

**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA E  
NEMATOLOGIA**

**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”  
Universidade de São Paulo**

**EXERCÍCIOS PRÁTICOS DE  
MICROBIOLOGIA**

**Coordenador: Prof. Jorge A. M. Rezende**

**Organizadores: Ana P. O. Amaral Mello**

**Ângelo A. B. Sussel**

**Eliane G. da Silva**

**Luis F. C. Ribeiro**

**Janayna M. Barbosa**

**Jorge A. M. Rezende**

**Raquel de C. Neroni**

**Ricardo Ferrari Silva**

**Scheila C. Maciel**

**Sylvia R. G. Moraes**

**PIRACICABA, SP**

**2014**

## **PREFÁCIO**

As aulas práticas da disciplina LEF-321 Microbiologia envolvem diversos exercícios práticos que são realizados e avaliados pelos alunos, tais como coloração e mobilidade de bactérias, análise das características morfológicas de fungos, preparo e esterilização de meio de cultura, efeito da luz e temperatura no crescimento e esporulação de microrganismos, fixação de nitrogênio atmosférico, entre outros.

Com o objetivo de proporcionar aos alunos um material didático mais adequado para melhorar o aprendizado foi elaborada a presente apostila que, antes de cada exercício, traz alguns conceitos básicos sobre o tema a ser trabalhado em sala de aula. Com isso, espera-se que o aluno disponha de uma melhor referência para estudos e eventuais consultas futuras.

Essa apostila foi organizada, em 2005, pelos alunos do programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Ângelo Aparecido Barbosa Sussel (mestrado), Janayna Magalhães Barbosa (doutorado), Raquel de Cássia Neroni (mestrado), Ricardo Ferrari Silva (doutorado) e Scheila da Conceição Maciel (doutorado), sob a coordenação do Professor Jorge Alberto Marques Rezende. Em 2007, a apostila com os Exercícios Práticos em Microbiologia foi atualizada pelos alunos do programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Ana Paula de Oliveira Amaral Mello (doutorado), Eliane Gonçalves da Silva (doutorado), Luiz Fernando Caldeira Ribeiro (doutorado) e Sylvia Raquel Gomes Moraes (doutorado), sob a supervisão do mesmo Professor. Todas as informações contidas na apostila foram compiladas de livros textos que tratam dos temas dos exercícios e que estão listados na Bibliografia Consultada.

**OS ORGANIZADORES**

## SUMÁRIO

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| REGRAS BÁSICAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO .....                         | 4  |
| 1 - MICROSCOPIA DE LUZ.....                                              | 6  |
| 2 - COLORAÇÃO E MOTILIDADE DE BACTÉRIAS .....                            | 11 |
| 3 - REINOS CHROMISTA E FUNGI .....                                       | 16 |
| 4. REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS E MEIOS DE CULTURA DE MICRORGANISMOS ..... | 27 |
| 5. CULTIVO E CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS .....                         | 36 |
| 6 - CONTROLE QUÍMICO E FÍSICO DE MICRORGANISMOS.....                     | 46 |
| 7 - CONTROLE BIOLÓGICO DE MICRORGANISMOS – ANTAGONISMO .....             | 57 |
| 8 - PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS.....                                          | 61 |
| 9 - ISOLAMENTO DE FUNGOS E BACTÉRIAS DO SOLO.....                        | 66 |
| 10 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E TRATAMENTO DA ÁGUA .....                   | 70 |
| 11 - FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....                                          | 78 |
| 12 – FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....                                          | 87 |
| BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....                                             | 95 |

## REGRAS BÁSICAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO

A segurança no laboratório exige o mesmo tipo de atenção contínua que se dedica à pesquisa. Cada pessoa tem a responsabilidade de conhecer os riscos à saúde e à segurança, os quais estão relacionados com o correto manuseio dos produtos químicos, dos equipamentos e das técnicas, de modo que possa estabelecer disposições e procedimentos que diminuam a ocorrência de acidentes.

As experiências que se realizarão são certamente novidades para alguns dos estudantes, com pouca experiência laboratorial. Importa, por isso, prevenir. É preciso proteger a saúde do próprio experimentador e de terceiros, que também poderão ser alvo de práticas menos adequadas. O sucesso das experiências dependerá do grau de rigor com que as mesmas forem executadas e dos baixos níveis de contaminações cruzadas que for possível manter.

Assim, o acesso ao laboratório de microbiologia é restrito às pessoas qualificadas, que incluem os estudantes apenas durante os períodos de aulas previstos. Como sugestão, recomenda-se o uso de um jaleco comprido, limpo e devidamente ajustado ao corpo, para proteger o operador e o seu vestuário de eventuais acidentes. Desta forma, além de proteger o experimentador, o jaleco minimiza o transporte de microrganismos exteriores para o laboratório, permitindo a manutenção de uma baixa carga de contaminantes evitando também a propagação indesejável no exterior dos microrganismos manipulados no laboratório.

É expressamente proibido comer, beber, fumar, manipular lentes de contato ou aplicar cosméticos durante a execução de experiências laboratoriais. É aconselhável adquirir o hábito de manter as mãos longe da boca.

O local de trabalho deverá estar sempre devidamente limpo, para tanto, o aluno deve sempre proceder à desinfestação da bancada antes de iniciar os trabalhos, para não permitir a contaminação das próprias experiências com microrganismos de sessões anteriores, e posteriormente para minimizar a propagação dos microrganismos com os quais acabou de manipular.

Todo o equipamento e material de laboratório utilizado durante a experimentação, deverá ser repostado no local indicado depois de concluída a sua utilização. Particularmente, as placas e tubos contaminados deverão ser desinfestados ou colocados em local próprio para descontaminação.

Qualquer acidente deverá ser imediatamente reportado ao responsável pela sessão de trabalho.

Não iniciar qualquer experiência sozinho. O conhecimento e compreensão prévia dos procedimentos experimentais e a efetiva disponibilidade de todos os recursos materiais necessários constituem elementos importantes para o sucesso dos experimentos.

o

# 1 - MICROSCOPIA DE LUZ

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos microrganismos se deve ao holandês Antony Van Leeuwenhoek (1632 – 1723), que combinava uma rara destreza na construção de microscópios simples com uma também rara habilidade como observador e intérprete científico. Como nos séculos 17 e 18 não existiam cientistas profissionais, como compreendemos o termo hoje, todos aqueles que se dedicavam às atividades científicas o faziam entre outras atribuições que lhes proporcionavam o sustento ou por já disporem de fortuna pessoal. Assim, todas as grandes descobertas deste período, em todos os campos da ciência, foram realizadas por amadores. Leeuwenhoek, apesar de possuir pouca educação formal e nunca ter frequentado uma Universidade, foi capaz de descobertas importantíssimas, as quais foram registradas em uma longa série de cartas escritas em holandês, que foram posteriormente traduzidas para o inglês e publicadas nos Anais da Sociedade Real de Londres.

Os microscópios de Leewenhoek pouco se parecem com os instrumentos que hoje nos são familiares. A lente, única, diminuta e quase esférica, esmerilada com grande cuidado, era montada entre duas pequenas placas metálicas. O exemplar era colocado na ponta rombóide de um alfinete afixado à placa posterior e trazido ao foco por manipulação de dois parafusos que variavam a posição do alfinete em relação a lente. Durante esta operação, o observador segurava o instrumento com a outra face muito próxima ao seu olho e procurava enxergar através da lente. Nenhuma mudança na amplificação era possível, visto que a capacidade magnificadora de cada microscópio era uma propriedade intrínseca de sua única lente. Apesar da construção grosseira, os microscópios de Leewenhoek proporcionaram aumentos de 50 a até cerca de 300 vezes o diâmetro. A amplificação máxima que ele pôde conseguir foi pouco menos de um terço da maior amplificação proporcionada por um moderno microscópio de luz composto.

O lugar de Leewenhoek na história científica não se deve tanto à sua habilidade em construir microscópios, embora ela tenha sido essencial, mas ao extraordinário alcance e à acuidade de suas observações microscópicas. Ele era dotado de um excepcional grau de curiosidade e estudou quase todos os objetos passíveis de serem visualizados através de um microscópio. Seu maior merecimento repousa, entretanto, em sua descoberta do mundo microbiano, cuja existência, em toda a sua variedade e profusão, revelou à humanidade.

Apesar das descobertas de Leewenhoek, a exploração do mundo dos micróbios não progrediu por mais de um século após sua morte. As principais razões desse longo atraso parecem ter sido de ordem técnica dos microscópios disponíveis na época. Os mais importantes progressos ópticos, que conduziram um dia aos microscópios compostos da qualidade dos que hoje empregamos, iniciaram-se aproximadamente em 1820, estendendo-se pelos cinco decênios subsequentes.

Desde as descobertas de Leewenhoek, ficou claro que o microscópio é ferramenta básica no estudo de microrganismos. Por isso, ter uma compreensão geral dos princípios físicos que constituem a base de seu funcionamento, bem como das técnicas especiais de preparação dos espécimes, são necessários para o estudo microscópico de material biológico.

## 2. MICROSCÓPIO DE LUZ

No período de 1860 a 1890 a construção do microscópio foi colocada em bases racionais, principalmente por Abbe, que foi o primeiro a compreender claramente as bases físicas da microscopia. Poder-se-ia pensar que o poder de ampliação de um microscópio poderia ser aumentado indefinidamente, pela introdução de um número cada vez maior de lentes de aumento, corrigidas quanto à aberração. No entanto, isto é impossível, como Abbe foi o primeiro a reconhecer, porque uma outra propriedade do sistema de lentes, seu PODER DE RESOLUÇÃO, estabelece uma limitação. O poder de resolução é a capacidade de mostrar, como distintos e separados, dois pontos muito próximos entre si. O poder de resolução é uma medida do tamanho do menor objeto que pode ser visto ao microscópio, e que pode ser calculado pela equação de Abbe, indicada abaixo. Se o objeto for menor do que o poder de resolução, haverá sobreposição da sua imagem com as imagens dos pontos adjacentes, e ele não será distinguido. Dois fatores governam o poder de resolução de um microscópio: uma propriedade da lente conhecida como sua abertura numérica; e o comprimento de onda da luz usada para a iluminação.

Equação de Abbe:  **$d = 0,612 \lambda/n \text{ sen } \alpha$**

onde:

d = poder de resolução

$\lambda$  = comprimento de onda da luz

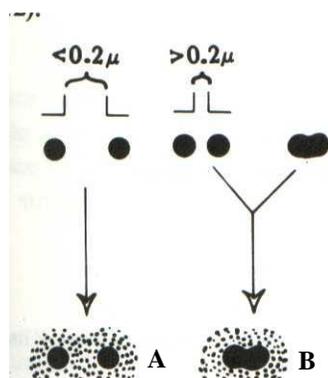
n = índice de refração do meio entre o objeto e a objetiva

$\alpha$  = metade do cone de luz que passa pelo objeto e atinge a objetiva.

n sen  $\alpha$  = abertura numérica

Para todas as finalidades práticas, o comprimento de onda da luz é fixo. Portanto, qualquer melhoria no poder de resolução, com lentes de elevado aumento, terá que ser baseada no aumento da abertura numérica. A abertura numérica depende de dois fatores: diâmetro da objetiva em relação à sua distância focal e índice de refração da substância existente entre a lente e o objeto examinado, e da matriz onde o objeto se encontra. No que se refere à lente, existem dificuldades ópticas que estabelecem um limite ao aumento da abertura numérica. Um recurso muito utilizado para aumentar a abertura numérica é aumentar o índice de refração do meio entre o objeto examinado e a objetiva, preenchendo-o com um líquido que tenha um índice de refração mais elevado que o do ar. O óleo de cedro é o mais usado para esse fim. As lentes empregadas com esse óleo são chamadas objetivas de imersão.

Qual é o menor objeto que pode ser nitidamente observado com um bom microscópio composto? Isso pode ser calculado considerando-se que:  $n$  = deve ser maior do que o índice de refração do ar que é igual a um. Isso pode ser obtido com o óleo de imersão, cujo  $n = 1,5$ ;  $\alpha$  deve ser o mais próximo possível de  $90^\circ$ ; e  $\lambda$  deve ser próximo de  $4000 \text{ \AA}$  (luz violeta) que é o menor comprimento de onda que sensibiliza o olho humano. Assim, com  $n = 1,5$  e  $\sin \alpha = 0,87$  (que é típico para uma lente de imersão) e  $\lambda = 4000 \text{ \AA}$ , a resolução ( $d$ ) teórica obtida é de  $0,2 \mu$ . Em outras palavras, dois pontos que não estão separados por pelo menos essa distância não serão vistos como pontos distintos, mas sim como uma única imagem, como ilustrado na figura 1.



**Figura 1.** A) Dois pontos separados por aproximadamente  $0,2 \mu$ ; B) Dois pontos separados por menos de  $0,2 \mu$  (Wischnitzer, 1988).

### **3. DESCRIÇÃO DE UM MICROSCÓPIO DE LUZ**

A figura 2, na página de exercícios, ilustra um moderno microscópio composto. Vamos em primeiro lugar seguir a trajetória de luz no instrumento. A luz é refletida por um espelho plano, para o condensador. O condensador é móvel e, para se obter a máxima resolução com grandes aumentos, deve focalizar a luz no plano do objeto. O condensador é equipado com um diafragma. Este tem a função de controlar o feixe luminoso que penetra no sistema de lentes do condensador. A sua função, portanto, não é, como muitos pensam controlar a quantidade de luz que penetra no microscópio, mas reduzir o ângulo do cone de luz de modo que, depois de atravessar o objeto e divergir para a objetiva, ele não exceda o diâmetro desta lente. Dessa forma, a luz que alcança os olhos não passa através da periferia da objetiva, que é de difícil correção. A luz que passa para o sistema da objetiva é focalizada no sistema de lentes da ocular, depois de passar pelo tubo do microscópio.

As objetivas do microscópio são fixadas a uma peça giratória, que pode alinhar qualquer delas com o resto do sistema óptico, permitindo, assim, fácil e rápida mudança de aumento.

O objeto é examinado em uma lâmina de vidro colocada sobre uma superfície plana horizontal, que possui um acessório para mover a lâmina.

Há dois tipos de ajustes para a focalização do sistema de lentes: o macrométrico, que move o sistema numa distância vertical de vários centímetros e serve para trazer o objeto ao foco aproximado; o micrométrico, que atua numa distância muito menor, e é utilizado para a focalização final.

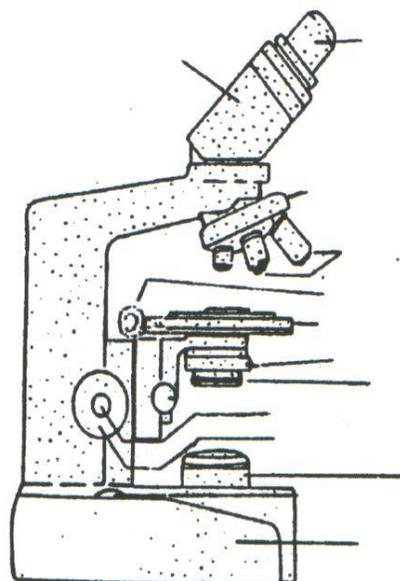
### **4. CUIDADOS COM O MICROSCÓPIO**

- ❖ Nunca forçar; deve-se trabalhar livremente;
- ❖ Limpeza: particularmente, as lentes de imersão devem ser limpas com algodão;
- ❖ Nunca tocar as lentes com as mãos; se necessário, limpar com algodão ou papel apropriado;
- ❖ As lentes das objetivas nunca devem tocar a lâmina; nunca fazer a focalização abaixando o canhão com o botão macrométrico, olhando pelas oculares;
- ❖ Não inclinar o microscópio;
- ❖ Após o uso, guardar em local apropriado e protegido.

## 5. EXERCÍCIOS

1. Identifique os componentes básicos do microscópio:

- a) Base
- b) Platina ou mesa
- c) Charriot
- d) Canhão ou tubo
- e) Revólver
- f) Objetivas
- g) Ocular
- h) Parafuso macrométrico
- i) Parafuso micrométrico
- j) Condensador
- k) Diafragma
- l) Fonte de luz ou iluminador



**Figura 2.** Microscópio composto

- 2) O que é o poder de resolução de um microscópio de luz? Qual o menor objeto que pode ser adequadamente visualizado em um microscópio de luz?
- 3) Para que serve o óleo de imersão?
- 4) Explique como foram feitas a montagem da lâmina e a observação do fungo ao microscópio.
- 5) Esquematize o fungo examinado ao microscópio, indicando o aumento utilizado.

## 2 - COLORAÇÃO E MOTILIDADE DE BACTÉRIAS

### 1. INTRODUÇÃO

Bactérias são microrganismos procarióticos invisíveis a olho nu. A dimensão de uma célula bacteriana é da ordem de micrometro ( $\mu\text{m}$ ), que corresponde a 1/1000 mm. As células bacterianas, dependendo da espécie, variam em tamanho. Por exemplo, *estafilococcus* e *estreptococcus* são bactérias esféricas com diâmetro variando de 0,75 a 1,25  $\mu\text{m}$ , enquanto que as bactérias causadoras de tifo e disenteria, que são cilíndricas, medem 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de largura por 2 a 3  $\mu\text{m}$  de comprimento.

As células bacterianas podem ser de três tipos: esférica, cilíndrica ou espiralada. As células esféricas são denominadas cocos. As bactérias cilíndricas, ou do tipo bastonetes, são chamadas de bacilos. Aquelas espiraladas recebem o nome de espirilo.

Embora algumas bactérias aparecem na forma de células individuais, muitas espécies crescem em arranjos bem definidos. Esses arranjos são típicos das espécies e podem ser utilizados para fins de identificação. Por exemplo, bactérias do tipo cocos podem apresentar diferentes arranjos, tais como diplococos, estreptococos, tétrades estafilococos e sarcinas. As bactérias do tipo bacilos, diferentemente das anteriores, geralmente não formam arranjos característicos, embora haja exceção.

Algumas células bacterianas podem apresentar estruturas externas, tais como flagelos e pêlos (pili/pilus). Os flagelos são estruturas filamentosas, do tipo de um fio de cabelo, com formato helicoidal, que propela a bactéria em um meio líquido. Os flagelos são geralmente mais longos que a célula, atingindo 15 a 20  $\mu\text{m}$ , mas o diâmetro é apenas uma pequena fração do diâmetro da célula, isto é, 12 a 20 nm (1 nm = 1/1000  $\mu\text{m}$ ). Por isso, os flagelos não podem ser vistos em um microscópio de luz, cujo poder de resolução é da ordem de 0,2  $\mu\text{m}$  ou 200 nm. No entanto, há processos especiais de coloração, que precipitam o corante na superfície do flagelo, tornando-o mais grosso e assim, visível ao microscópio de luz.

Muitas bactérias também apresentam estruturas externas que não estão relacionadas com motilidade e que são denominadas pêlos. O pêlo tem um diâmetro menor que o flagelo (3 a 10 nm), além de ser menor e reto. O pili está associado a diversas funções, entre as quais a reprodução sexuada da bactéria, aderência da célula bacteriana no hospedeiro, etc. O pili só é visto em microscópio eletrônico.

## **2. PAREDE CELULAR**

A parede celular dos procariotos é uma estrutura rígida que mantém a forma de cada célula bacteriana. A estrutura é tão rígida que condições de alta pressão ou qualquer outra condição adversa dificilmente alteram o formato de uma bactéria. Dependendo da espécie e das condições de crescimento da bactéria, a parede celular pode representar de 10 a 40 % do peso seco da célula.

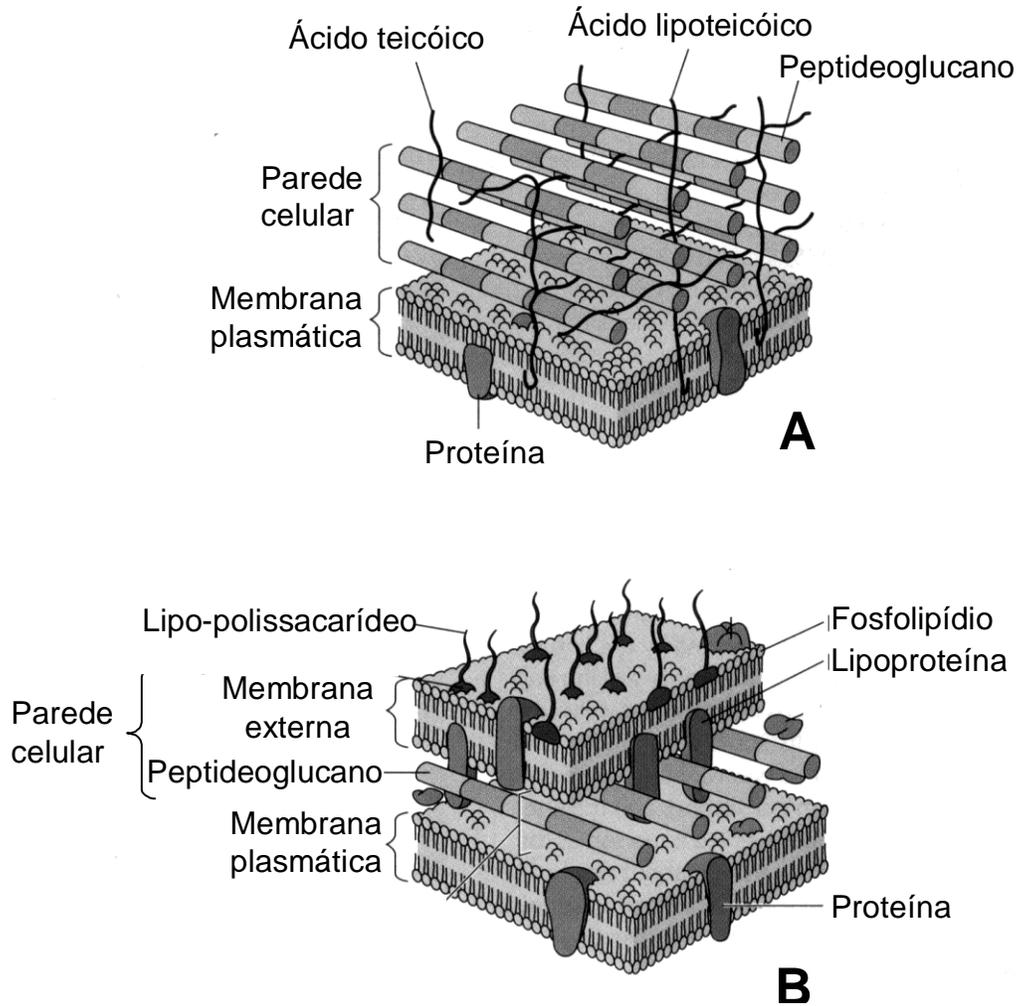
A parede celular da bactéria não é uma estrutura homogênea, mas sim constituída por camadas de diferentes substâncias que variam em espessura e composição. Essas diferenças são úteis para a identificação e classificação das bactérias. Dependendo da constituição da parede celular, as bactérias são classificadas em Gram positivas ou Gram negativas.

A parede celular das bactérias Gram positivas geralmente possui uma camada espessa de peptidoglicano. A parede celular das bactérias Gram negativas é mais complexa do que a das anteriores. As bactérias Gram negativas possuem uma membrana externa que cobre a camada de peptidoglicano, que é mais delgada que a encontrada nas bactérias Gram positivas. Nas bactérias Gram negativas, a camada de peptidoglicano representa somente 5 a 10 % do peso seco da parede celular da bactéria. Essa camada de peptidoglicano está localizada no espaço periplasmático, entre a membrana plasmática e a membrana externa. A membrana externa, ausente em bactérias Gram positivas, é constituída de fosfolípidios e encontra-se ancorada na camada de peptidoglicano por meio de moléculas lipoprotéicas (Figura 3).

