

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Biociências**  
**Bacharelado em Ciências Biológicas**

**Débora Marchesan Cunha**

**DESENVOLVIMENTO DE UM EQUIPAMENTO PARA ESTUDO DO CRESCIMENTO  
DE *Escherichia coli* SOB CONDIÇÃO DE MICROGRAVIDADE SIMULADA**

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Porto Alegre**  
**2019**

**Débora Marchesan Cunha**

**DESENVOLVIMENTO DE UM EQUIPAMENTO PARA ESTUDO DO CRESCIMENTO  
DE *Escherichia coli* SOB CONDIÇÃO DE MICROGRAVIDADE SIMULADA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Sueli Teresinha Van Der Sand  
Coorientador: Thomas Braun e Marcela Proença Borba

**Porto Alegre  
2019**

### CIP - Catalogação na Publicação

Cunha, Débora Marchesan Cunha  
DESENVOLVIMENTO DE UM EQUIPAMENTO PARA ESTUDO DO  
CRESCIMENTO DE *Escherichia coli* SOB CONDIÇÃO DE  
MICROGRAVIDADE SIMULADA / Débora Marchesan Cunha  
Cunha. -- 2019.

36 f.

Orientador: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Coorientadores: Thomas Braun, Marcela Proença  
Borba.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,  
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Microbiologia. 2. Microgravidade. 3. Curva de  
crescimento. 4. *Escherichia coli*. I. Van Der Sand,  
Sueli Teresinha, orient. II. Braun, Thomas, coorient.  
III. Proença Borba, Marcela, coorient. IV. Título.

Débora Marchesan Cunha

**DESENVOLVIMENTO DE UM EQUIPAMENTO PARA ESTUDO DO  
CRESCIMENTO DE *Escherichia coli* SOB CONDIÇÃO DE  
MICROGRAVIDADE SIMULADA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharel(a) em Ciências Biológicas

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Leonardo Gregory Brunnet - UFRGS

---

Heloísa Giacomelli Ribeiro - UFRGS

---

Sueli Teresinha Van Der Sand - UFRGS (orientadora)

## Agradecimentos

Durante a minha graduação, diversas pessoas foram de suma importância para que eu pudesse superar obstáculos, alcançar meus objetivos e estar onde estou hoje. A essas pessoas, eternizo aqui, nessa singela folha de papel, os meus mais sinceros agradecimentos.

Que venha a lista! Gostaria de agradecer. . .

À minha família, em primeiro lugar. Ao meu pai (biólogo), que me inspirou e me deu todo apoio necessário quando escolhi fazer Ciências Biológicas. À minha mãe, que esteve sempre ao meu lado, que ouviu todos os meus problemas e sorriu com todas as minhas conquistas. À minha avó que, durante esses 5 anos de graduação, preparou todas as manhãs um “cafezinho passado” e dividiu comigo toda a sua sabedoria. Ao meu irmão adolescente e pestinha que é, também, o meu melhor amigo e, é claro, ao meu *Canis lupus familiaris* Koda, por me fazer acordar cedo todas as manhãs para passear. Ter uma família como a nossa é, sem dúvida, o meu maior presente.

À professora Sueli Van Der Sand, que me recebeu de braços abertos no laboratório e me oportunizou a chance de trabalhar com o que eu realmente gosto, me proporcionando a liberdade de conceber esse projeto. Ao professor Thomas Braun, que no primeiro semestre despertou o meu interesse na física e que aceitou me acompanhar durante esse ano. À Marcela Borba e ao João Wistuk, que me receberam em seu “time” e me ensinaram como sobreviver dentro de um laboratório de microbiologia. A todos no Laboratório de Microbiologia Aplicada, que tornaram os meus dias mais descontraídos e se mostraram dispostos a me ajudar quando precisei. Aos professores e técnicos do Instituto de Física que ajudaram na montagem do equipamento usado no presente trabalho.

A todos os professores que compartilharam comigo um pouquinho do seu conhecimento. A formação dessa futura bióloga que aqui vos fala se deu em cada disciplina, curso, palestra ou saída a campo, em cada prova, trabalho, seminário, leitura de artigo ou aula prática. Obrigada, especialmente, por me fazerem perceber a verdadeira arte por trás dessa linda profissão.

As minhas amigas, que me ajudaram a “segurar as pontas” em cada final de semestre, que compartilharam comigo os finais de semana, as festas da faculdade e os quartos nos alojamentos.

E por último, também gostaria de agradecer as minhas próprias versões passadas, que construíram a cada dia o que hoje é uma realidade.

## Resumo

A existência e sobrevivência dos microrganismos requer a habilidade de sentir e responder às mudanças ambientais, incluindo mudanças nas características físicas do meio. A microgravidade e seus análogos são um dos fatores que podem acarretar profundos efeitos no crescimento e desenvolvimento microbiano. Recentemente, diversos estudos demonstraram o papel chave da microgravidade na regulação da expressão gênica, na fisiologia e na patogenicidade dos microrganismos estudados. Diante da importância desses estudos e, ao mesmo tempo, da dificuldade de realizá-los no ambiente espacial, tornou-se necessário o desenvolvimento de equipamentos que pudessem ser utilizados em solo e que conseguissem simular algumas das características físicas que estão associadas à microgravidade. Assim, o presente trabalho, em parceria com professores e técnicos do Instituto de Física da UFRGS, apresenta dois objetivos: (1) a construção de um novo instrumento, capaz de simular a microgravidade, baseado nos mesmos princípios utilizados no "Rotating-Wall Vessel" (equipamento desenvolvido pela NASA), e que apresentasse um baixo custo para a sua produção; (2) a utilização desse equipamento para o estudo do crescimento de *Escherichia coli* em microgravidade simulada. O equipamento é, essencialmente, uma forma de produzir uma cultura celular em suspensão constante. A partir de um pré-inóculo de  $10^8$  células/mL, a bactéria foi inoculada em doze frascos de vidro, de aproximadamente 30mL, completamente preenchidos com o meio de cultivo TSB (Caldo Soja Trypticaseína). Seis frascos para o grupo controle e os outros seis, para amostra. Todos os frascos foram mantidos dentro da estufa bacteriológica, o grupo controle ficou parado (gravidade terrestre), ao passo que, os recipientes da amostra, foram colocados dentro do equipamento e mantidos em rotação com uma velocidade angular constante (microgravidade simulada). A partir da leitura da absorbância feita com um intervalo de 1 hora e 15 minutos, as curvas de crescimento para o grupo controle e o grupo amostral foram traçadas. Além disso, a semeadura em placa contendo meio TSA (Agar Tripton de Soja) também foi realizada para contabilizar as Unidades Formadoras de Colônia. O método estatístico ANOVA ( $\alpha= 0,05$ ) foi aplicado para verificar a significância dos resultados encontrados. Segundo as análises estatísticas utilizadas, de acordo com a metodologia aplicada, não houveram diferenças significativas nas médias populacionais encontradas entre o grupo controle e o grupo amostral. O dispositivo construído para esse trabalho, apesar de seguir os mesmo princípios físicos do RWV, ainda carece de uma validação quanto a sua real capacidade de simular a microgravidade. Novas propostas para melhorar o equipamento estão sendo estudadas e, com o apoio do Instituto de Física, novos testes poderão ser feitos para validar o aparato.

**Palavras-chave:** Microgravidade. Curva de crescimento. *Escherichia coli*.

## Lista de ilustrações

Figura 1 – Representação esquemática do RWV. . . . .	15
Figura 2 – Eletromicrografia (O157:H7) . . . . .	17
Figura 3 – Esquema da metodologia empregada no estudo (Parte 1) . . . . .	22
Figura 4 – Esquema da metodologia empregada no estudo (Parte 2) . . . . .	23
Figura 5 – Esquema da metodologia empregada (Parte 3) . . . . .	24
Figura 6 – Comparação entre as curvas de crescimento obtidas para o grupo controle e o grupo amostral. . . . .	26
Figura 7 – Comparação entre a contagem das UFCs entre o grupo controle e o grupo amostral . . . . .	26
Figura 8 – Equipamento completo . . . . .	34
Figura 9 – Controlador do motor . . . . .	34
Figura 10 – Posição dos frascos dentro do equipamento (visão externa) . . . . .	35
Figura 11 – Conjunto frasco + tampa + filtro dentro do equipamento . . . . .	35
Figura 12 – Posição dos frascos dentro do equipamento (visão interna) . . . . .	36
Figura 13 – Equipamento em movimento (180°) . . . . .	36

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Relação entre o ponto (controle ou amostra) e o quais diluições foram utilizadas para semear na placa de TSA. . . . .	21
--	----

## Lista de abreviaturas e siglas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
IF	Instituto de Física
MAS	Média Aritmética Simples
MELISSA	Micro-ecological life-support system
MIR	Do russo, Paz ou Mundo
NASA	National Aeronautics and Space Administration
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
RWV	Rotating-Wall Vessel
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo Soja Tripticaseína
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
URSS	União das Republicas Socialistas Soviéticas

