed similar responses both in NaCl 2.5% solution and in autoclavated seawater. During this period the survival of *E. coli* K12S decreased progressively both in seawater filtered through 0.22 µm and 0.45 µm membrane filters. However, the reduction was greater in seawater filtered through 0.45 µm membrane, suggesting that the use of this membrane filter porosity seems to be more adequate to study the survival of *E. coli* in seawater.

Keywords: *Escherichia coli*, survival, sterilization technics, seawater.

Descritores: *Escherichia coli*, sobrevivência, técnicas de esterilização, água do mar.

INTRODUÇÃO

A sobrevivência de *Escherichia coli* na água do mar tem sido estudada como modelo para análise do comportamento de enterobactérias nos ambientes marinhos (GAUTHIER *et alii*, 1990). Esta espécie geralmente é detectada com altas frequências em águas poluídas fluviais (GRABOW, 1981; LAMKA *et alii*, 1980) e estuarinas (DE OLIVEIRA, 1990; PAGNOCCA, 1987) e contém sorogrupos toxigênicos responsáveis por graves infecções no homem e em animais domésticos (YANAGUITA *et alii*, 1989; ANDRADE e ROSA, 1986; WATANABE *et alii*, 1985; QUEIROZ *et alii*, 1985; GATTI *et alii*, 1985).

Com relação à sobrevivência, alguns autores sugerem que este microrganismo apresenta uma baixa viabilidade na água do mar, devido a fatores físicos e químicos - temperatura e radiação solar (LESSARD e SIEBURTH, 1982), salinidade (ANDERSON *et alii*, 1979), estresse osmótico (GAUTHIER *et alii*, 1991) ou produtos químicos tóxicos (CHAI, 1983)-, ou a fatores biológicos - competição com a microflora autóctone, predação por protozoários (GARCÍA-LARA *et alii*, 1991; SORENSEN, 1991), a presença de bacteriófagos (GARCÍA-LARA *et alii*, 1991) ou a microflora lítica (GURIJALA e ALEXANDER, 1990).

Por outro lado, o declínio no número de células viáveis pode não ser decorrente exclusivamente da morte celular, e sim, também, da presença de células estressadas

que não crescem em meios seletivos (PETTIBONE e COONEY, 1986; SINGH e McFETERS, 1986; SINGH *et alii*, 1986); células que entram em um estado de dormência - perda temporária da viabilidade, a qual pode ser restabelecida por incubação em condições apropriadas (MASON *et alii*, 1986)-; e células não-culturáveis, que são incapazes de produzir colônias visíveis, contudo apresentam atividade metabólica (GRIMES *et alii*, 1986; XU *et alii*, 1982).

Nos estudos de sobrevivência em ambientes confinados são comumente empregadas técnicas de esterilização por autoclavação ou filtração através de membranas com porosidade de, geralmente, 0,22 μ m. Estas técnicas podem alterar diferentemente a composição natural da água do mar e, em consequência, o microrganismo estudado pode apresentar comportamentos distintos em cada sistema. Neste sentido, objetivou-se verificar a influência destas técnicas de esterilização da água do mar na sobrevivência de *E. coli*, com o intuito de sugerir a mais adequada para estudos desta natureza.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos (em 24/11/91, 26/12/91 e 05/07/92) com água coletada na Praia do Seixas (Estado da Paraíba), na preamar (temperatura 32 °C, salinidade 33‰, pH 7,6 - médias dos valores). Após clarificação em algodão e papel de filtro, a água foi esterilizada por filtração em membranas (HAWG, Millipore) com porosidade de 0,22 ou 0,45 μ m ou por autoclavação a 121 °C/30 minutos.

A linhagem testada foi a *Escherichia coli* K12S, cedida pelo Prof. Dr. Benedito R. Aragão, do Laboratório de Radiobiologia do Depto. de Biologia Molecular - CCEN - Universidade Federal da Paraíba. O inóculo foi padronizado para cerca de 10⁹ UFC.ml⁻¹ em solução salina fisiológica (NaCl 0,85%), a partir de células cultivadas em caldo nutriente a 35 °C/24 h e lavadas três vezes com solução salina fisiológica.

