

METABOLISMO E FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO MICROBIANO

Profa. Dra Maria Bernadete Varesche

Todos os organismos vivos requerem nutrientes para seu crescimento e reprodução. Essas substâncias químicas podem ser orgânicas ou inorgânicas e são encontradas no ambiente em várias formas.

De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados em suas exigências nutricionais. Alguns podem crescer com algumas poucas substâncias inorgânicas como sua única exigência nutricional, enquanto, outros se assemelham aos organismos superiores na sua necessidade de compostos orgânicos complexos. Contudo, todos os organismos vivos compartilham algumas necessidades nutricionais em comum, tais como a necessidade de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, vitaminas e água. A água é importante para os microrganismos, porque a maioria deles pode absorver os nutrientes somente quando as substâncias químicas estão dissolvidas nela. Estas exigências químicas (fatores nutricionais), juntamente com as condições físicas (pH, temperatura, atmosfera, pressão osmótica e pressão hidrostática) são particulares para cada microrganismo e, devem ser fornecidas aos organismos para que ocorra seu desenvolvimento.

Os microrganismos podem ser distinguidos em relação à fonte de energia e carbono que utilizam. Podem ser divididos em categorias baseadas na natureza da fonte de energia e de carbono que utilizam.

O carbono é requerido pelos organismos vivos como importante constituinte da estrutura celular e fonte de energia para o crescimento. Em termos de fonte de carbono, há fundamentalmente duas classes de microrganismos: os que utilizam o dióxido de carbono (a forma mais oxidada do carbono) como sua principal ou até mesmo única fonte de carbono e são chamados de autotróficos, contudo a maioria deles é incapaz de usar o CO₂ como sua principal fonte de carbono e, neste caso, utilizam compostos orgânicos e são denominados heterotróficos.

1. FOTOTRÓFICOS: utilizam a energia luminosa e transformam-na em energia química que é armazenada em carboidratos e outras moléculas por meio da fotossíntese. Sintetizam moléculas a partir do dióxido de carbono fornecendo substâncias orgânicas, que são a base da cadeia alimentar para outros organismos. Ex: plantas verdes, algas, cianobactérias e bactérias fototróficas.

1.1 FOTOAUTOTRÓFICOS: são capazes de crescer utilizando como única fonte de carbono o CO_2 . Estes microrganismos utilizam a energia luminosa para reduzir o CO_2 a compostos orgânicos. No metabolismo destes microrganismos ocorrem dois tipos distintos de reações: (1) para a formação de ATP e (2) para a redução do CO_2 a compostos orgânicos. Para o crescimento destes microrganismos a energia vem do ATP e os doadores de elétrons para a redução do CO_2 são originários do NADH (ou NADPH), os quais são produzidos pela redução do NAD^+ (ou NADP^+). As bactérias fotoautotróficas utilizam como doadores de elétrons, por exemplo, H_2S , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ou H_2 , já as plantas, as algas e as cianobactérias utilizam H_2O . Quando H_2O é oxidado tem-se a geração de O_2 e, por isso, o processo de fotossíntese destes microrganismos é denominado de fotossíntese oxigênica. Contudo, em muitas bactérias fototróficas, a água não é oxidada e, assim, o O_2 não é gerado, sendo o processo denominado de fotossíntese anoxigênica.

1.2 FOTOHETEROTRÓFICOS: utilizam como fonte de carbono compostos orgânicos, como carboidratos e ácidos orgânicos.

2. QUIMIOTRÓFICOS: obtêm sua energia da oxidação de compostos químicos (ou energia das reações químicas). Podem ser divididos em duas categorias em relação ao composto utilizado:

2.1 QUIMIOHETEROTRÓFICOS: obtêm sua energia a partir da oxidação de compostos orgânicos. Ex: bactérias que usam carboidratos, ácidos orgânicos e proteínas como fonte de energia. As bactérias quimioheterotróficas variam consideravelmente em relação às exigências de substratos orgânicos, por exemplo, bactérias da Família Methylomonadaceae, usam o metano (CH_4) e outros compostos com um carbono como única fonte de energia e carbono; e são consideradas metilotróficas; enquanto, espécies de Pseudomonas podem usar 100 tipos diferentes de compostos orgânicos e, devido a essa capacidade, estão amplamente distribuídas na água e no solo.