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b> . . . . .	<b>10</b>
1.1	Justificativa . . . . .	12
1.2	Objetivos . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Fundamentação Teórica</b> . . . . .	<b>13</b>
2.1	A verdadeira gravidade zero . . . . .	13
2.2	A microgravidade simulada . . . . .	13
2.3	Os efeitos da microgravidade/microgravidade simulada no crescimento bacteriano . . . . .	15
2.4	<i>Escherichia coli</i> , caracterização . . . . .	16
2.5	Os efeitos da microgravidade/microgravidade simulada no crescimento de <i>Escherichia coli</i> . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Metodologia</b> . . . . .	<b>19</b>
3.1	Desenvolvimento do equipamento . . . . .	19
3.2	Curva de crescimento da <i>Escherichia coli</i> . . . . .	20
3.3	Análise dos resultados . . . . .	21
<b>4</b>	<b>Resultados</b> . . . . .	<b>25</b>
4.1	O equipamento desenvolvido . . . . .	25
4.2	Comparações entre o grupo amostral e o grupo controle . . . . .	25
<b>5</b>	<b>Discussão</b> . . . . .	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Considerações Finais</b> . . . . .	<b>29</b>
	<b>Referências</b> . . . . .	<b>30</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>33</b>

## 1 Introdução

Entre os anos de 1540 e 1610, três grandes físicos e astrônomos mudaram a concepção humana do que seria o próprio Universo. Nicolau Copérnico, Johannes Kepler e Galileu Galilei deram início ao que, posteriormente, seria chamado pelos historiadores de Revolução Científica (GLOBO, 2016). Com o passar do tempo, o imaginário popular e a ficção tomaram a liberdade de criar respostas às perguntas feitas durante os últimos séculos e milênios: Existe vida em outros planetas? Dentro do contexto do século XX, livros, filmes e histórias sobre viagens interplanetárias e alienígenas tiveram o seu auge, impulsionando as pesquisas científicas (GAMA-KHALIL; URZEDO, 2019).

A Astrobiologia, antes conhecida como Exobiologia ou Bioastronomia, teve origem a partir de interesses político-acadêmicos dentro da Administração Nacional da Aeronáutica e Espaço (NASA), durante a Guerra Fria. A notícia de um possível fóssil encontrado no meteorito ALH80001 somado ao descobrimento de planetas fora do Sistema Solar impulsionaram o repasse de verbas para o pioneiro Instituto de Astrobiologia da NASA (NAI) (LUQUE et al., 2009). Na visão atual, a Astrobiologia é definida como um campo de pesquisa interdisciplinar dedicado a entender a origem, evolução, a distribuição e o futuro da vida no Universo. Isso implica em estudar questões que envolvem não só a biologia, química e física, como também filosofia, geologia, psicologia, direito e religião (BLUMBERG, 2011).

De uma forma geral, podemos considerar que a Astrobiologia busca observar as diversas interações que os seres vivos têm com o corpo celeste que os abriga e seu ambiente astrofísico. Essas interações são extremamente dinâmicas e, ao mesmo tempo que a vida evolui de forma a acompanhar as mudanças do planeta e do Universo, ela também pode alterar o seu ambiente, gerando assim, esse ciclo extremamente complexo que varia ao longo do tempo (GALANTE et al., 2016). A partir disso, dentro do escopo da Astrobiologia, o advento das missões espaciais permitiu o estudo *in situ* das respostas metabólicas e fisiológicas dos seres vivos às condições encontradas fora do nosso planeta (HORNECK; KLAUS; MANCINELLI, 2010).

Inicialmente, a preocupação de astronautas e pesquisadores quanto a contaminação bacteriana nas espaçonaves fomentaram o surgimento da Microbiologia Aeroespacial, uma subárea da Astrobiologia. Os primeiros estudos dos microbiologistas visavam entender como se dá, fora da Terra, o crescimento da microbiota humana e a quais doenças os astronautas estão suscetíveis durante a viagem (ROSENZWEIG et al., 2014). Além disso, sempre houve uma enorme preocupação quanto a possibilidade de contaminação biológica em outros corpos celestes. Atualmente a Microbiologia Aeroespacial busca investigar como os microrganismos integram as informações dos

diferentes estímulos mecânicos encontrados no espaço, em uma resposta fisiológica apropriada (NICKERSON et al., 2004).

Os estudos mais recentes envolvendo microrganismos apresentam resultados com ênfase na utilização do ambiente espacial para entender alguns mecanismos biológicos básicos. Dentre os assuntos mais abordados estão a importância da gravidade a nível celular, intracelular e extracelular, os efeitos biológicos da radiação ionizante e os fatores de sobrevivência acima da biosfera (HORNECK; KLAUS; MANCINELLI, 2010). A Microbiologia Aeroespacial também pode ajudar a fundamentar ou refutar hipóteses, como a da Panspermia Cósmica (HORNECK, 2003). Além disso, os novos projetos de sistemas de suporte de vida que utilizam microrganismos são cada vez mais factíveis, como o projeto MELISSA (Micro-ecological life-support system) (LASSEUR et al., 2010).

Dentre as características encontradas no ambiente espacial, esse trabalho se atem a microgravidade, a condição onde a gravidade se encontra reduzida ( $< 9,8\text{m/s}^2$ ). Como a vida na Terra está condicionada a presença da gravidade, estudar a resposta que os organismos apresentam quando expostos a uma variação dessa condição é de suma importância. Com esses estudos podemos compreender como a aceleração gravitacional influenciou na evolução da vida. (NICKERSON et al., 2003). Ademais, diversas pesquisas mostram que a microgravidade e seus análogos podem afetar a regulação da expressão gênica, a fisiologia e a patogenicidade dos microrganismos (ROSENZWEIG et al., 2010).

Os experimentos científicos envolvendo voos espaciais são particularmente desafiadores. Tais experimentos requerem um planejamento significativo e precisam atender aos rigorosos padrões e protocolos impostos pelas agências espaciais. Portanto, estudos sobre os efeitos da microgravidade em microrganismos são limitados devido à algumas restrições, como peso, volume e espaço de armazenamento dos materiais, exigência de tempo e mão de obra, oportunidades de voos escassas, necessidade de equipamentos especializados e o alto custo financeiro (NICKERSON et al., 2003). Diante da importância desses estudos e, ao mesmo tempo, da dificuldade de realizá-los no ambiente espacial, tornou-se necessário o desenvolvimento de equipamentos que pudessem ser utilizados em solo e que conseguissem simular algumas das características físicas que estão associadas à microgravidade (KLAUS, 2001).

O Grupo de Biotecnologia da NASA desenvolveu o primeiro aparato que atende essas necessidades, chamado "*Rotating-Wall Vessel*" (RWV). Ele é uma poderosa ferramenta de laboratório, mas é bastante simples em conceito e 'design'. Atualmente, existem diversas variações do aparelho (NICKERSON et al., 2004). O equipamento é, essencialmente, uma forma de produzir uma cultura celular em suspensão constante: ao se girar o meio de cultivo em condições de baixa turbulência e baixo cisalhamento,

as forças hidrodinâmicas compensam a sedimentação gravitacional. Dessa forma, dentro do reator, não é permitindo que o organismo se assente na parte inferior do aparelho (HAMMOND; HAMMOND, 2001). Diversas respostas celulares encontradas em experimentos realizados no espaço também foram observadas durante testes similares usando o RWV em solo (NICKERSON et al., 2003).

### 1.1 Justificativa

Os efeitos que a microgravidade pode ter no crescimento e desenvolvimento dos microrganismos não se aplicam da mesma forma às diferentes espécies. Portanto, não podemos simplesmente deduzir como determinado organismo vai responder a essa situação de estresse físico. Assim, novas espécies devem ser continuamente testadas pelos pesquisadores de modo a aumentar esses dados. Atualmente, grande parte desses estudos são realizados em solo, utilizando instrumentos específicos, como o RWV e seus análogos. No entanto, apesar da tecnologia envolvida na fabricação desses equipamentos não ser complexa, os aparelhos mais simples têm um custo bastante elevado. Dessa forma, apesar de haver um grande interesse dos pesquisadores na área, a obtenção do aparelho pode ser um empecilho à pesquisa. A bactéria utilizada nesse trabalho, *Escherichia coli* foi escolhida devido a sua disponibilidade no Laboratório de Microbiologia Aplicada, a sua importância com relação a patogenicidade em seres humanos e por já ter sido estudada nas condições de microgravidade, de modo a proporcionar melhores comparações com o presente trabalho.

### 1.2 Objetivos

O presente trabalho, em parceria com professores e técnicos do Instituto de Física da UFRGS, apresenta dois objetivos: (1) a construção de um novo instrumento, capaz de simular a microgravidade, baseado nos mesmos princípios utilizados no RWV, e que apresentasse um baixo custo para a sua produção; (2) a utilização desse equipamento para o estudo do crescimento de *E. coli* em microgravidade simulada.

## 2 Fundamentação Teórica

### 2.1 A verdadeira gravidade zero

Para que um corpo literalmente experimente a “gravidade zero” é preciso estar infinitamente longe de qualquer outro corpo. Os casos de microgravidade, que geram a condição de “falta de peso”, são resultados quase nulos do somatório de todas as forças presentes em um determinado ponto no espaço. Nesse caso, não há ausência da força gravitacional (KLAUS, 2001).

### 2.2 A microgravidade simulada

As primeiras tentativas de se estudar os efeitos dos voos espaciais em microrganismos datam da década de 30, simulando a queda de pressão e o aumento da radiação através do balonismo (DICKSON, 1991). Anos depois a antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) investigou a viabilidade e o crescimento bacteriano em um experimento a bordo do satélite Sputnik (NICKERSON et al., 2004). Nas décadas seguintes os experimentos se tornaram mais complexos, com o avanço da tecnologia. Os estudos em microbiologia estiveram presentes nos programas *Gemini*, *Apolo*, *Skylab* e *Spacelab* da NASA, além dos programas *Salyut* e *Mir* da URSS (DICKSON, 1991). A partir dos anos 80 a Estação Espacial Internacional se tornou palco de grande parte dos novos experimentos (CASTRO et al., 2004).

