

Alterações morfológicas em *Bacillus subtilis* pela eletrólise

Rodolfo Tolentino-Bisneto¹
Ederio D. Bidoia¹

Recebido em: 07/03/2002
Aceito em: 08/06/2002

TOLENTINO-BISNETO, Rodolfo; BIDOIA, Ederio D. Alterações morfológicas em *Bacillus subtilis* pela eletrólise. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 47-56, 2002.

RESUMO

O tratamento de águas de abastecimento é indispensável à saúde pública. Tradicionalmente, o tratamento de água implica adição de substâncias químicas que podem gerar compostos tóxicos afetando a saúde daqueles que a utilizam. A cloração, por exemplo, promove a formação de compostos tóxicos como os trihalometanos, de reconhecido efeito carcinogênico, além de apresentarem outros efeitos toxicológicos. O tratamento eletrolítico pode ser uma alternativa na desinfecção de águas de abastecimento e residuárias. Além das vantagens para a saúde pública, o tratamento eletrolítico, por não requerer a adição de nenhuma substância ao processo, pode ser utilizado em indústrias de alta tecnologia que necessitem de águas extremamente puras em seus processos. O objetivo deste estudo foi observar o efeito do tratamento eletrolítico com cátodo de carbono sobre a morfologia do *Bacillus subtilis*. Suspensões de *B. subtilis* em tampão fosfato 0,2M em pH 7,2 livre de cloreto foram eletrolisadas com cátodo de carbono vitrificado e ânodo de platina recoberta por membrana de diálise. A corrente aplicada ao processo foi de 0,60A DC por 30 min. As suspensões eletrolisadas foram coradas pelo método de Gram e observadas ao microscópio óptico; observadas ao microscópio eletrônico de varredura após sua preparação. Os resultados permitem concluir que a eletrólise promove alterações na estrutura da parede do *B. subtilis* além de extravasamento de material celular.

UNITERMOS: Desinfecção, *Bacillus subtilis*, eletrodo de carbono, eletrólise, alterações morfológicas.

¹ Departamento de
Bioquímica e Micro-
biologia - Instituto de
Bióciências de Rio
Claro-UNESP

Endereço:
Av. 24-A, 1515, Bela
Vista, Rio Claro-SP.
CEP 13506-900
Telefone: (19) 526-
4135 /Fax: (19) 526-
4137 / e-mail:
ederio@rc.unesp.br

INTRODUÇÃO

O tratamento de águas de abastecimento é indispensável à saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde 80%, de todas as doenças que se alastram nos países de terceiro mundo são provenientes de água contaminada (TOMINAGA; MIDIO, 1999). No tratamento, a desinfecção da água garante a morte dos organismos patogênicos e outros de provável efeito nocivo, reduzindo sua veiculação (PIROU et al., 1998; TOMINAGA; MIDIO, 1999; LUTEY, 2000).

O tratamento de água tradicional implica adição de substâncias químicas que podem gerar compostos tóxicos afetando a saúde daqueles que a utilizam. O método mais utilizado, atualmente, é o da cloração, que consiste em adicionar cloro livre (Cl_2), ou substâncias que o liberem na água, para que esse promova a desinfecção (TOMINAGA; MIDIO, 1999). Mas esse método, apesar de barato e eficaz, promove a formação de compostos tóxicos como os trialometanos, de reconhecido efeito carcinogênico, além de apresentarem outros efeitos toxicológicos (MATSUNAGA et al., 1992; TOMINAGA; MIDIO, 1999).

O tratamento eletrolítico pode ser uma alternativa na desinfecção de águas de abastecimento e residuárias. Além das vantagens na saúde pública, o tratamento eletrolítico, por não requerer a adição de nenhuma substância ao processo, é um processo limpo (LUBICKI; JAYARAM, 1996), podendo ser utilizado em indústrias de alta tecnologia que necessitem de águas extremamente puras em seus processos.

Estudando o efeito da corrente elétrica no crescimento de *Escherichia coli* B, Rosenberg et al. (1965) observaram que essa tinha seu processo de divisão celular inibido. Os autores atribuíram a inibição da divisão celular dessa bactéria à formação de compostos de platina durante a eletrólise.