Algumas bactérias, por sua vez, são versáteis podendo exibir metabolismo fotoautotrófico na presença de luz e, ainda, podem crescer quimioautotroficamente no escuro, usando compostos como sulfeto de hidrogênio (H_2S), tiosulfato (S_2O_3) e hidrogênio molecular (H_2) como fontes de energia e CO_2 como fonte de carbono. Ainda há aquelas que podem usar compostos orgânicos como fonte de carbono e são denominadas fotoheterotróficas, ou ainda na presença de oxigênio (condições aeróbias) e na ausência da luz, podem crescer como quimioheterotrófica.

2.2 QUIMIOLITOTRÓFICOS: obtêm sua energia da oxidação de compostos inorgânicos, tais como sulfeto de hidrogênio (H_2S), hidrogênio (H_2), nitrito (NO_2^-), amônia (NH_3) e íons ferro (Fe^{2+}).

Na maior parte dos processos de tratamento de esgotos (exceção feita às lagoas facultativas), a luz não penetra significativamente no líquido contido nos tanques destinados ao tratamento, devido à elevada turbidez do mesmo e, por conseguinte, a presença de microrganismos que têm a luz como fonte de energia (fotoautotróficos e fotoheterotróficos) é extremamente limitada. Os organismos de real importância neste caso são os quimioautotróficos (responsáveis, por exemplo,

pelo processo de nitrificação) e os quimioheterotróficos (responsáveis, por exemplo, pela maior parte das reações que ocorrem no tratamento biológico).

CONDIÇÕES NUTRICIONAIS PARA O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

Além do carbono, os microrganismos requerem outros nutrientes para que as células consigam sintetizar todas as macromoléculas essenciais ao seu desenvolvimento. Estes nutrientes são requeridos pelas células de diversos organismos em diferentes quantidades. Aqueles requeridos em grandes quantidades são denominados macronutrientes, enquanto, outros são necessários em pequenas quantidades – micronutrientes.

O nitrogênio é um macronutriente necessário a todos os organismos. Ele está presente na síntese de enzimas, outras proteínas e ácidos nucleicos. As bactérias são versáteis na utilização do nitrogênio e utilizam-no na forma inorgânica ou orgânica. As maiores fontes inorgânicas de nitrogênio são nitrato (NO_3^-), amônia (NH_3) e nitrogênio (N_2). As fontes orgânicas de nitrogênio incluem aminoácidos, purinas e pirimidinas. Os compostos nitrogenados orgânicos, freqüentemente são usados não somente como fonte de nitrogênio por bactérias, mas, também como fonte de energia. Ao contrário das células eucarióticas, algumas bactérias podem utilizar nitrogênio gasoso ou atmosférico para a síntese celular por meio do processo de fixação de nitrogênio. Em adição ao carbono e nitrogênio, os microrganismos necessitam do suprimento de outros macronutrientes, como, por exemplo, enxofre e fósforo, os quais são importantes componentes da célula.

O fósforo é o elemento encontrado nos ácidos nucleicos, ATP, membranas fosfolipídicas, coenzimas e em muitos compostos intermediários associados com o metabolismo e armazenamento de energia. Os microrganismos obtêm fósforo, principalmente, a partir de íons de fosfato inorgânico (PO_4^{3-}), o qual é utilizado diretamente pelas bactérias, ao passo que, compostos de fosfato orgânico são

primeiramente hidrolisados em ésteres por enzimas denominadas fosfatases e, posteriormente, incorporado às biomoléculas.

O enxofre e aminoácidos que contém enxofre são utilizados para síntese de proteínas, coenzimas e outros componentes celulares. Este elemento é necessário para a biossíntese dos aminoácidos cisteína e metionina, de vitaminas, como, por exemplo, a tiamina e biotina, e da coenzima A. Alguns microrganismos podem sintetizar aminoácidos que contém enxofre utilizando enxofre inorgânico e outros aminoácidos com enxofre. A maior parte do enxofre utilizado pelas células é de fonte inorgânica, obtido a partir do sulfato (SO_4^{2-}) ou sulfeto (HS^-).