Como mencionado anteriormente, há uma série de fatores que tornam os experimentos envolvendo voos espaciais particularmente desafiadores. A oportunidade de realizar qualquer teste abordo envolve limitações como: peso, volume, energia, estocagem, tempo, materiais de laboratório, astronautas aptos a realizar os procedimentos, equipamento especializado e custo. No caso dos experimentos que envolvem microrganismos, ainda há uma preocupação extra quanto aos cuidados especiais para que não haja uma contaminação biológica (NICKERSON et al., 2004). Devido a todas essas dificuldades, surgiu a necessidade de desenvolver métodos e equipamentos, capazes de simular algumas das condições envolvidas no ambiente espacial, para experimentos em solo. O aparato mais conhecido para estudos de microgravidade simulada é conhecido como Clinostato, do qual derivam diversos outros instrumentos, como o *Rotating Wall Vessel* (RWV) (HORNECK; KLAUS; MANCINELLI, 2010).

O clinostato e o RWV representam importantes ferramentas que proporcionam ao pesquisador estudar componentes específicos de uma série de efeitos induzidos pela ausência da gravidade. Esses aparatos possuem dispositivos funcionalmente semelhantes (KLAUS, 2001). Ambos operam com o objetivo de gerar um sistema em constante rotação, capaz de evitar a sedimentação das partículas envoltas no meio

(HORNECK; KLAUS; MANCINELLI, 2010). A rotação desses aparelhos precisa ser rápida o bastante para evitar que o organismo sinta ou responda ‘a gravidade a cada instante do tempo, mas lenta o suficiente para impedir uma centrifugação significativa do sistema (KLAUS, 2001).

Em princípio, o clinostato é um instrumento capaz de rotacionar a amostra ao redor de um ou dois eixos, de forma lenta ou rápida. O número de eixos de rotação, a velocidade e a direção da rotação são definidos de acordo com os objetivos do experimento (LOON, 2007). O funcionamento do clinostato se adapta melhor ao estudo de organismos multicelulares, por isso a maioria das pesquisas visa entender o crescimento de plantas nas condições geradas por esse equipamento (HUANG et al., 2018).

Na tentativa de criar um aparato capaz de simular a microgravidade, o Grupo de Biotecnologia da NASA desenvolveu o *Rotating Wall Vessel* (RWV). O seu ‘design’ possibilita o crescimento celular em suspensão, num ambiente conhecido como “*low-shear*” e “*low-turbulence*” (baixo cisalhamento e baixa turbulência, em tradução literal) (SCHWARZ; WOLF; TRINH, ). O RWV é uma importante ferramenta de laboratório e atualmente existem diversas variações com relação ao seu modelo original, mas que seguem o mesmo princípio de funcionamento (Figura 1) (NICKERSON et al., 2004). O RWV consiste basicamente em um cilindro de vidro completamente preenchido com meio de cultivo (sem bolhas de ar) que gira ao redor de um eixo paralelo ao chão (perpendicular ao vetor da força gravitacional). O sistema rotaciona com uma velocidade angular constante, após um breve período, a velocidade é transferida da parede do recipiente para o fluido, de forma radial. O meio é continuamente oxigenado através de uma membrana tubular hidrofóbica que rotaciona junto com o meio de cultura (FREED; VUNJAK-NOVAKOVIC, 2002).

O termo “microgravidade simulada” é frequentemente usado para descrever o estado de clinorotação gerado por esses aparelhos. No entanto, é amplamente aceito pela comunidade científica que os clinostatos e biorreatores do tipo RWV, na verdade, não removem a aceleração gravitacional. Dessa forma, a cada instante, todo o sistema segue sob a influência da gravidade terrestre, porém, ao se inibir a sedimentação, o que realmente ocorre é que a relação entre o tempo de resposta do organismo e o período de rotação podem alterar a biopercepção da gravidade (KLAUS, 2001).

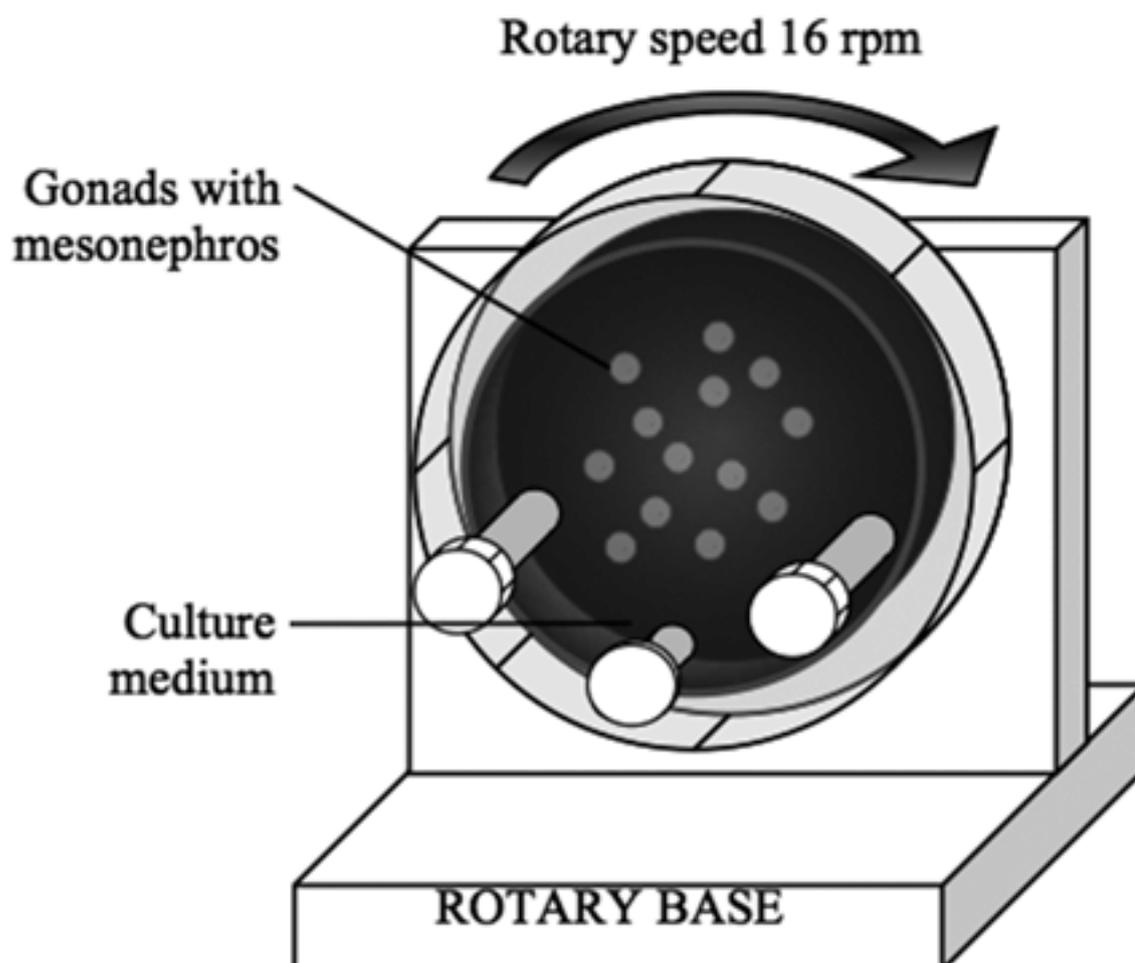


Figura 1 – Representação esquemática do RWV.

Schematic representation of rotating wall vessel (RWV) bioreactor | Download Scientific Diagram.  
Disponível em: <[https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-rotating-wall-vessel-RWV-bioreactor\\_fig1\\_283754366](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-rotating-wall-vessel-RWV-bioreactor_fig1_283754366)>. Acesso em: 10 dez. 2019.

### 2.3 Os efeitos da microgravidade/microgravidade simulada no crescimento bacteriano

Os microrganismos são capazes de sobreviver em diversos ambientes extremos. No entanto, os diferentes mecanismos envolvidos na resposta e adaptação à essas condições inóspitas permanecem incertos (HORNECK; KLAUS; MANCINELLI, 2010). Recentemente, experimentos a bordo de voos espaciais ou testes em solo vêm demonstrado que a microgravidade pode afetar processos e funções celulares nos microrganismos. Os estudos mais recentes apontam alterações no crescimento celular, expressão gênica, morfologia e desenvolvimento celular, virulência, resistência a antibióticos, formação do biofilme e metabolismo secundário (HUANG et al., 2018).

Quando analisamos os estudos já feitos, observamos que há uma grande divergência de resultados encontrados quanto aos efeitos da microgravidade/microgravidade simulada. Essa discrepância é mais evidente nos estudos que buscam entender o crescimento dos microrganismos (BENOIT; KLAUS, 2007). A inconsistência se deve

principalmente a dois fatores: (1) a seleção das espécies e cepas variam de acordo com os objetivos experimentais; (2) as condições experimentais variam de acordo com o estudo. No primeiro caso, constata-se que não há uma homogeneidade interespecífica quanto às respostas à microgravidade. Já o segundo fator é um empecilho para que os estudos possam ser comparados, já que as condições experimentais variam quanto ao método de cultivo, o meio de cultura e a concentração dos nutrientes, oxigenação, viscosidade do meio e a velocidade de rotação (no caso do RWV) (HUANG et al., 2018).