Os milhares de espécies de bactérias são diferenciados através de análise de diferentes características, tais como morfologia, presença e tipo de flagelos, composição química da parede celular (Gram), requerimentos nutricionais, atividades bioquímicas e fonte de energia e sequência de nucleotídeos do DNA genômico.

## **3. MÉTODOS DE COLORAÇÃO DE BACTÉRIAS**

Os métodos de coloração de bactérias são utilizados para caracterização morfológica, visualização de flagelos, identificação da composição da parede celular, etc. Esse conjunto de informações é útil na identificação da espécie bacteriana.



**Figura 3.** Estrutura da parede celular de uma bactéria Gram positiva (A) e Gram negativa (B).

### 3.1 COLORAÇÃO DIRETA

A coloração da célula bacteriana com um único corante é chamada de coloração direta, simples ou positiva. As principais etapas da coloração direta são:

- fazer um esfregaço da suspensão bacteriana na lâmina de vidro;
- fixar o esfregaço na lâmina através do calor;
- cobrir o esfregaço com o corante (safranina ou fuccina) por um minuto;
- lavar gentilmente a lâmina com água, secar com o calor e observar.

### **3.2 COLORAÇÃO INDIRETA**

Na coloração indireta ou negativa, o meio (lâmina) fica corado, pois a célula bacteriana não absorve o corante.

- a) fazer um esfregaço da suspensão bacteriana na lâmina de vidro;
- b) fixar o esfregaço na lâmina através do calor;
- c) colocar uma gota do corante (Nanquim) em uma extremidade da lâmina, distante do esfregaço;
- d) com o auxílio de outra lâmina, na posição inclinada, arrastar o Nanquim sobre o esfregaço, de tal sorte que forme uma película bem fina do corante;
- e) secar no ar e observar.

### **3.3 COLORAÇÃO DIFERENCIAL OU DE GRAM**

Uma das técnicas mais importantes de coloração diferencial para bactéria é a coloração de Gram. Essa técnica foi primeiramente descrita em 1884, pelo médico dinamarquês Christian Gram. Ele desenvolveu esse método quando estava procurando meios para localizar células de pneumococos em tecido pulmonar de pacientes que morreram de pneumonia. As principais etapas da coloração de Gram são:

- a) fazer um esfregaço da suspensão bacteriana na lâmina de vidro;
- b) fixar o esfregaço na lâmina através do calor;
- c) cobrir o esfregaço com cristal violeta por um minuto;
- d) cobrir o esfregaço com solução de iodo (30 segundos), que irá fixar o cristal violeta dentro da célula bacteriana;
- e) lavar com álcool, que irá remover o corante da bactéria Gram negativa;
- f) cobrir o esfregaço com safranina (um minuto), que irá colorir as células que foram descoloridas pela ação do álcool.
- g) Lavar com água, secar no calor e observar.

As bactérias que retêm o cristal violeta e adquirem uma coloração violeta são chamadas de Gram positivas. As bactérias que perdem o cristal violeta com a ação do álcool e que adquirem a coloração vermelha proporcionada pela safranina são chamadas de Gram negativas. Essa diferença na coloração está relacionada com a espessura e composição da parede celular dessas bactérias. Durante o processo inicial de coloração descrito acima, há a formação de um complexo cristal violeta + solução de iodo no interior da célula bacteriana. Quando a célula de uma bactéria Gram negativa é lavada com

álcool, os lipídeos localizados na membrana externa são dissolvidos e removidos. Isso promove o rompimento da membrana externa e aumenta a sua permeabilidade. Com isso o complexo cristal violeta + iodo é lavado. A célula descolorida da bactéria Gram negativa adquire a coloração vermelha proporcionada pelo corante safranina. No caso das células de uma bactéria Gram positiva, o álcool promove o fechamento dos poros existentes na espessa camada de peptidoglicano, retendo o complexo cristal violeta + iodo dentro da célula (Figura 3).

#### **4. MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MOTILIDADE**

A motilidade de células bacterianas, que é um indicativo da presença de flagelos, é visualizada em uma gota da suspensão bacteriana, observada em uma lâmina especial que possui uma área côncava no centro. O procedimento denominado “gota pendente” consiste das seguintes etapas:

- a) colocar uma gota da suspensão bacteriana em uma lamínula;
- b) inverter a lamínula e colocá-la sobre a lâmina, de tal sorte que a gota fique pendente no centro da área côncava;
- c) observar a motilidade das células bacterianas

#### **5. EXERCÍCIOS**

- 1) Quais as formas básicas das células bacterianas e qual seu tamanho médio?
- 2) Por que as bactérias gram positivas aparecem coradas de azul e as gram negativas de rosa no método de coloração de Gram?
- 3) Quais as principais características utilizadas para a identificação dos milhares de espécies de bactérias?
- 4) Esquematize as bactérias vistas ao microscópio indicando o aumento utilizado.

### 3 - REINOS CHROMISTA E FUNGI

#### 1. INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 10 milhões de espécies de organismos vivos na face da Terra, dos quais os microrganismos compreendem a grande maioria. Com isso, há necessidade de ordená-los em grupos baseados nas suas similaridades. O primeiro sistema de classificação de organismos surgiu em meados do século 18, proposto pelo médico e botânico suíço Carolus Linnaeus. Esse sistema possuía dois reinos: Plantae e Animalia. Nesse sistema, Linnaeus agrupou os protozoários no reino Animalia, e outros microrganismos dentro do reino Plantae. Esse sistema tornou-se pouco prático para os microrganismos, pois alguns deles eram semelhantes às plantas, outros aos animais, enquanto alguns possuíam características de ambos. Em 1866, o zoologista alemão Ernst H. Haeckel propôs um terceiro reino para solucionar esse problema. Esse reino, denominado Protista, incluía todos os microrganismos tais como bactérias, algas, leveduras e protozoários. À medida que mais informações foram sendo obtidas a respeito das estruturas internas desses microrganismos, o reino Protista passou a ser questionado.

Em meados do século 20, após a invenção do microscópio eletrônico, houve um avanço significativo nos estudos das estruturas internas das células. A descoberta mais importante em termos taxonômicos foi a de que as células podiam ser divididas em duas categorias, com base no núcleo: **eucarióticas**, que possuem uma membrana celular envolvendo o núcleo, separando-o assim do citoplasma e **procarióticas**, que não possuem o material nuclear envolto por uma membrana, sendo então disperso no citoplasma. Essa diferença foi a base para separar as bactérias de outros reinos de microrganismos, além das plantas e animais. Bactérias possuem células procarióticas. Algas, fungos, protozoários, plantas e animais possuem células eucarióticas.

Em 1969, Robert H. Whittaker expandiu o sistema de classificação proposto por Haeckel e apresentou um sistema composto por cinco Reinos, levando em consideração as maneiras pelas quais os organismos obtinham o seu alimento (fotossíntese, absorção e ingestão) e a sua organização celular (Eucariótico/Procariótico). Nessa nova classificação, os organismos procarióticos (bactérias) foram alocados no reino Monera. O reino Protista incluía os microrganismos eucarióticos unicelulares: algas, protozoários e fungos limosos. Organismos eucarióticos superiores foram colocados nos reinos Plantae, Animalia e Fungi.

Antes de 1997 acreditava-se que os organismos procarióticos representavam a forma mais primitiva de um organismo, devido a sua estrutura bastante simples. Por isso, foram considerados ancestrais dos eucariotos mais complexos. No entanto, Carl Woese e colaboradores, descobriram que os procariotos e eucariotos aparentemente evoluíram a partir de um ancestral comum, porém por caminhos diferentes. As evidências que apoiaram essa sugestão vieram dos estudos do ácido nucléico ribossomal (rRNA), que é essencial para a síntese de proteínas em todas as células vivas. O rRNA de qualquer organismo possui uma sequência específica de nucleotídeos, cujos genes que controlam essa sequência mudaram lentamente durante os bilhões de anos de evolução dos organismos. A comparação das sequências de nucleotídeos do rRNA permite indicar com maior precisão o grau de relacionamento entre eles. Atualmente, a sequência do rRNA é usada para discernir inter-relações evolucionárias entre os organismos vivos, servindo como cronômetro evolucionário consideravelmente importante. Com isso, ficou claro que havia dois tipos de bactérias, distintos um do outro, designados archaeobacteria e eubactéria.

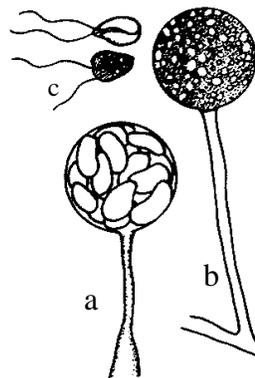
A sequência molecular do RNA ribossomal revelou uma história evolucionária dos organismos vivos bem diferente das anteriores, baseadas principalmente nas relações fenotípicas. Assim, verifica-se hoje que a vida celular tem evoluído em três linhas principais, tendo duas delas permanecido exclusivamente microbianas e compostas por células procarióticas. Essas duas linhas são Bacteria e Archaea. A linha eucariótica é chamada Eukarya. Essas três linhas, originalmente denominadas reinos, foram mais recentemente re-denominadas com o nível taxonômico de domínio.

No Domínio Eukarya, além dos Reinos Protozoa, Animalia e Plantae, também estão os microrganismos dos Reinos Chromista e Fungi, cujos representantes serão estudados em aulas práticas.

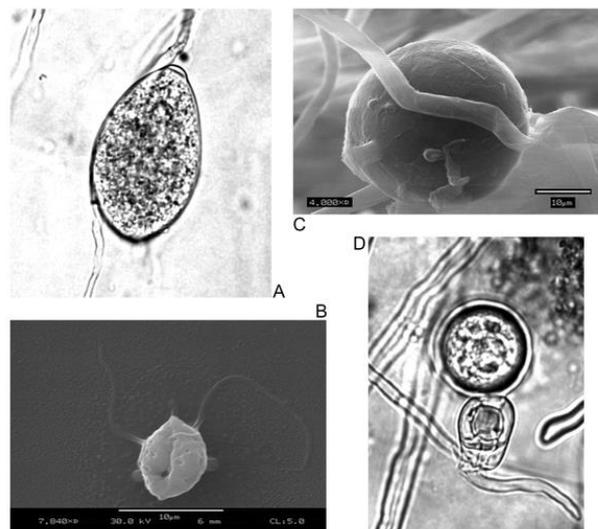
## **2. REINO CHROMISTA**

Os organismos do Reino Chromista são unicelulares ou filamentosos, nutrem-se por fotossíntese ou absorção, possuem celulose na parede celular e presença de flagelos tubulares. Três filos (divisões) anteriormente incluídos no reino Fungi são hoje aceitas dentro do reino Chromista: Hyphochytridiomycota; Labyrinthulomycota e Oomycota. Desses, apenas o último será motivo de estudo em aula prática devido à sua importância com agente causal de doenças de plantas.

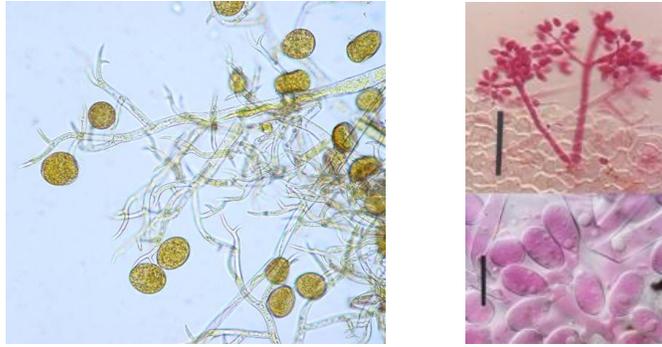
Os Oomycotas diferem dos fungos verdadeiros em relação a várias características estruturais, bioquímicas, fisiológicas e moleculares. São cromistas aquáticos ou terrestres, de água marinha ou doce, saprófitas ou parasitas (alguns economicamente importantes para as plantas). Possuem talo unicelular ou micelial (hifa asseptada), parede celular composta por  $\beta$  1-3 e  $\beta$  1-6 glucana e celulose. Têm como principais estruturas do ciclo assexual o esporângio, os zoósporos com dois flagelos, o esporangióforo e a vesícula (em algumas espécies). Exemplos de Oomycotas que causam prejuízos às plantas são: *Pythium* sp., *Phytophthora* sp, *Plasmopara* sp. e *Peronospora* sp (Figuras 4, 5 e 6).



**Figura 4.** Estruturas de *Pythium* sp.: (a) esporângio (vesícula) contendo zoósporos imaturos; (b) esporângio típico; (c) zoósporos



**Figura 5.** Estruturas reprodutivas de *Phytophthora*. Assexuais: (a) esporângio, (b) zoósporo, (c) clamidósporo e Sexual: (d).



**Figura 6.** Estrutura de *Peronospora* (a) e *Plasmopara* (b): esporangióforo e esporângio

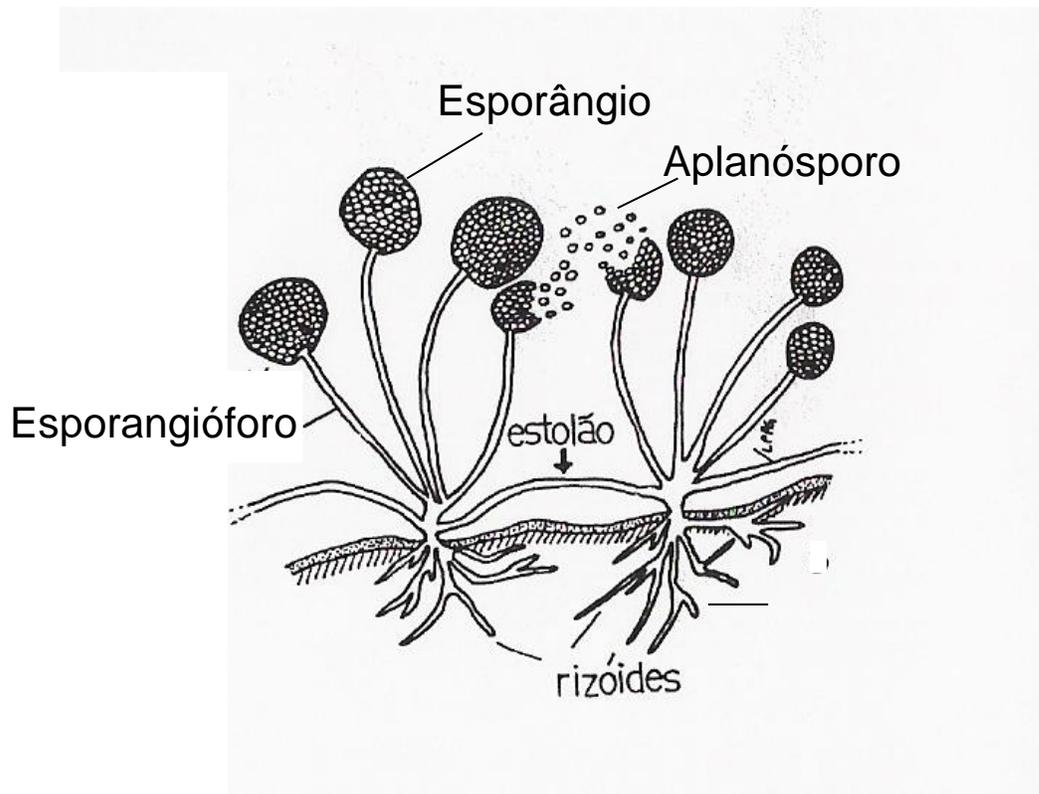
### 3. REINO FUNGI

Os organismos do reino Fungi são unicelulares ou filamentosos (maioria), possuem hifas asseptadas ou septadas, caracterizados pela nutrição por absorção, parede celular constituída basicamente por quitina e fase somática ou vegetativa haplóide ou dicariótica. Os principais filos são: Ascomycota; Basidiomycota; e Zygomycota. Incluem-se também os Fungos Mitospóricos, que são aqueles cuja reprodução sexual é desconhecida ou ausente.

Resumo das principais características de cada filo é apresentado a seguir.

#### ZYGOMYCOTA

O filo **Zygomycota**, classe **Zygomycetes**, compreende todos os fungos que produzem zigósporo (que é um zigoto de origem sexuada), contido em um zigosporângio de parede espessa. São fungos de conjugação, filamentosos saprofíticos que apresentam hifas cenocíticas (sem septos). Um exemplo é o mofo preto do pão (*Rhizopus nigricans*) que produz esporangiospóro (assexuados) situado no esporângio, que ao se abrir dispersa os esporangiospóros (aplanósporos), e esses encontrando local adequado irão germinar formando um novo fungo (Figura 7). O grupo compreende cerca de 600 espécies de fungos, que se desenvolvem principalmente em material vegetal ou animal em decomposição.

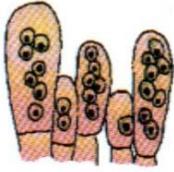


**Figura 7.** Estruturas vegetativa e reprodutiva de zigomicetos (*Rhizopus*).

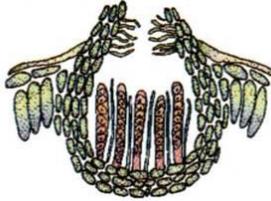
## ASCOMYCOTA

Os **ascomicetos** são fungos da divisão **Ascomycota** que produzem esporos em corpos de frutificação específicos chamados ascos e é um grupo monofilético bem sucedido de cerca de 12.000 espécies (em 1950). Neste grupo incluem-se quase todos os fungos que se associam com algas ou cianobactérias para formar líquenes. Este grupo engloba, também, a maioria dos fungos patogênicos para as plantas.

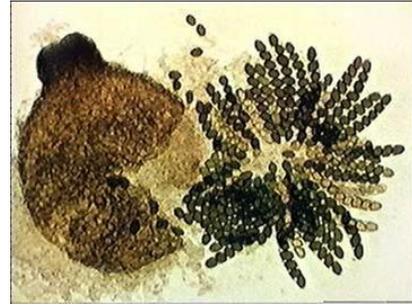
Estes fungos produzem grandes quantidades de ascos de cada vez, que estão contidos numa estrutura (corpo de frutificação) chamada de ascocarpo. Os principais tipos de ascocarpos são: peritécio; cleistotécio; apotécio e ascostroma. Em alguns casos os ascos são desprovidos de corpo de frutificação e por isso são denominados ascos nus (Figura 8). Cada asco produz 8 ascósporos (ou um múltiplo de 8), que resultam de uma mitose seguida de uma meiose. Os núcleos haplóides resultantes estão cercados por uma membranas e, eventualmente, por uma parede esporófito. As hifas dos ascomicotas são divididas por septos.



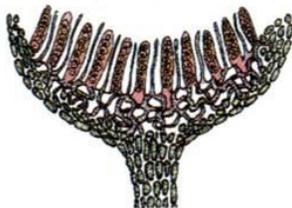
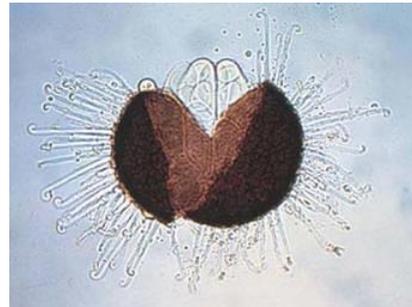
**Ascus nus**



**Peritécio**



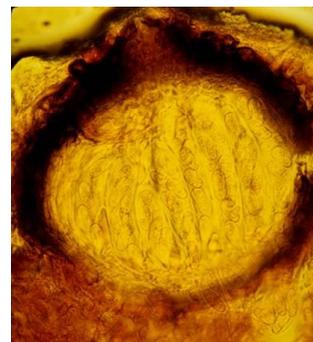
**Cleistotécio**



**Apotécio**



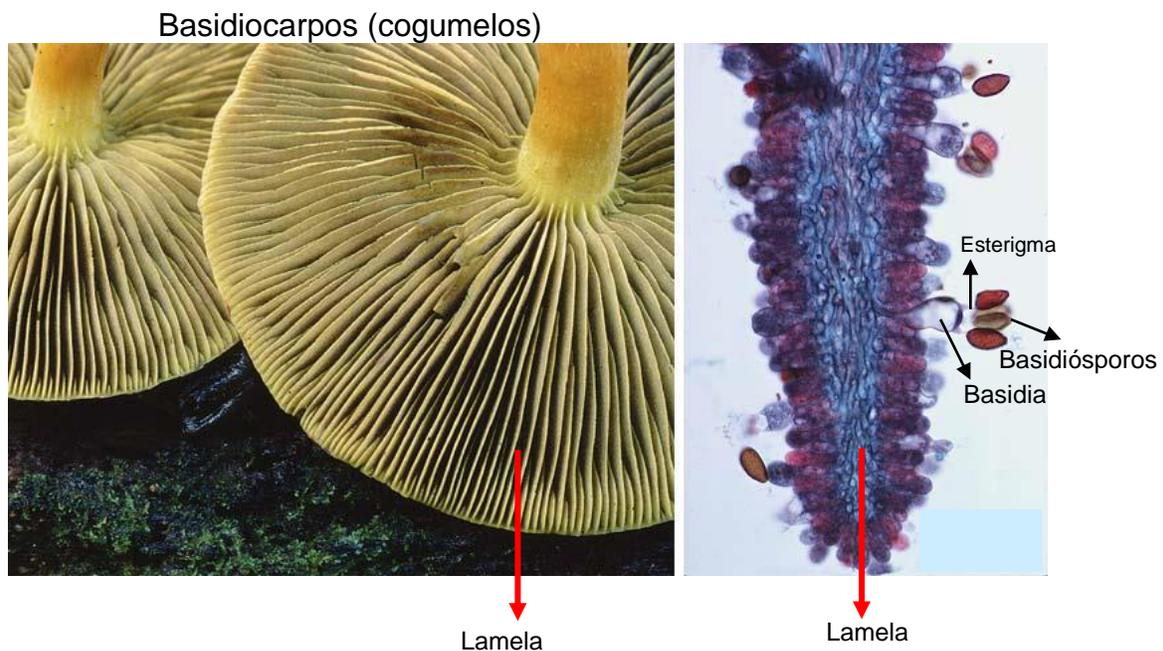
**Ascostroma**



**Figura 8.** Corpos de frutificação (ascocarpos)

## BASIDIOMYCOTA

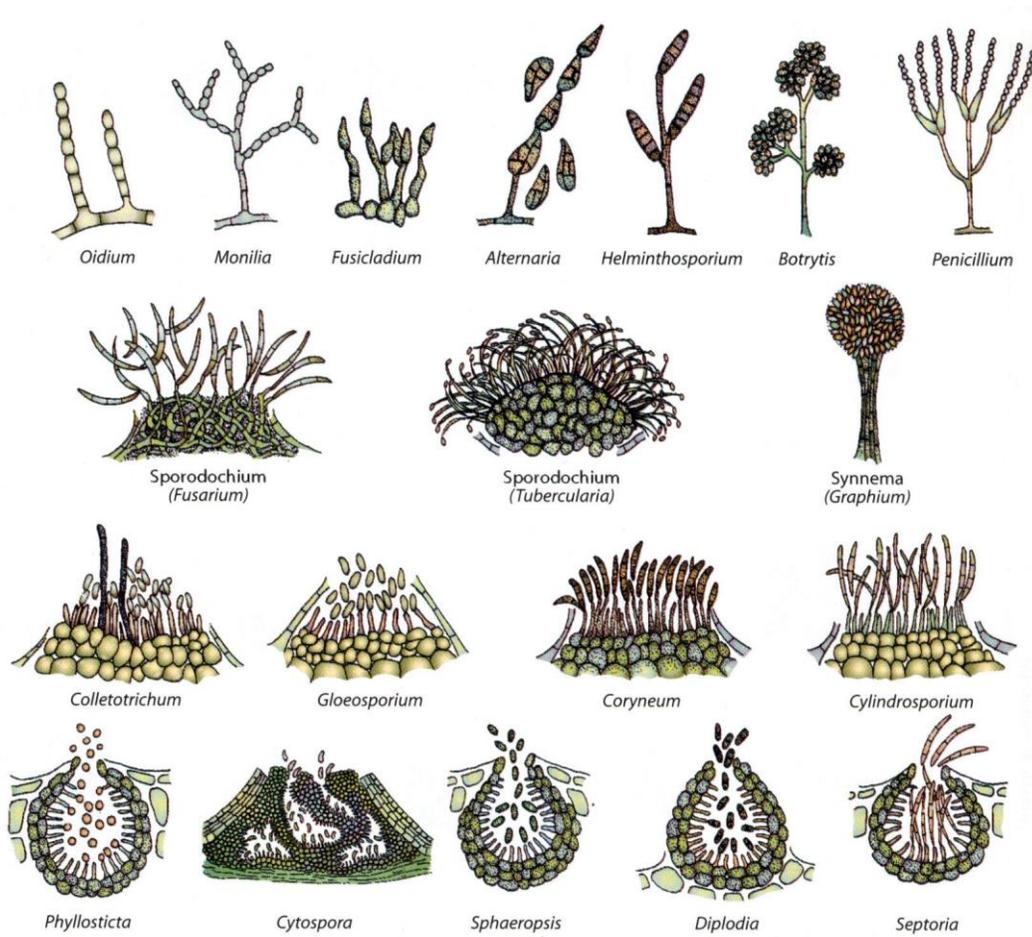
O filo **Basidiomycota** é um grande *taxon* do reino dos fungos que engloba as espécies que produzem esporos exógenos numa estrutura em forma de bastão chamada **basidia** (Figura 9). Essencialmente o grupo irmão dos Ascomycota, contém cerca de 30 000 espécies (37 % dos fungos descritos). Hoje considera-se que os Basidiomycota compreendem três grandes classes: os Hymenomycotina (Hymenomycetes; cogumelos), os Ustilaginomycotina (Ustilaginomycetes; ferrugens dos cereais), e os Teliomycotina (Urediniomycetes; ferrugens). Ocorrem em ambientes terrestres e aquáticos (incluindo o ambiente marinho) e podem ser caracterizados por possuírem hifas septadas, transportarem os esporos sexuais nas **basídias**, por terem um fase dicariótica duradoura, e por apresentarem **ligações em grampo de conexão**.