Além destes macronutrientes, outros elementos são necessários para o desenvolvimento celular, como, por exemplo, o potássio (K) que é o principal cátion e cofator para algumas enzimas; o magnésio (Mg), o qual é importante na estabilidade dos ribossomos, membranas, e ácidos nucléicos, é componente importante da clorofila e cofator para muitas enzimas; o cálcio (Ca) que é requerido pelas bactérias Gram-positivas para a síntese da parede celular e pelos organismos que formam esporos para a síntese destas estruturas; o sódio (Na) que é requerido pela permease, a qual transporta o açúcar melibiose em células de *Escherichia coli*. Outros elementos essenciais para todos os organismos são o hidrogênio e o oxigênio. Ambos fazem parte de muitos compostos orgânicos.

Muitos microrganismos requerem variedade de micronutrientes ou elementos traços, tais como, cromo, cobalto, cobre, ferro, zinco, manganês, molibdênio, níquel, selênio, obtidos usualmente na forma de íons. Tais elementos são necessários em pequenas quantidades, mas nem por isso, são menos importantes que os macronutrientes, pois servem como cofatores em reações enzimáticas. Podem ser adicionados especificamente como sais aos meios de cultura, mas normalmente ocorrem como impurezas de outros componentes. A função de cada um deles é diferente. O molibdênio, por exemplo, é requerido pela nitrogenase (enzima que converte o gás nitrogênio atmosférico (N_2) para amônia (NH_3) durante a fixação do nitrogênio).

Além dos macro e micronutrientes, alguns compostos orgânicos são necessários para certos microrganismos – os fatores de crescimento, que são

nutrientes orgânicos requeridos para o crescimento celular, mas não necessariamente são sintetizados por eles. Os fatores de crescimento mais comuns são os aminoácidos, purinas, pirimidinas e vitaminas.

Os aminoácidos, que são os constituintes das proteínas, podem também ser precursores de vias metabólicas intermediárias. Devem ser sintetizados ou fornecidos através de fontes exógenas. As bactérias incapazes de sintetizar algum aminoácido, geralmente não possuem uma ou mais enzimas das vias biossintéticas para tais compostos. Quando é necessário o suplemento destes fatores, os mesmos são fornecidos na forma de aminoácidos ou pequenos peptídeos, os quais são degradados por protease bacteriana antes ou após entrar na célula.

As purinas e pirimidinas são usadas para sintetizar os ácidos nucléicos e coenzimas. Algumas bactérias são incapazes de formar nucleosídeos e, portanto, devem ter seu meio de cultura suplementado com estes fatores de crescimento através de fontes exógenas.

Outros fatores incluem as vitaminas, que são substâncias orgânicas, que o organismo requer em pequenas quantidades e que são tipicamente usadas como coenzimas. Como exemplo de vitaminas requeridas pelos microrganismos tem-se o ácido fólico, a vitamina B₁₂ e a vitamina K.

CONDIÇÕES FÍSICAS PARA O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

Quatro condições físicas principais influenciam o crescimento de um microrganismo: temperatura, pH, atmosfera gasosa e pressão osmótica. O cultivo bem sucedido dos vários tipos de microrganismos requer uma combinação de nutrientes apropriados e de condições físicas adequadas. As espécies de microrganismos encontrados em dado ambiente e as velocidades nas quais elas crescem podem ser influenciadas pelos fatores físicos e químicos.

Com relação à temperatura, podemos dizer que este parâmetro tem grande influência no crescimento dos microrganismos. Todos os processos de

crescimento são dependentes de reações químicas, as quais são afetadas pela temperatura. Os microrganismos podem crescer numa faixa ampla de temperatura, embora restrita para uns e maior para outros. Em temperaturas mais favoráveis para o crescimento, o número de divisões celulares por hora, chamado de velocidade de crescimento, geralmente dobra para cada aumento de temperatura de 10°C. Este comportamento do 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.