Quanto ao crescimento celular, muitos estudos concluem que a microgravidade provoca um aumento na taxa de crescimento das amostras. No entanto, outros testes apontam o contrário e ainda há um terceiro grupo de estudos que afirmam não ter ocorrido modificações significativas entre as amostras e o grupo controle (HUANG et al., 2018). Como já mencionado anteriormente, a discrepância nos resultados é decorrente tanto das respostas biológicas diferenciadas de cada espécie bacteriana, quanto das condições e metodologias impostas em cada experimento (TUCKER et al., 2007).

Por exemplo, as culturas de *E. coli* ZK650 que estavam sob condições de microgravidade simulada apresentaram um peso seco maior do que o grupo controle (FANG et al., 1997). Em comparação, as amostras de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 e *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253 apresentaram um peso seco menor com relação ao grupo controle (HUANG et al., 2018). Quando analisamos os trabalhos em que os biorreatores são utilizados, o crescimento bacteriano também difere de acordo com a velocidade de rotação (BAKER; MEYER; LEFF, 2004b).

Está claro que alguns microrganismos apresentam profundas mudanças fisiológicas e morfológicas quando expostos à microgravidade. Entretanto, os mecanismos específicos responsáveis por essas alterações não são bem conhecidos. Dessa forma, diversos estudos em laboratório vêm tentando esclarecer esses questionamentos (NICKERSON et al., 2004) (TIRUMALAI et al., 2017). As hipóteses mais aceitas até o momento argumentam que a microgravidade em si não seria o grande fator responsável pelas alterações encontradas nas curvas de crescimento. O que se observa é que outros fatores físicos indiretos, atrelados a microgravidade, seriam os protagonistas, como as mudanças na dinâmica dos fluidos, na tensão de cisalhamento e no transporte extracelular (HUANG et al., 2018).

#### 2.4 *Escherichia coli*, caracterização

Em 1885, o pediatra alemão Theodore Escherich foi responsável pela primeira descrição do organismo que futuramente levaria o seu nome. A partir de então a bactéria *E. coli* se tornou uma das espécies mais conhecidas. Este é um organismo razoavelmente simples de ser manipulado e cultivado, possuiu ciclo de vida curto e diversas ferramentas de manipulação genética já desenvolvidas (CHOU, 2007). Os

estudos envolvendo a bactéria *E. coli* ajudam a esclarecer diversos tópicos acerca do metabolismo bacteriano, da recombinação gênica, da replicação do DNA, transcrição do RNA, síntese proteica, secreção, etc. A espécie ocorre naturalmente no intestino de animais endotérmicos e são patógenos extraintestinais de humanos e outros animais (THORPE; RITCHIE; ACHESON, 2002).

A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa pertencente a família *Enterobacteriaceae*. A célula é do tipo bastonete, não esporulado, cujo tamanho fica em torno de 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1 a 3  $\mu\text{m}$  de comprimento; podem ocorrer isoladas ou em pares. Pode apresentar flagelos ao redor da célula (peritríquio) ou não apresentarem motilidade (Figura 2). Quanto ao seu metabolismo são anaeróbias facultativas (BRENNER et al., 2005).



Figura 2 – Eletromicrografia de *E. coli* O157:H7 cepa EDL933.  
Barra =1000 nm (Micrografia de Charles D. Humphrey)

## 2.5 Os efeitos da microgravidade/microgravidade simulada no crescimento de *Escherichia coli*

Dentre as espécies bacterianas estudadas na Microbiologia Aeroespacial, com certeza a *E. coli* se destaca (SINGH; MATIN, 2016). Em uma série de experimentos a bordo de sete missões norte americanas (STS-37, -43, -50, -54, -57, -60 e 62), a bactéria *E. coli* foi cultivada em meio líquido, ou seja, as células permaneceram em suspensão. Klaus et al. (2001) reportaram taxas de crescimento semelhantes entre as amostras cultivadas durante o voo espacial e o seu grupo controle em solo. No entanto, as culturas em microgravidade apresentaram uma fase *lag* encurtada - fase inicial da curva de crescimento, onde não há um aumento significativo no número de células. Além disso, a fase de crescimento exponencial foi prolongada na amostra quando comparada ao grupo controle (KLAUS et al., 1997).

No voo espacial feito pelo ônibus Discovery (STS 95), Brown et al. (2002) encontraram resultados diferentes para o crescimento da *E. coli*. Nesse experimento, as amostras apresentaram um aumento no crescimento de 25%, quando comparadas ao grupo controle, em solo. Além disso, os pesquisadores também testaram a semelhança dos resultados encontrados em microgravidade para aqueles encontrados com a utilização de um clinostato. Nesse caso, as amostras em microgravidade simulada também tiveram um crescimento maior do que o grupo controle, mas de 9% (BROWN; KLAUS; TODD, 2002) (SINGH; MATIN, 2016). Outros estudos a bordo da estação espacial MIR (Rússia) e dos ônibus espacial *Discovery* e *Endeavour* (NASA) também encontraram uma diminuição da fase *lag* das cepas de *E. coli* e um aumento final da quantidade de células (KACENA; SMITH; TODD, 1999). O crescimento nesses estudos foi mensurado a partir das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e das mudanças na densidade óptica.

Resultados contrários àqueles mencionados anteriormente também foram descritos para culturas de *E. coli*. Outros estudos apontam não haver alterações na fase *lag*, na fase de crescimento exponencial e nem no crescimento final do grupo amostral em relação ao seu controle (VUKANTI; MODEL; LEFF, 2012). As diferenças encontradas para *Escherichia coli* são atribuídas principalmente às cepas utilizadas e a composição do meio de cultura (BAKER; MEYER; LEFF, 2004a).

### 3 Metodologia

#### 3.1 Desenvolvimento do equipamento

A idealização e montagem do equipamento, no Instituto de Física da UFRGS, se deu em quatro etapas principais:

1<sup>o</sup>- Desenvolvimento teórico: Como o primeiro objetivo do trabalho era desenvolver um equipamento de baixo custo que fosse similar ao RWV, o estudo do funcionamento e da montagem do biorreator foi o primeiro passo a ser realizado. Com base nos manuais, nos desenhos e na literatura disponível, a delimitação inicial do equipamento teve início. Para que o equipamento seja eficiente, alguns pré-requisitos precisam ser atendidos:

- O material utilizado no equipamento precisa ser resistente à temperatura interna da estufa bacteriológica utilizada (37°C), além de ter as suas dimensões compatíveis com a mesma;
- O equipamento deve ter uma faixa de frequência (rotações por minuto) condizente com as indicadas e utilizadas por outros pesquisadores da área;
- A montagem e desmontagem do equipamento deve ser prática para se adequar à dinâmica do laboratório e os materiais utilizados para sua confecção foram escolhidos no intuito de priorizar a durabilidade;
- Decidiu-se que as amostras seriam manipuladas em frascos de vidro, já que estes podem ser autoclavados sem alteração de forma ou volume;
- O número de frascos deve ser o suficiente para fazer a curva de crescimento do grupo amostral e do grupo controle;
- Todo o processo de concepção do equipamento e sua fabricação precisa ser condizente com os materiais e serviços disponíveis no Instituto de Física, estar dentro do orçamento previsto e ser plausível de realização dentro dos prazos da estudante;

Dessa forma, com todas essas questões solucionadas, teve início a confecção do equipamento, com o auxílio de diferentes setores do Instituto de Física.

2<sup>o</sup>- Setor de Vidros do IF-UFRGS: Confecção de 12 frascos de vidros com cerca de 30 ml de volume e 12 tampas feitas de Teflon. Ambos os materiais utilizados suportam a temperatura das estufas bacteriológicas e podem ser autoclavados. As tampas são percorridas por um furo ao qual é possível acoplar um filtro de seringa

hidrofóbico (0,22  $\mu\text{m}$ ). O filtro foi utilizado na tentativa de oxigenar o meio sem que houvesse vazamento do fluido e nem contaminação biológica.

3º- Setor de Eletrônica do IF-UFRGS: O motor, o controlador e seus componentes foram comprados para que a parte elétrica, responsável por girar o equipamento, fosse desenvolvida. A faixa de frequência escolhida permite ao motor fazer de 10 a 30 rotações por minuto, o suficiente para os objetivos desse trabalho. A caixa que armazena o circuito e permite ao usuário ligar e controlar o aparelho foi projetada para ficar fora da estufa.

4º- Setor de Mecânica do IF-UFRGS: A partir das características da estufa biológica (tamanho e temperatura), o Polipropileno e o Policloreto de vinila (PVC) foram escolhidos para serem os materiais utilizados para formar toda a estrutura do equipamento, dando suporte para que o sistema formado pelos vidros, tampas e filtros possa girar.

### 3.2 Curva de crescimento da *Escherichia coli*

Os testes para estudar o crescimento da *E. coli* ATCC 25922 foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFRGS (Figura 3). Os exemplares de cada espécie foram recuperados a partir de amostras pré-existentes que estavam armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [1]. A bactéria foi inoculada em um tubo contendo Caldo Soja Tripticaseína (TSB) e mantida na estufa bacteriológica por 24 horas à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  [2]. A partir dessa amostra, o pré-inóculo foi ajustado a uma densidade óptica de 0,8 no densitômetro (600 nm) [3]. Esse pré-inóculo foi diluído em TSB até que a sua concentração fosse de 1% [4]. Posteriormente, os doze frascos, 6 do grupo amostral e 6 do grupo controle, foram completamente preenchidos pelo meio (sem bolhas de ar) com células. Os frascos foram fechados pelo conjunto formado pela tampa de Teflon e o filtro de seringa [5].