**Figura 9.** Basidiocarpo (cogumelo) com diversas lamelas onde estão situadas as basídias e os basidióporos (esporos sexuais exógenos).

## FUNGOS MITOSPÓRICOS

A maioria dos fungos é classificada com base nas características dos corpos de frutificação e nos esporos produzidos durante a reprodução sexual. Os fungos mitospóricos, anteriormente chamados de deuteromicetos ou fungos imperfeitos, são aqueles onde o processo sexual é desconhecido ou inexistente. Esse termo atualmente é usado apenas informalmente para denotar formas de reprodução assexuada de membros de Ascomycota e Basidiomycota.



**Figura 10.** Exemplos de conidióforos, conídios e corpos de frutificação de fungos mitospóricos

## 5. EXERCÍCIOS

1. Identifique e esquematize as estruturas dos microrganismos (Oomycota e Zygomycota) observadas ao microscópio de luz, colocando legendas e o aumento utilizado.

|    |    |
|----|----|
| A) | B) |
|----|----|

2. Identifique e esquematize as estruturas fúngicas observadas nos **Ascomicetos**, colocando legendas e o aumento utilizado.

|    |    |
|----|----|
| A. | B. |
|----|----|

3. Identifique e esquematize as estruturas fúngicas observadas nos **Basidiomicetos**, colocando legendas e o aumento utilizado.

|    |    |
|----|----|
| A) | B) |
|----|----|

4. Identifique e esquematize as estruturas observadas nos **Fungos Mitospóricos**, colocando legendas e o aumento utilizado.

|    |    |
|----|----|
| A) | B) |
| C) | D) |

## 4. REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS E MEIOS DE CULTURA DE MICROORGANISMOS

### 1. INTRODUÇÃO

De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados em suas exigências nutricionais. Porém, compartilham algumas necessidades nutricionais em comum com todos os organismos vivos, tais como a necessidade de carbono, de nitrogênio e de água. Logo, em estudos laboratoriais, onde as células microbianas são caracterizadas em relação as suas propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, há requerimento de uma variedade de elementos químicos como nutrientes de meios de cultivo apropriados. Estes elementos são necessários tanto para a síntese como para as funções normais dos componentes celulares. Os elementos químicos principais para o crescimento dos microrganismos são carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo.

Um meio adequado para o desenvolvimento de microrganismos deve incluir as fontes disponíveis de carbono, nitrogênio, de sais inorgânicos, e dependendo do organismo, até mesmo de vitaminas e de outros fatores de crescimento.

**Carbono:** usado para síntese de carboidratos, proteínas, lipídeos;

**Fontes de carbono:** O carbono além de ser uma fonte de energia, é também fonte principal de elementos estruturais e funcionais dos microrganismos. As fontes de C geralmente empregadas são monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos.

Os monossacarídeos são açúcares simples, como glucose (dextrose), frutose, galactose e manose, biologicamente muito importantes para fungos. A glicose é uma fonte de C universal utilizada pela maioria dos fungos.

Os oligossacarídeos são açúcares derivados de 2, 3 ou 4 hexoses, pela perda da água. Os mais comumente empregados são: maltose, celobiose, lactose e sacarose. A não utilização de um dissacarídeo pelo fungo indica sua incapacidade de converter este açúcar em hexoses, enquanto os que utilizam um dissacarídeo possuem enzimas que o hidrolisam em açúcares mais simples. A maltose é um produto da hidrólise do amido, sendo utilizado por quase todos os fungos.

Os polissacarídeos são polímeros de açúcares ou derivados de açúcares. Do mesmo modo, a utilização destas fontes de C pelos fungos depende da sua capacidade na produção de enzimas hidrolíticas que degradam estes compostos em açúcares mais

simples. Portanto, somente os fungos que possuem essas enzimas são capazes de utilizar a celulose, o amido e o glicogênio, para seu crescimento e esporulação.

**Nitrogênio:** é um importante componente dos aminoácidos e ácidos nucleicos que são utilizados na síntese de proteínas. As células eucarióticas não conseguem usar o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), somente algumas bactérias conseguem usar o  $N_2$  dando origem a  $NH_4$ . Portanto, os fungos não fixam nitrogênio atmosférico e não sobrevivem na ausência de uma fonte inorgânica ou orgânica deste.

**Fontes de nitrogênio:** os fungos utilizam o N como elemento estrutural e funcional. As proteínas são compostas de substâncias nitrogenadas e constituem a base do protoplasma. Os fungos diferem na capacidade de utilizar as várias formas de N, mas todas as espécies crescem bem em nitrogênio orgânico, como a asparagina, peptona, caseína, etc. Alguns crescem melhor quando o N inorgânico é adicionado ao meio de cultura, como nitrato de potássio, nitrato de sódio, nitrato de cálcio, os quais são equivalentes, fornecendo N nítrico, porém os seus efeitos fisiológicos são diferentes. Do mesmo modo, os sais de amônia orgânicos e inorgânicos são equivalentes, fornecendo N amoniacal. Os sais de nitrato e de amônia têm efeitos opostos sobre o pH do meio de cultura. Quando um fungo consome o nitrato, o meio se torna alcalino, porém quando a amônia é utilizada pelo fungo, o meio de cultura se torna mais ácido. Em geral, os sais de amônia de ácidos inorgânicos fortes tendem a tornar o meio muito ácido, em relação aos sais de amônia de um ácido fraco.

Outros elementos químicos, também necessários para a sobrevivência de microrganismos são o hidrogênio/oxigênio que se encontram presentes nos muitos compostos orgânicos; o enxofre que participa da síntese dos aminoácidos cisteína, cistina, metionina; o fósforo que é constituinte dos ácidos nucleicos e adenosina trifosfato (ATP); bem como as vitaminas, que são também importantes, pois funcionam como coenzimas nas reações enzimáticas (a maioria dos fungos é deficiente para tiamina e biotina).

Além disso, temos os micronutrientes – Co, Bo, Mo, etc. que são importantes na ativação de certas enzimas.

A alteração do pH do meio impede o desenvolvimento de certos microrganismos. A maioria dos fungos cresce melhor em condições ácidas (pH 5,5 – 6), enquanto que o crescimento de bactérias é, geralmente, favorecido por condições aproximadamente neutras (pH 6-8).

De um modo geral, os meios pobres em carboidratos e ricos em substâncias de origem vegetal induzem ou aumentam a esporulação de fungos fitopatogênicos. Os substratos sem fontes de nutrientes, como ágar-água, são comumente usados quando se deseja que o desenvolvimento do microrganismo em estudo, se dê a partir dos nutrientes presentes no tecido contaminado, do qual se está tentando isolar esses organismos.

## **2. EXERCÍCIO**

- 1) Esquematize o exercício visando a demonstração da utilização do nitrogênio por fungos (na aula será utilizado o fungo *Verticillium* sp.). Comente os possíveis resultados a serem obtidos no exercício.

2) Anote no quadro abaixo o diâmetro (cm) do crescimento da colônia fúngica na presença (asparagina) ou na ausência de nitrogênio no meio de cultivo.

| <b>Balcão</b>      | <b>Com asparagina</b> |                |              | <b>Sem asparagina</b> |                |              |
|--------------------|-----------------------|----------------|--------------|-----------------------|----------------|--------------|
|                    | <b>Placa 1</b>        | <b>Placa 2</b> | <b>Media</b> | <b>Placa 1</b>        | <b>Placa 2</b> | <b>Media</b> |
| <b>1</b>           |                       |                |              |                       |                |              |
| <b>2</b>           |                       |                |              |                       |                |              |
| <b>3</b>           |                       |                |              |                       |                |              |
| <b>4</b>           |                       |                |              |                       |                |              |
| <b>5</b>           |                       |                |              |                       |                |              |
| <b>Media Final</b> |                       |                |              |                       |                |              |

Comente o resultado:

### **3. MEIOS DE CULTURA**

A sobrevivência e o suporte da vida dos microrganismos dependem do fornecimento adequado de nutrientes e de condições para o seu crescimento. Quanto aos nutrientes, grande parte dos microrganismos apenas necessita de substâncias solúveis de baixo peso molecular, usualmente originada pela degradação enzimática de outros nutrientes mais complexos. Uma solução contendo estes nutrientes é designada como meio de cultura. Há uma grande quantidade de meios utilizados no isolamento, na manutenção e na propagação de culturas puras de bactérias e de fungos fitopatogênicos ou não. Um meio adequado para o desenvolvimento de microrganismos deve incluir as fontes disponíveis de carbono, nitrogênio, sais inorgânicos e, dependendo do organismo, até mesmo de vitaminas e de outros fatores de crescimento.

Em geral, os meios de cultura são líquidos, semi-sólidos ou sólidos. Um meio líquido sem agente solidificante é designado por caldo nutritivo. As culturas líquidas são usadas principalmente para aumentar o inóculo de bactérias e de fungos, e para estudar a taxa de desenvolvimento e as propriedades fisiológicas dos organismos, quando, por exemplo, a colônia tem de ser recuperada para pesagem ou para extração química. Os meios líquidos raramente são utilizados para fins de identificação, porque poucos fungos esporulam bem nestas soluções. Os organismos em cultura líquida podem ser cultivados em meio parado (estacionário) ou em meio agitado, num aparelho agitador contínuo ou em ar estéril borbulhante. A agitação proporciona aeração e uniformidade no processo de desenvolvimento de organismos.

Um caldo nutritivo (meio líquido) suplementado com um agente solidificante, usualmente o ágar, origina um meio sólido ou semi-sólido. O ágar é um extrato de algas marinhas, um carboidrato complexo que contém basicamente galactose e possui muito pouco valor nutritivo. O ágar é muito adequado como agente solidificante porque se liquefaz a 100 °C e solidifica a 40 °C. Devido a estas propriedades, os microrganismos, em especial os patogênicos, podem ser cultivados a temperaturas da ordem dos 37 °C sem receios de liquefação do meio solidificado. Um meio de cultura bem solidificado exige uma concentração de ágar da ordem dos 1,5 a 1,8 %. Uma concentração inferior a 1% resulta num meio semi-sólido.

Os meios sólidos normalmente são utilizados no isolamento de bactérias e de fungos para fins de identificação e de preservação de culturas. A grande vantagem e utilidade do meio sólido residem no fato da existência de uma superfície dura, em que os microrganismos podem crescer adequadamente para o isolamento de colônias

separadas. Uma colônia bem definida e isolada constitui uma cultura pura. Além disso, o meio com ágar dissolvido à temperatura elevada, pode ser distribuído por tubos de ensaio que, depois solidificado, servem para cultura em profundidade, para teste da produção de gás ou, em meio inclinado para cultura em rampa, para teste de características ou preservação de culturas.

A maioria dos meios se enquadra em três categorias: 1) sintético ou definido, 2) semi-sintético, e 3) natural ou complexo.

Os meios sintéticos ou definidos são constituídos de ingredientes cuja composição e concentração química é conhecida. Esses meios são úteis nos estudos fisiológicos e descritivos, quando se torna necessário repetir exatamente um lote anterior do meio de cultivo ou registrar os efeitos da retirada ou acréscimo de determinada substância.

Os meios semi-sintéticos assemelham-se aos meios sintéticos quanto a possuírem um conjunto conhecido de ingredientes. Porém, apresentam a diferença de que, pelo menos alguns dos ingredientes são de composição desconhecida ou variável. Um meio sintético, no qual todos os ingredientes são definidos quimicamente, pode ser transformado em semi-sintético, acrescentando-se uma determinada substância, como extrato de levedura. Sabe-se que o extrato de levedura contém certas vitaminas, mas desconhecem-se as quantidades exatas ou a existência de outras substâncias que podem estar presentes. Os meios semi-sintéticos são amplamente utilizados nos trabalhos de rotina e oferecem opção entre os meios sintéticos e naturais.

O meio natural ou complexo é composto, parcial ou integralmente, por produtos naturais, como partes de plantas (folhas, brotos, tubérculos, etc) ou de infusões ou de extratos de materiais de origem vegetal ou animal. Os meios naturais são muito bons e proporcionam a esporulação de fungos que, de outra forma, poderia não ocorrer. Sua principal desvantagem é que podem diferir, significativamente, de lote para lote, não fornecendo assim resultados experimentais confiáveis.

---

Exemplo de cada um destes dois últimos tipos de meio são apresentado a seguir. Meio definido

---

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| NaNO <sub>2</sub>                     | 0.1 g/L   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 0.5 g/L   |
| CaCO <sub>3</sub>                     | 5.0 g/L   |
| MgSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O | 0.2 g/L   |
| FeSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O | 0.005 g/L |
| NaCl                                  | 0.5 g/L   |

---

---

Meio semi-sintético

---

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Tryptona            | 5.0 g/L  |
| Extrato de levedura | 2.5 g/L  |
| Glucose             | 1.0 g/L  |
| Ágar                | 15.0 g/L |

---

Além destes, os meios de cultura podem também ser classificados de outras formas:

- ❖ Meios enriquecidos: O enriquecimento se faz de modo a favorecer o crescimento de determinado organismo. Contêm alguns importantes fatores de crescimento como vitaminas, aminoácidos ou componentes do sangue.
- ❖ Meios seletivos: A utilização deste tipo de meio permite a seleção de um microrganismo particular de uma população em que os microrganismos presentes não conseguem crescer. Os aditivos para tornar estes meios seletivos são os antibióticos ou outros compostos tóxicos;
- ❖ Meios diferenciais: Como o nome indica este tipo de meio permite a separação de microrganismos de diferentes características, como a coloração das colônias ou da região envolvente do meio de cultura.
- ❖ Meios salinos mínimos: São meios quimicamente definidos que contêm apenas os sais inorgânicos indispensáveis ao crescimento bacteriano (o exemplo de meio sintético apresentado anteriormente é um meio salino mínimo).

Alguns meios podem ser considerados, simultaneamente, pertencerem a mais de uma das categorias indicadas. Um ágar salino de manitol, por exemplo, é um meio complexo, diferencial e seletivo.

Nas primeiras tentativas para isolar um patógeno desconhecido, com frequência utiliza-se um meio padrão de isolamento. Por exemplo, ágar nutritivo (NA) para bactérias e ágar-água (AA) ou batata-dextrose-ágar (BDA) para fungos causadores de doenças em plantas. Outros meios mais específicos também podem ser utilizados tanto para fungos como para bactérias. O exame microscópico do tecido infectado, frequentemente, indica o “tipo” de patógeno envolvido – se fungo, bactéria ou actinomicetos, sugerindo desta forma, os meios prováveis a serem utilizados.

#### **4. EXERCÍCIO**

##### **Preparo do meio de batata-dextrose-ágar (BDA)**

- BDA é um meio semi-sintético: composto em parte de material natural de composição desconhecida e em parte de substâncias conhecidas.

- BDA é um meio não seletivo: permite o desenvolvimento de ampla gama de microrganismos.

- Preparo: pesar 1,5 g de ágar, 1,5 g de dextrose (glicose), juntar com 100 mL de caldo de batata cozido (200 g de batata/ litro de água) contidos no Erlenmeyer. Fechar com tampão de algodão, cobrir o bocal com jornal e anotar o número do balcão. Esterilizar em autoclave. Após esterilização, verter em 3 placas de Petri, esterilizadas, no interior de câmara asséptica. Anotar nas placas o número do balcão/turma e examinar na aula seguinte. Observe as placas de Petri contendo meio BDA. Caso algumas placas apresentem o crescimento de fungos e bactérias contaminantes, comentem as possíveis causas e como resolvê-las.

- Observar o funcionamento da autoclave, estufa para esterilização de vidrarias e câmara asséptica ou de fluxo laminar.

1) Diferencie os meios sintéticos dos meios complexos.

2) O que é ágar?

3) Com relação ao crescimento de bactérias e fungos em meios de cultivo: a) qual o pH mais adequado para esses microrganismos? B) Qual a preferência desses microrganismos em relação à quantidade de proteínas e carboidratos no meio?

## 5. CULTIVO E CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

### 1. INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, os cientistas aprenderam a cultivar muitos tipos de microrganismos em laboratório, fazendo-os crescer e mantendo-os viáveis. Os microrganismos são cultivados em meios de cultura, que contêm nutrientes, como dito anteriormente. Além disso, um meio físico apropriado deve ser fornecido para um crescimento ótimo. Os microrganismos apresentam grandes diferenças com relação às condições físicas requeridas para o crescimento. Dentre estas, destacam-se a temperatura, oxigênio, pH e luz.

A maioria dos microrganismos cresce bem nas temperaturas ideais para os seres humanos. No entanto, certas bactérias são capazes de crescer em temperaturas extremas, onde a maioria dos organismos eucarióticos não sobreviveria. Algumas espécies crescem em temperaturas próximas a ponto de congelamento da água, outras crescem em temperaturas tão altas quanto 110 °C. Já o oxigênio é essencial para alguns, porém tóxico para outros. A maioria das bactérias cresce melhor em pH neutro, mas o pH preferido para o crescimento dos fungos é o ácido. Sendo assim, as condições físicas devem ser ajustadas no laboratório para satisfazer as necessidades especiais de crescimento das espécies. Uma vez que as necessidades físicas e químicas são satisfeitas, é possível estudar o modo de crescimento e reprodução de uma espécie de microrganismo. Os microbiologistas devem conhecer quais são as necessidades específicas dos microrganismos para o crescimento, satisfazer estas necessidades e verificar as culturas para ter certeza de que os microrganismos estão se desenvolvendo.

### 2. TEMPERATURA

A temperatura tem uma grande influência no crescimento dos microrganismos. Isso não é surpresa, já que todos os processos de crescimento são dependentes de reações químicas que são afetadas pela temperatura. Ao contrário das células de um mamífero, que crescem em uma variação de temperatura relativamente pequena (próximo a 37 °C), os microrganismos podem crescer em uma faixa muito maior de temperatura. Entretanto, esta variação pode ser maior para alguns que para outros. Por exemplo, a variação para o *Bacillus subtilis* é de 8 a 53 °C, uma variação de 45 °C.

Em temperaturas mais favoráveis para o crescimento, o número de divisões celulares por hora, chamado de **taxa de crescimento**, geralmente dobra para cada

aumento de temperatura de 10 °C. Este comportamento de crescimento é similar ao da maioria das reações catalisadas por enzimas, dando suporte ao princípio de que o crescimento é o resultado de uma série de reações enzimáticas. A temperatura na qual uma espécie de microrganismo cresce mais rapidamente é a **temperatura ótima de crescimento**.

Cada espécie de microrganismo apresenta para seu crescimento uma temperatura mínima, ótima e máxima. Estas são conhecidas como temperaturas “cardinais”. As temperaturas cardinais de uma espécie particular podem variar no ciclo de vida do microrganismo e de acordo com o conteúdo nutricional do meio. A temperatura pode afetar a taxa de crescimento, assim como o tipo de reprodução. A temperatura ótima para o crescimento pode não ser necessariamente a temperatura ótima para toda atividade celular.

Quando se elabora um gráfico relacionando a resposta do crescimento com a variação de temperatura, pode-se observar que a temperatura ótima de crescimento está, normalmente, deslocada para perto da variação máxima de temperatura e, acima desta a velocidade de crescimento decresce rapidamente. Este decréscimo acontece provavelmente porque a alta temperatura inativa sistemas enzimáticos necessários à célula.

O crescimento ótimo (reprodução mais rápida) é representado pela parte superior da curva. As velocidades de reprodução decrescem rapidamente quando a temperatura está pouco acima do ótimo. Nas variações extremas da temperatura a velocidade de reprodução é muito menor que na temperatura ótima.

Os fungos mostram grande diversidade de comportamento nas variações de temperatura e ao poder de resistência ao frio e ao calor. A temperatura não só influi no crescimento da parte vegetativa como também no tamanho e número dos esporos. Os fungos podem em temperaturas desfavoráveis, principalmente frias, permanecer em estado de vida latente, germinando ou voltando a desenvolverem-se desde que as condições de temperatura se tornem propícias.

Em relação ao ótimo de temperatura de um fungo, é importante considerar três fases do desenvolvimento: 1) germinação do esporo; 2) desenvolvimento do micélio e 3) formação de novos esporos. A temperatura ótima para o desenvolvimento do micélio pode não ser ótima para a formação dos esporos e germinação destes. Deste fato decorre certa dificuldade para se determinar à temperatura ótima no desenvolvimento completo de um fungo, levando naturalmente em conta a germinação do esporo, o desenvolvimento do

micélio e a formação de novos esporos. De maneira geral, o ótimo, para quase todos os fungos, está compreendido entre 20 e 30 °C. As altas temperaturas provocam a morte das células vegetativas, e em temperaturas superiores a 40 °C poucos fungos se desenvolvem. Além disso, as altas temperaturas podem provocar as mutações e variações comuns neste grupo de microrganismos. O estudo da resistência dos fungos às altas temperaturas e a determinação do ponto de morte pelo calor é interessante para a aplicação do calor no controle das doenças provocadas pelos fungos.

