

II • Crescimento populacional

Relembre que o crescimento é definido como um aumento no *número* de células em uma população. Assim, prosseguiremos considerando os eventos de crescimento e divisão em uma célula individual para compreender a dinâmica do crescimento em populações bacterianas.

5.5 Aspectos quantitativos do crescimento microbiano

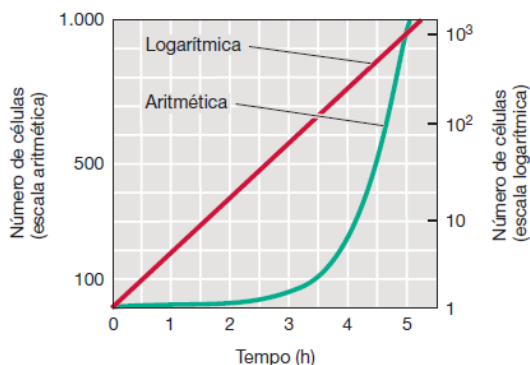
Durante a divisão celular, uma célula transforma-se em duas. Durante o tempo necessário para que esse processo ocorra (tempo de geração), o *número* total de células e a *massa* duplicam-se (Figura 5.1). Conforme veremos, o número de células em uma cultura bacteriana em crescimento pode rapidamente tornar-se muito elevado, portanto daremos enfoque à maneira de lidar com esses grandes números em uma forma quantitativa.

Plotando dados de crescimento

Um experimento de crescimento iniciado com uma única célula, com tempo de geração de 30 minutos, é apresentado na **Figura 5.9**. Este padrão de aumento populacional, em que o número de células é duplicado a um intervalo de tempo constante, é denominado **crescimento exponencial**. Em um experimento desse tipo, quando o número de células é plotado em um gráfico de coordenadas aritméticas (lineares) em função do tempo, obtém-se uma curva de inclinação constantemente crescente (Figura 5.9*b*). Em contrapartida, quando o número de células é plotado em uma escala logarítmica (\log_{10}) em função do tempo (um gráfico *semilogarítmico*), conforme ilustrado na Figura 5.9*b*, obtém-se uma linha reta. Essa função linear reflete o fato de que as células estão crescendo exponencialmente e a população está se duplicando em um intervalo de tempo constante.

Tempo (h)	Número total de células	Tempo (h)	Número total de células
0	1	4	256 (2^8)
0,5	2	4,5	512 (2^9)
1	4	5	1.024 (2^{10})
1,5	8	5,5	2.048 (2^{11})
2	16	6	4.096 (2^{12})
2,5	32	.	.
3	64	.	.
3,5	128	10	1.048.576 (2^{20})

(a)



(b)

Figura 5.9 Taxa de crescimento de uma cultura microbiana. (a) Dados de uma população que se duplica a cada 30 minutos. (b) Dados plotados em escalas aritmética (ordenada à esquerda) e logarítmica (ordenada à direita).

Gráficos semilogarítmicos também são convenientes para estimar os tempos de geração de uma cultura a partir de um conjunto de dados de crescimento, uma vez que o tempo de geração pode ser consultado diretamente a partir do gráfico, conforme apresentado na **Figura 5.10**. Por exemplo, quando dois pontos na curva que representa duplicação de uma célula no eixo Y são selecionados e linhas verticais são desenhadas a partir deles até interceptar o eixo X, o intervalo de tempo mensurado no eixo X é o tempo de geração (**Figura 5.10b**).

A matemática e as expressões do crescimento

O aumento no número de células de uma cultura bacteriana em crescimento exponencial pode ser expresso com matemática simples baseada em uma progressão geométrica de quociente 2. Quando uma célula se divide, originando duas células, expressamos esse processo como $2^0 \rightarrow 2^1$. Quando duas células originam quatro, esse processo é expresso como $2^1 \rightarrow 2^2$, e assim por diante (**Figura 5.9a**). Há uma relação fixa entre o número de células inicialmente presentes em uma cultura e o número presente após um período de crescimento exponencial; essa relação pode ser expressa como

$$N = N_0 2^n$$

em que N corresponde ao número final de células, N_0 representa o número inicial de células e n é o número de gerações formadas durante o período de crescimento exponencial. O tempo de geração (g) da população em crescimento exponencial corresponde a t/n , em que t refere-se à duração do crescimento exponencial, sendo expresso em dias, horas ou minutos. A partir do conhecimento dos números inicial e final de células em uma população em crescimento exponencial, é possível calcular n e, a partir de n e do conhecimento de t , o tempo de geração, g .