Para qualquer microrganismo, três temperaturas são importantes: a de crescimento mínimo, ótimo e máximo. Estas são conhecidas como temperaturas cardinais de uma espécie de microrganismo. As temperaturas cardinais de uma espécie particular podem variar conforme o estágio no ciclo de vida do microrganismo e o conteúdo nutricional do meio. A temperatura pode afetar a velocidade de crescimento, assim como, o tipo de reprodução. Entretanto, a temperatura ótima para o crescimento pode não ser necessariamente a temperatura ótima para toda a atividade celular.

Temperatura máxima – acima da qual o crescimento cessa.

Temperatura mínima – abaixo da qual o crescimento cessa.

Temperatura ótima – não é a temperatura mediana entre a máxima e mínima. É a mais próxima do limite superior da variação da temperatura, porque a velocidade das reações enzimáticas aumenta com o aumento da temperatura até um ponto em que as enzimas são danificadas pelo calor e as células param de crescer.

Com relação à temperatura de crescimento, os organismos podem ser divididos em três grupos:

Psicrófilos: ou microrganismos que crescem em baixas temperaturas (-10°C a 25°C) e a temperatura ótima está entre 15 a 20°C, embora possam crescer em temperaturas mais baixas. Alguns morrem se forem expostos à temperatura ambiente por curto período. Ex: bactérias (*Pseudomonas*, *Flavobacterium* e

Alcaligenes), algas, fungos e protozoários. São encontrados em águas frias e solos de regiões polares e sedimentos de oceanos.

Mesófilos: ou microrganismos que crescem em temperaturas moderadas (10 a 45°C). A maioria deles é mesófila, crescendo melhor em temperatura ótima que varia de 25 a 40°C. Ex: bactérias saprófitas, os fungos, as algas e os protozoários crescem no limite mínimo da variação de temperatura mesófila.

Termófilos: ou microrganismos que crescem em altas temperaturas. A maioria dos termófilos podem crescer em temperaturas que variam de 30 a 80°C, mas crescem melhor entre 50 a 60°C. Os termófilos extremos crescem em temperaturas de 80°C e superiores.

A maioria dos microrganismos termofílicos é procariótica, pois nenhuma célula eucariótica conhecida cresce em temperatura superior a 60 °C. Tais microrganismos podem ser encontrados em áreas vulcânicas e fontes termais. As enzimas dos termófilos são produzidas mais rapidamente do que as enzimas dos mesófilos. Os ribossomos, as membranas e as enzimas das bactérias termofílicas funcionam melhor a altas temperaturas do que a baixas temperaturas. A perda da função da membrana citoplasmática em baixas temperaturas pode ser o que determina a temperatura de crescimento mínimo dos termófilos. Entre os procarióticos, certas *Archaea* são capazes de crescer em temperatura acima do ponto de ebulição da água. Ex: *Pyrodictium occultum* pode crescer a 110°C e *Thermococcus celer* cresce a 103°C. *Thermus aquaticus*, isolada de “hot springs” (Yellowstone National Park em Wyoming) tem temperatura ótima de crescimento entre 80 a 85°C.

Outro parâmetro físico que limita o crescimento celular é o pH. Ao contrário da temperatura ótima, o pH ótimo para o crescimento microbiano encontra-se no valor mediano da sua variação. O pH ótimo é o pH em que determinado microrganismo cresce melhor. O pH ótimo, normalmente, é bem definido para cada espécie e as diferentes espécies são adaptadas ao crescimento em vários valores de pH. O valor de pH é crítico para o crescimento microbiano, pois pode afetar a atividade enzimática por meio da desnaturação ou inativação de enzimas e também levar ao rompimento celular.