## **2.1. Classificação dos microrganismos quanto à temperatura necessária para o crescimento**

Os microrganismos podem ser divididos em três grupos primários, de acordo com a variação de temperatura na qual crescem melhor: 1) Psicrófilos ou microrganismos que crescem em baixas temperaturas; 2) Mesófilos ou microrganismos que crescem em temperaturas moderadas e 3) Termófilos ou microrganismos que crescem em altas temperaturas (Figuras 11 e 12).

- **Psicrófilos:** microrganismos que crescem melhor em temperaturas de 15 a 20 °C, embora possam crescer em temperaturas mais baixas. Alguns morrem se forem expostos à temperatura ambiente (por volta de 25 °C) por um tempo curto. As razões fisiológicas para as baixas temperaturas requeridas por esse grupo estrito não são completamente compreendidas. Entretanto, se a temperatura é muito alta, certas enzimas e/ou a membrana citoplasmática podem ser danificadas. As enzimas de células psicrófilas são catalisadoras mais eficientes nas reações que ocorrem em temperaturas baixas. Tais células também são capazes de transportarem solutos através da membrana citoplasmática em temperaturas baixas.

Existem bactérias, fungos, algas e protozoários que são psicrófilos. Eles são encontrados em águas frias e solos tais como os oceanos e as regiões polares. A maioria dos microrganismos marinhos pertence a esse grupo. Em temperaturas de 4 a 10 °C, os microrganismos psicrófilos deterioram o alimento estocado por períodos prolongados. Entre as bactérias, muitas psicrófilas são membros do gênero *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes*.

Os psicrófilos foram inicialmente caracterizados como organismos capazes de crescer a 0°C. No entanto, existem dois grupos diferentes capazes de crescerem nesta temperatura. Um grupo, contendo somente os psicrófilos, pode crescer a 0 °C, mas sua temperatura ótima de crescimento se localiza em 15 °C. A maioria desses organismos é

extremamente sensível a altas temperaturas, sendo incapaz de crescer, por exemplo, a 20 °C. São os organismos encontrados principalmente nas profundezas dos oceanos e em certos locais da região Ártica e, em geral, não causam problemas na preservação dos alimentos. O outro grupo de organismos capaz de crescer a 0 °C apresenta seu crescimento ótimo nas temperaturas de 20 a 30 °C. Estes tipos de organismos aparecem mais frequentemente que os psicrófilos e como podem crescer em temperaturas utilizadas em refrigeradores são mais encontrados em alimentos estragados. Esses organismos são conhecidos como psicrotóxicos e são responsáveis pela degradação dos alimentos.

- **Mesófilos:** A maioria dos microrganismos é mesófilo, crescendo melhor em temperaturas que variam de 25 a 40 °C. As bactérias saprófitas, os fungos, as algas e os protozoários crescem no limite mínimo da variação de temperatura mesofílica. Os microrganismos parasitários de humanos e animais crescem no limite máximo dessa variação. Aqueles que são patogênicos para o homem crescem melhor em torno da temperatura corporal, que é 37 °C. A temperatura ótima de crescimento de muitas bactérias patogênicas fica em torno de 37 °C e, portanto, as incubadoras empregadas em laboratórios clínicos utilizam normalmente esta temperatura. A temperatura elevada de uma febre pode inibir o crescimento de alguns patógenos.

Entre os mesófilos encontramos a maioria dos organismos que comumente degradam os alimentos e que são patogênicos.

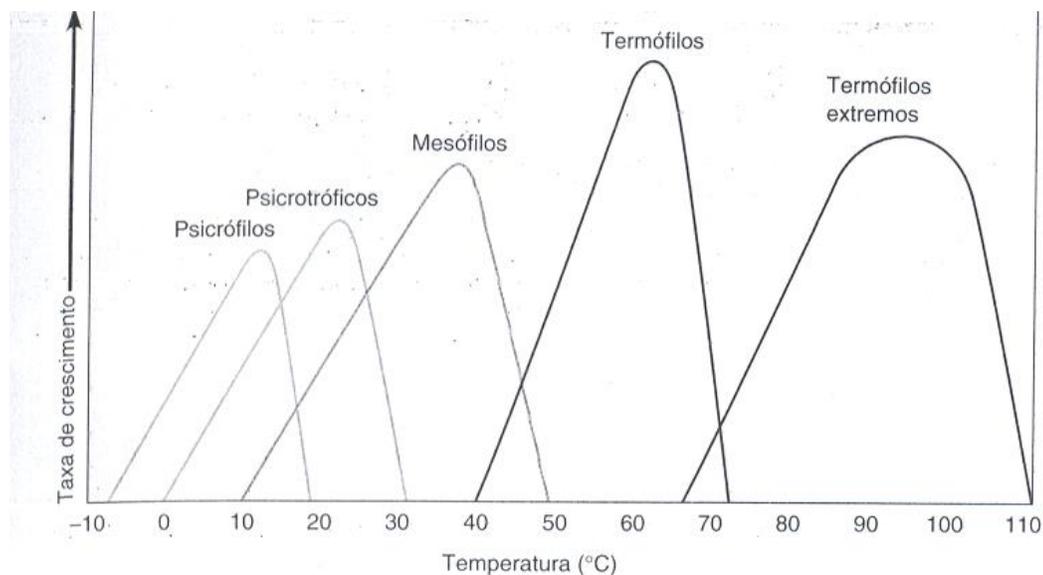
- **Termófilos:** A maioria dos termófilos cresce a temperaturas em torno de 40 a 85 °C, mas eles crescem melhor entre 50 e 60 °C, aproximadamente à temperatura da água presente em uma panela de água quente. Esses microrganismos podem ser encontrados em áreas vulcânicas, em mistura de fertilizantes e em nascentes quentes. A maioria dos microrganismos termofílicos é procariótico, sendo que nenhuma célula eucariótica conhecida cresce em uma temperatura superior a 60 °C (Figura 12).

Um fato impressionante é que muitos termófilos não são capazes de crescer em temperaturas abaixo de 45 °C. Existem muitos fatores que capacitam os termófilos, como o *Bacillus stearothermophilus*, a crescer em temperaturas elevadas. As enzimas dos termófilos são produzidas mais rapidamente que as enzimas dos mesófilos, por isso aquelas que são danificadas pelas altas temperaturas são rapidamente substituídas. Entre os procariotos, certas arqueobactérias são capazes de crescer acima do ponto de ebulição da água. Por exemplo, o *Pyrodictium occultum* pode crescer a 110 °C, o *Pirococcus woesei* cresce a 104,8 °C e o *Thermococcus celer* cresce a 103 °C. Estes

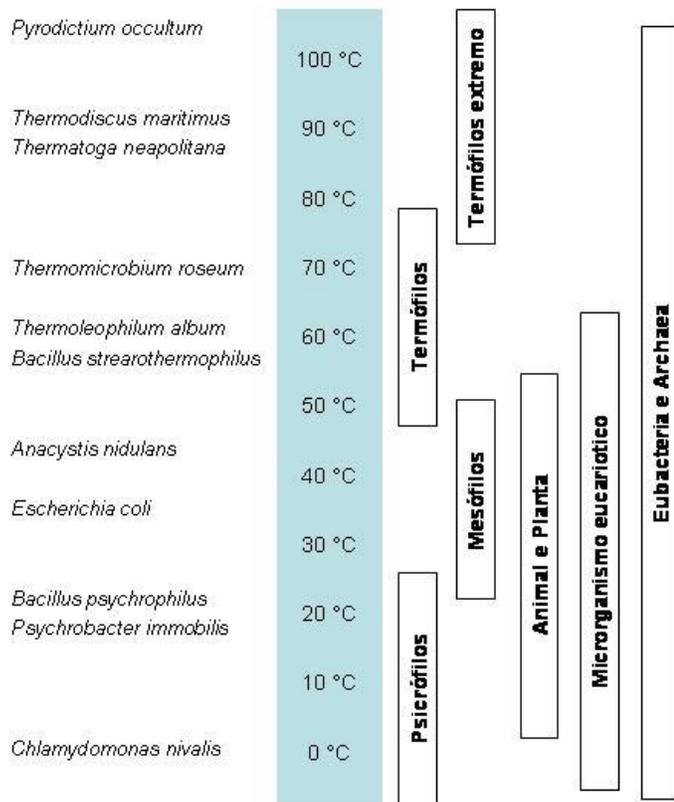
organismos têm sido isolados de sedimentos próximos às fendas do solo oceânico, que esguicham águas superaquecidas. Os ribossomos, as membranas e as várias enzimas das bactérias termófilas funcionam melhor a altas temperaturas que a baixas temperaturas. A perda de função da membrana citoplasmática em baixas temperaturas pode ser o que determina a temperatura de crescimento mínimo dos termófilos.

Os endósporos formados pelas bactérias termofílicas normalmente são resistentes ao calor podendo sobreviver ao tratamento por aquecimento utilizado em alimentos enlatados. A elevação da temperatura nos alimentos estocados pode permitir a germinação destes endósporos, desta forma degradando os alimentos. No entanto, estes termófilos não são considerados um problema de saúde pública.

A figura 12 classifica alguns microrganismos quanto à temperatura necessária para o seu crescimento. Os procaríotos são mais versáteis, com a habilidade de crescer entre a temperatura de 0°C a 100 °C. Os únicos microrganismos capazes de crescer em temperatura acima de 92 °C são as Archaea.



**Figura 11.** Curvas de crescimento características de diferentes microrganismos em resposta à variação na temperatura



**Figura 12.** Temperatura ótima de crescimento para diversas formas de vida.

### 3. LUZ

Para os organismos autótrofos fotossintetizantes, a luz é necessária. Por outro lado tem pouco efeito evidente no crescimento da maioria das bactérias e fungos, embora possa ter um efeito muito importante na dispersão de esporos e na maturação de fungos. É sabido que o raio ultravioleta do espectro solar tem grande poder germicida. As bactérias e muitas outras células vivas são suscetíveis à luz ultravioleta (também aos raios-X), que prontamente as matam. A exposição a doses subletais pode causar mutações. A luz ultravioleta frequentemente é utilizada para esterilização.

É impossível generalizar sobre o efeito da luz no crescimento dos fungos. Muitas espécies crescem igualmente na luz ou no escuro, outras são estimuladas definitivamente pela luz, ainda outras são afetadas negativamente pela luz. Podemos afirmar que a luz influi diferentemente sobre o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo; na primeira fase, os fungos preferem a obscuridade ou luz difusa para desenvolver o micélio, e, na

segunda, procuram a luz para formar as frutificações. Certos fungos hialinos, quando expostos diretamente à luz, morrem.

Denomina-se fototropismo a influência da luz na direção do crescimento. Os corpos de frutificação de alguns fungos são orientados para a luz, e é possível que em tal caso o fototropismo represente uma adaptação para melhor disseminação dos esporos. O desenvolvimento vegetativo é quase sempre negativamente fototrópico. Estas respostas ao estímulo da luz são admiravelmente adaptadas a fim de permitir aos órgãos de reprodução, que são produzidos ou dispostos irregularmente no substrato, liberar seus esporos, de maneira que escapem livremente para o ar. De maneira geral, a luz mostra ao fungo o caminho para o espaço onde ele deve lançar seus esporos.

É prática comum nos laboratórios expor as placas contendo fungos à luz, a fim de provocar a formação das frutificações em fungos que na escuridão ou luz difusa só formam o sistema vegetativo.

#### 4. OXIGÊNIO

Os microrganismos variam em sua necessidade ou tolerância a oxigênio. Dessa forma, os microrganismos podem ser divididos em quatro grupos dependendo da resposta ao oxigênio. 1) **Aeróbios** são espécies que normalmente requerem  $O_2$  para o crescimento e podem crescer em atmosfera padrão de 21 % de  $O_2$ ; 2) **Microaerófilos** são organismos que, assim como os aeróbios, podem utilizar  $O_2$  nas reações químicas para a produção de energia. Entretanto, ao contrário daqueles, eles não podem resistir a níveis de  $O_2$  (21 %) presentes na atmosfera e normalmente crescem melhor em níveis de  $O_2$  variando de 1 a 15 %; 3) **Anaeróbios** são espécies que podem ser mortos pelo oxigênio, não podem crescer em presença do ar e não utilizam oxigênio para as reações de produção de energia. Alguns anaeróbios podem tolerar baixas concentrações de  $O_2$ , mas anaeróbios estritos são mortos por uma breve exposição ao gás; 4.) **Facultativos** são aqueles que crescem na presença de  $O_2$  ou podem também crescer em anaerobiose. Eles não requerem oxigênio para o crescimento, embora possam utilizá-lo para a produção de energia em reações químicas. Sob condições anaeróbicas, eles obtêm energia por um processo metabólico chamado fermentação. Ex. gêneros da família bacteriana Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

## 5. PH

Ao contrário da temperatura ótima, o pH ótimo para o crescimento encontra-se no valor mediano da variação de pH sobre o qual o crescimento acontece. O pH ótimo é normalmente bem definido para cada espécie. A maioria dos ambientes naturais possui valores de pH entre 5 e 9, e dentro desse alcance, encontram-se a maioria dos microrganismos. Poucas espécies podem crescer em valores de pH abaixo de 2 ou maior que 10. Os organismos que sobrevivem em pH baixo são denominados de **acidófilos**. E os que sobrevivem em pH alto, às vezes superior a 10-11, são conhecidos como **alcalífilos**.

Para o microrganismo crescer em meio ácido ou básico (alcalino), este deve ser capaz de manter o seu pH intercelular próximo à neutralidade a fim de prevenir a destruição de macromoléculas na célula, sendo que, o pH ótimo ao crescimento representa o pH do ambiente extracelular.

Entre as Eubacterias e Archaea há uma ampla variação do pH ótimo para o crescimento, podendo variar de 0 a 11. Já crescimento da maioria das bactérias de solo é requerido o pH próximo ao neutro. Fungos filamentosos crescem melhor na variação de pH de 4 a 6.

Quando os microrganismos em crescimento ativo são cultivados em meio de cultura, o pH do meio sofrerá alterações à medida que os compostos ácidos ou alcalinos são produzidos. Esta mudança no pH pode ser tão grande que o crescimento posterior é inibido; tais variações são prevenidas pela adição de tampão ao meio.

## 6. EXERCÍCIOS

### 1) Influência da temperatura

Placas de Petri contendo BDA deverão receber um disco de meio contendo micélio (0,5 cm diâmetro) de *Sclerotinia sclerotiorum*. As placas, em número de 3 por balcão, serão marcadas (turma/balcão/temperatura) e incubadas no escuro a 5, 20 e 30 °C durante duas semanas. Após o período de incubação, o crescimento vegetativo (diâmetro da colônia em cm) nas diferentes temperaturas será avaliado em aula, sendo os resultados obtidos discutidos no tocante ao efeito da temperatura nesses processos.

**Avaliação dos resultados** – Anotar no quadro a seguir o diâmetro (em cm) do crescimento da colônia fúngica e o número de escleródios produzidos nas diferentes temperaturas.

| Balcão | 5°C      |                       | 20°C     |                       | 30°C     |                       |
|--------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|
|        | Diâmetro | Número de escleródios | Diâmetro | Número de escleródios | Diâmetro | Número de escleródios |
| 1      |          |                       |          |                       |          |                       |
| 2      |          |                       |          |                       |          |                       |
| 3      |          |                       |          |                       |          |                       |
| 4      |          |                       |          |                       |          |                       |
| 5      |          |                       |          |                       |          |                       |
| Média  |          |                       |          |                       |          |                       |

2) Descreva os três grupos de microrganismos conforme a variação de temperatura na qual eles crescem.

### 3) Influência da luminosidade

Placas de Petri contendo BDA deverão receber um disco de meio contendo micélio (0,5 cm diâmetro) de *Alternaria tenuis*. As placas, em número de 2 por balcão, serão marcadas (turma/balcão) e incubadas sob fotoperíodo c/ luz UV ou escuro (embrulhar a placa de Petri c/ papel alumínio) a 20-22 °C durante duas semanas. Após o período de incubação, o crescimento vegetativo (diâmetro da colônia em cm) e o número de esporos/mL serão avaliados em aula, sendo os resultados obtidos, discutidos no tocante ao efeito da luz nesses processos.

**Cálculo do nº de esporos / campo** – adicionar volume fixo de água (1-5 mL) nas placas, raspar a superfície da colônia com alça de vidro e contar o número de esporos / campo (escolher aumento adequado).

**Avaliação dos resultados:** Anotar na tabela a seguir, o diâmetro (em cm) do crescimento da colônia fúngica e a esporulação na presença e na ausência de luz.

| BALCÃO       | COM LUZ       |                                | SEM LUZ       |                                |
|--------------|---------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|
|              | Diâmetro (cm) | Esporulação (n° esporos/campo) | Diâmetro (cm) | Esporulação (n° esporos/campo) |
| 1            |               |                                |               |                                |
| 2            |               |                                |               |                                |
| 3            |               |                                |               |                                |
| 4            |               |                                |               |                                |
| 5            |               |                                |               |                                |
| <b>Média</b> |               |                                |               |                                |

### 3) Influência do oxigênio

Placas de Petri contendo BDA deverão receber 30 µL de suspensão bacteriana, que deverá ser espalhada com o auxílio da alça de Drigalsk. Em seguida, deverão flambar 3 lamínulas e colocá-las sobre o meio de cultura. As placas, em número de 2 por balcão, serão marcadas (turma/balcão) e incubadas por uma semana em temperatura ambiente. Após esse período as placas serão avaliadas em aula.

4) Descreva os quatro grupos fisiológicos dos microrganismos baseados na resposta ao oxigênio livre.

5) Qual é a variação de pH ideal para o crescimento da maioria das bactérias? E dos fungos?

6) Considerando o pH do ambiente e o da célula, qual a diferença entre acidófilo e alcalífilos? Em qual condição eles são similares?

## **6 - CONTROLE QUÍMICO E FÍSICO DE MICRORGANISMOS**

### **1. INTRODUÇÃO**

Podemos citar inúmeras funções benéficas de microrganismos para o ambiente, dentre elas, a produção de antibióticos, reciclagem de matéria orgânica na natureza, simbiose com espécies vegetais, e vários outros exemplos. Entretanto, sabe-se que muitos microrganismos podem ser prejudiciais em diversas situações, podendo atuar como agentes patogênicos ou como agentes degradantes de materiais de importância econômica (tecidos, madeiras, alimentos, etc). Sendo assim, torna-se necessário à tomada de medidas que atuem no controle de microrganismos. As principais razões para o controle de microrganismos podem ser resumidas como se segue:

- ❖ Prevenir a transmissão de doença e infecção;
- ❖ Prevenir a contaminação ou crescimento de microrganismos nocivos;
- ❖ Prevenir a deterioração e dano de materiais por microrganismos.

Os microrganismos podem ser removidos, inibidos ou mortos por diferentes agentes químicos ou físicos. Uma grande variedade de técnicas e de agentes pode ser utilizada, agindo de modos diferentes e tendo seu próprio limite de aplicação prática.

Esses agentes antimicrobianos inibem ou matam os microrganismos pela destruição de certas estruturas das células, como a parede celular ou a membrana citoplasmática ou substâncias presentes no citoplasma, como enzimas, ribossomos ou material nuclear. O conhecimento do mecanismo de ação de uma agente antimicrobiano é de grande valor para tomar decisões de aplicações práticas.

### **2. AGENTES QUÍMICOS**

Os agentes químicos são usados para matar ou inibir o crescimento de microrganismos em tecidos vivos (como anti-sépticos) e em objetos inanimados (como desinfetantes). Há centenas de diferentes produtos químicos utilizados para o controle de microrganismos. No entanto, nenhum agente químico único é o melhor ou o ideal para qualquer ou toda finalidade. Dessa forma, algumas especificações podem orientar a preparação de novos compostos e devem ser consideradas nos métodos de avaliação dos desinfetantes destinados ao uso prático. Essas especificações são:

- atividade antimicrobiana em baixas concentrações;
- solubilidade em água ou em outros solventes (como o álcool);
- estabilidade;

- ausência de toxicidade ao homem e animais;
- homogeneidade;
- inativação mínima por material estranho (proteínas ou orgânicos);
- atividade em temperatura ambiente ou corporal;
- poder de penetração;
- ausência de poderes corrosivos e tintoriais;
- desodorizante;
- capacidade detergente;
- disponibilidade e baixo custo.

Os agentes antimicrobianos utilizados para desinfecção ou anti-sepsia são divididos em vários grupos: fenol e compostos fenólicos, álcoois (álcool etílico e isopropílico), corantes, halogênios (iodo e cloro), metais pesados e seus compostos, detergentes, compostos quartenários de amônio, biguanidas, e aldeídos (formaldeídos e glutaraldeídos). A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais agentes químicos e seu mecanismo de ação no controle de microrganismos.

TABELA 1. Mecanismo de ação de alguns agentes químicos.

| <b>Agente</b>              | <b>Mecanismo de ação</b>                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Álcool                     | Desnaturam proteínas e rompem a membrana lipídica.                                                                                                                                                       |
| Aldeídos                   | Inativam proteínas formando ligações cruzadas covalentes com vários grupos funcionais orgânicos.                                                                                                         |
| Compostos quart. de amônio | Desnaturam proteínas das células, interferência com os processos metabólicos e lesão da membrana citoplasmática.                                                                                         |
| Fenol e seus derivados     | Lesam as células microbianas pela alteração da permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, causando perda das substancias intracelulares vitais, além disso, desnaturam e inativam as proteínas. |
| Halogênios                 | O iodo e seus componentes destroem compostos metabólicos essenciais por meio da oxidação. O cloro e seus derivados impedem o funcionamento do sistema enzimático celular.                                |
| Metais pesados             | Inativam as proteínas celulares combinando-se com algum componente da proteína, por exemplo, o cloreto de mercúrio inativa enzimas que contêm grupos sulfidrilas (-SH).                                  |

### 3. AGENTES FÍSICOS:

Em condições naturais, as alterações das condições ambientais podem apresentar efeitos inibitórios seletivos ou mesmo letais aos microrganismos, no entanto, a proporção dessa inibição ou morte de microrganismos depende, em parte, da intensidade das condições físicas. Devido à necessidade de eliminação de populações microbianas, numerosos agentes físicos podem ser escolhidos para essa finalidade. A Tabela 2 lista alguns desses agentes e seu mecanismo de ação.