A equação $N = N_0 2^n$ pode ser expressa em termos de n , tomando os logaritmos de ambos os lados, como a seguir:

$$\begin{aligned} N &= N_0 2^n \\ \log N &= \log N_0 + n \log 2 \\ \log N - \log N_0 &= n \log 2 \\ n &= \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0,301} \\ &= 3,3(\log N - \log N_0) \end{aligned}$$

Usando esta última expressão, é possível calcular os tempos de geração em termos de quantidades mensuráveis, N e N_0 . Para exemplificar, considere os dados reais de crescimento do gráfico ilustrado na **Figura 5.10b**, no qual $N = 10^8$, $N_0 = 5 \times 10^7$ e $t = 2$:

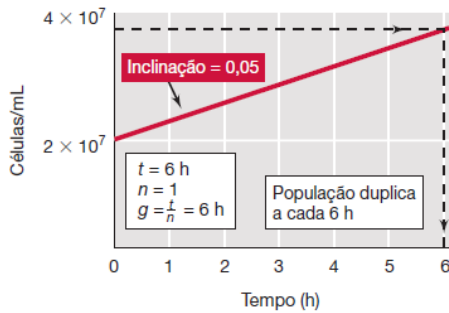
$$\begin{aligned} n &= 3,3 [\log(10^8) - \log(5 \times 10^7)] \\ &= 3,3 (8 - 7,69) = 3,3 (0,301) = 1 \end{aligned}$$

Assim, nesse exemplo, $g = t/n = 2/1 = 2$ h. Se o crescimento exponencial prosseguisse por mais duas horas, o número de células seria 2×10^8 . Após duas horas, o número de células seria 4×10^8 , e assim por diante. Além de determinar o tempo de geração de uma cultura em crescimento exponencial por inspeção dos dados gráficos, o g pode também ser calculado diretamente a partir da inclinação da função linear obtida em um gráfico semilogarítmico de crescimento exponencial. A inclinação é calculada como $0,301 n/t$ (ou $0,301/g$). No exemplo acima, a inclinação seria então $0,301/2$, ou $0,15$. Uma vez que g é igual a $0,301/\text{inclinação}$, obtemos o mesmo valor de 2 para g . O termo $0,301/g$ é denominado *taxa específica de crescimento*, abreviada por k .

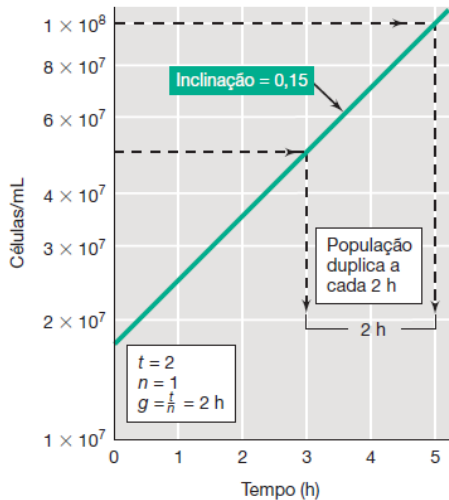
Outra expressão útil de crescimento pode ser calculada a partir desses dados. Por exemplo, a recíproca do tempo de geração, denominada *taxa de divisão*, abreviada por v . A taxa de divisão é igual a $1/g$, apresentando unidades de horas recíprocas (h^{-1}). Isso significa que, enquanto o termo g é uma medida do tempo necessário para uma população dobrar o número de células, v é uma medida do número de gerações por unidade de tempo, em uma cultura em crescimento exponencial. A inclinação da reta relacionando o log do número de células ao tempo (**Figura 5.10**) é igual a $v/3,3$. De posse dos valores de n e t , pode-se calcular g , k e v para diferentes microrganismos, crescendo em diferentes condições de cultura. Esses cálculos são úteis para otimizar as condições de cultivo de um organismo recentemente isolado e também para avaliar os efeitos positivos e negativos de algum tratamento sobre a cultura bacteriana. Por exemplo, comparando-se a um controle não tratado, os fatores que estimulam ou inibem o crescimento podem ser identificados mensurando-se seu efeito sobre os vários parâmetros de crescimento aqui discutidos.

As consequências do crescimento exponencial

Durante o crescimento exponencial, inicialmente o aumento no número de células é relativamente lento, porém posteriormente torna-se acelerado. Nos estágios finais do crescimento, observa-se um aumento significativo do número de células. Por exemplo, no experimento apresentado na **Figura 5.9**, a taxa de produção de células nos primeiros 30 minutos de crescimento corresponde a uma célula a cada 30 minutos. Entretanto, entre 4 e 4,5 horas de crescimento, a taxa de produção



(a)



(b)

Figura 5.10 Cálculo dos parâmetros de crescimento microbiano. Método para estimar os tempos de geração (g) de populações em crescimento exponencial, com tempos de geração de (a) 6 h e (b) 2 h, a partir de dados plotados em gráficos semilogarítmicos. A inclinação de cada reta é igual a $0,301/g$, e n representa o número de gerações formadas no intervalo de tempo, t . Todos os números estão expressos de acordo com a notação científica, isto é, $10.000.000$ equivale a 1×10^7 , $60.000.000$ a 6×10^7 , e assim por diante.

de células é consideravelmente maior, com 256 células a cada 30 minutos, e entre $5,5$ e 6 horas o crescimento corresponde a 2.048 células a cada 30 minutos (Figura 5.9). Assim, o número de células em culturas bacterianas de laboratório pode tornar-se rapidamente muito elevado, com um tamanho populacional final de $> 10^9$ células/mL não sendo incomum.