Os frascos foram colocados na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , o grupo controle permaneceu parado [6], ao passo que o grupo amostral permaneceu em rotação (25 rpm) [7]. A cada 1 hora e 15 minutos, um frasco do grupo controle e outro do grupo amostral eram retirados para que a concentração de células fosse analisada. O experimento da curva de crescimento teve duração de 7 horas e 30 minutos. O procedimento que se sucede foi realizado da mesma forma para todos os 12 recipientes:

(1) 200  $\mu\text{l}$  do meio foram retirados do frasco e colocados em uma cubeta de vidro; a leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro na faixa de 560 nm [8].

(2) Outra alíquota de 200  $\mu\text{l}$  foi retirada do frasco e passou por uma diluição seriada (Tabela 1); a partir dessa diluição, 100  $\mu\text{l}$  foram semeados em placa contendo o

meio Ágar Triptona de Soja (TSA), utilizando o método do “espalhamento” com a alça de Drigalsky [9]. As placas foram mantidas por 24 horas na estufa a 37°C e as UFCs foram contadas . O experimento completo foi feito em triplicata.

Tabela 1 – Relação entre o ponto (controle ou amostra) e o quais diluições foram utilizadas para semear na placa de TSA.

Ponto	Tempo transcorrido (horas)	Diluições utilizadas para a semeadura
0	00:00	$10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$
1	01:15	$10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$
2	02:30	$10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$
3	03:45	$10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$
4	05:00	$10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$
5	06:15	$10^{-6}$ , $10^{-7}$ , $10^{-8}$
6	07:30	$10^{-7}$ , $10^{-8}$ , $10^{-9}$

### 3.3 Análise dos resultados

A partir dos resultados, dois gráficos foram obtidos: (1) gráfico relacionando os valores da absorbância ao longo do tempo, entre o grupo amostral e o grupo controle; (2) gráfico relacionando o número de UFCs formadas em cada placa com o seu respectivo ponto e grupo. Para a construção de cada gráfico, o valor utilizado em cada ponto foi o resultado da Média Aritimética Simples (MAS) das triplicatas. Além disso, para se comparar os resultados obtidos, o método estatístico ANOVA foi aplicado ( $\alpha= 0,05$ ), onde:

Hipótese nula - As médias populacionais são iguais

Hipótese alternativa- Pelo menos uma das médias é diferente das demais

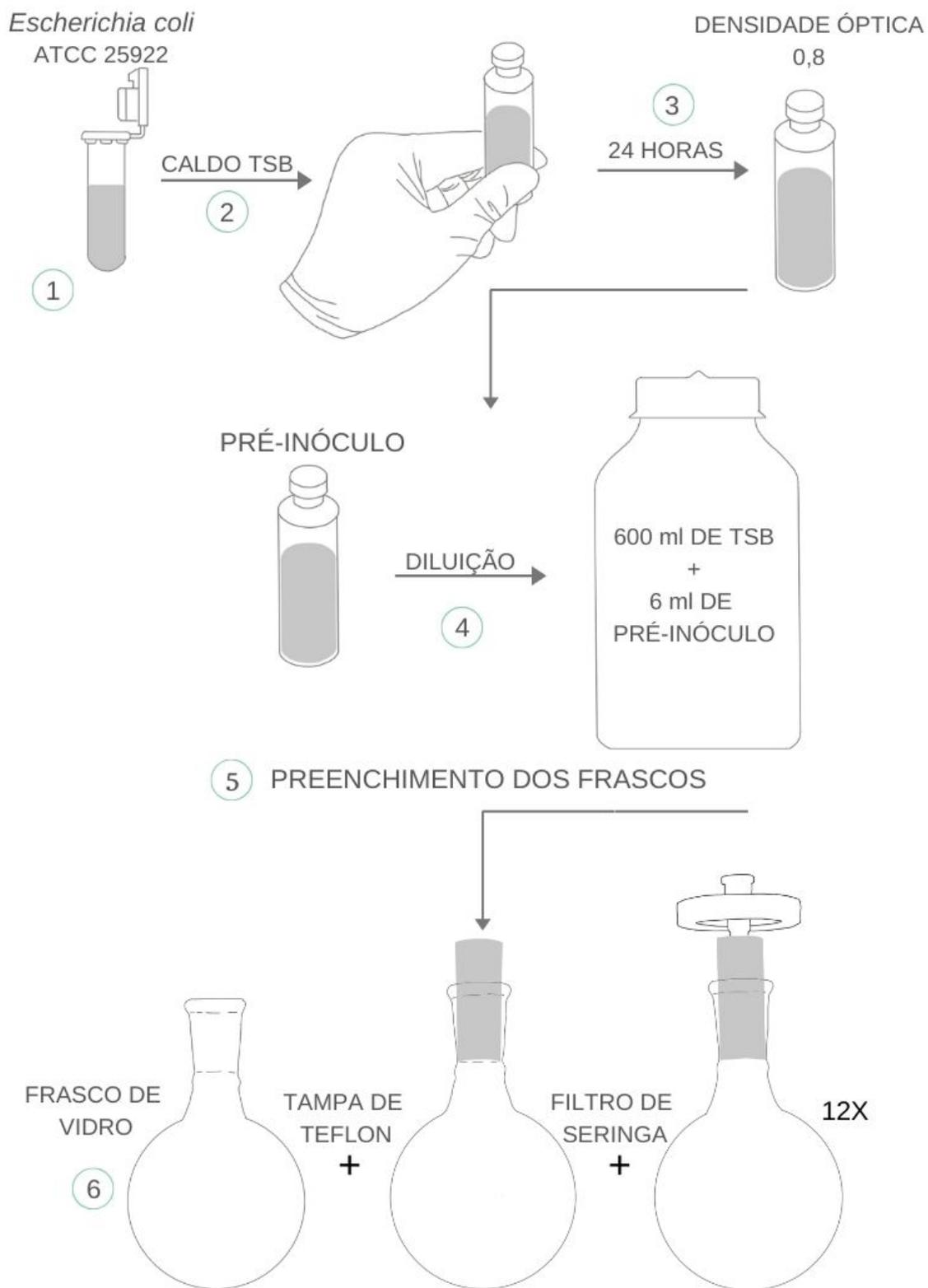


Figura 3 – Esquema da metodologia empregada (Parte 1)

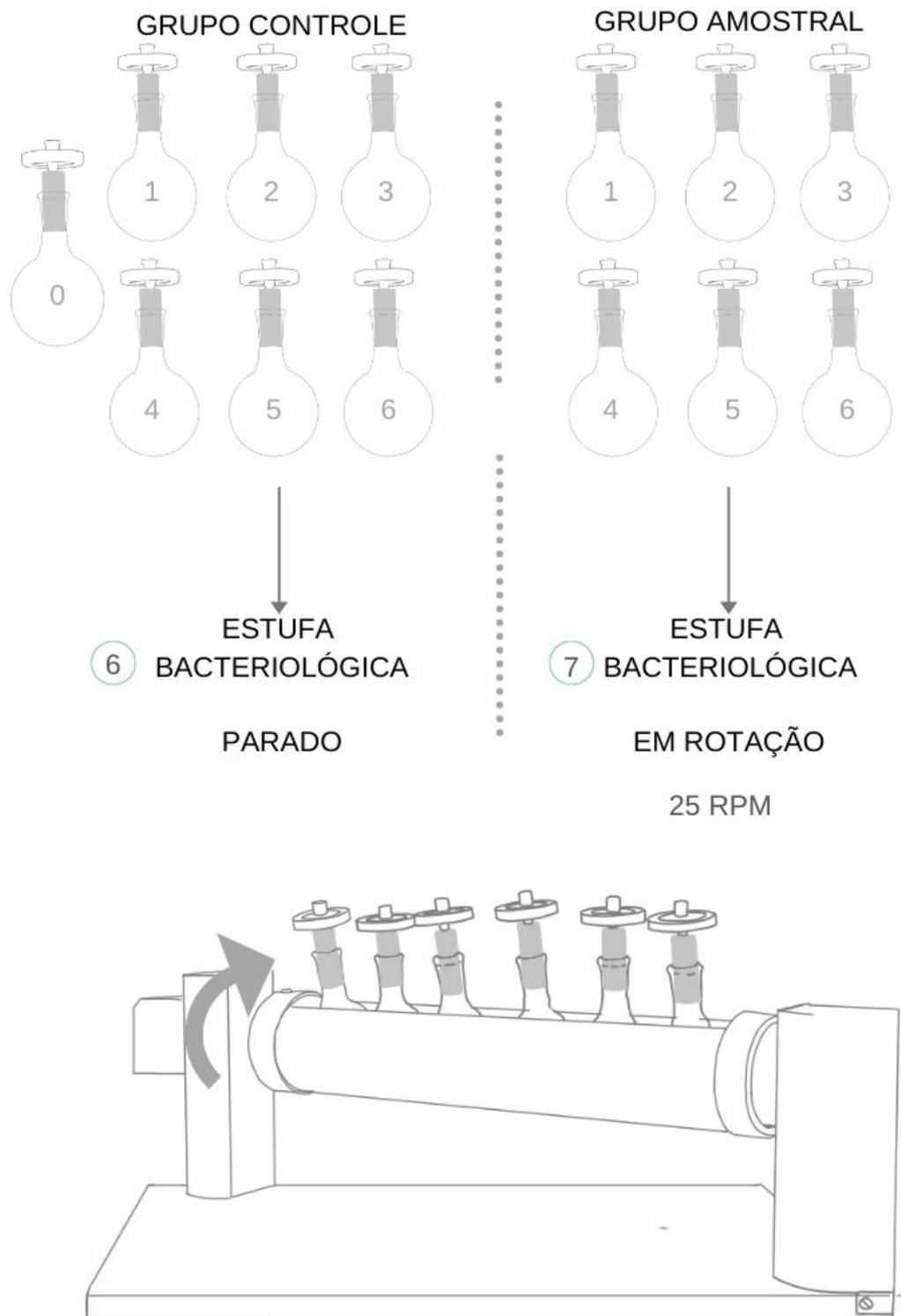


Figura 4 – Esquema da metodologia empregada (Parte 2)