Em cada experimento, adicionou-se 2 ml do inóculo a frascos Erlenmeyer (500 ml) contendo 98 ml de caldo nutriente, água do mar autoclavada, água do mar filtrada ou solução salina a 2,5% (salinidade 24‰). Estes frascos foram agitados (150 rpm) a temperatura ambiente (26 \pm 2 °C) e as contagens do número de células viáveis foram efetuadas em ágar nutriente (incubado a 36 \pm 1 °C/24 h) com 0, 12 e 24 horas e, em seguida, com 5, 7, 10 e 15 dias.

Simultaneamente, procedeu-se a determinação de colifagos na água do mar *in natura* e filtrada, seguindo as recomendações de MANIATIS *et alii* (1982), utilizando-se a própria *E. coli* K12S como linhagem hospedeira.

RESULTADOS

Em caldo nutriente a cepa apresentou um comportamento semelhante ao da curva de crescimento padrão bacteriano em meio nutritivo, enquanto que em solução salina a 2,5% e na água do mar autoclavada o número de células viáveis permaneceu relativamente estável, em torno de 10⁷ UFC.ml⁻¹ (Fig. 1A).

Na água do mar filtrada com membrana de $0,45\ \mu\text{m}$, a população inicial ($3,7 \times 10^7$ UFC. ml^{-1}) permaneceu praticamente constante nas primeiras 24 horas e após este período declinou, apresentando uma média de $3,2 \times 10^2$ UFC. ml^{-1} no 15º dia. Todavia, na água do mar filtrada com membrana de $0,22\ \mu\text{m}$, o número de células viáveis apresentou um declínio menos acentuado, cujos valores no tempo zero e com 15 dias foram $3,0 \times 10^7$ e $5,9 \times 10^3$ UFC. ml^{-1} , respectivamente (Fig. 1B).

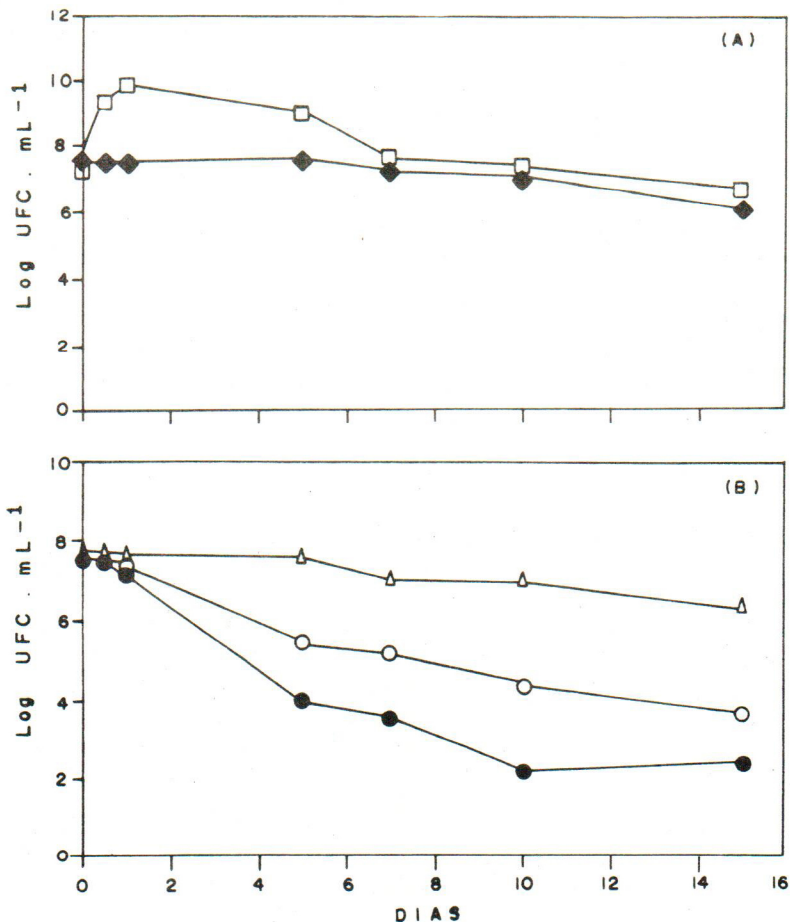


FIGURA 1 – Configuração do crescimento de *E. coli* K12S (A) no caldo nutriente (—□—) e de sua sobrevivência em solução salina a 2,5% (—◆—), (B) em água do mar autoclavada (—△—), em água do mar filtrada com membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ (—○—) ou $0,45\ \mu\text{m}$ (—●—) de porosidade. (Médias geométricas dos números de células viáveis, em Log UFC. mL^{-1} , versus tempo em dias).