Além de ser uma construção teórica, o crescimento exponencial pode ter implicações na vida cotidiana. Considere algo tão comum como a deterioração do leite. As bactérias do ácido láctico, responsáveis pelo sabor azedo do leite estragado, contaminam o leite durante a coleta e estão no leite fresco e no pasteurizado em menor número; esses organismos crescem lentamente na temperatura de geladeira (4°C), mas rapidamente à temperatura ambiente. Se uma garrafa de leite fresco é deixada à temperatura ambiente durante a noite, algum ácido láctico é produzido, mas não em quantidade suficiente para afetar a qualidade do leite. Entretanto, se o leite coletado há uma semana, que agora contém o crescimento bacteriano acumulado de uma semana e, portanto, um número bem mais elevado de células, é deixado sob as mesmas condições, uma enorme quantidade de ácido láctico é produzida, resultando na deterioração.

MINIQUESTIONÁRIO

- O que é um gráfico *semilogarítmico* e quais informações podem ser obtidas a partir dele?
- Faça a diferenciação entre os termos “taxa específica de crescimento” e “tempo de geração”.
- Se em um período de 8 horas uma população de células em crescimento exponencial aumenta de 5×10^6 células/mL para 5×10^8 células/mL, calcule os valores de g , n , v e k .

5.6 O ciclo de crescimento

Os dados apresentados nas Figuras 5.9 e 5.10 refletem apenas uma parte do ciclo de crescimento de uma população microbiana, a parte denominada *crescimento exponencial*. Por diversas razões, um organismo crescendo em um recipiente fechado, como um tubo ou frasco (uma *cultura em batelada*), não pode continuar crescendo exponencialmente de forma indefinida. Em vez disso, uma *curva de crescimento* típica de uma população de células é obtida, conforme ilustrado na Figura 5.11. A curva de crescimento descreve um ciclo de crescimento completo, incluindo as fases lag, exponencial, estacionária e de morte.

Fase lag

Quando uma população microbiana é inoculada em um novo meio, o crescimento é iniciado somente após um período de tempo, denominado *fase lag*. Esse intervalo pode ser breve ou longo, dependendo do histórico do inóculo e das condições de crescimento. Se uma cultura em crescimento exponencial for transferida ao mesmo meio, nas mesmas condições de crescimento (temperatura, aeração, entre outros), a fase lag não necessariamente ocorre e o crescimento exponencial começa imediatamente. Entretanto, se o inóculo for proveniente de uma cultura antiga, em geral haverá uma fase lag, uma vez que as células encontram-se depletadas de vários constituintes essenciais, requerendo tempo para sua biossíntese. Uma fase lag também é observada quando o inóculo é de baixa viabilidade (poucas células vivas) ou consiste em células que sofreram algum tipo de dano, mas não foram mortas, decorrente de algum agente estressante, como altas e baixas temperaturas, radiação ou compostos químicos tóxicos.

Uma fase lag também é observada quando uma população microbiana é transferida de um meio de cultura rico para um mais pobre; por exemplo, de um meio complexo a um meio definido (↔ Seção 3.2). Para crescerem em qualquer meio de cultura, as células devem dispor de um conjunto completo de enzimas necessárias à biossíntese dos metabólitos essenciais não fornecidos por aquele meio. Assim, quando transferidas para um meio onde os metabólitos essenciais devem ser biossintetizados, há uma demanda de tempo para a síntese das novas enzimas requeridas e para a produção de uma pequena quantidade inicial de cada metabólito.

Fase exponencial

Conforme vimos na Seção 5.5, durante a fase exponencial de crescimento, a população celular duplica-se a intervalos regulares por um período curto ou longo, dependendo dos recursos disponíveis e de outros fatores. Células em crescimento exponencial geralmente encontram-se nas condições mais saudáveis e, por essa razão, são preferencialmente utilizadas para estudos enzimáticos ou de outros componentes celulares.