Figura 5 – Esquema da metodologia empregada (Parte 3)

## 4 Resultados

### 4.1 O equipamento desenvolvido

Em julho de 2019 a montagem do equipamento foi concluída. Em anexo estão incluídas algumas fotografias que mostram o resultado dessa parte do trabalho. Com relação às exigências citadas na seção 3.1 foi observado que:

- O material utilizado é resistente a temperatura utilizada nos experimentos e suas dimensões são compatíveis com as estufas bacteriológicas comumente utilizadas nos laboratórios de microbiologia. Além disso, a montagem e desmontagem é feita de forma rápida e prática.
- Apesar de emitir um ruído quando ligado, ao ser posto dentro da estufa esse ruído passa a ser quase imperceptível no ambiente externo.
- O equipamento foi capaz de atingir as frequências exigidas em todos os testes realizados.
- Os frascos de vidros e as tampas de Teflon foram várias vezes autoclavados e não houveram alterações aparentes com relação a sua forma e volume.
- A vedação formada entre a tampa e o frasco foi eficiente em evitar vazamentos do meio de cultura e o filtro de seringa utilizado conseguiu evitar a contaminação microbiológica. No entanto, a tentativa de oxigenação do fluido não foi bem sucedida. Ao repetir o teste com outras bactérias aeróbias estritas, o crescimento efetivo não foi observado.

### 4.2 Comparações entre o grupo amostral e o grupo controle

A Figura 6 corresponde as curvas de crescimento obtidas para o grupo controle (crescimento estático) e o grupo amostral (crescimento em condição de microgravidade simulada) da *E. coli*. Pode-se observar que a partir de 2 horas e 30 minutos teve início a fase exponencial de crescimento microbiano, que perdurou até 5 horas de experimento. Nesse momento, a absorbância obtida foi de 0,570 para o grupo controle e de 0,583 para o grupo amostral. A partir da análise estatística ANOVA o valor-P obtido foi de 0,452.

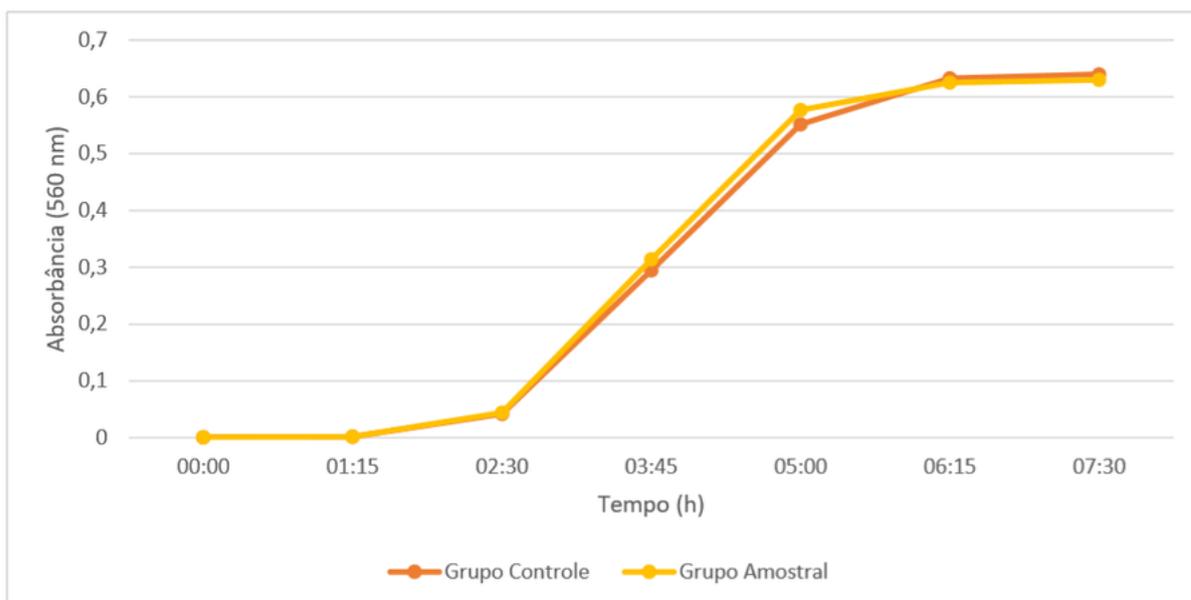


Figura 6 – Comparação entre as curvas de crescimento obtidas para o grupo controle e o grupo amostral.

Na Figura 7 pode-se observar o número de Unidades Formadoras de Colônias de cada ponto amostral durante as 7 horas e 30 minutos de crescimento microbiano. Observa-se um comportamento similar a densidade óptica obtida na Figura 6 . A partir da análise estatística ANOVA o valor-P obtido foi de 0,966.

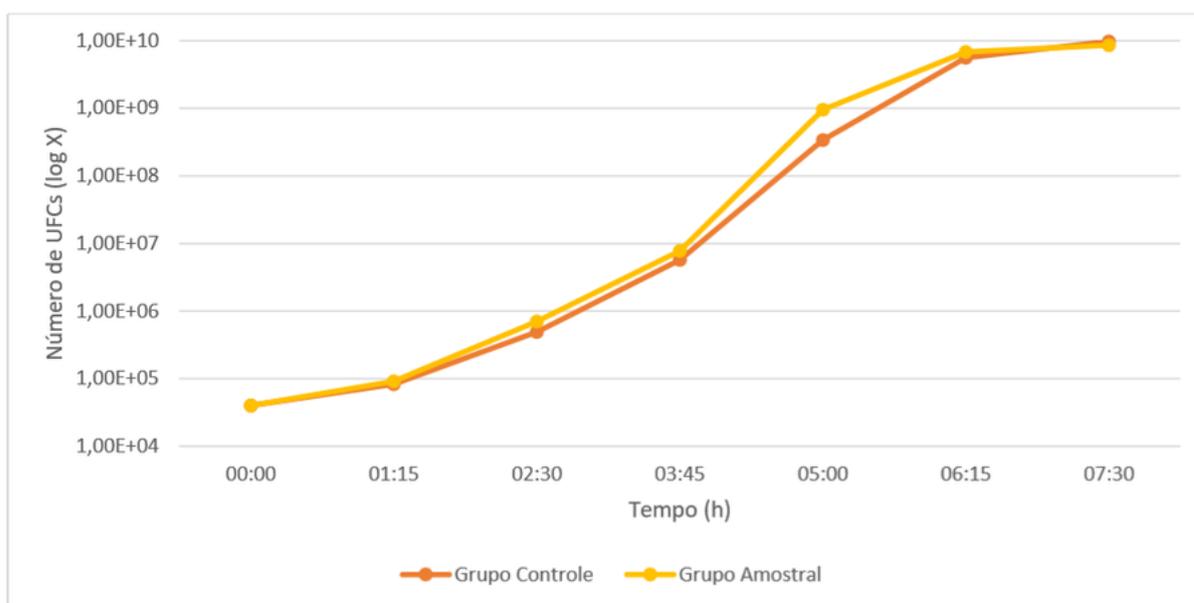


Figura 7 – Comparação entre a contagem das UFCs entre o grupo controle e o grupo amostral

## 5 Discussão

Como mencionado anteriormente, os dados obtidos até então para o estudo do crescimento de *E. coli*, em condições de microgravidade e microgravidade simulada, não podem ser considerados resultados consensuais (SENATORE et al., 2018). Por um lado, diversos autores relataram variações significativas entre os diferentes tratamentos, do outro, vários estudos observaram o contrário: nenhuma alteração (SINGH; MATIN, 2016). Dentre os trabalhos que encontraram diferentes respostas para os grupos testados, comumente os resultados obtidos indicam um encurtamento da fase *lag* e um prolongamento da fase exponencial do grupo amostral. No entanto, os mecanismos responsáveis por essas diferenças permanecem desconhecidos.

As hipóteses mais aceitas sugerem que a dinâmica do fluido possibilita uma utilização mais eficiente do meio de cultura pela célula bacteriana. Dessa forma, seriam geradas mais células por unidade de substrato consumido (TIRUMALAI et al., 2017). Muitas vezes também é proposto que a *Escherichia coli* “entende” a microgravidade e a microgravidade simulada com uma situação de estresse. Como resposta, ocorreria um processo de fragmentação, um fenômeno onde uma única célula da origem a vária de tamanho reduzido (SINGH; MATIN, 2016).

