



Determinação da curva de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis*¹

Lauana Borges Santiago², Lea Chapaval³, Francisco Selmo Fernandes Alves⁴, Ismênia França de Brito⁵,
Francisca Geovânia Canafistula de Sousa⁶, Raymundo Rizaldo Pinheiro⁷

¹Parte da dissertação de mestrado da primeira autora.

²Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos. Bolsista da FUNCAP. e-mail: lauanabs@hotmail.com

³Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos. email: lea@cnpq.embrapa.br

⁴Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos. email: selmo@cnpq.embrapa.br

⁵Graduanda em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA. email: ismenia_franca@yahoo.com.br

⁶Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB/Areia. email: francisgeovania@hotmail.com

⁷Orientador - Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos e Professor da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA. email: rizaldo@cnpq.embrapa.br

Resumo: O campo voltado para a pesquisa relacionada à Linfadenite Caseosa ainda é bastante amplo objetivando alcançar o completo entendimento da enfermidade. Porém, a execução de alguns protocolos de pesquisa ligados à *Corynebacterium pseudotuberculosis* exige o conhecimento de informações relacionadas ao microrganismo em questão, que não encontram-se disponíveis na literatura, como a descrição de sua curva de crescimento. Objetivou-se, portanto, determinar a curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis* inoculada em Caldo de Infusão de Cérebro e Coração adicionado de 0,1% de Tween 80 (BHI+T), ao longo de 48 horas de incubação a 37°C. Cinco colônias isoladas do microrganismo foram inoculadas em um frasco contendo BHI+T. A cada quatro horas, 2 mL eram retirados para medição da massa celular em espectrofotômetro e 1 mL para realização das diluições seriadas, plaqueamento em Ágar Sangue e contagem de células viáveis. A partir daí, observou-se que, para a obtenção de uma concentração máxima de *C. pseudotuberculosis*, próxima a 1200×10^5 células viáveis por mL, deve-se manter o inóculo sob incubação adequada por um período de 28 a 40 horas. Além disso, observou-se que a densidade óptica do meio de cultura pode ser um método empregado para estimar a concentração de células viáveis de *C. pseudotuberculosis* em BHI+T, somente até 40 horas de crescimento. Os dados obtidos neste estudo contribuem para simplificar o desenvolvimento de vários protocolos de pesquisa ligados à Linfadenite Caseosa.

Palavras-chave: abscesso, crescimento, linfonodo, microrganismo, pequenos ruminantes

Growth curve of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Abstract: The research field that involves Caseous Lymphadenitis is wide aiming the complete understanding of the disease. However, some experimental protocols related to *Corynebacterium pseudotuberculosis* require the knowledge of certain information about this microorganism that is not available in the recent literature, like the respective growth curve description. So that, the purpose of this study was to define the growth curve of *C. pseudotuberculosis* inoculated in Brain Heart Infusion Broth plus 0,1% of Tween 80 (BHI+T), for 48 hours incubation at 37°C. Five colonies were inoculated in a bottle containing BHI+T. Every four hours, 02 mL were withdrawn to evaluate the cell mass at a spectrophotometer and 01 mL were withdrawn to accomplish serial dilutions, Blood Agar Base plating and counting of viable cells/mL. It was observed that, to reach the maximum concentration of *C. pseudotuberculosis*, near to 1200×10^5 viable cells/mL, the inoculum must be maintained at appropriate incubation for a 28-40 hours period. Besides that, it was noted that the optical density of the medium culture can be an effective method to appoint the concentration of viable cells in BHI+T, only until 40 hours of growth. The data obtained beyond this study will certainly contribute to make easier the development of many research protocols related to Caseous Lymphadenitis.