A morte de bactérias durante o tratamento eletrolítico tem sido atribuída a diversos fatores, tais como: a geração de compostos de cloro, como o cloro gasoso e o hipoclorito a partir do íon cloreto (PARELEUX; SICARD, 1970; STONER et al., 1982; PATERMARAKIS; FOUNTOUKIDIS, 1990); a evolução de O_2 e O_3 no cátodo (PATERMARAKIS; FOUNTOUKIDIS, 1990); a formação de radicais livres como HO_2^{3-} e OH^- (PATERMARAKIS; FOUNTOUKIDIS, 1990; TOLENTINO-BISNETO; BIDOIA, 2000 a, b); as reações provocadas na transferência direta de cargas entre o eletrodo e a bactéria (PATERMARAKIS; FOUNTOUKIDIS, 1990; NAKASONO et al., 1992, 1993; BRATFICH et al., 1999; TOLENTINO-BISNETO; BIDOIA, 2000 b); a oxidação de substâncias celulares como a Coenzima A (MATSUNAGA et al., 1992; NAKASONO et al., 1992; OKOCHI et al., 1999); a destruição da membrana citoplasmática ou simplesmente um aumento em sua permeabilidade e diminuição em sua seletividade (LUBICKI; JAYARAM, 1996; FRIENDRICH et al., 1998; LEE; TAI, 1999); alteração rápida de pH (TOLENTINO-BISNETO; BIDOIA, 2000 a); a capacidade redutora do íon ferroso ao contato com o microrganismo (ANGELIS et al., 1998; BRATFICH

TOLENTINO-BISNETO,
Rodolfo;
BIDOIA, Ederio
D. Alterações
morfológicas em
Bacillus subtilis
pela eletrólise.
Salusvita, Bauru,
v. 21, n. 2,
p. 47-56, 2002.

TOLENTINO-BISNETO, Rodolfo; BIDOIA, Ederio D. Alterações morfológicas em *Bacillus subtilis* pela eletrólise. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 47-56, 2002.

et al., 1999); a lise celular. (LUBICKI; JAYARAM, 1996; LEE; TAI, 1999).

A velocidade de morte independe da concentração inicial de microrganismos e é diretamente proporcional à densidade de corrente ou ao potencial aplicados ao processo (PATERMARAKIS; FOUNTOUKIDIS, 1990; BRATFICH et al., 1999; LEE; TAI, 1999).

O objetivo deste estudo foi observar o efeito do tratamento eletrolítico com cátodo de carbono sobre o *Bacillus subtilis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Célula eletrolítica

Foi utilizada uma célula eletrolítica de 80ml com circulação de água ligada a um banho termostatizado. A temperatura do sistema não ultrapassou 25°C. Como cátodo, foi utilizado um eletrodo de carbono esponjoso vitrificado, fabricado pela Tokai Carbon Co.[®], do Japão. Suas dimensões eram de 3,80 x 1,70 x 1,30cm. A área efetiva de reação do cátodo era de 148,6cm². Como ânodo foi utilizado um eletrodo de platina policristalina da Aldrich (99,98% m/m) recoberto com uma membrana de diálise. Essa membrana ainda foi preenchida com 2mL de tampão fosfato 0,2M a pH 7,2 livre de cloreto. O recobrimento desse eletrodo impede o efeito desse na desinfecção.

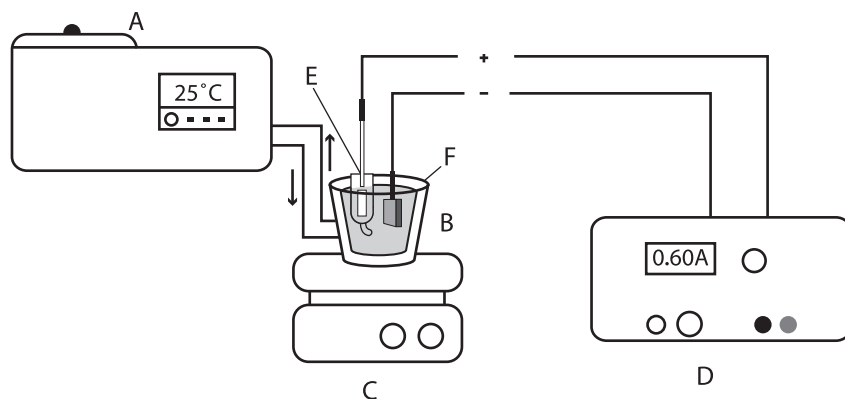


FIGURA 1: Diagrama do sistema de tratamento. A: banho termostatizado; B: célula eletrolítica; C: agitador magnético; D: fonte de corrente DC; E: anodo de platina recoberto pela membrana de diálise; F: catodo de carbono.