Os resultados obtidos e as análises estatísticas utilizadas no presente estudo corroboram com a Hipótese Nula. Dessa forma, de acordo com a metodologia aplicada, não houveram diferenças significativas nas médias populacionais encontradas entre o grupo controle e o grupo amostral. Além de haver a dificuldade de comparação dos resultados que constam na literatura, devido às variações na metodologia e nas cepas utilizadas, esse trabalho ainda apresenta uma particularidade a mais: o início do desenvolvimento de um novo equipamento. Como já esperado, o desenvolvimento de um novo instrumento laboratorial exige tempo, investimento e inúmeros testes. O modelo construído para esse Trabalho de Conclusão de Curso, apesar de seguir os mesmos princípios físicos do RWV, ainda carece de uma validação quanto a sua real capacidade de simular a microgravidade.

Dessa forma, a partir dos resultados encontrados, a justificativa para o observado pode se dar de duas formas: (1) analisando apenas a metodologia biológica, os resultados obtidos se enquadram dentro da gama de respostas já relatadas por outros pesquisadores quanto ao crescimento de *Escherichia coli*. Como citado anteriormente, diversos testes não apresentaram diferenças fisiológicas entre o grupo controle e o grupo amostral. No entanto, uma fiel discussão acerca dos resultados obtidos depende, primeiramente, que o equipamento seja validado. (2) Quanto a metodologia física, a frequência utilizada (25rpm) é a que mais aparece na literatura, entretanto, alguns trabalhos utilizaram frequências superiores e encontraram resultados diferentes. Além

disso, um novo sistema de oxigenação precisa ser desenvolvido, apesar da *E. coli* ser uma bactéria anaeróbica facultativa, a presença de oxigênio dissolvido no meio iguala esse fator ambiental aos outros trabalhos já publicados, facilitando a comparação. Se os resultados encontrados permanecerem inalterados quando a funcionalidade do equipamento for comprovada, isso reforça a preocupação acerca das possíveis contaminações biológicas que podem acontecer durante as missões espaciais.

## 6 Considerações Finais

Esse trabalho é o começo de um projeto maior cujo objetivo final é desenvolver um novo equipamento capaz de simular algumas características da microgravidade. Dessa forma, os resultados obtidos até então servirão como base para o aperfeiçoamento das técnicas utilizadas. Novas propostas para melhorar a oxigenação do meio já estão sendo estudadas e, com o apoio do Instituto de Física, testes poderão ser feitos para validar o equipamento.

Os estudos envolvendo a resposta de organismos as condições de microgravidade podem ajudar a elucidar algumas questões acerca da própria origem da vida no nosso planeta e a entender a real possibilidade da existência de vida em outros astros. Além disso, no caso dos microrganismo, esses estudos são de suma importância para que as agências espaciais desenvolvam protocolos de segurança coerentes para se evitar a contaminação biológica durante as missões espaciais. Apesar das diferentes exigências que cada programa espacial impõem sobre os trabalhos científicos a bordo das espaçonaves, deve haver um esforço dos pesquisadores em padronizar a metodologia para que os resultados possam ser comparados. Ademais, por serem mais viáveis, os estudos feitos em solo devem ser incentivados. Nesse intuito, o desenvolvimento de novos equipamentos laboratoriais incentiva a produção científica nessa área emergente da microbiologia aeroespacial.

## Referências

- BAKER, P.; MEYER, M.; LEFF, L. Escherichia coli growth under modeled reduced gravity. **Microgravity science and technology**, v. 15, p. 39 – 44, 02 2004a.
- BAKER, P. W.; MEYER, M. L.; LEFF, L. G. Escherichia coli growth under modeled reduced gravity. **Microgravity Science and Technology**, v. 15, n. 4, p. 39 – 44, 2004b.
- BENOIT, M. R.; KLAUS, D. M. Microgravity, bacteria, and the influence of motility. v. 39, n. 7, p. 1225 – 1232, 2007. Acesso em: 2019-10-11T00:00:00+00:00.
- BLUMBERG, B. S. **Astrobiology, space and the future age of discovery**. 2011. 508 – 515 p. Acesso em: 2019-10-19T00:00:00+00:00.
- BRENNER, D. et al. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**: Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. 2. ed. [S.l.]: Springer US, 2005. ISBN 978-0-387-24144-9.
- BROWN, R. B.; KLAUS, D.; TODD, P. Effects of space flight, clinorotation, and centrifugation on the substrate utilization efficiency of E. coli. **Microgravity Science and Technology**, v. 13, n. 4, p. 24 – 29, 2002.
- CASTRO, V. A. et al. Microbial characterization during the early habitation of the international space station. **Microbial Ecology**, v. 47, n. 2, p. 119 – 126, 2004.
- CHOU, C. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in Escherichia coli. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, p. 521 – 32, 10 2007.
- DICKSON, K. J. **Summary of biological spaceflight experiments with cells**. 1991. 151 – 260 p.
- FANG, A. et al. Effect of simulated microgravity and shear stress on microcin B17 production by Escherichia coli and on its excretion into the medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 4090 – 4092, 1997.
- FREED, L. E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Spaceflight bioreactor studies of cells and tissues. **Advances in Space Biology and Medicine**, v. 8, p. 177 – 195, 2002.
- GALANTE, D. et al. **Astrobiologia: Uma ciência emergente**. São Paulo: Tikinet Edição, 2016. 384 p.
- GAMA-KHALIL, M. M.; URZEDO, L. M. B. de. O Extraterrestre: Esse Ser Maravilhoso De Todos Os Tempos. v. 8, n. 8, p. 36 – 66, 2019.
- GLOBO, E. (ed.). **O Livro da Ciência**. 2. ed. São Paulo: Editora Globo, 2016. 352 p.
- HAMMOND, T. G.; HAMMOND, J. M. Optimized suspension culture: The rotating-wall vessel. **American Journal of Physiology**, v. 281, n. 1 50-1, p. 12 – 25, 2001.
- HORNECK, G. 7 - Could life travel across interplanetary space? Panspermia revisited. In: ROTHSCILD, L. J.; LISTER, A. M. (Ed.). **Evolution on Planet Earth**. London: Academic Press, 2003. p. 109 – 127. ISBN 978-0-12-598655-7. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125986557500343>.

HORNECK, G.; KLAUS, D. M.; MANCINELLI, R. L. Space Microbiology: Microbiological studies in the space environment or using facilities. v. 74, n. 1, p. 121 – 156, 2010.

HUANG, B. et al. **Effects of spaceflight and simulated microgravity on microbial growth and secondary metabolism**. 2018. 1 – 14 p. Acesso em: 2019-10-24T00:00:00+00:00.

KACENA, M. A.; SMITH, E. E.; TODD, P. Autolysis of Escherichia coli and Bacillus subtilis cells in low gravity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 437 – 439, 1999.

KLAUS, D. et al. Investigation of space flight effects on Escherichia coli and a proposed model of underlying physical mechanisms. v. 143, n. 2, p. 449 – 455, 1997.

KLAUS, D. M. Clinostats and bioreactors. **Gravitational and Space Biology Bulletin**, v. 14, n. 2, p. 55 – 64, 2001.

LASSEUR, C. et al. Melissa: The European project of closed life support system. v. 23, n. 2, p. 3 – 12, 2010. Disponível em: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2006cosp...36.3579L>.

LOON, J. J. van. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. **Elsevier**, v. 39, n. 7, p. 1161 – 1165, 2007.

LUQUE, B. et al. **Astrobiología: Un puente entre em Big Bang y la vida**. Madrid: Akal, 2009.

NICKERSON, C. A. et al. **Low-shear modeled microgravity: A global environmental regulatory signal affecting bacterial gene expression, physiology, and pathogenesis**. 2003. 1 – 11 p. Acesso em: 2019-10-11T00:00:00+00:00.

NICKERSON, C. A. et al. Microbial Responses to Microgravity and Other Low-Shear Environments. v. 68, n. 2, p. 345 – 361, 6 2004. Acesso em: 2019-10-11T00:00:00+00:00.

ROSENZWEIG, J. A. et al. **Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence**. 2010. 885 – 891 p. Acesso em: 2019-10-11T00:00:00+00:00.

ROSENZWEIG, J. A. et al. **Low-shear force associated with modeled microgravity and spaceflight does not similarly impact the virulence of notable bacterial pathogens**. 2014. 8797 – 8807 p. Acesso em: 2019-10-20T00:00:00+00:00.

Ray P. Schwarz, Davids A. Wolf e Tinh T. Trinh. **United States Patent**. 1991.

SENATORE, G. et al. Effect of microgravity & space radiation on microbes. v. 13, n. 7, p. 831 – 847, 2018.

SINGH, R.; MATIN, A. Cellular Response of Escherichia coli to Microgravity and Microgravity Analogue Culture. In: SINGH, R.; MATIN, A. (Ed.). **Effect of Spaceflight and Spaceflight Analogue Culture on Human and Microbial Cells**. New York: Springer, 2016. p. 259 – 282. ISBN 978-1-4939-3276-4.

THORPE, C.; RITCHIE, J.; ACHESON, K. Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen. p. 119 – 141, 01 2002.

TIRUMALAI, M. R. et al. The adaptation of *Escherichia coli* cells grown in simulated microgravity for an extended period is both phenotypic and genomic. v. 3, p. 15 –, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28649637><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5460176>. Acesso em: 2019-11-26T00:00:00+00:00.

TUCKER, D. L. et al. Characterization of *Escherichia coli* MG1655 grown in a low-shear modeled microgravity environment. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 1 – 16, 2007.

VUKANTI, R.; MODEL, M. A.; LEFF, L. G. Effect of modeled reduced gravity conditions on bacterial morphology and physiology. **BMC microbiology**, v. 12, 2012.