A presença de colifagos foi evidenciada apenas na água do mar *in natura* (título médio de 80 UFP.ml⁻¹).

DISCUSSÃO

O calor e a pressão empregados no processo de autoclavação da água do mar podem liberar nutrientes adicionais contidos na biomassa microbiana para o meio e também solubilizar a matéria orgânica particulada, que não estariam disponíveis nestas formas. Como resultado, este tipo de água provavelmente contém um suporte de nutrientes mais elevado que o natural, contribuindo, desta maneira, para a sobrevivência das células.

A autoclavação pode, também, volatilizar determinados componentes tóxicos ou destruir certas substâncias bactericidas termossensíveis ou bacteriófagos, os quais podem estar presentes na água do mar filtrada (GARCÍA-LARA *et alii*, 1993).

SORENSEN (1991) observou que *E. coli* K12 sobreviveu apenas 5 dias em água do mar *in natura*, devido à predação por microzooplâncton, enquanto que em água do mar com sedimento autoclavado, ela sobreviveu por 25 dias.

Possivelmente, os componentes tóxicos ou nutrientes adicionais não interferiram na sobrevivência de *E. coli* na água do mar autoclavada, uma vez que as contagens apresentaram valores relativamente estáveis ao longo do período experimental, comportamento semelhante àquele observado na solução salina a 2,5% (Fig. 1A-B).

Por outro lado, a sobrevivência da *E. coli* K12S na água do mar e na solução salina a 2,5% pode ter sido influenciada pelo fenômeno da autólise, presença de glicocálice ou reservas endógenas.

O comportamento observado na água do mar autoclavada, bem como em solução salina a 2,5%, provavelmente, indica que a ausência de nutrientes exógenos pode não ser o sinal externo que induz as células a entrarem no estado não-cultivável, como observado com *Vibrio vulnificus* por NILSSON *et alii* (1991).

A ação dos componentes adversos à sobrevivência bacteriana presentes na água do mar foi evidenciada no sistema or.de se empregou a filtração com membrana de 0,45 µm, cuja população inicial declinou atingindo baixos números de células viáveis no 15º dia. Porém, não foi tão evidente na água do mar filtrada com membrana de 0,22 µm. Portanto, os processos de autoclavação e filtração com membranas de 0,22 µm podem ter reduzido o efeito desses componentes (Fig 1B).

Apesar dos colifagos estarem presentes na água do mar *in natura*, os mesmos não foram detectados nos sistemas analisados. No entanto, como observado por GARCÍA-LARA *et alii* (1991), é possível que tenham interferido na sobrevivência da *E. coli* K12S na água do mar filtrada, principalmente com membranas de 0,45 µm.