Para crescer bem em meio com pH ácido ou básico, o microrganismo deve ser capaz de manter o seu pH intracelular em torno de 7,5, não importando qual o valor do pH externo. A célula viva tem a habilidade, dentro de limites próprios, de manter o pH interno constante pela expulsão ou absorção de íons hidrogênio pela célula. A maioria dos procarióticos cresce melhor em pH entre 6,5 e 7,5. De acordo com a sua tolerância em relação a variações de pH, os microrganismos são classificados em:

Acidófilos: ou organismos que crescem melhor em pH na faixa de 0,1 a 5,4. Ex: *Lactobacillus*, que produz o ácido láctico. Algumas bactérias que oxidam enxofre a ácido sulfúrico toleram condições de pH igual a 1 (*Thiobacillus thiooxidans* e *Sulfolobus acidocaldarius*). O *Thiobacillus* pode ser encontrado em águas ácidas de escoamento de minas onde enxofre e ferro estão presentes. Os alimentos tais como chucrute e pickles são preservados por ácidos orgânicos resultantes da fermentação bacteriana, uma vez que as bactérias que deterioram os alimentos não podem crescer em valores de pH entre 3 e 4.

Neutrófilos: ou organismos que crescem na faixa de pH entre 5,4 a 8,5.

Alcalófilos: ou microrganismos que podem crescer em pH entre 8,5 e 11,5. Mantém o pH neutro dentro de suas células por meio de trocas de Na^+ , presente no interior da célula, por H^+ externo. Ex: *Bacillus alcalophilus* e *Microcystis aeruginosa*, os quais são encontrados em ambientes com pH elevado, tais como, solo alcalino e lagos soda.

Algumas bactérias, tais como *Streptococcus* e *Lactobacillus*, geram como produtos de seu metabolismo ácidos, os quais abaixam o pH do meio e, podem, eventualmente, inibir o crescimento das mesmas. Mudanças extremas de pH no meio de cultura podem ser minimizadas pela adição de agentes tamponantes, como, por exemplo, fosfatos e carbonatos. Os tampões são sais de ácidos ou bases fracas, que se combinam com os íons hidrogênio ou liberam íons hidrogênio no meio quando a concentração deles se altera. Frequentemente, encontram-se nos meios de cultura compostos nutricionais como peptonas e aminoácidos, os quais possuem capacidade tamponante.

Os organismos necessitam para crescer de quantidades variadas de gases, como, por exemplo, o oxigênio, dióxido de carbono, nitrogênio e metano. O dióxido de carbono é utilizado por todas as células para certas reações químicas; entretanto, o oxigênio é requerido por alguns microrganismos, mas é tóxico para outros. Muitos fungos e bactérias são capazes de crescer na ausência de oxigênio molecular. De acordo com a tolerância ao oxigênio gasoso, os microrganismos são divididos em quatro grupos distintos:

Aeróbios: ou microrganismos que normalmente requerem oxigênio para o crescimento. Podem crescer na atmosfera padrão com 21% de oxigênio. Ex: *Mycobacterium* (fungo filamentosos), *Pseudomonas* e *Legionella* (bactérias). Os microrganismos aeróbios adquirem mais energia dos nutrientes do que aqueles que não utilizam oxigênio. Quando microrganismos aeróbios crescem na superfície do meio de cultura solidificado a quantidade de oxigênio não é limitante. Contudo, em meio líquido os microrganismos podem rapidamente utilizar o oxigênio dissolvido na camada superficial do meio e a concentração deste gás passa a ser fator limitante para o crescimento. Para prevenir esse problema, as culturas líquidas de aeróbios são algumas vezes agitadas em agitador mecânico para aumentar o suprimento de oxigênio dissolvido e produzir estoque celular maior num tempo de incubação menor. Para esses microrganismos, o oxigênio é freqüentemente o fator que limita a velocidade de crescimento. O oxigênio é pobremente solúvel na água, e ampla variedade de métodos são algumas vezes empregados para manter alta a concentração de O₂ no meio. Entre estes métodos, pode-se citar mistura vigorosa ou aeração através do borbulhamento de O₂ no meio de cultura.