Preparo da suspensão

Culturas de *B. subtilis* CCT 2576 foram obtidas a partir de dois repiques consecutivos. O primeiro em tubo de cultura, em meio sólido ágar nutriente incubado a 28°C por 24h. O segundo em 100mL de meio de cultura líquido caldo nutritivo incubado a temperatura ambiente por 24h sob agitação. Alíquotas de 2mL da cultura em meio líquido foram adicionadas a 50ml de tampão fosfato 0,2M a pH 7,2 estéril. À célula eletrolítica, foram adicionados 52mL dessas suspensões. A suspensão foi agitada constantemente durante todo o tratamento por um agitador magnético.

Essas suspensões foram eletrolisadas a uma corrente contínua de 0,60A por 30 min em sistema de batelada. As suspensões eletrolisadas tiveram seu pH e sua temperatura determinados.

Microscopia Óptica

Foram confeccionadas lâminas pela técnica de esfregação a partir de suspensões de *B. subtilis* submetidas e não submetidas ao tratamento eletrolítico. Tais lâminas foram coradas pelo método de Gram (LAPERNT; GOURGAUD, 1975) e observadas ao microscópio óptico.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Suspensões do *B. subtilis* submetidas e não submetidas ao tratamento eletrolítico foram fixadas em glutaraldeído, preparadas (ALDRICH; TODD, 1986) e examinadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), onde foram fotografadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microscopia óptica

As células de *B. subtilis* não expostas ao tratamento eletrolítico apresentavam-se como bastonetes Gram-positivos, facilmente observados ao microscópio.

Após 30 min de tratamento, as células do bacilo apresentavam-se coradas em vermelho pela coloração de Gram (Gram-negativas) além de apresentarem alterações em sua forma bastonete e diminuição em seu tamanho quando comparada à bactéria não eletrolisada.

Os resultados obtidos com a microscopia óptica permitem concluir que a eletrólise provoca alterações na parede celular, pois essa se apresentava corada em azul (Gram-positivas) pelo método de Gram antes do tratamento, e vermelhas (Gram-negativas) após terem sido tratadas. Essa

TOLENTINO-BISNETO, Rodolfo; BIDOIA, Ederio D. Alterações morfológicas em *Bacillus subtilis* pela eletrólise. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 47-56, 2002.

TOLENTINO-
BISNETO,
Rodolfo;
BIDOIA, Ederio
D. Alterações
morfológicas em
Bacillus subtilis
pela eletrólise.
Salusvita, Bauru,
v. 21, n. 2,
p. 47-56, 2002.

alteração na coloração se deu por lesões na parede celular. Tais lesões fizeram com que as células perdessem material e diminuíssem de tamanho. A coloração de Gram está baseada na propriedade da parede das bactérias Gram-positivas em reter o complexo formado entre os corantes cristal violeta e lugol quando expostas ao álcool (LAPERNT; GOURGAUD, 1975). A ocorrência de regiões onde haja a ausência de paredes ou alterações na mesma permite que o álcool lave o complexo cristal violeta/lugol do interior celular. Isso explicaria a inversão do Gram da bactéria após o tratamento.

Substâncias celulares podem ser precipitadas através da eletroporação (STAPULIONIS, 1999). Essa eletroporação não é impossibilitada pela presença da parede celular (XUE et al., 1999). Assim, a diminuição do tamanho do *B. subtilis* após o tratamento eletrolítico pode ter sido causada pela precipitação de substâncias celulares, além das alterações na parede do microrganismo.