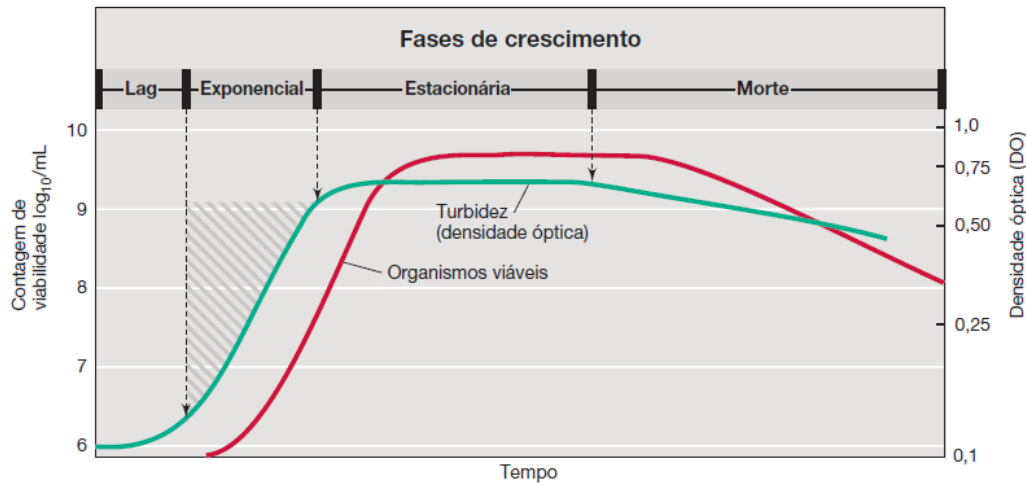


Figura 5.11 Curva de crescimento típica de uma população bacteriana. Uma contagem de viáveis mede as células presentes na cultura capazes de se reproduzir. A densidade óptica (turbidez), uma medida quantitativa da

dispersão de luz por uma cultura líquida, aumenta de acordo com o aumento do número de células.

As taxas de crescimento exponencial variam amplamente, sendo influenciadas pelas condições ambientais (temperatura, composição do meio de cultura), bem como pelas características genéticas do próprio organismo. Em geral, os procariotos crescem mais rapidamente que os microrganismos eucarióticos, e os eucariotos menores crescem mais rapidamente do que os maiores. Esse fato nos recorda do conceito discutido anteriormente em relação à proporção superfície-volume. Lembre-se de que as células menores apresentam uma maior capacidade de permuta de nutrientes e produtos de excreção, quando comparadas às células maiores, e essa vantagem metabólica pode afetar significativamente seu crescimento e outras propriedades (↻ Seção 2.6).

Fase estacionária e de morte

Em uma cultura em batelada, o crescimento exponencial não pode ser mantido indefinidamente. Considere o fato de que uma única célula bacteriana, pesando apenas um trilionésimo (10^{-12}) de grama e crescendo exponencialmente com um tempo de geração de 20 minutos, produziria, se permitida crescer exponencialmente em uma cultura em batelada por 48 horas, uma população de células cujo peso seria 4 mil vezes superior ao peso da Terra! Obviamente, essa situação é impossível, e o crescimento torna-se limitado nessas culturas porque ou um nutriente essencial no meio de cultura é depletado ou os produtos de excreção do organismo acumulam-se. Quando o crescimento exponencial cessa por uma (ou ambas) dessas razões, a população atinge a *fase estacionária* (Figura 5.11).

Na fase estacionária, não se observa aumento ou diminuição líquidos no número de células, portanto a taxa de crescimento da população corresponde a zero. Apesar da interrupção no crescimento, o metabolismo energético e os processos biossintéticos podem continuar em células na fase estacionária, mas normalmente a uma taxa muito reduzida. Algumas células podem até mesmo se dividir durante a fase estacionária, porém não há aumento líquido no número de células. Isso ocorre porque algumas células da população crescem, ao passo que outras morrem; os dois processos equilibram-se um ao outro (crescimento críptico). No entanto, cedo ou tarde a

população entrará na *fase de morte* do ciclo de crescimento celular, que, assim como a fase exponencial, ocorre como uma função exponencial (Figura 5.11). Todavia, normalmente a taxa de morte celular é muito mais lenta do que a taxa de crescimento exponencial, e células viáveis podem permanecer em uma cultura por meses ou até mesmo anos.

As fases do crescimento bacteriano, apresentadas na Figura 5.11, refletem eventos que ocorrem em uma *população* de células, e não em células individuais. Assim, os termos fase lag, fase exponencial e assim por diante não se aplicam a células individuais, mas somente a populações de células. O crescimento de uma célula individual é um pré-requisito necessário ao crescimento da população. No entanto, o crescimento da população é mais relevante para a ecologia de microrganismos, uma vez que as atividades microbianas mensuráveis requerem populações microbianas, e não somente uma célula microbiana individual.