Facultativos: ou microrganismos que crescem na presença de ar atmosférico (respiração) e podem também crescer na ausência deste gás (fermentação). São os que possuem o sistema enzimático mais complexo, ou seja, capazes de usar oxigênio ou outro aceptor de elétrons. Eles não requerem oxigênio para o crescimento, embora possam utilizá-lo para a produção de energia em reações químicas. Sob condições anaeróbias – sem O₂, obtêm energia através da

fermentação. Ex: leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* – levedura comum dos pães), membros da Família Enterobacteriaceae (*E. coli*).

Anaeróbios: microrganismos que crescem melhor na ausência de oxigênio. Não utilizam o oxigênio para as reações de produção de energia. Alguns anaeróbios podem tolerar concentrações pequenas de oxigênio dissolvido. No entanto, outros como os anaeróbios estritos ou obrigatórios morrem por breve exposição ao gás. Ex: *Clostridium* encontrado no solo, sedimentos de lagos, trato intestinal – onde o oxigênio está ausente. *Clostridium perfringens* – altamente tolerante ao oxigênio. *Clostridium tetani* – moderadamente tolerante ao oxigênio. *Methanobacterium* – presente no tratamento de esgoto. *Ruminococcus* – que vivem no rúmen.

A toxicidade do oxigênio para anaeróbios estritos deve-se a certas moléculas produzidas durante as reações envolvendo oxigênio. Algumas destas reações resultam na adição de um único elétron à molécula de oxigênio, formando radical superóxido. Estes radicais podem causar danos às células, mas também dão origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e aos radicais hidroxila (OH), que podem destruir os componentes vitais da célula. O superóxido é formado por certas enzimas oxidativas e é convertido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por uma enzima denominada superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio molecular pela enzima catalase. Os aeróbios obrigatórios e maioria dos anaeróbios facultativos têm ambas as enzimas. A maioria dos anaeróbios obrigatórios não possui estas enzimas e, por isso, sucumbem ao efeito tóxico do superóxido e do peróxido de hidrogênio. Ex: *Campylobacter jejuni*.

Microaerófilos: são microrganismos que, assim como os aeróbios, podem utilizar oxigênio nas reações químicas para a produção de energia. Entretanto, não podem resistir a níveis de oxigênio (21%) presentes na atmosfera e cresce melhor em níveis de oxigênio variando de 1 a 15%.

A água, que representa 80 a 90% da célula, é outro fator que afeta o crescimento microbiano. Além da função ligada ao metabolismo celular e aos nutrientes, a água influencia o crescimento por meio da pressão osmótica e pressão hidrostática.

A pressão osmótica é a força com a qual a água se move através da membrana citoplasmática de uma solução contendo baixa concentração de substâncias dissolvidas (solutos) para outra contendo alta concentração de solutos. Quando as células microbianas estão em meio aquoso, não devem existir grandes diferenças na concentração de solutos dentro e fora da célula, ou as células poderiam desidratar-se ou romper-se. Em solução isotônica, o fluxo de água para dentro e para fora da célula está em equilíbrio e a célula cresce normalmente. Entretanto, quando o meio externo é hipertônico, em que a concentração de solutos é mais alta fora do que no citoplasma, a célula perde água e seu crescimento é inibido – a célula fica desidratada. Ao contrário, quando a solução externa é hipotônica, com concentração de solutos muito mais baixa externamente do que no interior da célula, a água flui para dentro da célula e ela se rompe.

A pressão hidrostática também pode influenciar o crescimento microbiano. Esta pressão é aquela exercida nas células pelo peso da água que permanece na superfície delas. Os microrganismos têm sido isolados do fundo do oceano a 2.500 metros abaixo do nível do mar, onde a pressão é maior do que 250 bars (250 vezes a pressão atmosférica). Estes microrganismos não crescerão em laboratório a menos que o meio esteja sob pressão semelhante. Os microrganismos dependentes de pressão são chamados barófilos. Eles morrem em meio com baixa pressão hidrostática porque contêm vesículas de gás que se expandem com grande força na descompressão e rompem as células.

Referências bibliográficas:

Madigan, M.T; Martinko, J.M.; Dunlap, P.V.; Clark, D.P (2009) Brock Biology of microorganisms. 12ed.

Tortora, G.J; Funke, B.R; Case, C.L (2005) Microbiologia. 8ed.