Essa alteração na parede do *B. subtilis* foi causada pela transferência de carga no contato do microrganismo com o cátodo uma vez que o ânodo estava recoberto pela membrana de diálise e o meio estava isento de cloreto.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A FIGURA 2 permite observar a morfologia do *B. subtilis* antes do tratamento eletrolítico. Observam-se as células em formato bastonete, bastante regulares. A superfície da parede celular dos microrganismos apresenta-se sem irregularidade ou lesões.

Em suspensões não eletrolisadas o *B. subtilis* apresentou um comprimento entre 1,6 e 4,8 μm e uma largura média de 0,6 μm . Em suas micrografias, não se observa extravasamento de material celular e a superfície de sua parede bem como sua forma de bastonete aparecem bem preservadas.

Na FIGURA 3, podemos observar a morfologia do *B. subtilis* exposto a 30 min de tratamento eletrolítico. Observa-se que a forma do bacilo apresenta-se irregular. As células apresentam pontos de extravasamento de material celular (indicados por setas), grande quantidade de material celular extravasado além de ruptura da parede celular (cabeça de seta).

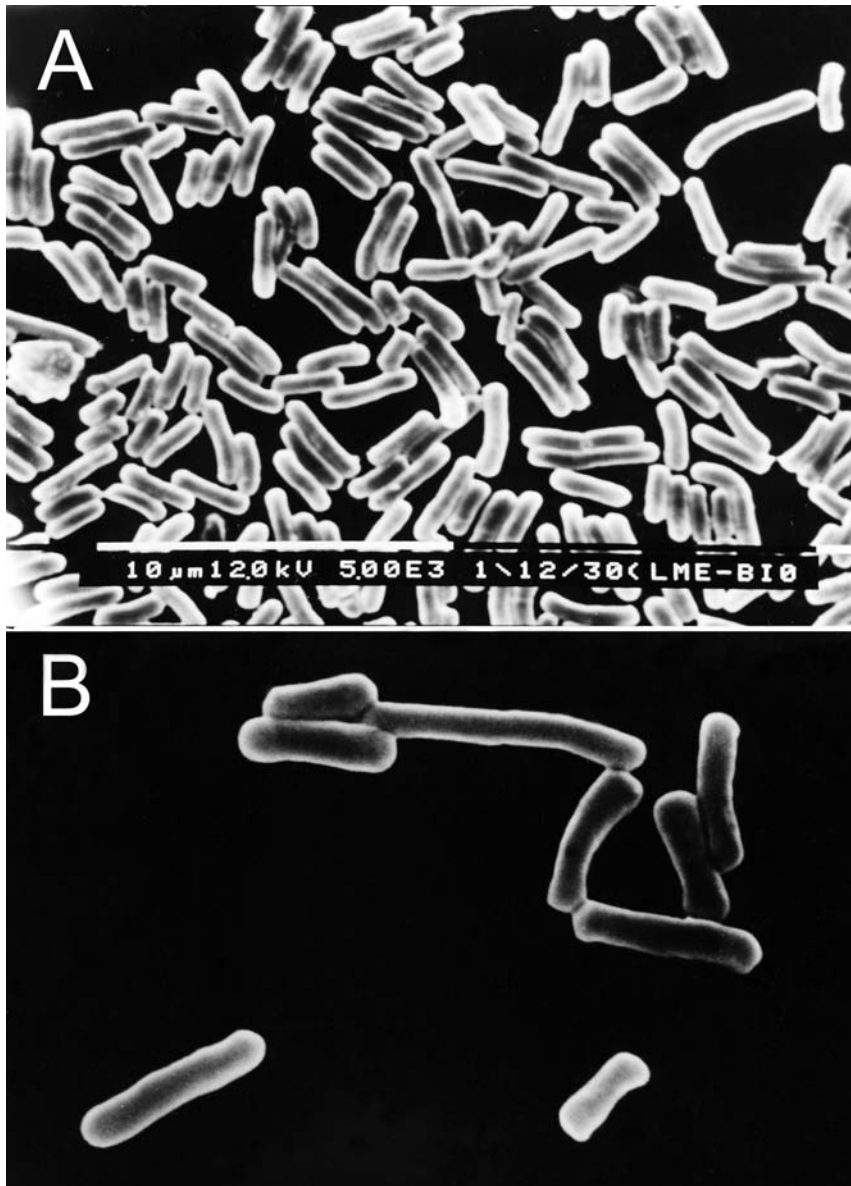
A superfície da parede apresenta-se bastante irregular quando comparada à da bactéria antes do tratamento. As células de *B. subtilis* tinham um comprimento entre 1 e 3 μm e um diâmetro médio de 0,4 μm após 30 min de tratamento eletrolítico. Assim, as células tiveram uma redução em seu tamanho durante o tratamento.