## **Anexos**

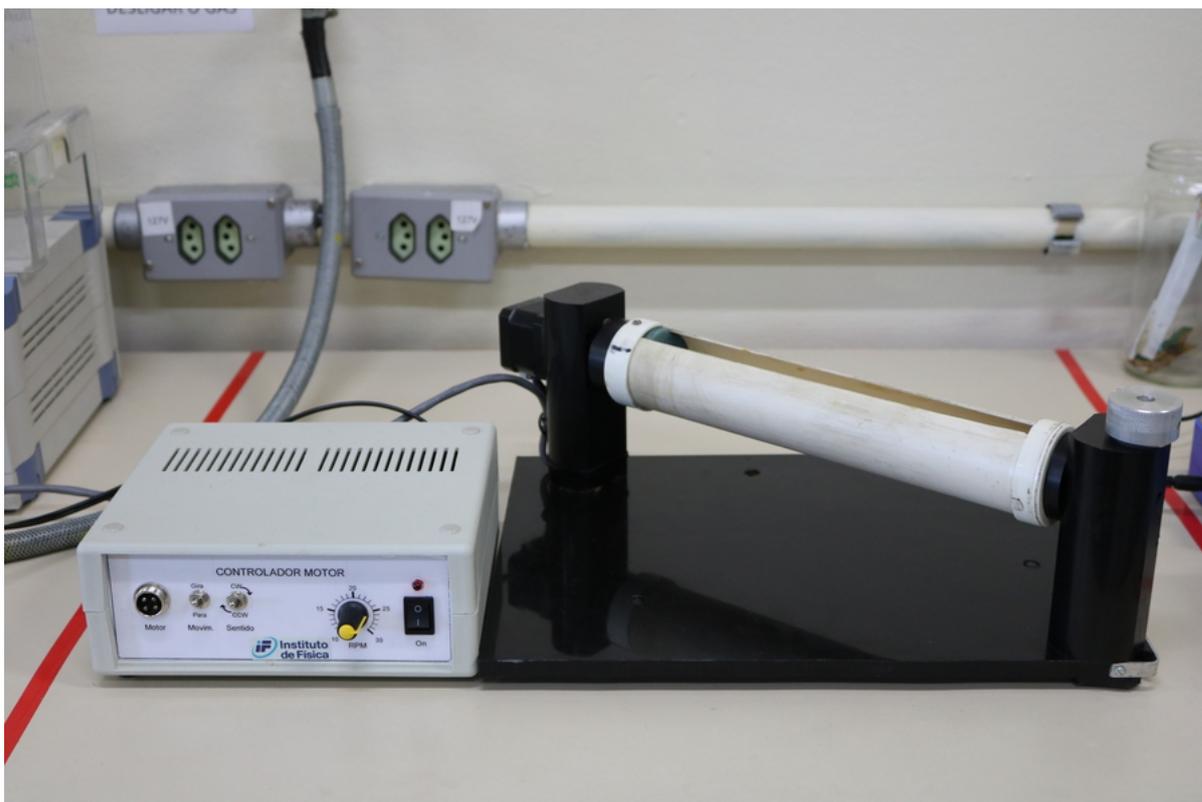


Figura 8 – Equipamento completo



Figura 9 – Controlador do motor

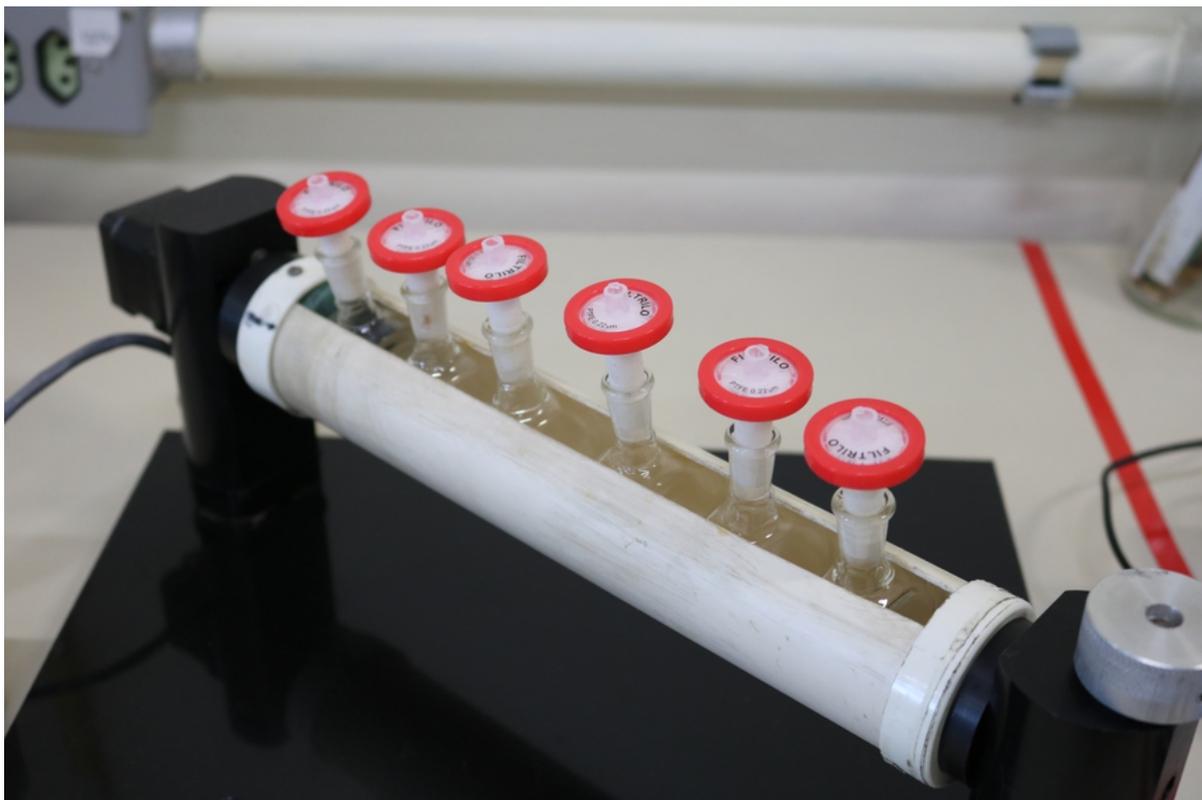


Figura 10 – Posição dos frascos dentro do equipamento (visão externa)



Figura 11 – Conjunto frasco + tampa + filtro dentro do equipamento



Figura 12 – Posição dos frascos dentro do equipamento (visão interna)

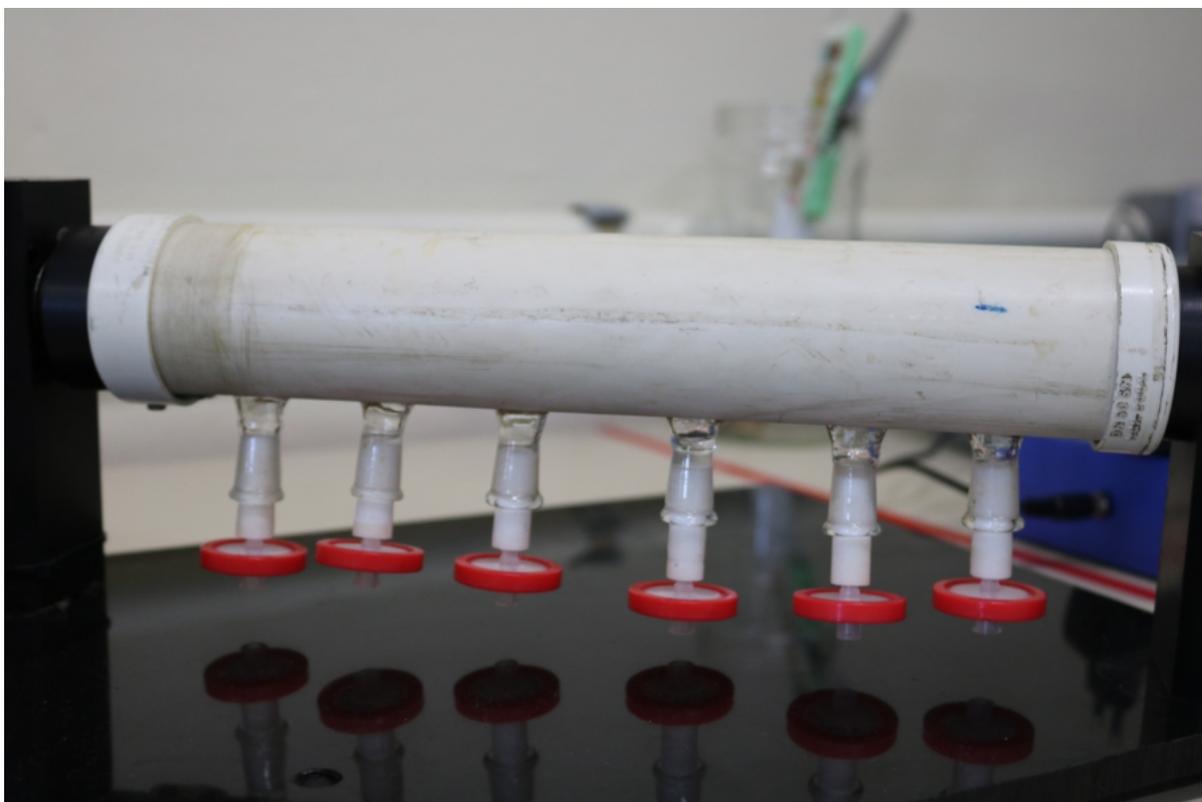


Figura 13 – Equipamento em movimento (180°)