TABELA 2. Mecanismo de ação dos agentes físicos.

| <b>Agentes</b>                 | <b>Mecanismo de ação</b>                                          |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>Temperatura alta</b>        |                                                                   |
| 1. Calor úmido - vapor d'água  | Desnaturação proteínas                                            |
| 2. Calor úmido - água fervente | Desnaturação proteínas                                            |
| 3. Calor úmido - pasteurização | Desnaturação proteínas                                            |
| 4. Calor seco - chama direta   | Queima os contaminantes até se tornarem cinzas                    |
| 5. Calor seco - incineração    | Queima até se tornarem cinzas                                     |
| 6. Calor seco - ar quente      | Oxidação                                                          |
| <b>Temperatura baixa</b>       |                                                                   |
| 1. Refrigeração                | Redução das reações químicas e possíveis alterações nas proteínas |
| 2. Congelamento                | Redução das reações químicas e possíveis alterações nas proteínas |
| 3. Liofilização                | Redução das reações químicas e possíveis alterações nas proteínas |
| <b>Radiação</b>                |                                                                   |
| 1. Ionizante                   | Destruição do DNA por raios gama e raios X                        |
| 2. Não ionizante               | Lesão ao DNA pela luz UV com lâmpada UV (germicida)               |
| <b>Filtração</b>               | Separação das bactérias do líquido de suspensão                   |
| <b>Dessecação</b>              | Interrupção do metabolismo                                        |
| <b>Pressão osmótica</b>        | Plasmólise                                                        |

### **3.1. Temperatura**

Altas e baixas temperaturas realizam papel importante no controle de microrganismos. A temperatura elevada, combinada com alto grau de umidade representa um dos métodos mais efetivos para a destruição dos microrganismos. Em qualquer processo antimicrobiano, é importante distinguir o calor seco e úmido. O calor úmido (vapor d'água sob pressão, água fervente, pasteurização) mata os microrganismos por coagulação de suas proteínas e é muito mais rápido e eficiente do que o calor seco (forno), o qual destrói os microrganismos por oxidação de seus constituintes químicos. O método que utiliza temperaturas extremas para matar os microrganismos é a incineração, o qual é utilizado para a eliminação de carcaças de animais de laboratório infectadas ou de materiais contaminados. A destruição de microrganismos pelo calor direto é, também, praticada rotineiramente quando a agulha de inoculação (ou alça de platina) é levada à chama de um bico de Bunsen.

As temperaturas inferiores ao ponto ótimo de crescimento diminuem o ritmo metabólico e, sendo a temperatura suficientemente baixa, cessa o metabolismo e o crescimento, entretanto, não mata o microrganismo.

#### **3.1.1. Calor Úmido**

O aparelho mais usado para esterilizar vidrarias e meios de cultura é a autoclave (Figura 13). As autoclaves trabalham à semelhança de panelas de pressão domésticas. As autoclaves de laboratório operam normalmente sob uma pressão de 1 atmosfera a uma temperatura de 121 °C, esterilizando a maioria dos materiais em 15-30 minutos. Sendo a variação do tempo de esterilização devida à relação superfície/volume dos materiais a serem esterilizados.

Aspectos da esterilização por calor úmido:

##### **- Temperatura**

Uma temperatura de 121 °C oferece uma boa margem de segurança se for mantida durante um período de tempo apropriado. Os endósporos das bactérias são as formas de vida mais resistentes ao calor, e a sua destruição pode ser conseguida se for aplicado vapor sob pressão.

##### **- Umidade**

A umidade em conjunto com temperaturas amenas coagula o protoplasma bacteriano, e à medida que esta é removida, a temperatura necessária para haver

coagulação deve ser elevada rapidamente. Se o vapor for sobre aquecido ficará mais "seco", o que ocasionará um aumento da temperatura e do tempo de exposição para a esterilização, que em situação extrema de esterilização em calor seco será de 170 °C durante uma hora. Em conclusão, vapor excessivamente quente perde alguma da sua eficiência como agente letal além de poder danificar os materiais a serem tratados.

#### - Pressão

A pressão, nos valores usados na autoclave, por si só não exerce qualquer efeito na esterilização, sendo útil para elevar a temperatura do vapor acima dos 100 °C.

#### - Tempo

O tempo é necessário para que o vapor penetre e aqueça os materiais a serem esterilizados. Mesmo quando as temperaturas de esterilização são atingidas, os esporos (e as células vegetativas) não são todos mortos de uma vez. A velocidade de morte é uma constante a uma dada temperatura, e para cada unidade de tempo de exposição ao agente letal, uma proporção constante de uma dada população é morta. Normalmente são necessários de 11 a 12 minutos a 121 °C (calor úmido) para matar os endósporos das bactérias termofílicas.

#### - Purga

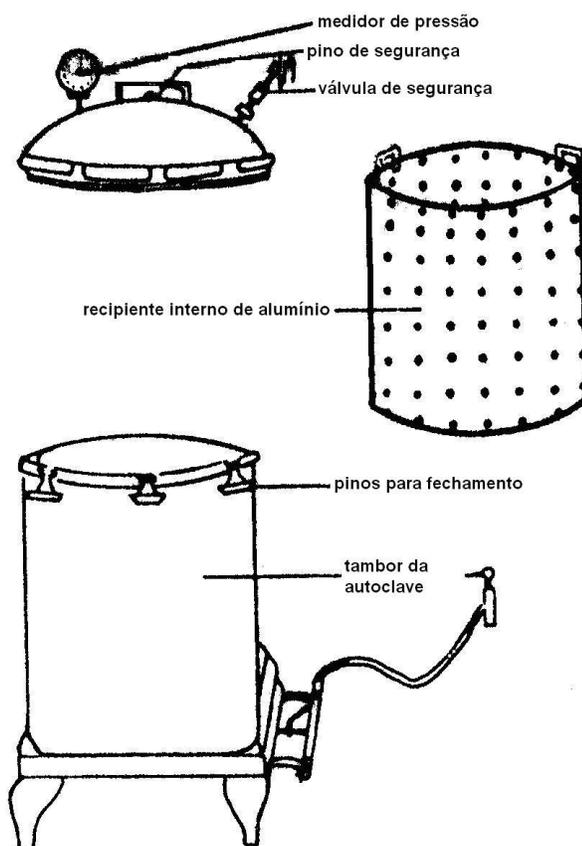
O ar relativamente frio na câmara de esterilização é muito mais pesado que o vapor à temperatura de esterilização. Se não for permitida a saída do ar cria-se uma estratificação na autoclave que conduz a uma falta de uniformização das temperaturas desenvolvidas. Uma vez que o ar e o vapor são lentos a misturarem-se, a diferença de temperatura entre camadas pode ser muito grande, por isso a necessidade de se substituir todo o ar por vapor (purga).

#### - Natureza do carregamento

Geralmente, os materiais mais volumosos requerem um maior tempo de esterilização, sendo preferível esterilizar pequenos volumes de cada vez (Tabela 3). Por exemplo, é preferível esterilizar 5 balões de um litro cada do que esterilizar apenas um balão com cinco litros. Os frascos devem ser tapados com algodão ou papel. Se for necessário usar rolhas rosqueadas, estas devem ir pouco apertadas para a autoclave, de modo a permitirem a troca de gases, evitando-se assim a quebra de frascos na autoclave.

TABELA 3. Tempo requerido para esterilização de líquidos em autoclave de acordo com o volume.

| Volume do recipiente       | Minutos de exposição a 120 °C e 1 atm. |
|----------------------------|----------------------------------------|
| Erlenmeyer de 1000 mL      | 17-20                                  |
| Erlenmeyer de 500 mL       | 15-17                                  |
| Erlenmeyer de 250 e 125 mL | 12-15                                  |
| Tubos de ensaio            | 12-15                                  |



**Figura 13.** Esquema de autoclave usada em aula prática.

Procedimento para operação da autoclave:

- Verificar as tampas dos frascos (não apertadas, para permitir a troca de gases com o exterior);
- Introduzir na autoclave o material a esterilizar;
- Fechar a autoclave e apertar a tampa seguindo os cuidados adequados recomendados;
- Abrir a torneira de saída de vapor para permitir a purga do ar no interior;

- Ligar a corrente elétrica e colocar o termostato para a posição máxima;
- Aguardar que a corrente de vapor que sai pela torneira seja bastante intensa;
- Fechar a torneira de saída do vapor;
- Aguardar que o termômetro atinja a temperatura de esterilização desejada (121 °C), ou que o indicador de pressão marque 1,02 Bar;
- Reduzir a potência do termostato de modo a manter constante a temperatura;
- Atingida a temperatura de esterilização, iniciar a contagem do tempo (por exemplo, 20 minutos);
- Desligar a autoclave;
- Aguardar até o indicador de pressão indicar 0;
- Abrir a torneira de purga (pode ainda haver pressão e o ar estará muito quente);
- Abrir cuidadosamente a autoclave. Remover os materiais esterilizados, (ATENÇÃO: os materiais esterilizados podem estar muito quentes);
- Depois do arrefecimento é conveniente fechar os frascos mal rosqueados.

### 3.1.2. Calor Seco

O calor seco é usado para esterilizar material de vidro, outros materiais sólidos termoestáveis e alguns componentes de meios ou alimentos que ficariam impróprios se expostos ao vapor. Trata-se também de um dos métodos de esterilização mais usados e de fácil aplicação. O equipamento indispensável é uma estufa de alta temperatura (160 – 200 °C). Geralmente, a esterilização é feita a 180 °C, durante duas horas. Entretanto, outras temperaturas podem ser indicadas (Tabela 4).

TABELA 4. Temperatura e tempo necessários para esterilização de vidrarias em estufa.

| Temperatura (°C) | Tempo de exposição (min) |
|------------------|--------------------------|
| 170-180          | 60                       |
| 160              | 120                      |
| 150              | 150                      |
| 140              | 180                      |
| 121              | Durante 1 dia ou 1 noite |

O calor seco é necessário para remover toda umidade do material. Antes do processo de esterilização, deve-se ter o cuidado de envolver o material com papel jornal ou outro tipo, para evitar contaminações posteriores, quando da estocagem da vidraria.

A esterilização de objetos metálicos tais como, pinça, alça de platina, escalpelo e outros, pode ser feita através do calor seco, fornecido pela chama de um bico de Bunsen ou similar. A passagem do material na chama é comumente conhecida como flambagem.

### **3.2. Esterilização por gases**

O recente incremento do uso de material de plástico descartável, como seringas, placas de Petri, tubos de cultura, filtros, etc, levou ao desenvolvimento de uma nova forma de esterilização que usa gases tóxicos para a eliminação dos microrganismos de materiais termo-sensíveis. A aplicação desta técnica requer a utilização de equipamentos próprios, que forcem a circulação do gás tóxico através de todas as superfícies dos materiais, o que a torna de difícil utilização em laboratórios de tipo não industrial.

O óxido de etileno é o gás usado com maior frequência neste tipo de esterilização. Este gás, ao contrário de muitos produtos químicos tóxicos, é pouco corrosivo e não altera os materiais a serem esterilizados, sendo facilmente removido por arejamento. As suas desvantagens incluem a necessidade de longos períodos de exposição para se obter a esterilização (várias horas), a reatividade com componentes do meio e certos tipos de plásticos e a necessidade de equipamentos próprios e disponibilidade do gás.

### **3.3. Radiações**

A radiação tem vários efeitos sobre as células, dependendo de seu comprimento de onda, intensidade e duração. Existem dois tipos de radiação que mata microrganismos: ionizante e não-ionizante. A radiação ionizante, como os raios gama e X, possui um comprimento de onda mais curto que 1 nm. A radiação não-ionizante, como a luz ultravioleta (UV), tem comprimento de onda entre 1 nm e cerca de 380 nm, onde o espectro visível começa.

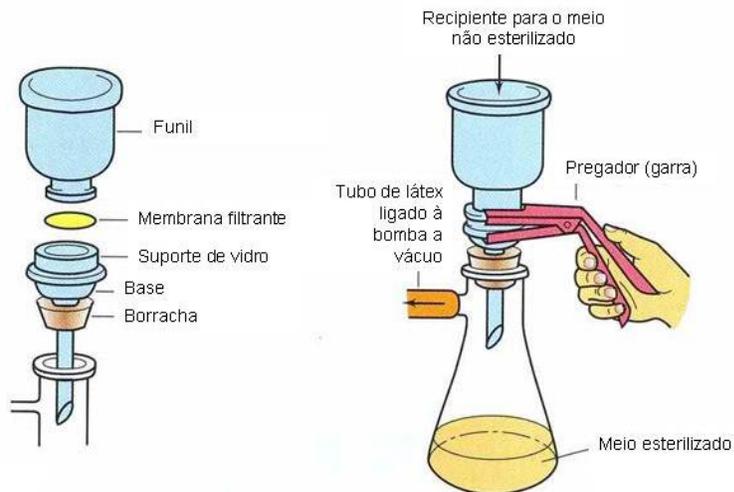
Radiação ionizante tem energia suficiente para causar a ionização de moléculas, isto é, conduzir elétrons constantemente e romper as moléculas em átomos ou grupo de átomos. Por exemplo, moléculas de água são quebradas em radicais hidroxilas (OH<sup>-</sup>) e íons de hidrogênio (H<sup>+</sup>), e os radicais hidroxila são altamente reativos e destroem compostos celulares como DNA e proteínas. As radiações ionizantes podem também atuar diretamente nos constituintes vitais da célula, inclusive os microrganismos. Dessa forma, a grande vantagem desse agente é a capacidade de penetrar em pacotes e produtos e esterilizar seus interiores.

Radiação não-ionizante excita os elétrons, resultando em uma molécula que reage diferentemente das moléculas não-irradiadas. A luz UV danifica o DNA das células expostas, produzindo ligações entre as timinas adjacentes nas cadeias de DNA. Estes dímeros de timina inibem a replicação correta do DNA durante a reprodução da célula.

Lâmpadas especiais que emitem luz UV têm pouca capacidade de penetrar na matéria e somente microrganismos da superfície de um objeto são mortos pela radiação. Uma camada fina de vidro ou água pode impedir a ação da luz. Ainda assim, esta forma de radiação é comumente utilizada para reduzir o número de microrganismos no ar, em superfície de salas cirúrgicas e em câmaras assépticas onde produtos esterilizados são distribuídos em garrafas ou ampolas estéreis, no entanto, não pode ser operada quando pessoas estão presentes.

### 3.4. Filtração

A filtração é a passagem de um líquido ou gás através de material semelhante a uma tela, com poros pequenos o suficiente para reter os microrganismos. Um vácuo que é criado no frasco de recepção auxilia a gravidade a puxar o líquido através do filtro (Figura 14). Os filtros são utilizados no laboratório e na indústria para esterilizar materiais sensíveis ao calor, como proteínas, açúcares, soros animais, e algumas vitaminas ou antibióticos.



**Figura 14.** Conjunto com membrana filtrante utilizada para filtração de líquidos sob pressão negativa (bomba a vácuo) (Fonte: Madigan et al., 1996).

### 3.5. Pressão Osmótica

Altas concentrações de substâncias, como sais e açúcares, dissolvidas em um líquido resultam em soluções que exercem um efeito osmótico marcante sobre as células. Muitos microrganismos quando colocados em um meio ou solução contendo elevadas quantidades de material dissolvido tem o crescimento paralisado em virtude da possibilidade do estabelecimento de um equilíbrio entre a solução no interior da célula e a solução no meio externo. A água passará do interior da célula para a solução externa. Como resultado, as células tornam-se desidratadas, o que evita o crescimento. Entretanto, alguns microrganismos mostram-se capazes de tolerar altíssimas concentrações de sal ou açúcar.

A turgidez celular é caracterizada pela maior concentração de solutos dissolvidos em seu interior, quando comparado com o meio externo. Estes solutos são mantidos na célula pela presença de uma membrana semipermeável. Sendo assim, a água pode se difundir livremente pela membrana, igualando as concentrações da solução intra e extracelular. Partindo-se destas informações, pode-se afirmar que a adição de solutos (sal ou açúcar) no meio pode ocasionar um desequilíbrio na pressão osmótica celular, podendo causar uma ruptura na sua estrutura.

Em sua maior parte, contudo, os microrganismos são inibidos por altas concentrações de sal (10 a 15 %) e de açúcar (50 a 70 %), fato que fundamenta os métodos de conservação de alimentos por salgamento ou por soluções concentradas de açúcar. Em tais situações, o mecanismo de inibição microbiana é a plasmólise: as células são desidratadas, tornando-se inaptas para metabolizar ou crescer, o que pode levar à morte.

## 4. EXERCÍCIO

Material a ser preparado na aula. Serão distribuídas placas de Petri com meio de cultura Trypticase Soy Agar com diferentes concentrações de glucose (0, 5 e 25%) e de NaCl (0, 5 e 15%). Em dois balcões, os alunos devem inocular *Escherichia coli* na metade do meio de cultura de cada placa e *Staphilococcus aureus* na outra metade. Nos três balcões restantes os alunos devem inocular 1,0 mL de suspensão de esporos de *Aspergillus niger* sobre toda a superfície do meio de cultura de cada placa de Petri.

## Resultados

Preencher o quadro abaixo indicando crescimento (pouco = +; médio = ++, muito = +++ ) e ausência de crescimento (-) das bactérias nos diferentes meios.

| Balcão | Controle |    | 5% glucose |    | 25% glucose |    | 5% NaCL |    | 15% NaCL |    |
|--------|----------|----|------------|----|-------------|----|---------|----|----------|----|
|        | Ec       | Sa | Ec         | Sa | Ec          | Sa | Ec      | Sa | Ec       | Sa |
| I      |          |    |            |    |             |    |         |    |          |    |
| II     |          |    |            |    |             |    |         |    |          |    |

Efeito da pressão osmótica no crescimento e esporulação de *A. niger*. Para avaliar o crescimento mede-se o diâmetro da colônia. Para avaliar a esporulação deverão ser adicionados 5 ml de água por placa. Raspar os esporos com a alça. Colocar uma gota da suspensão de esporos em uma lâmina e contá-los em apenas um campo do microscópio (aumento de 400 x)

| Balcão | Controle |     | 5% glucose |     | 25% glucose |     | 5% NaCL |     | 15% NaCL |     |
|--------|----------|-----|------------|-----|-------------|-----|---------|-----|----------|-----|
|        | Cre      | Esp | Cre        | Esp | Cre         | Esp | Cre     | Esp | Cre      | Esp |
| III    |          |     |            |     |             |     |         |     |          |     |
| IV     |          |     |            |     |             |     |         |     |          |     |
| V      |          |     |            |     |             |     |         |     |          |     |

3) Compare a eficácia do calor seco e do calor úmido como métodos de esterilização.

4) O que significa autoclavagem? O que é uma autoclave?

## 7 - CONTROLE BIOLÓGICO DE MICRORGANISMOS – ANTAGONISMO

O antagonismo é a inibição de uma espécie de microrganismo por outra através de um ou mais mecanismos de interações antagônicas.

A produção de um antibiótico por um microrganismo é um exemplo clássico de antagonismo microbiano. Entretanto, existem muitas outras formas de antagonismo, como por exemplo, no caso de alguns fungos que produzem cianeto em concentrações que são tóxicas para outros microrganismos, e algumas algas que produzem ácidos graxos antibacterianos. O metano, o sulfeto e compostos voláteis que contêm enxofre, produzidos por alguns microrganismos do solo podem inibir outras espécies.

Antibióticos, por sua vez, são substâncias orgânicas produzidas por microrganismos que, em concentrações baixas, são deletérias ao crescimento ou atividade metabólicas de outros microrganismos, podendo ser específicos ou de amplo espectro de ação. Entre os efeitos provocados pelos antibióticos, podem ser observadas a redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa.

Metabólitos antifúngicos são, muitas vezes, produzidos por microrganismos que sobrevivem no solo, principalmente fungos, bactérias e actinomicetos, e exercem um grande papel no antagonismo entre microrganismos. Dentre os fungos que possuem informação genética para a produção de substâncias inibidoras, antibióticas ou não, destacam-se os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*. Os primeiros trabalhos científicos provando a produção de antibióticos por *Trichoderma* spp. foi demonstrado na década de 70 que isolados deste gênero foram capazes de produzir metabólitos voláteis e não voláteis, com efeito inibitório sobre o crescimento de vários fungos.

O termo antagonista é empregado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos, estando estas raças ou espécies de microrganismo adaptadas ecologicamente ao mesmo tecido das plantas que os ocupados pelos patógenos, mas não sendo patogênicas às mesmas, enquanto que, o termo “formas de antagonismo” designa os mecanismos pelos quais os antagonistas agem sobre os patógenos.

Os mecanismos básicos de antagonismo podem ser divididos em:

- ❖ **Antibiose:** interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos pelo antagonista têm efeito negativo sobre o outro microrganismo, resultando na inibição do crescimento e/ou germinação (Figura 15);



**Figura 15.** Antibiose de isolados de *Pseudomonas* sp contra *Dreshlera avenae*

- ❖ **Competição:** interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação, ocorrendo principalmente por alimentos (carboidratos, nitrogênio e fatores de crescimento), por espaço e por oxigênio;
- ❖ **Parasitismo:** fenômeno em que determinado microrganismo estabelece relações em nível celular com um hospedeiro e se nutre das estruturas vegetativas e/ou reprodutivas do mesmo. Essas interações físicas entre parasita e fitopatógenos têm como consequência alterações, tais como: perfurações de hifas, destruição de estruturas de resistência e de reprodução dos fitopatógenos (exemplo, *Trichoderma harmazianum* parasitando *Rhizoctonia solani* (Figura 16);



Fonte: Mello (1998)

**Figura 16.** *Trichoderma harmazianum* parasitando *Rhizoctonia solani*

- ❖ **Hipovirulência:** literalmente significa virulência subnormal, ou seja, introdução de linhagem do patógeno menos agressiva ou não patogênica, que pode transmitir esta característica para as linhagens patogênicas;
- ❖ **Predação:** quando um organismo obtém alimento a partir de outro organismo. Ao contrário do parasitismo, os participantes não estabelecem relações celulares (por

exemplo, amebas são encontradas predando *Gaumannomyces graminis* f. sp. e outros fungos);

- ❖ **Indução de resistência:** é um fenômeno onde a resistência de plantas contra patógenos é induzida sistematicamente através do tratamento com microrganismos ou seus metabólitos ou através de compostos orgânicos ou inorgânicos.

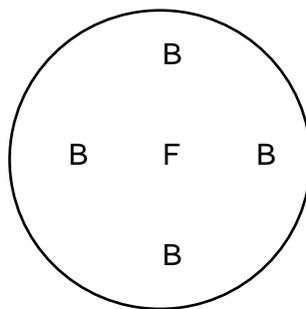
Apesar destas divisões, um antagonista pode atuar através de um ou mais mecanismos, o que constitui uma característica muito desejável, pois as chances de sucesso no caso do controle biológico serão aumentadas. Além disso, os mecanismos não são mutuamente exclusivos ou excludentes, pois sua importância relativa pode variar com as condições ambientais e estados de desenvolvimento do agente biocontrolador e do fitopatógeno.

## EXERCÍCIO

Interação antagonica (antibiose) envolvendo *Bacillus* sp. e fungos fitopatogênicos.

Transferir assepticamente para o centro de uma placa de Petri, contendo o meio de BDA, um disco de um dos fungos fitopatogênicos (inóculo) fornecido na prática. (**IMPORTANTE: Se possível utilizar fungos fitopatogênicos diferentes em cada balcão**) retirado da cultura fornecida (fungos em placa de Petri com meio BDA). A seguir, transferir o inóculo bacteriano (fornecido em tubo de ensaio ou placa contendo meio para crescimento de bactérias) para quatro pontos da placa e a 2 cm dos bordos da mesma. Preparar uma placa testemunha contendo apenas o fungo fitopatogênico usado pelo balcão (sem antagonista) / balcão. Anotar o nº do balcão e a turma na placa. Incubar em condições de laboratório e avaliar na semana seguinte.

Exemplo:



F = Fungo

B = bactéria (*Bacillus*)

Avaliação dos resultados (próxima aula)

- 1) Esquematize o desenvolvimento diferenciado observado para as colônias fúngicas na placa testemunha e na placa contendo a Bactéria (*Bacillus* sp.).