Keywords: abscess, growth, lymph nodes, microorganism, small ruminants

Introdução

A Linfadenite Caseosa é uma doença infectocontagiosa causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um bacilo gram positivo curto e irregular, que pode também apresentar um aspecto cocóide (Batey, 1986). É uma enfermidade crônica e debilitante, responsável por causar grandes perdas

econômicas na caprino-ovinocultura mundial e que se caracteriza pela formação de abscessos em gânglios linfáticos superficiais, podendo também acometer órgãos e linfonodos internos (Alves et al., 2007). O campo voltado para a pesquisa relacionada à Linfadenite Caseosa e ao seu agente causador ainda é bastante amplo objetivando alcançar o completo entendimento da enfermidade e, conseqüentemente, a obtenção de seu controle eficaz (Alves et al., 2007). Entretanto, a execução de alguns protocolos de pesquisa ligados à *C. pseudotuberculosis* exige o conhecimento de determinadas informações relacionadas ao microrganismo em questão, que não encontram-se disponíveis na literatura, como por exemplo, a descrição da respectiva curva de crescimento. A partir de sua análise, seria possível estimar o número de células bacterianas viáveis existentes em determinado meio de cultura, por unidade de tempo, auxiliando estudos relacionados à produção de vacinas, testes de diagnóstico, medidas de tratamento e controle da doença. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis* inoculada em Caldo de Infusão de Cérebro e Coração adicionado de 0,1% de Tween 80 (BHI+T), ao longo de 48 horas de incubação, através da contagem do número de células bacterianas viáveis e da medição da massa celular pela turbidimetria.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado a partir de uma cepa regional de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sendo que todas as análises foram desenvolvidas nos Laboratórios de Bacteriologia e de Proteoma da Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada na cidade de Sobral-CE. O material drenado do abscesso de um caprino suspeito para Linfadenite Caseosa foi plaqueado em Ágar Base enriquecido com 7% de sangue ovino e a placa mantida em estufa a 37°C por 48 horas. As colônias foram caracterizadas macroscopicamente, coradas pelo método de Gram e submetidas às provas da catalase, urease e fermentação de carboidratos, para isolamento e identificação do agente etiológico. Para determinação da curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis*, a quantificação celular foi estimada através da avaliação da densidade óptica, com comprimento de onda de 600 nm, e posterior contagem em placas (Tortora, 2005). Cinco colônias isoladas do microrganismo foram, então, transferidas da placa de Ágar Sangue para um frasco erlenmeyer contendo 75 mL de BHI+T. Quatro horas após a inoculação do meio, 02 mL foram retirados para medição da massa celular em espectrofotômetro e 01 mL para realização das diluições seriadas em solução salina a 0,95% (10^{-1} a 10^{-9}), plaqueamento em Ágar Sangue e contagem do número de células viáveis por mL. Esta etapa foi repetida sucessivamente, a cada quatro horas, ao longo das 48 horas de incubação do meio inoculado, a 37°C. Um frasco contendo BHI+T estéril foi utilizado ao longo do experimento para zerar o espectrofotômetro nos momentos de avaliação da densidade óptica. Para a montagem da curva do número de células viáveis por mL de meio de cultura foram utilizados os valores das menores diluições que possibilitaram sua contagem. Ao final do experimento, foi realizada a confirmação de pureza do microrganismo no meio de cultura.

Resultados e Discussão

Durante o crescimento bacteriano em meio de cultura líquido, as bactérias apresentam uma curva de crescimento padrão, quando este é expresso como o logaritmo do número de bactérias ao longo do tempo, composta por quatro fases distintas: fase de arranque, fase exponencial de crescimento, fase estacionária e fase de declínio (Koneman et al., 2001). Na tabela 1 estão descritos os valores obtidos para densidade óptica e o número de células bacterianas viáveis existentes por mL de meio de cultura, ao longo de 48 horas de incubação. Na figura 1, estão representadas as respectivas curvas de crescimento, com o número de células viáveis descrito em logaritmo na base 10. A partir destes dados, observa-se que a *C. pseudotuberculosis* apresenta um crescimento relativamente lento em BHI+T, já que aproxima-se de sua fase equilíbrio, somente após 28 horas de crescimento. Depois de 40 horas de incubação, observa-se um grande declínio no número de células bacterianas viáveis. Assim, sugere-se que, para a obtenção de uma concentração máxima de *C. pseudotuberculosis* em meio BHI+T, próxima a 1200×10^5 células viáveis por mL, deve-se manter o inóculo sob incubação adequada por um período de 28 a 40 horas. A queda brusca deste valor é justificada pelo esgotamento de nutrientes do meio de cultura e pelo aumento dos produtos tóxicos provenientes do próprio metabolismo bacteriano (ISCSS, 2009). Além disso, nota-se que a avaliação da densidade óptica do meio de cultura pode ser considerada um método eficaz para estimar a quantidade de células viáveis de *C. pseudotuberculosis* em BHI+T, somente até 40 horas de crescimento, ou seja, até o final da fase estacionária, já que a turbidimetria não é capaz de realizar discriminação entre as células vivas e as células mortas no meio de cultura (Tabela 1 e Figura 1). A avaliação da densidade óptica é baseada no fato de as células microbianas dispersarem a luz, podendo assim, ser detectadas, por medição da absorvância em um espectrofotômetro (ISCSS, 2009). A partir da observação dos dados descritos na figura 1, é possível obter, ao longo das primeiras 40 horas de crescimento da *C. pseudotuberculosis*, a correlação existente entre a turbidez do inóculo e o número de células microbianas viáveis existentes por mL de meio de cultura. A estimativa da concentração de células viáveis de *C. pseudotuberculosis*, a partir da análise das curvas de crescimento obtidas neste