Conclui-se, portanto, que para estudos de sobrevivência de enterobactérias em ambientes marinhos a técnica menos recomendada é a autoclavação. E recomenda-se, no entanto, a utilização de filtração em membrana de 0,45 µm ou outras técnicas que eliminem, o mínimo possível, os componentes do ecossistema.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Profa. Márcia Rosa de Oliveira, do Departamento de Biologia Molecular-CCEN (Universidade Federal da Paraíba), pelo auxílio nas determinações de colifagos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, I.C., RHODES, M. e KATOR, H. 1979 – Sublethal stress in *Escherichia coli*: a function of salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 38(6):1147-1152.
- ANDRADE, J.R.C. e ROSA, M.R.S. 1986 – Investigações sobre propriedade adesiva (aderência localizada) característica dos sorogrupos enteropatogênicos de *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol.* 17(2):116-125.
- CHAI, T.J., 1983 – Characteristics of *Escherichia coli* grown in bay water as compared with rich medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(4):1316-1323.
- DE OLIVEIRA, R.B. 1990 – Indicadores de poluição e taxonomia de leveduras do estuário do Rio Paraíba do Norte, João Pessoa, PB, Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Microbiologia, CCS, UFRJ, Rio de Janeiro, 398 p.
- GARCÍA-LARA, J., MARTINEZ, J., VILAMÚ, M. e VIVES-REGO, J. 1993 – Effect of previous growth condition on the starvation-survival of *Escherichia coli* in seawater. *J. Gen. Microbiol.* 139:1425-1431.
- GARCÍA-LARA, J., MENON, P., SERVAIS, P. e BILLEN, G. 1991 – Mortality of fecal bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(3):885-888.
- GATTI, M.S.V., SERAFIM, M.B., DE CASTRO, A.F.P., BRITO, J.R.F. e DE BARCELOS, D.E.S.N. 1985 – Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas para suínos isoladas no Brasil. *Rev. Microbiol.* 16(1):21-30.
- GAUTHIER, M.J., FLATAU, G.N. e CLÉMENT, R.L. 1990 – Influence of phosphate ions and alkaline phosphatase activity of cells on survival of *Escherichia coli* in seawater. *Microbial Ecology* 20:245-251.
- GAUTHIER, M.J., FLATAU, G.N., LE RUDULIER, D., CLÉMENT, R.L. e COMBARRO, M.P.C. 1991 – Intracellular accumulation of potassium and glutamate specifically enhances survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(1):272-276.
- GRABOW, W.O.K. 1981 – Evaluation of standard and modified M-Fc, MacConkey and Teepol media for membrane filtration counting of fecal coliforms in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:192-199.
- GRIMES, D.J., ATWELL, R.W., BRAYTON, P.R., PALMER, L.M., ROLINS, D.M., ROSZAK, D.B., SINGLETON, F.L., TAMPLIN, M.L. e COLWELL, R.R. 1986 – The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiol. Sci.* 3(11):324-329.
- GURIJALA, K.R. e ALEXANDER, M. 1990 – Explanation for the decline of bacteria introduced into lake water. *Microbial Ecology* 20:231-244.
- LAMKA, H.G., LE CHEVALIER, M.W. e SEIDLER, R.J. 1980 – Bacterial contamination of drinking water supplies in a modern neighborhood. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(4):734-738.
- LESSARD, E.J. e SIEBURTH, J.M. 1982 – Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and batch chambers in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(3):950-959.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. e SAMBROOK, J. 1982 – **Molecular Cloning**; pp. 76-87. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- MASON, C.A., HAMER, G. e BRYERS, J.D. 1986 – The death and lysis of microorganisms in environment processes. *FEMS Microbiol. Rev.* 39:373-401.

- NILSSON, L., OLIVER, J.D. e KJELLEBERG, S. 1991 – Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 173(16):5054-5059.
- PAGNOCCA, F.C. 1987 – **Microbiota associada ao camarão branco (*Peneus shmitti*), água e sedimento da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.** Tese de doutorado. Instituto de Microbiologia, CCS, UFRJ, Rio de Janeiro, 241 p.
- PETTIBONE, G.W. e COONEY, J.J. 1986 – Effect of organotins in fecal pollution indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(3):562-566.
- QUEIROZ, D.M.M., MENDES, E.N., CISALPINO, E.Q., PERES, J.N. e PENNA, F.J. 1985 – Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica em crianças com diarreia aguda e em controles, em Belo Horizonte. *Rev. Microbiol.* 15(2):95-100.
- SINGH, A. e McFETERS, G. A. 1986 – Recovery, growth and production of heat-stable enterotoxin by *Escherichia coli* after copper-induced injury. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(4):738-742.
- SINGH, A., YEAGER, R. e McFETERS, G.A. 1986 – Assessment of *in vivo* revival, growth and pathogenicity on *Escherichia coli* strains after copper- and chlorine- induced injury. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(4):832-837.
- SORENSEN, S.J. 1991 – Survival of *Escherichia coli* K12 in seawater. *Microbiol. Ecol.* 85:161-168.
- WATANABE, D.S.A., LOPES, C.A.M., DECARLIS, R.M.S.T., MICHELIN, L.A. e MONTELLI, C.A. 1985 – Sorogrupos de *Escherichia coli* envolvidos em infecção urinária em Botucatu, SP. *Rev. Microbiol.* 16(3):240-244.
- XU, H-S., ROBERTS, N., SINGLETON, F.L., ATWELL, R.W., GRIMES, D.J. e COLWELL, R.R. 1982 – Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbiol. Ecol.* 8:313-323.
- YANAGUITA, R.M., BARBOSA, A.D., SILVA, L.A. e GILIO, A.E. 1989 – Emprego do método de coaglutinação na detecção de enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol.* 20(4):442-445.

Humberto M. Barreto
Mestrando do Curso de Pós-Graduação em
Genética
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária
58059-900 João Pessoa, PB
BRASIL

Reinilson Batista de Oliveira
NEPREMAR/Departamento de Biologia Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária
58059-900 João Pessoa, PB
BRASIL