- 2) Demonstre experimentalmente um mecanismo de interação antagônica?
- 3) Quais as principais estratégias na utilização do controle biológico de doenças de plantas?

## 8 - PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS

### 1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos fitopatogênicos geralmente necessitam de seus respectivos hospedeiros para garantir a sua sobrevivência. Sendo assim, a maioria deles retira seus nutrientes do hospedeiro utilizando-os para seu próprio metabolismo. Porém, muitos desses nutrientes encontram-se no interior do protoplasma das células vegetais, e para alcançá-los, os patógenos devem vencer as barreiras externas formadas pela cutícula e/ou parede celular, assim como promover a colonização interna dos tecidos da planta.

Os patógenos podem ganhar acesso ao interior dos hospedeiros através da penetração direta, aberturas naturais da planta ou ferimentos. A penetração direta pode ocorrer exclusivamente através de força mecânica aplicada por estruturas específicas de alguns poucos fungos sobre o hospedeiro. Porém, quase na sua totalidade, este processo é acompanhado pela secreção de enzimas. Depois de penetrar na planta, os patógenos podem se espalhar e colonizar o tecido do hospedeiro, sendo este processo normalmente caracterizado pela degradação celular e pela utilização de nutrientes, resultando em alterações na morfologia e no metabolismo, levando ao aparecimento dos sintomas da doença.

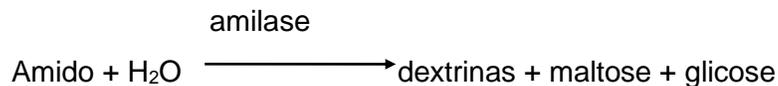
Dessa forma, para um patógeno infectar uma planta, é necessário que ele consiga penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, retirar os nutrientes necessários para sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa da planta, utilizando para isso substâncias como enzimas, toxinas e hormônios. A importância dessas substâncias varia grandemente nas interações hospedeiro-patógeno. Por exemplo, no caso das podridões moles, as exoenzimas são aparentemente as substâncias mais importantes.

Entre os fitopatógenos conhecidos, com exceção dos vírus e viróides, todos produzem enzimas, hormônios e, possivelmente, toxinas, sendo que, de maneira geral, as enzimas produzidas por fitopatógenos são promotoras da desintegração dos componentes estruturais das células do hospedeiro, degradando substâncias presentes nas células ou afetando diretamente o protoplasto.

## 2. EXOENZIMAS:

**Exoenzimas** são enzimas produzidas por microrganismos que atuam no ambiente externo, degradando moléculas orgânicas complexas (polissacarídeos, proteínas, etc), a partir das quais são formadas moléculas mais simples (monossacarídeos, aminoácidos, etc), assimiláveis pelos microrganismos. Como exemplos de exoenzimas podem-se citar: celulases (celulose), quitinases (quitina), pectinases (pectina), proteases (proteínas), amilases (amido), etc.

A produção de exoenzimas pode ser facilmente verificada nos microrganismos produtores de amilase. Nesse caso, os microrganismos devem crescer em meio de cultivo contendo amido como fonte de carbono (energética). Com seu desenvolvimento e com a produção de amilases, parte do amido é degradado (originando dextrinas, maltose e glicose), sendo essa degradação visualizada através de um indicador de amido (iodo). O amido não hidrolisado fica azul, o hidrolisado não é corado. As zonas claras são as testemunhas da atividade enzimática da  $\beta$ -amilase. As zonas vermelhas indicam uma hidrólise parcial do amido em dextrinas (polissacarídeos com cadeias de tamanho intermediário) devido à atividade de  $\alpha$ -amilase.



### 2.1 DEGRADAÇÃO DA CUTÍCULA:

As paredes das células epidérmicas dos vegetais em contato com o meio exterior mostram-se recobertas por uma camada lipídica contínua, conhecida como cutícula, a qual fica aderida à parede celular através de uma camada intermediária rica em substâncias pécticas. A cutícula recobre folhas, frutos e talos jovens, tendo como funções básicas evitar a difusão de água e nutrientes para o meio externo, bem como proteger a planta contra os efeitos adversos do meio ambiente. A espessura e a morfologia da cutícula variam dependendo da espécie vegetal, do órgão envolvido, do estágio de desenvolvimento do tecido e das condições do ambiente. A cutícula pode ser separada da parede celular por meio de tratamento químico ou enzimático, produzindo dois componentes lipídicos principais, as ceras e a cutina.

A cutícula consiste basicamente de cutina impregnada com cera e frequentemente recoberta por placas cerosas. Além das funções já mencionadas, também serve como barreira protetora contra microrganismos. Os fungos que penetram através da superfície

intacta da planta mostram-se aptos para degradar enzimaticamente essa barreira através da produção de cutinases, o que constitui, para alguns, em fator chave na patogenicidade. Além dessa função, aparentemente as cutinases também podem estar envolvidas na determinação da especificidade de fungos fitopatogênicos com os tecidos do hospedeiro. As cutinases são esterases que rompem as ligações ésteres entre as moléculas presentes na cutina, substrato natural da enzima, liberando como produto da ação enzimática monômeros e oligômeros derivados de ácidos graxos.

Em função de sua importância para certos patógenos na penetração do hospedeiro, a cutinase constitui-se em alvo potencial para o controle de doenças vegetais. A desativação da enzima (inibição de sua ação e/ou síntese-excreção), ao nível de superfície do hospedeiro, evitaria a penetração e, conseqüentemente, protegeria as plantas contra algumas doenças fúngicas.

## **2.2 DEGRADAÇÃO DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR:**

As paredes celulares são estruturas complexas e dinâmicas, circundando o protoplasto, externamente à membrana plasmática. Podem estar envolvidas na expansão celular, influenciando a forma da célula e, conseqüentemente, a morfogênese de tecidos vegetais. De maneira geral, são divididas em três regiões estruturais: lamela média (região entre as paredes de células vizinhas), parede primária (entre membrana plasmática e a lamela média, formada somente por células em ativo processo de crescimento, após a divisão celular ser completada) e parede secundária (localizada internamente à parede primária, formada após o término da expansão celular).

A lamela média é constituída principalmente por substâncias pécticas, que são polissacarídeos. Em função da capacidade de formarem géis, devido às ligações entre cadeias por meio de íons cálcio, as substâncias pécticas atuam como uma espécie de cimento intercelular, mantendo coesos os tecidos vegetais. Várias enzimas conhecidas como pectinases ou enzimas pectolíticas, degradam substâncias pécticas.

Os polissacarídeos constituintes das paredes celulares têm sido tradicionalmente divididos em substâncias pécticas, hemiceluloses e celulose, com base na solubilidade, e não na composição química. As hemiceluloses são encontradas na matriz das paredes primária e secundária e a sua degradação em constituintes monoméricos requer a atividade de várias enzimas, genericamente conhecidas como hemicelulases. Os nomes específicos dessas enzimas variam em função do substrato e dos monômeros liberados. A celulose constitui-se no principal componente estrutural das paredes celulares dos

vegetais (20-30 % nas paredes primárias e acima de 40 % na parede secundária de plantas lenhosas) e mostra-se como uma substância cristalina e insolúvel em sua forma nativa. A degradação desse polímero, com a produção final do monossacarídeo glicose, resulta da ação de diferentes celulases como  $\beta$ -1,4 D-glucanase,  $\beta$ -1,4-D-glucana celobiohidrolase e  $\beta$ -glucosidase.

As enzimas que degradam a parede (EDP) estão provavelmente envolvidas na maioria das doenças de plantas. A contribuição dessas enzimas na patogênese pode envolver a extensiva destruição dos tecidos vegetais por patógenos necrotróficos (por exemplo, enzimas pectolíticas), bem como alterações específicas e localizadas nas paredes celulares por patógenos biotróficos (por exemplo, glicanases e glicosidases). Embora estejam ligadas à degradação dos componentes da parede, a comprovação do envolvimento das EDP na patogênese deve preencher alguns critérios, como: capacidade do patógeno em produzir as EDP *in vitro*; detecção das EDP em tecido infectado; correlação da produção das EDP com patogenicidade; alterações nas paredes de tecidos infectados observáveis com o uso de técnicas de microscopia; reprodução das alterações na parede ou sintomas da doença com o uso de EDP purificadas.

### **2.3 DEGRADAÇÃO DE COMPONENTES DA MEMBRANA PLASMÁTICA:**

A membrana plasmática (plasmalema) separa o interior da célula do ambiente externo, enquanto as membranas de organelas delimitam compartimentos no interior celular. Extensões da membrana plasmática (plasmodesma) atravessam a parede celular e promovem conexões com as células vizinhas. As membranas vegetais contêm proteínas (40-50 %) e lipídios (40 %), sendo que a maioria pode também conter carboidratos (0-10 %) na forma de glicolipídios e glicoproteínas. Apresentam uma estrutura unitária dupla (camada lipídica dupla), formando uma matriz, na qual os componentes protéicos se integram. A camada lipídica contém três tipos de lipídios, os fosfolipídios, os lipídios neutros (colesterol) e os glicolipídios. As proteínas podem ser de diferentes classes e tamanhos, sendo de maneira geral designadas como intrínsecas (voltadas para o citoplasma) ou extrínsecas (voltadas para a parede celular). Os carboidratos das membranas, glicolipídios ou glicoproteínas, normalmente são orientados em direção à superfície externa.

Em função da composição, as membranas podem sofrer ação destrutiva de enzimas como fosfolipases (liberam ácidos graxos a partir de moléculas de fosfolipídios)

e proteases (liberam peptídeos e aminoácidos a partir da ruptura das ligações peptídicas em moléculas de proteínas).

A maioria dos fitopatógenos obtém os nutrientes necessários para o crescimento e a reprodução a partir de protoplastos dos hospedeiros. Alguns dos nutrientes, como açúcares (monossacarídeos) e aminoácidos, podem ser utilizados diretamente pelas bactérias e fungos. Outros constituintes das células vegetais, porém, como amido, proteínas e lipídios necessitam ser degradados por enzimas secretadas por esses microrganismos. Todos os fitopatógenos podem degradar, através da ação de enzimas proteolíticas, diferentes tipos de proteínas, o que resulta em profundas alterações na organização e função celulares no hospedeiro. O amido, um polímero de glicose, constitui-se no principal polissacarídeo de reserva nas células vegetais. A maioria dos patógenos produz amilases, as quais degradam esse polímero em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas desses microrganismos. Diferentes tipos de lipídios são encontrados nas células vegetais, como óleos, gorduras presentes principalmente nas sementes, ceras, na cutícula, e, fosfolipídios e glicolipídios presentes nas membranas. Várias bactérias e fungos podem degradar esses compostos através da ação de enzimas lipolíticas (lípases, fosfolipases, etc), liberando ácidos graxos que podem ser utilizados diretamente por esses patógenos.

### **3. EXERCÍCIO**

1) Esquematize o exercício visando a detecção da produção de exoenzimas (amilase) pela levedura (*Saccharomyces*) e pela bactéria (*Bacillus*).

2) Comente os resultados obtidos no teste de produção de amilase.

## 9 - ISOLAMENTO DE FUNGOS E BACTÉRIAS DO SOLO

Um isolamento bem sucedido de um microrganismo depende basicamente da capacidade da técnica de separar um determinado organismo de outro. Os métodos descritos para isolamento de grupos de microrganismos (bactéria, fungo e actinomicetos) possuem pelo menos uma limitação em comum, por exemplo, alguns membros do grupo podem exigir componentes no meio de cultivo utilizado para isolamento. Por isso, é preciso conhecer as condições ideais para cada microrganismo que se quer estudar e utilizar técnicas adequadas para este fim. Outro fator importante, é o correto manuseio das amostras de solo que serão utilizadas, visto que, uma amostra manuseada inadequadamente não mantém as características biológicas do momento da amostragem, mesmo porque, as condições de preservação e o período de armazenamento das amostras de solo influenciam nas atividades e nas densidades das populações microbianas.

na seleção de meios de cultura, deve-se considerar a presença de nutrientes na forma assimilável, que servem como fonte de energia e de carbono para os microrganismos, sendo que as necessidades nutricionais geralmente são específicas. Tem-se observado que, normalmente, as populações fúngicas se desenvolvem melhor em meios com alta relação carbono-nitrogênio, enquanto que, para as populações bacterianas o melhor desenvolvimento acontece em meios com baixa relação carbono-nitrogênio. Na comunidade bacteriana, também existe variabilidade entre as populações de bactérias em geral e de actinomicetos, em relação à utilização dos nutrientes presentes no meio de cultura. Assim, substâncias químicas inibidoras do crescimento de determinadas populações de microrganismos devem ser adicionadas ao meio para tornar as avaliações mais específicas.

Existem diversas maneiras de isolar microrganismos, variando de acordo com o hábito de crescimento, o modo de reprodução e a ecologia do microrganismo. Assim, várias técnicas podem ser utilizadas no isolamento de fungos e bactérias, utilizando partes da planta (caule, rizomas, raízes, folhas, frutos, sementes) ou mesmo o solo.

Dentre os métodos existentes, temos: método de diluição em série, método de plaqueamento e método armadilha ou isca.

Uma grande variedade de fungos e bactérias pode ser obtida pelo emprego do método de diluição em série, possibilitando conhecer a sua população em diferentes perfis do solo, em condições secas ou úmidas e também, em áreas pobres ou férteis, para estudos ecológicos comparativos.

O método de plaqueamento é mais utilizado para isolamento de patógenos de plantas presentes em solo. Nesse caso, utilizam-se pequenas porções de solo suspeito de conter o patógeno numa placa com meio de ágar, usando a ponta de uma espátula ou escalpelo esterilizados numa chama de álcool. Após, colocam-se as placas numa incubadora, observando-as em intervalos regulares.

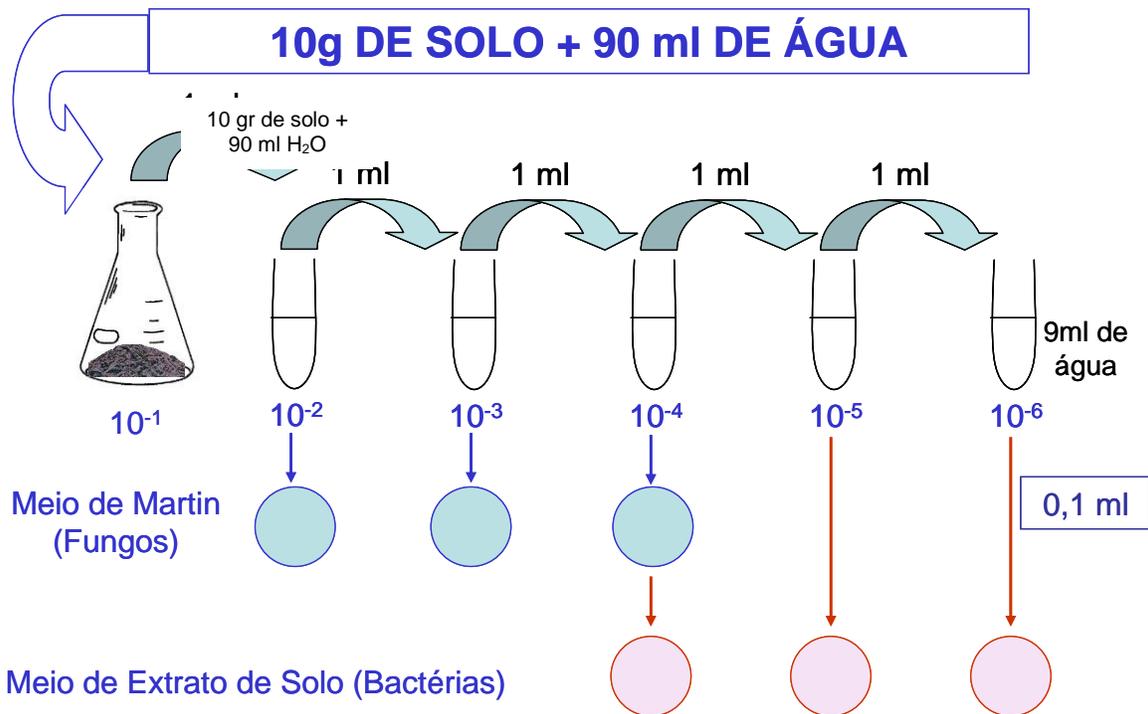
Por outro lado, alguns fungos de solo são mais facilmente isolados utilizando-se o método de armadilha ou isca. Onde, algumas partículas de solo são colocadas sobre a superfície de uma rodela de cenoura esterilizada, as placas são incubadas e observadas até uma semana mais tarde.

## **EXERCÍCIO**

O isolamento de microrganismos do solo será realizado através do método de diluição em série, conforme etapas descritas a seguir:

- coletar pelo menos cinco amostras de solo e fazer uma amostra composta, misturando rigorosamente e peneirando;
- colocar 10 gr do solo seco ao ar em um Erlenmeyer de 250 mL e, em seguida, adicionar 90 mL de água estéril;
- agitar por 30 minutos;
- transferir 1 mL da suspensão para 9 mL de água estéril (diluição 1:100) e agitar brevemente;
- transferir 1 mL desta suspensão para 9 mL de água estéril (diluição 1:1000) e agitar brevemente;
- repetir a operação até obter a diluição desejada. A quantidade de solo e água utilizada pode variar, de acordo com a necessidade, bem como o volume transferido (sempre respeitando a diluição), como visto na Figura 17.
- transferir 0,1 mL de cada diluição do solo para placas Petri contendo meio solidificado, espalhando a suspensão com uma alça de Drigalski.

# DILUIÇÃO SERIADA



**Figura 17.** Esquema das diluições e distribuição das suspensões em placas de Petri contendo meio de cultura.

- incubar as placas em condições de temperatura e luminosidade adequadas; para quantificação dos fungos ou bactérias, multiplicar o número médio de colônias pelo fator de diluição, obtendo-se o número por grama de amostra de solo original.

$$\text{UFC}^* = (\text{n}^\circ \text{ de colônias}) \times 10^{**} \times (\text{diluição utilizada para contagem})$$

\* UFC significa Unidade Formadora de Colônia, uma vez que a contagem feita é referente às colônias e não às células presentes.

\*\* 10 é um fator de correção.

## EXEMPLO:

Se são contadas 105 colônias em uma placa onde foi feita diluição de  $10^{-2}$  o cálculo final será:

$$\text{UFC} = 105 \times 10 \times 10^2 = 1,05 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$$

1) Faça o cálculo de UFC (Unidade formadora de colônia) de pelo menos uma diluição utilizada.

2) O que se pode concluir a respeito da quantidade e grupo de microrganismos encontrados nas amostras de solo utilizadas?

## 10 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E TRATAMENTO DA ÁGUA

### 1. INTRODUÇÃO

A água é um importante meio de transmissão de MICRORGANISMOS, principalmente intestinais. As infecções intestinais são geralmente transmitidas de uma pessoa para outra através da ingestão da água ou consumo de alimentos contaminados. Essas doenças também podem resultar do emprego de água poluída para pesca, irrigação e recreação. Os microrganismos patogênicos responsáveis por infecções do trato intestinal e outras chegam à água através dos excrementos do homem e animais de sangue quente.

Uma série de doenças veiculadas pela água são causadas por bactérias, fungos, protozoários, helmintos e vírus. Entre as doenças causadas por bactérias, são mais frequentes: a febre tifóide, causada pela *Salmonella typhi*; a febre paratifóide pelas *S. paratyphi*, *S. schotmuelleri*; a cólera pelo *Vibrio cholerae*; as desintérias bacilares causadas pelas *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. flexneri* e *S. boydii*. A *Leptospira* entra na água através da urina de animais, sendo o rato o mais comum agente da leptospirose. Algumas bactérias são capazes de conduzir a infecções externas ao corpo, com um simples contato com a água contaminada, como o *Staphylococcus aureus*, que promove intoxicação alimentar, infecções cutâneas e da garganta, e a *Pseudomonas aeruginosa*, que pode provocar infecções nos olhos e ouvidos, importante agente de infecções hospitalares.

Entre os fungos está a levedura *Candida albicans*, que pode provocar candidíase. Entre os protozoários encontramos *Giardia lamblia* e a *Entamoeba histolytica*. Doenças como verminoses intestinais podem ser transmitidas através da água, sendo as mais importantes a ascaridíase (*Ascaris lumbricoides*), ancilostomose (*Ancylostoma duodenale*), tricurose (*Trichuris trichiura*) e esquistossomose (*Schistosoma mansoni*), entre outras. No tocante a doenças ocasionadas por vírus entéricos presentes em água contaminada por fezes, têm a hepatite tipo A, gastroenterite e doenças causadas por Adenovírus, Echovírus, vírus Coxsackie, entre outros.

Raramente é possível isolar patógenos intestinais diretamente da água que sofreu contaminação, porque eles geralmente estão presentes em número relativamente baixo, a menos que a água tenha sido recente e maciçamente contaminada por um portador de doença intestinal. Qualquer abastecimento de água que esteja contaminado com matéria fecal constitui uma fonte potencial de doenças intestinais. Como a *Escherichia coli* é um

habitante constante do trato intestinal humano e de animais superiores, apresenta taxa de sobrevivência semelhante ao das bactérias enteropatogênicas e seu número é bastante grande, embora não seja um agente causal de doença intestinal, sua presença na água constitui indicação de contaminação fecal. Assim, a detecção de *E. coli* na água é o melhor meio de se demonstrar a qualidade da água usada para consumo.

## **2. MICRORGANISMOS SAPRÓFITOS E PATOGÊNICOS NA ÁGUA**

Historicamente, a maioria das nossas preocupações sobre a pureza das águas tem sido relacionada com a transmissão de doenças. A qualidade da água dos nossos rios, lagoas e outros reservatórios é comprometida pelos poluentes nela lançados. Estes são provenientes de esgoto doméstico ou efluente industriais, ou de outras fontes decorrentes do carreamento de contaminantes pela água de chuva que escoam pela superfície do solo ou pavimentação.

Em cidades onde não existe um sistema eficiente de tratamento do esgoto, o esgoto doméstico é um dos principais responsáveis pela poluição das águas, estimulando o crescimento de microrganismos. A assimilação destes contaminantes orgânicos biodegradáveis é realizada com o concurso de bactérias presentes, por meio de um processo que consome o oxigênio dissolvido na água dos rios ou reservatórios.

Quando a carga contaminante dos esgotos é superior a capacidade de autodepuração do rio ou açude, estes ficam sem oxigênio, ocasionando odores fétidos e impedindo a sobrevivência de peixes. Esta condição é medida por dois parâmetros: a Demanda Bioquímica de Oxigênio, que determina a quantidade de matéria orgânica biodegradável presente na água, e o Oxigênio Dissolvido, que mede a concentração de oxigênio na água. Existem indicadores de poluição para as águas destinadas ao consumo humano e água para fins de balneabilidade (recreação), entre outras.

A patogenicidade dos microrganismos é relativa, dependendo de fatores como a resistência do hospedeiro, características de infectividade e produção de toxinas. Qualquer microrganismo é patogênico em potencial, caso encontre um hospedeiro debilitado. Entretanto, apenas um número limitado de espécies microbianas pode provocar doenças em uma porção significativa de hospedeiros normais. Considerando os motivos práticos, o homem é o hospedeiro de preocupação primária, embora, as enfermidades de outros organismos também possam ter importantes implicações econômicas.

A grande maioria das bactérias presentes na água é originária do solo. Uma proporção considerável é constituída pelas espécies nitrificadoras e fixadoras de nitrogênio, envolvidas no ciclo de decomposição da matéria orgânica na natureza, além de outras que têm seu habitat no solo, entretanto não constituindo perigo à saúde.