estudo, favorece o desenvolvimento de estudos relacionados à Linfadenite Caseosa que exigem o conhecimento de tal informação, tornando sua execução mais prática e rápida.

Tabela 1 Densidade óptica do meio de cultura e número de células viáveis por mL de *Corynebacterium pseudotuberculosis* inoculada em BHI+T, ao longo de 48 horas de incubação a 37°C.

Tempo (h)	Densidade Óptica*	Número de células viáveis (UFC/mL)
04	0,011	68 x 10 ⁵
08	0,046	82 x 10 ⁵
12	0,162	178 x 10 ⁵
16	0,459	306 x 10 ⁵
20	0,961	700 x 10 ⁵
24	1,366	900 x 10 ⁵
28	1,498	1050 x 10 ⁵
32	1,515	820 x 10 ⁵
36	1,519	1110 x 10 ⁵
40	1,537	1200 x 10 ⁵
44	1,508	140 x 10 ⁵
48	1,426	221 x 10 ⁵

*comprimento de onda de 600 nm

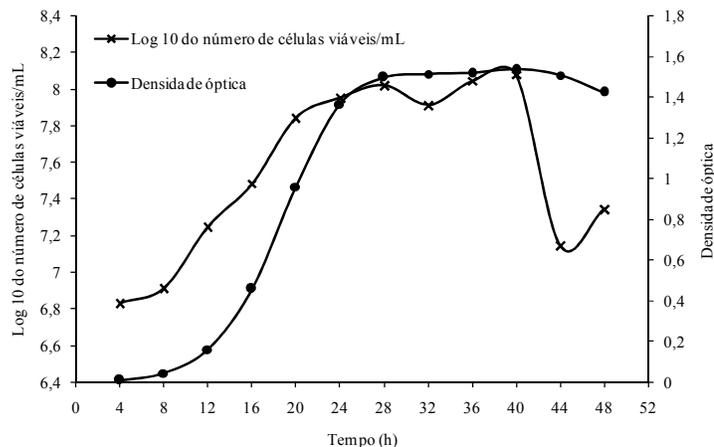


Figura 1 Curvas de crescimento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em meio BHI+T, em função dos valores obtidos para densidade óptica e do logaritmo na base 10 do número de células viáveis por mL, ao longo de 48 horas de incubação a 37°C.

Conclusões

Os dados obtidos neste trabalho contribuem fundamentalmente para simplificar e facilitar o desenvolvimento de inúmeros protocolos de pesquisa relacionados à Linfadenite Caseosa. Além disso, são descritas informações importantes ligadas à execução de testes práticos e rápidos contidos na metodologia de alguns experimentos, de modo a assegurar a confiabilidade de seus resultados.

Literatura citada

- ALVES, F.S.F.; SANTIAGO, L.B.; PINHEIRO, R.R. **Linfadenite Caseosa: o estado da arte**. Sobral: EMBRAPA Caprinos e Ovinos, 2007. 60p. (EMBRAPA-CNPC. Documentos, 74).
- BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v.63, n.9, p. 269-272, 1986.
- INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DO SUL. **Manual prático de microbiologia**. Disponível em: <http://www.egasmoniz.edu.pt/ficheiros/alunos/anos_antiores/microbiologia/pratica/CAPITULO09.pdf>. Acesso em: 15/02/2009.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 894p.