Ao compararmos os resultados obtidos na observação no *B. subtilis* ao MEV antes e depois do tratamento eletrolítico, podemos concluir que a eletrólise provocou alterações na estrutura da parede celular dessa bactéria.

Os resultados obtidos com a microscopia eletrônica são coerentes àqueles obtidos com a microscopia óptica. Em ambas as técnicas, é possível observar alterações no tamanho e na forma das células de *B. subtilis*. A alteração da coloração da bactéria, quando corada pelo método de

Gram, após a eletrólise, indica que essa sofreu modificações em sua permeabilidade. Essas modificações na permeabilidade das células de *B. subtilis* promoveram o extravasamento de material celular, observado na FIGURA 3.

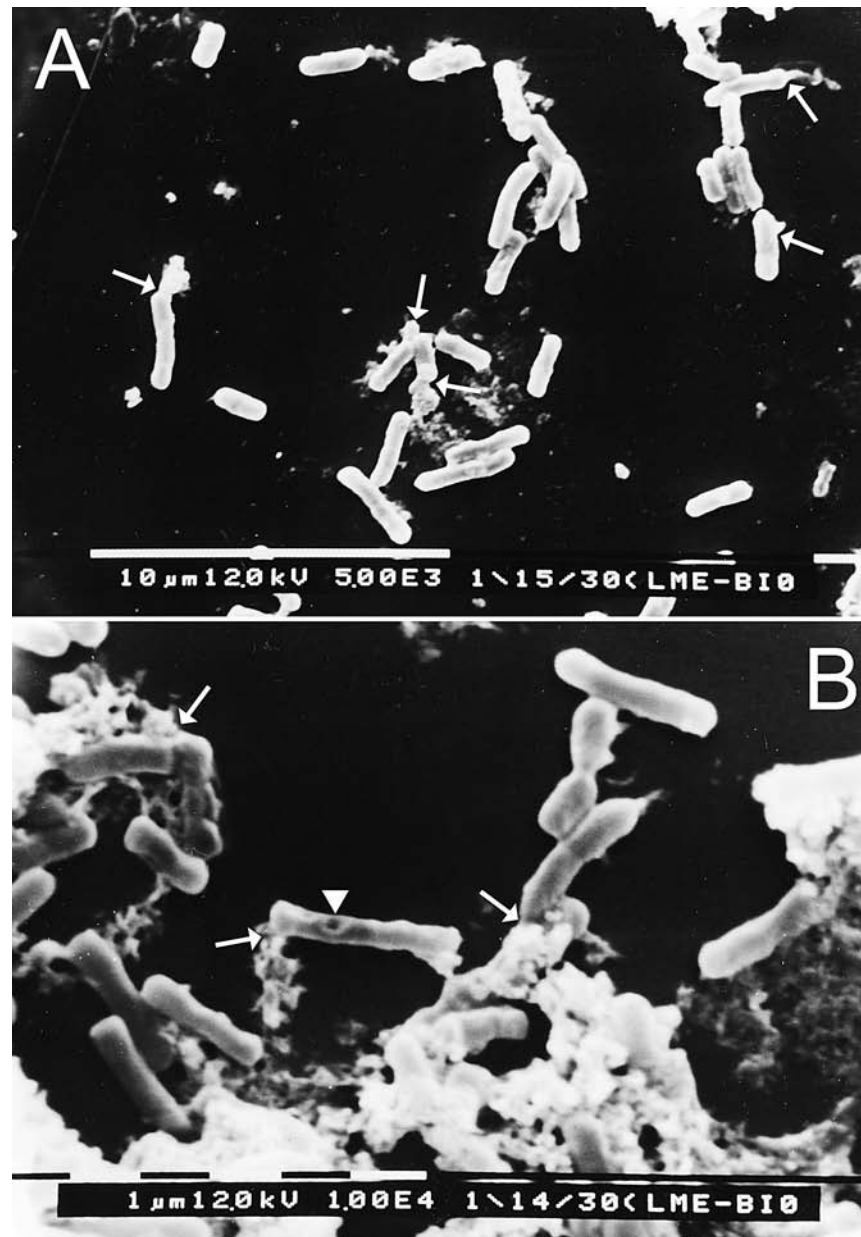
TOLENTINO-BISNETO, Rodolfo; BIDOIA, Ederio D. Alterações morfológicas em *Bacillus subtilis* pela eletrólise. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 47-56, 2002.