As águas de abastecimento das cidades e as águas de irrigação de hortas e de recreação apresentam do ponto de vista sanitário, grande importância com relação aos microrganismos patogênicos. Entretanto, a pesquisa destes microrganismos, no que se refere ao isolamento e identificação, é impraticável, por serem caras, difíceis de realizar e demandarem bastante tempo.

Os testes para pureza de água, usados atualmente, visam detectar organismos indicadores em particular. Existem vários critérios para um organismo indicador, o mais importante é que o organismo esteja consistentemente presente em número substancial nas fezes humanas, de forma que, sua detecção seja uma boa indicação que resíduos humanos estão sendo introduzidos na água. O organismo indicador também deve viver na água pelo menos tão bem quanto os patógenos. Os organismos indicadores devem ser detectáveis através de testes simples que podem ser executados por pessoas com pouco treino em microbiologia.

Os organismos indicadores usuais são as bactérias coliformes. Coliformes são definidos como bastonetes Gram-negativos aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de endósporos, que fermentam lactose com produção de gás em 48 horas de incubação em caldo lactosado a 35 °C. Como alguns coliformes não são enterobactérias, mas sim bactérias encontradas em amostras de plantas e de solo, muitos padrões para alimentos e água especificam a identificação de coliformes fecais. O coliforme fecal predominante é a *Escherichia coli*, que constitui uma grande proporção da população bacteriana intestinal humana. Existem testes especializados para distinguir entre coliformes fecais e não fecais. Em condições normais, os coliformes podem não ser patogênicos, embora algumas linhagens possam causar diarreias e infecções urinárias oportunistas. O grupo coliforme apresenta uma série de vantagens como indicadores de poluição fecal na água, a saber; constância e elevado número nas fezes, são fáceis de isolar e identificar, a concentração de coliformes na água é alta. A presença de *E. coli* em águas também poderá representar sérios riscos diretos à saúde, uma vez que existem algumas linhagens que são capazes de provocar distúrbios gastrintestinais em crianças e adultos.

As bactérias empregadas como indicadoras de poluição fecal em águas são os coliformes totais, os coliformes fecais, estreptococos fecais e o *Clostridium perfringens*. As mais utilizadas são pertencentes aos dois primeiros grupos.

Os métodos mais comuns para determinar a presença de coliformes na água são baseados na habilidade das bactérias coliformes em fermentarem lactose. O método dos tubos múltiplos pode ser utilizado para estimar o número mais provável, ou o método da filtração, que é mais direto na determinação e números de coliformes.

Os coliformes têm sido organismos indicadores muito úteis na sanitização de águas, porém, apresentam algumas limitações. O crescimento da bactéria coliforme nas superfícies internas de canos de água não é considerado um perigo para a saúde pública. Um problema mais sério é que alguns patógenos são mais resistentes a desinfetantes do que os coliformes. Dentre estes estão os vírus e cistos de protozoários. Amostras de água quimicamente desinfestadas, livres de coliformes, podem estar infestadas por vírus entéricos, e por alguns cistos que são resistentes à cloração, sendo sua eliminação por este método impossível, neste caso sendo necessária a filtração da água.

### **3. PADRÕES MICROBIANOS DE QUALIDADE DE ÁGUA**

Os padrões microbianos de qualidade de água são estabelecidos em função do uso. Contudo, os padrões brasileiros foram baseados em dados obtidos de regiões temperadas, e para assegurar a sua aplicabilidade necessitam de estudos locais, relevando nossa condição tropical.

#### **A) ÁGUA POTÁVEL**

Os padrões de água potável empregados em todo mundo são semelhantes e baseados nos padrões americanos. Exigem a ausência de coliformes totais em 100 mL de água, em uma única amostra. A presença de mais de 4 coliformes totais em 100 mL de água exige medidas imediatas para corrigir o problema e análises de outras amostras para confirmar a situação. Para compensarem falhas ocasionais na análise do grupo coliforme, tem sido recomendado o uso de indicadores suplementares. Quando a fonte de água não está grosseiramente contaminada, a aplicação do padrão de coliformes totais zero em 100 mL tem sido um objetivo realístico.

## **B) ÁGUA DE CONTATO PRIMÁRIO**

Algumas atividades envolvem contato direto da água e superfícies do corpo, com pouca ou nenhuma ingestão, como o banho e a natação. Nas regiões tropicais a recreação na água é economicamente significativa e está relacionada à indústria do turismo. O risco de contrair infecções de patógenos entéricos oriundos da contaminação fecal é reduzido porque não há ingestão. Por isso, padrões de qualidade de água são menos rigorosos que os estabelecidos para a água potável. O padrão internacional estabelece uma média de 100-300 coliformes fecais/100 mL, contudo os métodos de avaliação imprecisa e análise estatística variável criam esta diferença de valores. Já os padrões brasileiros estabelecem o limite de 1000 coliformes fecais/100 mL, contudo, devem ser considerados indicadores adicionais de patógenos não fecais como *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

## **C) MÉTODOS DE ANÁLISE**

a) Teste presuntivo: colocar amostra de água em tubos de ensaio, contendo caldo lactosado, incubar a 37 °C e observar a produção de gás. Caso seja formado gás, presume-se que a água esteja contaminada. Como *E. coli* e *A. aerogenes* podem formar gás, prossegue-se a análise.

b) Teste de confirmação: o material do tubo é semeado em meio de cultura contendo eosina-azul de metileno (EMB), que permite separar as duas bactérias - *E. coli*: colônia azul-brilhante; *A. aerogenes*: colônia rósea sem brilho.

c) Teste completo: o material de colônias de *E. coli*, plaqueada em EMB, é colocado em caldo lactosado visando observar a formação de gás e em ágar para se efetuar o teste de Gram.

## **D) TRATAMENTO DA ÁGUA**

O tratamento tradicional da água potável envolve uma combinação de métodos físicos e químicos, destinados à remoção da turbidez causada pelos sólidos em suspensão, e a desinfecção para controlar os microrganismos patogênicos. A água originária de poços profundos e de boa qualidade é relativamente livre de microrganismos. Os solos, especialmente os argilosos, atuam como filtros removendo os microrganismos; sendo que, à medida que a água passa, no entanto, os solos arenosos são menos eficientes nesta ação. A matéria orgânica dissolvida na água é degradada pelos microrganismos durante o movimento da mesma nas camadas do solo.

Um manancial aquático bem mantido pode fornecer água potável sem tratamento, entretanto, em áreas residenciais densamente habitadas, as fontes de água frequentemente podem sofrer poluição com esgoto. As águas de superfícies são mais susceptíveis a contaminação fecal.

Quando a água é obtida de reservatórios não contaminados alimentados por poços profundos, ela requer um mínimo de tratamento. Contudo, a maioria das cidades obtém suas águas de fontes bastante poluídas, tais como rios que receberam resíduos municipais ou industriais.

Águas muito turbidas ficam paradas em um reservatório pelo tempo necessário, para permitir a deposição da matéria orgânica particulada suspensa. A água passa então pelo processo de floculação, remoção de materiais coloidais como a argila, que poderia ficar em suspensão indefinidamente. Um floculante químico, como o sulfato de potássio e alumínio, forma agregados de partículas finas suspensas em forma de flocos. Quando estes agregados vão lentamente se depositando no fundo do reservatório, carregam consigo material coloidal. Grandes quantidades de vírus e bactérias são removidas juntamente com o material depositado no fundo do reservatório.

Após a floculação, a água é tratada por filtração, passa através de leitos de 33 a 132 cm de areia fina. Os microrganismos são adsorvidos à superfície das partículas de areia. Os microrganismos não penetram através das rotas tortuosas entre as partículas, mesmo assim os espaços devem ser maiores que os micróbios que estão sendo filtrados. Limpezas periódicas são necessárias para evitar acúmulos. A utilização de carvão ativado na filtração tem como objetivo tanto a remoção de matéria particulada quanto a maioria dos poluentes químicos orgânicos dissolvidos. Tratamentos químicos devem ser feitos para eliminar a dureza, cheiro e sabor da água.

Antes de entrar no sistema de distribuição normal, a água é filtrada e clorada. Como a matéria orgânica neutraliza o cloro, deve-se prestar atenção para manter o nível de cloro efetivo. Quanto a possibilidade de que o cloro possa reagir com contaminantes da água e formar compostos carcinogênicos, é um risco aceitável quando comparado à utilidade comprovada da cloração da água. O cloro tem desvantagem de reagir quimicamente com as substâncias orgânicas presentes na água, formando derivados tóxicos e recalcitrantes, reduzindo a concentração e poder desinfetante. A quantidade de cloro necessária depende do pH e da presença de outras substâncias na água. Em pH levemente ácido, o equilíbrio com a água favorece a forma de hipoclorito, mais potente



3) Interprete os resultados.

4) Visita a estação de tratamento de água da ESALQ.

## 11 - FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

### 1. INTRODUÇÃO

Na Antiguidade, o homem já fazia uso da preservação de alimentos, envolvendo inconscientemente manipulações microbiológicas. Documentos da história antiga revelam que o homem conhecia a arte de fabricar pão, cerveja, vinho e iogurte. Muitos destes alimentos produzidos por fermentações, provavelmente descobertos acidentalmente, já eram conhecidos pelo homem há 8.000 anos. Contudo, as verdadeiras causas que regiam o processo de fermentação permaneceram ignoradas pelo homem até metade do século XIX.

A confirmação por Pasteur, em 1857, de que a fermentação alcoólica era causada por leveduras, isto é, por seres vivos, já havia sido sugerida por outros pesquisadores, como Thenerd, Charles De La Tour, Schwan e Kützing, que sofreram forte oposição por parte dos químicos influentes da época, como Liebig, Berzelius e Whöhler, que admitiam aquele processo ser estritamente químico. A constatação por Büchner, em 1897, de que extratos de células de leveduras possuem capacidade de provocar a fermentação alcoólica, serve de marco inicial do campo da Bioquímica, e é fundamental para o conhecimento do processo de fermentação alcoólica. Fermentação é o processo bioquímico em que os microrganismos retiram do meio em que vivem o material nutritivo que necessitam, ao mesmo tempo em que, sob a ação catalítica de enzimas, produzem substâncias das quais se utiliza a indústria.

### 2. FERMENTAÇÃO

Para muitos, fermentação simplesmente significa produção de álcool; grãos e frutas são fermentados para produzir cerveja e vinho. Outros definem como deterioração de alimentos por microrganismos, ou processo microbiológico em grande escala ocorrendo com ou sem ar. Em suma, fermentação pode ser definida como um processo metabólico que libera energia de açúcares ou moléculas orgânicas, tais como aminoácidos e ácidos orgânicos; que não requer oxigênio, mas podendo ocorrer em sua presença; não requer o uso do ciclo de Krebs ou uma cadeia de transporte de elétrons; utiliza uma molécula orgânica como aceptor final de elétrons; produz somente pequenas quantidades de ATP (somente uma ou duas moléculas de ATP para cada molécula de material inicial) devido ao fato de grande quantidade de energia original da glicose

permanecer nas ligações químicas dos produtos finais orgânicos, tais como ácido láctico ou etanol.

Na fermentação, o doador de elétrons e o receptor final de elétrons são compostos orgânicos. Ambos são usualmente produzidos a partir de um único substrato orgânico no decurso do metabolismo intermediário. Para ser “fermentável”, um composto precisa ser capaz de produzir intermediários tanto oxidáveis quanto redutíveis, por isso, não pode ser nem muito oxidado e nem muito reduzido. Os açúcares preenchem estas exigências admiravelmente e estão entre os compostos mais fácil e amplamente utilizados pelos microrganismos fermentadores. Outras substâncias, incluindo vários ácidos orgânicos, aminoácidos, purinas e pirimidinas podem ser fermentadas por algumas bactérias.

Os produtos finais de uma dada fermentação variam com o tipo de organismo, natureza do substrato fermentável e, em alguns casos, com os fatores ambientais temperatura e acidez do meio.

Contudo, a utilização de microrganismos fermentadores se presta devido principalmente à transformação de um alimento para outro com características mais peculiares no sabor, textura, aparência e digestibilidade, agregando-se assim valor a um produto primário, ou até produzindo um novo alimento sem perda ou utilização de grandes quantidades de energia, visto que se trata de um dos mecanismos de biossíntese de menor gasto energético.

As fermentações são controladas pelo homem através da escolha dos microrganismos, dos substratos, da temperatura e pH adequados.

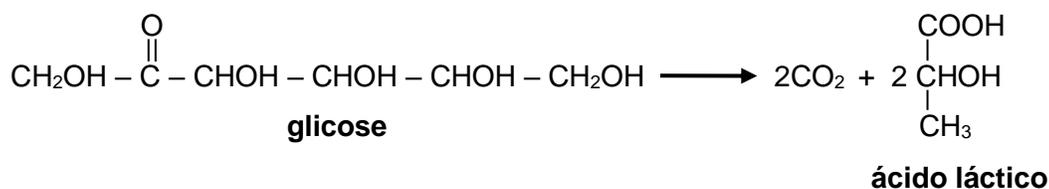
### **3. FERMENTAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO**

O ácido láctico, formado através do processo de fermentação láctica, produz nos alimentos transformações benéficas, ou indesejáveis. Como exemplos de transformações benéficas, estão as que se verificam no leite, que possibilitam a criação de produtos derivados, com excelentes qualidades organolépticas. Como ação indesejável de fermentação láctica, está aquela que ocorre nos sucos de frutas, cervejas e vinhos, que podem ser alterados pela presença de turvações.

O ácido láctico, elaborado através da fermentação láctica, não só torna possível a obtenção de apreciável linha de produtos utilizados como complementos de refeições, como também representam para estes, seu meio de conservação. Os pickles, o chucrute e a azeitona, constituem os mais populares alimentos conservados por meio da fermentação láctica.

A fermentação láctica pode se processar de dois modos. A fermentação homoláctica, realizada por estreptococos e algumas espécies de *Lactobacillus*, resulta na formação de apenas ácido láctico. A fermentação heteroláctica, realizadas por bactérias do gênero *Leuconostoc* e algumas espécies de *Lactobacillus*, origina o ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol, manitol e ácido acético.

Assim, durante a glicólise, que é a primeira fase da fermentação do ácido láctico, uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de ácido pirúvico (Figura 18). Esta oxidação gera energia que é utilizada para formar as duas moléculas de ATP. No próximo passo, as duas moléculas de ácido pirúvico são reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de ácido láctico. Devido ao fato do ácido láctico ser o produto final da reação, ele não sofre mais oxidação, e a maioria da energia produzida pela reação permanece armazenada no ácido láctico. Então, esta fermentação rende somente uma pequena quantidade de energia. A equação geral para a fermentação conduzindo um açúcar como a glicose à formação de ácido láctico pode ser descrita como:



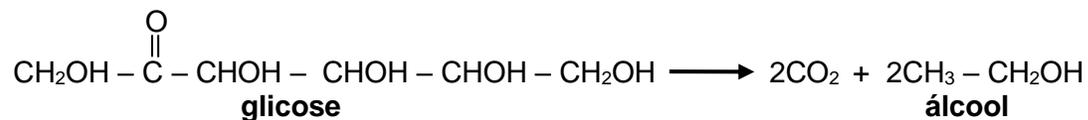
Dois importantes gêneros de bactérias do ácido láctico são *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Devido ao fato desses microrganismos produzirem somente ácido láctico, eles são referidos como homofermentativos.

#### 4. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O substrato ou matéria-prima para a fermentação alcoólica é bastante variável, constituída por produtos açucarados (cana-de-açúcar, beterraba, mel, melaço e frutas) e amiláceos (amido de grãos, raízes e tubérculos).

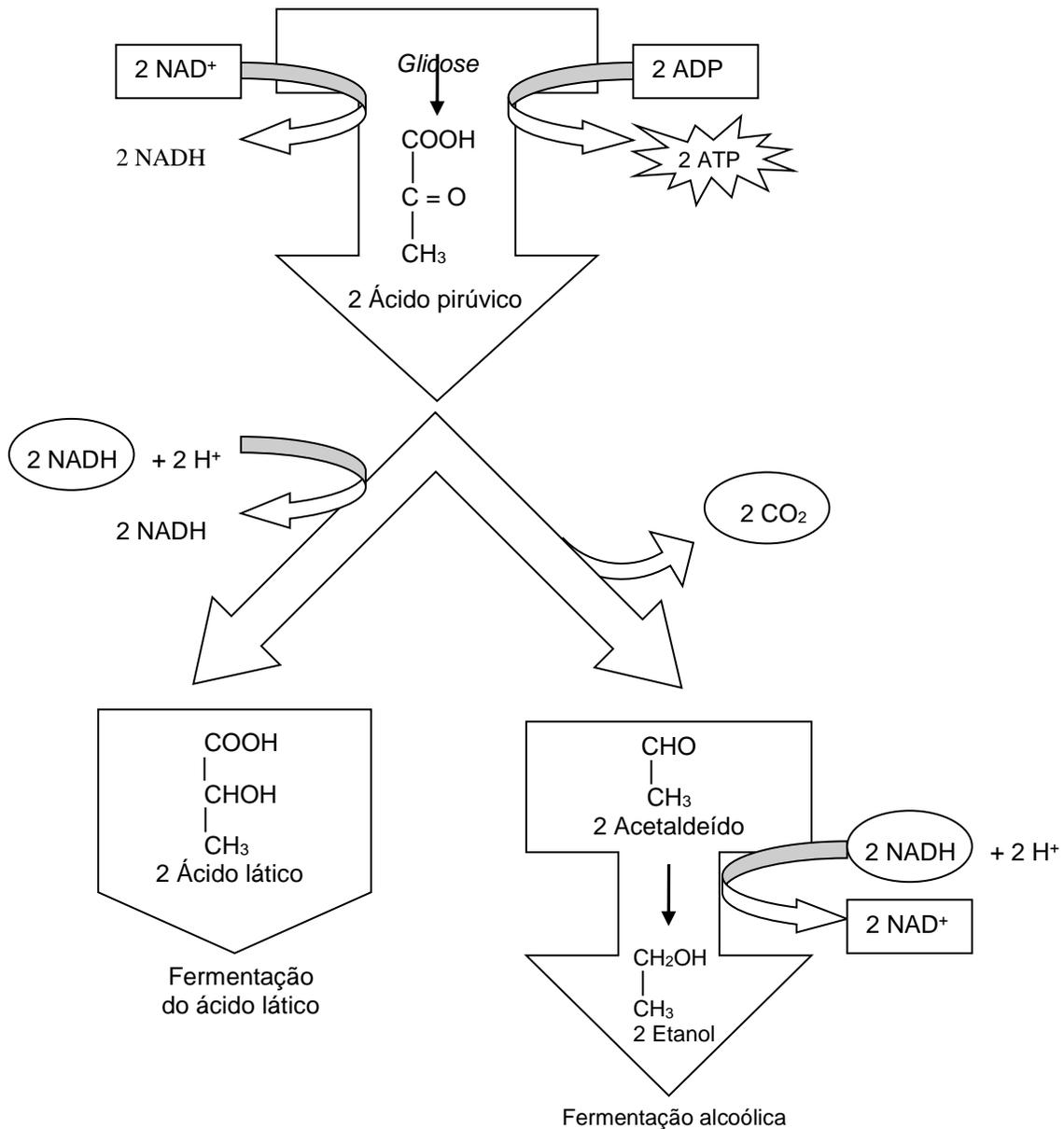
Os açúcares monossacarídeos como glicose e frutose são fermentados diretamente. Já os dissacarídeos como a sacarose, necessitam sofrer o fenômeno de inversão, realizado pelas enzimas invertase; já os amidos necessitam ser sacarificados química, enzimática ou biologicamente, para que sejam disponíveis açúcares fermentáveis.

A fermentação alcoólica é característica dos tecidos vegetais de plantas superiores, das leveduras, de alguns outros fungos, e de poucas bactérias. A equação geral para a fermentação alcoólica de um açúcar como a glicose pode ser descrita como:



A fermentação alcoólica também começa com a glicólise de uma molécula de glicose para obter duas moléculas de ácido pirúvico e duas moléculas de ATP. Na próxima reação, as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas a duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO<sub>2</sub>. As duas moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol. Outra vez, a fermentação alcoólica é um processo de baixo rendimento energético porque a maioria da energia continua na molécula de glicose original pertencente ao etanol, o produto final (Figura 18).

A fermentação alcoólica é realizada por algumas bactérias e leveduras. O etanol e o dióxido de carbono produzidos pela levedura *Saccharomyces* são resíduos para as células leveduriformes, mas são úteis para os humanos. O etanol produzido pelas leveduras forma o constituinte alcoólico das bebidas alcoólicas, e o dióxido de carbono produzido pelas leveduras causa crescimento na massa do pão.

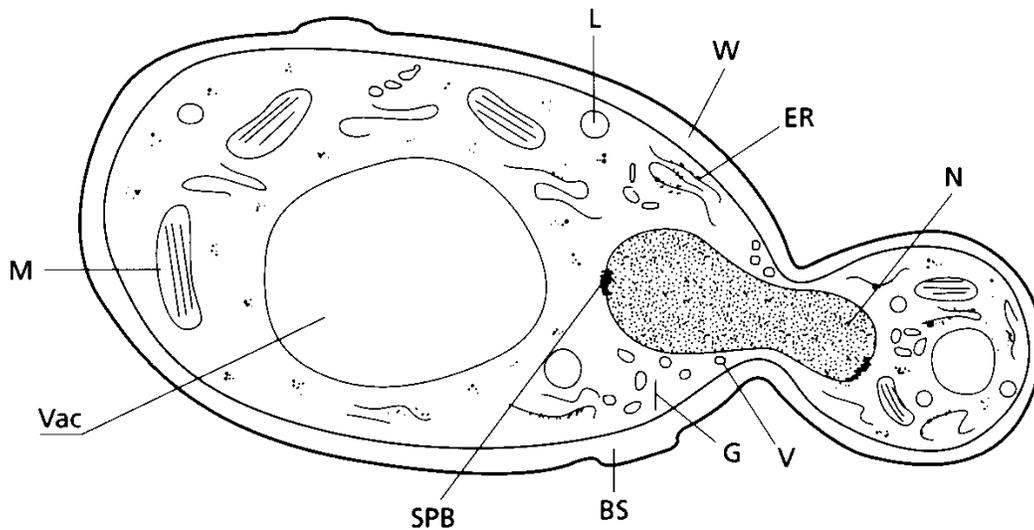


**Figura 18.** Diagrama dos tipos de fermentação

## 5. A LEVEDURA

As leveduras são fungos unicelulares, ascomicetos não-filamentosos, caracteristicamente esféricas ou ovais. Da mesma forma que os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente distribuídas na natureza: são frequentemente encontradas como um pó branco cobrindo frutas e folhas. As leveduras se multiplicam por fissão binária, como a *Schizosaccharomyces*, ou por brotamento, como *Saccharomyces*. As

leveduras que se multiplicam por brotamento formam uma protuberância (broto) em sua superfície extrema, onde, a medida em que o broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide, e um dos dois núcleos migra para o broto. O material da parede celular é então sintetizado entre o broto e a célula parental, e o broto eventualmente se separa da célula mãe (Figura 19).



**Figura 19.** Representação da reprodução da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

- W** – parede celular
- Vac** – vacúolo central
- BS** – cicatriz de brotamento
- M** - mitocôndrio
- L** - corpúsculo de lipídeo
- G** – aparelho de Golgi
- ER** – retículo endoplasmático
- V** – vesícula
- SPB** – “spindle-pole body” equivalente ao centríolo em outros eucariotos
- N** – núcleo

As leveduras são capazes de crescimento anaeróbio facultativo podendo utilizar oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons. Este é um atributo valioso porque permite que estes fungos sobrevivam em vários ambientes. Se é dado acesso ao oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar os hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água; na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono. Esta fermentação é usada na fabricação de cerveja, do vinho e nos processos de panificação.

Os microrganismos por eles mesmos constituem um produto industrial. A levedura utilizada em panificação é produzida em grandes tanques de fermentação aerados. Ao final da fermentação, o conteúdo do tanque é de aproximadamente 4% de levedura sólida. As células são coletadas por centrifugação contínua, prensadas em blocos de leveduras, e vendidas em supermercados para utilização doméstica.

## **6. OUTRAS FERMENTAÇÕES**

Embora as fermentações láctica e alcoólica sejam os processos fermentativos mais difundidos nos organismos vivos em geral, muitos outros tipos de fermentações existem, que diferem entre si com relação aos substratos fermentados ou a natureza dos produtos finais formados (Tabela 5). É particularmente entre as bactérias que uma grande variedade de padrões fermentativos é encontrada, cada um deles característico de um grupo bacteriano específico. Entre os produtos finais da fermentação de carboidratos há numerosos compostos ácidos e alcoólicos, dióxido de carbono e hidrogênio gasoso. Os produtos finais característicos definem uma série de classes diferentes de fermentação.

TABELA 5. Usos industriais para diferentes tipos de fermentação.

| Microrganismo                          | Material inicial    | Uso comercial ou industrial    | Produto final da fermentação          |
|----------------------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>        | Extrato de malte    | Cerveja                        | Etanol                                |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var.   | Uva ou outros       | Vinho                          | Etanol                                |
| <i>Ellipsoideus</i>                    | sucos de frutas     |                                |                                       |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>        | Refugos industriais | Combustível                    | Etanol                                |
| <i>Acetobacter</i>                     | Etanol              | Vinagre                        | Ácido acético                         |
| <i>Lactobacillus, Streptococcus</i>    | Leite               | Queijo, iogurte                | Ácido láctico                         |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i>        | Grão, açúcar        | Pão de centeio                 | Ácido láctico                         |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>         | Repolho             | Chucrute                       | Ácido láctico                         |
| <i>Pediococcus</i>                     | Carne               | Salsicha, linguiça             | Ácido láctico                         |
| <i>Propionibacterium freudnreichii</i> | Ácido láctico       | Queijo suíço                   | Ácido propiônico e dióxido de carbono |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i>      | Melaço              | Usos farmacêutico e industrial | Acetona e butanol                     |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>        | Melaço              | Usos farmacêutico e industrial | Glicerol                              |
| <i>Aspergillus</i>                     | Melaço              | Sabor                          | Ácido cítrico                         |
| <i>Methanosarcina</i>                  | Ácido acético       | Combustível                    | Metano                                |
| <i>Acetobacter</i>                     | Sorbitol            | Vitamina C                     | Sorbose                               |

## 7. EXERCÍCIOS

- 1) O que é fermentação alcoólica? Qual a finalidade do experimento com caldo de cana + *Saccharomyces cerevisiae* e o tubo de Smith?

2) Esquematize, colocando legendas, as estruturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* observada ao microscópio.

| Fermento Biológico | Caldo de cana |
|--------------------|---------------|
|                    |               |

## 12 – FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

### 1. INTRODUÇÃO

O ar atmosférico possui nitrogênio e cerca de 78% da constituição gasosa da atmosfera, é formada por **nitrogênio molecular** ou dinitrogênio ( $N_2$ ). No entanto, os organismos eucariontes são incapazes de absorver o  $N_2$  e convertê-lo a uma forma assimilável. Assim, o  $N_2$  move-se para dentro da planta através dos estômatos, saindo logo em seguida, sem que possa ser utilizado. Por esta razão, a transformação cíclica de compostos de nitrogênio, incluindo a mineralização da matéria orgânica, é de fundamental importância na transformação geral deste elemento na biosfera. Os principais aspectos do ciclo do nitrogênio estão ilustrados na Figura 20.

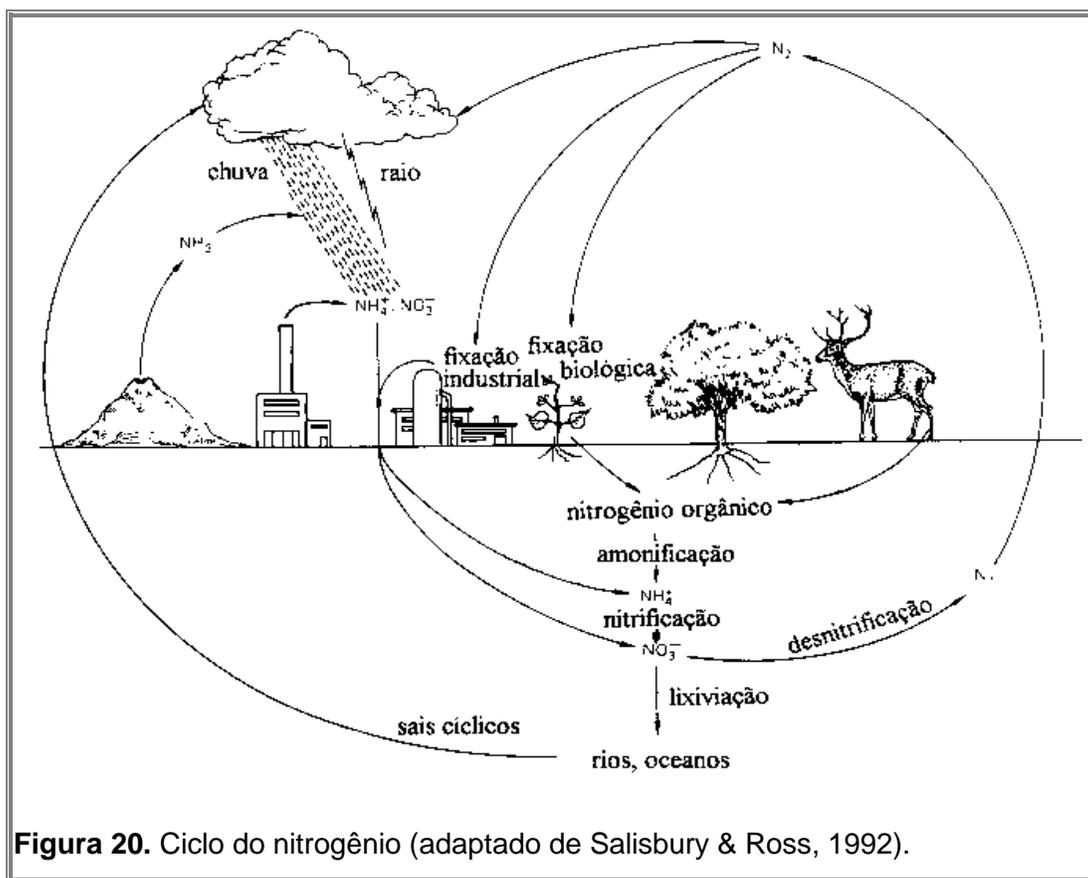
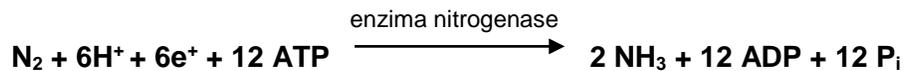


Figura 20. Ciclo do nitrogênio (adaptado de Salisbury & Ross, 1992).

Os átomos encontram-se unidos de uma maneira muito estável na molécula de nitrogênio e por esse motivo para que o  $N_2$  possa ser convertido a uma forma assimilável é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (**fixação industrial**) ou a presença de um sistema enzimático apropriado (**fixação biológica**).

A fixação industrial do N<sub>2</sub>, chamada de processo de Haber-Bosch, utiliza temperaturas em torno de 400-600°C e pressões em torno de 100-200 atm, sendo dispendiosa do ponto de vista energético. Reação: **N<sub>2</sub> + 3 H<sub>2</sub> ---> 2 NH<sub>3</sub>**

Já as bactérias fixadoras de nitrogênio, possuem a enzima **nitrogenase**, sendo esta um complexo de duas enzimas – uma proteína contendo ferro e outra contendo molibdênio, que juntas catalisam a seguinte reação:



A reação catalisada pela nitrogenase requer não somente uma fonte de elétrons para reduzir o N<sub>2</sub> em NH<sub>3</sub> como também grande quantidade de energia na forma de ATP. Além do mais, a nitrogenase é facilmente inativada pelo oxigênio. Algumas bactérias fixadoras de nitrogênio são anaeróbicas e, normalmente, vivem em ambientes livres de oxigênio. Entretanto, outras são aeróbias e utilizam vários meios para manter o oxigênio distante da nitrogenase no interior da célula. Por exemplo, um *Azotobacter* respira tão rápido (reduz o oxigênio à água rapidamente) na superfície celular que o interior da célula permanece livre de oxigênio.

Assim, podemos caracterizar três grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotrofos: diazotrofos de vida livre (que fixam o nitrogênio para seu próprio uso); diazotrofos associativos (que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose) e os diazotrofos simbióticos (que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos).

## 2. MICRORGANISMOS SIMBIÓTICOS

A capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente é encontrada em vários grupos de microrganismos e, em alguns casos, observa-se a formação de estruturas diferenciadas. Em relação ao rizóbio, durante a sua associação com leguminosas, são observadas estruturas chamadas nódulos. Esses microrganismos são tipicamente hábeis para invadir as raízes de plantas leguminosas de zonas temperadas e tropicais, fazendo com que ocorra a formação do nódulo. Nos nódulos, o rizóbio, na forma pleiomórfica (bacteróide) está normalmente envolvido na fixação do nitrogênio atmosférico dentro de uma forma combinada (amônia), que pode ser utilizado pela planta hospedeira. Atualmente, são conhecidos cinco gêneros de diazotrofos da família *Rhizobiaceae*:

*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*.

A taxa de fixação de nitrogênio varia com a espécie, mas é geralmente limitada pelas condições abióticas do solo, como: a acidez do solo, o tipo de solo, textura e composição, temperatura e umidade e metais pesados. Entretanto, em condições favoráveis, inoculando com o rizóbio específico, corrigindo deficiências dos demais nutrientes e adequando a espécie às condições edafopedoclimáticas, altas taxas de fixação podem ser obtidas.

Os rizóbios podem ser isolados dos nódulos, mas não são facilmente identificados quando isolados do solo. Tradicionalmente, os rizóbios são divididos em grupos, de acordo com a velocidade de crescimento, como primeiro sugerido por Lonis & Hansen (1921), os de crescimento rápido (*Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), crescimento intermediário (*Mesorhizobium*) e crescimento lento (*Bradyrhizobium*).

As bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são aeróbias, Gram negativas, usualmente produzem poli- $\beta$ -hidroxibutirato, são móveis, com temperatura ótima de crescimento variando de 25-30°C e pH 6,0-7,0. Algumas estirpes, porém, podem crescer em extremos de temperatura (4 - 42,5°C) e pH (4,5-9,5). São quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono, sem a formação de gás. Celulose e amido não são utilizados. Produzem uma reação ácida em meio contendo sais minerais e manitol ou outros carboidratos e reação alcalina oriunda de uma reação proteolítica. Sais de amônio, nitrato, nitrito e muitos aminoácidos podem servir como fontes de nitrogênio. Peptona é pobremente utilizada e a caseína e o ágar não são hidrolizados.

O gênero *Bradyrhizobium* possui características semelhantes ao gênero *Rhizobium*, diferindo nos seguintes aspectos: a reação que ocorre em meio contendo sais minerais e manitol é alcalina e, algumas estirpes podem crescer quimiolitotroficamente na presença de H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e baixos níveis de O<sub>2</sub>. Este gênero possui três espécies: *B. japonicum*, *B. elkanii* e *B. lianinense*.

O gênero *Azorhizobium* compreende apenas uma espécie *A. caulinodans*, capaz de nodular a raiz e caule de *Sesbania rostrata*. Este gênero não assimila açúcares (exceto glicose). Pode fixar nitrogênio no estado de vida livre.

O gênero *Mesorhizobium* possui estirpes com células Gram-negativas, aeróbias, móveis (apresentam flagelo) podendo conter poli- $\beta$ -hidroxibutirato. Todas as espécies assimilam glicose, raminose e sacarose metabolizando-os em produtos ácidos. O pH ideal

para crescimento está entre 4,0 e 10,0 e temperatura entre 37 a 40°C. Já foram descritas as espécies *M. loti* (nodulando *Lotus*), *M. huakuii* (nodulando *Astragalus sinicus*), *M. ciceri* e *M. mediterraneum* (nodulando *Cicer arietinum*), *M. tianshanense*, *M. amorphi* (nodulando *Amorpha sp.*) e *M. plurifarium* (nodulando *Cicer*).

No gênero *Sinorhizobium* as células usualmente contêm grânulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, são Gram-negativas, aeróbias e móveis. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25 e 30°C, mas muitas estirpes crescem a 35°C e outras a 10°C, o pH ótimo está entre 6,0 e 8,0, porém, algumas estirpes crescem em pH 5,0 e outras em pH 10,5. As bactérias são quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos (mas não celulose e amido) e sais de ácidos orgânicos como fonte de carbono. Cloreto de amônio e nitrato ao invés de aminoácidos são preferidos como fonte de nitrogênio, mas algumas estirpes utilizam certos aminoácidos. O gênero possui as seguintes espécies: *S. meliloti* (nodulando *Medicago*) *S. fredii* (*Glycine*) *S. saheli*, *S. teranga* (*Acacia*) e *S. medicae* (nodulando *Medicago polymorpha*).

O novo gênero *Allorhizobium* está representado pela espécie *A. undicola*, bactéria fixadora de nitrogênio capaz de formar nódulos no caule de *Neptunia natans*, uma leguminosa tropical de ocorrência no Senegal. Foi demonstrado que este grupo é fenotipicamente e filogeneticamente separado das espécies descritas anteriormente, sendo o seu vizinho mais próximo, o *Agrobacterium vitis*, com 96,2% de homologia, deduzido pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. As células são Gram-negativas, aeróbias e móveis, quimiorganotróficas e utilizam uma série de ácidos orgânicos e aminoácidos como fonte de carbono para crescimento.

Além dos rizóbios, bactérias pertencentes ao gênero *Frankia*, também fazem simbiose com diversas plantas. Essas bactérias são aeróbias ou microaerófilas, Gram-positivas, embora as células mais velhas podem ser Gram variável, pertencendo à ordem *Actinomycetales*, uma ordem de bactérias filamentosas, sendo a simbiose chamada de actinorriza. Há uma grande diversidade de plantas noduladas por *Frankia* incluindo mais de 200 espécies distribuídas em 24 gêneros de oito famílias.

O processo de infecção por *Frankia* inicia-se como uma relação simbiótica com a planta hospedeira, podendo ser de dois tipos, infecção de raízes e infecção via penetração intercelular, sendo estes modos análogos aos observados nos legumes simbióticos. Ao contrário dos nódulos dos legumes que são limitados por oxigênio, nódulos actinorrizais mostram máxima velocidade de fixação de nitrogênio em níveis atmosféricos de oxigênio. Plantas actinorrizais são mais numerosas e possuem maior

diversidade em regiões temperadas, onde são frequentemente encontradas em solos pobres em nitrogênio.

Uma outra simbiose de grande importância é a que ocorre entre as cianobactérias e várias plantas. Elas são procariotos Gram-negativos, que fazem fotossíntese, com aspectos muito similares as plantas superiores. Possuem células especializadas em fixar nitrogênio, os heterocistos, pois a cianobactéria faz na mesma célula a fotossíntese (processo oxigênico) e a fixação de nitrogênio (processo sensível ao oxigênio). A maior parte das associações é de espécies dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena*. Além disso, fungos e algas formadoras dos líquens constituem alguns exemplos de simbiose (gênero *Collema*, *Peltigera*, *Leptogium*, etc).

### 3. FIXAÇÃO ASSIMBIÓTICA (ISOLAMENTO DE *Azotobacter*)

Em geral, já foram descritas espécies representantes de vários grupos de procariotos com a capacidade de fixar nitrogênio, como as bactérias fotossintéticas (ex.: *Rhodospirillum rubrum*), as bactérias anaeróbicas (ex.: *Clostridium spp.*), as microaeróbicas (ex.: *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus spp.*, *Burkholderia spp.*, etc), as bactérias aeróbicas (ex.: *Azotobacter spp.* e *Derxia spp.*) e também alguns representantes das cianobactérias (algas verdes-azuladas) e actinomicetos (*Frankia*). Histórica e economicamente, vários diazotrofos têm sido amplamente utilizados como organismos modelos para investigações em laboratórios. *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* e *Azotobacter chroococcum* foram muito utilizados para o isolamento e caracterização da enzima nitrogenase.

A maioria das bactérias diazotróficas de vida livre são heterotróficas, requerendo ecossistemas capazes de prover uma fonte de carbono utilizável, necessária para a fixação de nitrogênio. Os diazotrofos de vida livre foram os primeiros a serem reconhecidos, como é o caso de *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica*, isoladas da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar de solos tropicais, sendo demonstrado o seu potencial na associação com Gramíneas.

Bactérias do gênero *Klebsiella* e *Enterobacter*, da família *Enterobacteriaceae*, são anaeróbicas facultativas que fixam nitrogênio, porém requerem compostos nitrogenados para crescer sob condições estritamente anaeróbicas.

A família *Azotobacteraceae* é representada por dois gêneros, *Azotobacter* e *Azomonas*, sendo todos aeróbicos, heterotróficos e fixadores de nitrogênio. Dentre as

espécies de *Azotobacter* conhecidas, as mais comuns são *A. chroococcum*, *A. vinelandii* e *A. paspali*, sendo esta última a mais estudada ecologicamente. *Azomonas spp.* é encontrada em habitats de água corrente. Existe somente um relato na literatura sobre a ocorrência de uma espécie desse gênero em solo, a *A. macrocytogenes*.

Os microrganismos que realizam fixação assimbiótica ou livre apresentam contribuição relativamente pequena (12-75 Kg/hectare de solo anualmente). Entretanto, este tipo de fixação está mais presente que a fixação simbiótica, visto ser feita por microrganismos livres ou independentes, que vivem no solo ou na água. Dentre estes microrganismos, podemos destacar as bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Beijerinckia*.

O gênero *Azotobacter* tem como características ser bastonetiforme, parecendo algumas vezes com leveduras. Suas células são flageladas peritríquias, não apresentam endosporos, são Gram-negativas e aeróbias obrigatórias, tendo como limites de temperatura de 9-35 °C. A temperatura ótima de crescimento varia de 25 a 28 °C, com a temperatura letal variando de 45 a 50 °C, numa exposição de 30 minutos. O pH pode variar de 5,5 a 8,5, havendo variedades ácido-tolerantes (pH = 4,6), sendo que estes organismos estão presentes no solo e na água. Uma *Azotobacter* típica tem uma estrutura celular muito característica, onde seus bastonetes vegetativos são maiores do que a maioria das eubactérias unicelulares e ocorrem aos pares. Além disso, algumas espécies formam células de repouso típicas (cistos).

Além de poder utilizar o Método da diluição em série, outro método que pode ser utilizado para isolar bactérias, como *Azotobacter sp.*, seria o Método da cultura de enriquecimento.

### **3.1 MÉTODO DA CULTURA DE ENRIQUECIMENTO**

Para o estudo de vários tipos fisiológicos de microrganismos existentes na natureza, foi desenvolvida a técnica da *cultura de enriquecimento*, ou seja, elabora-se um meio de cultura com composição química definida e inocula-se-o com uma população microbiana mista, como por exemplo uma amostra de solo. Examina-se o crescimento dos microrganismos neste meio, afim de observar quais microrganismos predominam. Como sua predominância decorre de sua capacidade de se desenvolver neste *meio de enriquecimento*, esse tipo de microrganismo pode ser facilmente isolado pelo plaqueamento em meio sólido de composição idêntica.

Para microrganismos que utilizam o nitrogênio atmosférico como única fonte do elemento nitrogênio, deve-se preparar um meio isento de nitrogênio combinado, mas que

contenha todos os demais nutrientes necessários ao seu crescimento. Uma amostra de solo contendo este tipo de microrganismo é inoculada neste meio, na presença de  $N_2$ , e sobre determinado conjunto de condições físicas. Podem ser variados inúmeros fatores, como a fonte de carbono, temperatura, suprimento de energia, entre outros fatores. Sabe-se que este tipo de meio descrito anteriormente é altamente específico para o isolamento de três grupos microbianos diferentes: as bactérias aeróbias *Azotobacter*, certas algas verde-azuladas e algumas bactérias verde-azuladas do gênero *Clostridium*.

#### 4. EXERCÍCIO

1) Pesar 100 g de solo, previamente peneirado e homogeneizado; pesar 5 g de amido (Maizena). Misturar solo + amido em recipiente plástico, utilizando um bastão de vidro ou espátula e adicionar água da torneira, aos poucos. Misturando-se o material até que seja obtida uma mistura pastosa, que apresente uma superfície bem lisa, transferir parte da mistura para uma placa de Petri esterilizada, moldando a massa de forma que a parte central se apresente mais elevada que à parte periférica, situada nos bordos da placa.



Alisar a superfície com uma espátula, umedecendo-a sempre que necessário. Anotar o nº do balcão/turma na placa e incubá-la em condições ambiente de laboratório até a próxima aula.

Comentar sobre as características do exercício (meio seletivo para *Azobacter* sp - meio isento de nitrogênio combinado; desequilíbrio da relação C/N).

2) Examinar o tipo de microrganismo predominante que se desenvolveu na superfície da pasta de solo colocado na placa de Petri;

3) Esquematizar as células de *Azotobacter* sp.

4) Esquematize a sequência do preparo do exercício para o isolamento de *Azotobacter* do solo. Qual a principal característica de um meio seletivo para o isolamento de *Azotobacter*?

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos, volume I, 3ª. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919p.
- EVANGELISTA, J. Tecnologia de alimentos. 2ª ed., 1992, 652p.
- MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: I. S. Melo & J. L. Azevedo (eds.). Controle Biológico, v.1, Jaguariúna, SP. Embrapa, 264p, 1998.
- MELO, I.S, AZEVEDO, J.L. Controle Biológico, v.3, Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente, 388p. 2000.
- MINHONI, M.T.A. & DA SILVA, A.F. Metabolismo, nutrição e fisiologia de microorganismos. Manual teórico prático de biotecnologia e microbiologia aplicada;, 1991, 44p.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia: conceitos e aplicações, volume I, 2ª. ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996. 523p.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia: conceitos e aplicações, volume II, 2ª. ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996. 523p.
- SILVEIRA, V.D. Lições de Micologia 3ª. ed. Rio de Janeiro: Editora José Olympio, 1968. 301p.
- SOARES, J.B. & MAIA, A.C.F. Água: Microbiologia e Tratamento. 1ª ed., 1999, 215p.
- STANIER, R.Y. Mundo dos Micróbios. 2ª ed., 1969, p.
- STEVENSON, G.B. Biologia dos fungos, bactérias e vírus, São Paulo: Editora Polígono, 1974. 267p.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Artes Médicas Sul, Porto Alegre, 2000, 827p.