Escala : A =10 μ m; B =1 μ m.

FIGURA 2: Micrografia em MEV de *B. subtilis* antes do tratamento eletrolítico.

TOLENTINO-
BISNETO,
Rodolfo;
BIDOIA, Ederio
D. Alterações
morfológicas em
Bacillus subtilis
pela eletrólise.
Salusvita, Bauru,
v. 21, n. 2,
p. 47-56, 2002.



Escala: A=10 µm; B=1 µm.

FIGURA 3: Micrografia em MEV de *B. subtilis* após 30 min de tratamento eletrolítico em tampão fosfato pH 7,2. I = 0,60A. Setas igual a pontos de extravasamento de material celular, m igual a material celular, cabeça de seta igual a ruptura na parede celular.

O aumento da permeabilidade celular é gerado pela eletroporação (LUBICKI; JAYARAM, 1996; FRIENDRICH et al., 1998; LEE; TAI, 1999). O potencial aplicado durante o tratamento esteve entre 8,7 e 11,9

V o que é suficiente para provocar esse fenômeno (LUBICKI; JAYARAM, 1996). A eletroporação irreversível é, talvez, a maior responsável pela morte do *B. subtilis*.

A morte do *B. subtilis* não se deu pela oxidação da Coenzima A como propuseram Matsunaga et al., 1992 e Okochi et al., 1999, uma vez que as reações de oxidação foram excluídas do sistema com o isolamento do ânodo.

A desinfecção promovida pela formação de cloro gasoso (Cl₂), ou seu compostos derivados, não ocorreu, pois o sistema estava isento de cloreto.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que o tratamento eletrolítico é eficiente na desinfecção de águas contaminadas com bactérias Gram-positivas como o *Bacillus subtilis*.

O tratamento eletrolítico promove alterações na estrutura da parede celular do *B. subtilis*. Essas alterações são promovidas pela transferência de carga na interface eletrodo/solução.

A inversão da coloração da bactéria no método de Gram é causada por alterações na permeabilidade da parede celular do *B. subtilis*.

A eletrólise promove alterações morfológicas e ultra-estruturais no *B. subtilis*. Tais alterações são promovidas pela eletroporação além de alterações na parede celular geradas pela transferência de carga eletrodo solução.

O provável mecanismo de desinfecção do tratamento eletrolítico dentro do sistema empregado neste trabalho, é a associação do efeito da eletroporação com as transformações geradas pela transferência de carga quando o microrganismo entra em contato com o eletrodo.

AGRADECIMENTOS

CAPES, FUNDUNESP, CNPq e FAPESP.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Rio Claro-UNESP

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDRICH, H. C.; TODD, W. J. *Ultrastructure techniques for microorganisms*. New York: Plenum Press, 1986.
2. ANGELIS, D. F.; et. al. Eletrólise de resíduos poluidores: I - Efluentes de uma indústria liofilizadora de condimentos. *Química Nova*, v. 21, n.1, p. 20-4, 1998.
3. BRATFICH, O. J.; et. al. Electrolysis of cell suspensions of *Bacillus subtilis* (ATCC-9372) and of *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann Royal) using cast-iron electrodes. *Brazilian Journal of Ecology*, v. 3, p. 83-4, 1999.

TOLENTINO-BISNETO, Rodolfo; BIDOIA, Ederio D. Alterações morfológicas em *Bacillus subtilis* pela eletrólise. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 47-56, 2002.

TOLENTINO-
BISNETO,
Rodolfo;
BIDOIA, Ederio
D. Alterações
morfológicas em
Bacillus subtilis
pela eletrólise.
Salusvita, Bauru,
v. 21, n. 2,
p. 47-56, 2002.

4. FRIEDRICH, U.; et. al. High efficiency electrotransference with aluminum electrodes using microsegunde controlled pulses. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 47, p. 103-11, 1998.
5. LARPENT, J. P.; GOURGAUD, M. L. *Microbiologia prática*. São Paulo: EDUSP, 1975.
6. LEE, S. W.; TAI, Y. C. A micro cell lysis device. *Sens. and Actuat.*, v. 73, p. 74-9, 1999.
7. LUBICK, P.; JAYARAM, S. High voltage pulse application for the destruction of Gram-negative bacterium *Yersunia enterocolitica*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 43, p. 135-41, 1997.
8. LUTEY, R. W. Microbiological control in process water systems: an overview. Official Proceedings *The International Water Conference 61st Annual Meeting*, Pittsburgh- Pennsylvania, USA, p. 9-15. 22 a 26 de outubro de 2000.
9. MATSUNAGA, T.; NAKASONO, S.; et. al. Disinfection of drinking water by using a novel electrochemical reactor employing carbon-cloth electrodes. *Applied Environmental Microbiology*, v. 58, p. 686-9, 1992.
10. NAKASONO, S.; et. al. Electrochemical disinfection of marine bacteria attached on plastic electrode. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 27, p. 191-8, 1992.
11. NAKASONO, S.; et. al. Electrochemical prevention of marine biofouling with a carbon-chloroprene sheet. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59-11, p. 3757-2, 1993.
12. OKOCHI, M.; NAKAMURA, N.; MATSUNAGA, T. Electrochemical killing of microorganisms using the oxidized form of ferrocenemonocarboxylic acid. *Electrochimica Acta*, v. 44, p. 3795-9, 1999.
13. PARELIEUX, A.; SICARD, N. Lethal effects of Electric Current on *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 19, p. 421-2, 1970.
14. PATERMARAKIS, G.; FOUNTOUKIDIS, E. Disinfection of water by electrochemical treatment. *Water Research*, v. 24, n.12, p. 1491-6, 1990.
15. IROU, P.; DUKAN, S.; KIENE, L. Modeling bacteriological water quality in drinking water distribution systems. *Water Science and Technology*, v. 38, n. 8-9, p. 299-307, 1998.
16. RSENGERG, B.; CAMP, L. V.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrode. *Nature*, v. 205, n. 4972, p. 698-9, 1965.
17. STAPULIONIS, R. Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 48, p. 249-54, 1999.
18. STONER, G. E.; ET. AL. The mechanism of low frequency AC electrochemical disinfection. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 9, p. 229-43, 1982.

19. TOLENTINO-BISNETO, R.; BIDOIA, E. D. Efeito do pH na desinfecção de águas de abastecimento por eletrólise utilizando eletrodos de carbono. *IV simpósio de iniciação científica do Campus de Rio Claro – Unesp*. p. 13. 2000.
19. TOLENTINO-BISNETO, R.; BIDOIA, E. D. Desinfecção de águas de consumo através de eletrólise utilizando eletrodos de carbono. *XII Congresso de iniciação científica da Unesp*. São José do Rio Preto-SP. p. 14. 17 a 20 de outubro de 2000.
20. TOMINAGA, M. Y.; MIDIO, A. F. Exposição humana a trihalometanos presentes em águas tratadas. *Revista Saúde Pública*, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 413-21, 1999.
21. XUE, G. P.; JOHNSON, J. S. DALRYMPLE, B. P. High Osmolarity Improves the Electro-Transformation Efficiency of Gram-Positive Bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods*. v. 34, p. 183-91, 1999.

TOLENTINO-BISNETO, Rodolfo; BIDOIA, Ederio D. Alterações morfológicas em *Bacillus subtilis* pela eletrólise. *Salusvita*, Bauru, v. 21, n. 2, p. 47-56, 2002.