



# Crescimento e Cultivo de Bactérias

## CAPÍTULO

# 6



Eu estava extasiado, próximo a um gêiser, na Islândia, maravilhado e completamente absorto pela grandeza ao meu redor. A única razão da minha expedição ondulava delicadamente na correnteza fugidia que se apresentava diante de mim. Os filamentos longos e ondulantes das bactérias do enxofre pareciam longos cabelos louros agitados por uma brisa suave. Eles eram magníficos! Finalmente, pude ver com meus próprios olhos as bactérias a respeito das quais eu vinha lendo há anos.

Minha excitação me dominou, e, apesar do vapor ameaçador oriundo da água, mergulhei minha mão. Queria apenas descobrir que sensação os filamentos provocavam, mas acho que nunca vou saber. A proximidade da água fervente imediatamente queimou minha mão. Mais tarde, quando tratava minhas bolhas e meu orgulho ferido, refleti sobre este fenômeno que permite às bactérias se desenvolverem em um ambiente tão hostil à maior parte das formas de vida (a mim, inclusive).

### Conhecimentos Indispensáveis

arranjo das bactérias .....	(Figura 4.2)
ferramentas matemáticas: logaritmo .....	(Apêndice A)
pH .....	(Capítulo 2)
Celsius vs. Fahrenheit .....	(Apêndice A)
enzimas e coenzimas .....	(Capítulo 5)
relações osmóticas .....	(Figura 4.28)

Neste capítulo, utilizaremos o que aprendemos no Cap. 5 sobre a energia em microrganismos para estudarmos como desenvolvê-los em laboratório. O crescimento bacteriano, que tem sido estudado mais cuidadosamente do que o crescimento de outros microrganismos, é afetado por uma variedade de fatores físicos e nutricionais. Saber como estes fatores influenciam o crescimento é útil para cultivar organismos em laboratório e também para impedir seu crescimento em lugares indesejáveis. Além disso, cultivar micróbios em culturas puras é essencial para a realização de testes diagnósticos, que são usados na identificação de vários organismos causadores de doenças.

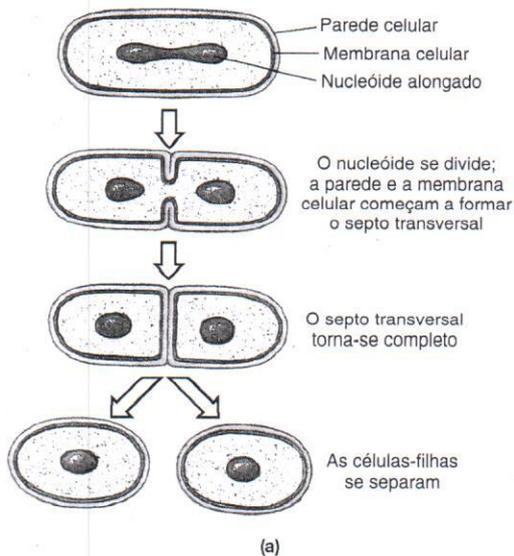
## Crescimento e Divisão Celular

### Crescimento Microbiano Definido

Na linguagem cotidiana, o crescimento refere-se ao aumento de tamanho. Estamos acostumados a ver crianças, outros animais e vegetais crescerem. Os organismos unicelulares também crescem; porém, logo que uma célula, chamada **célula-mãe**, tenha aproximadamente dobrado de tamanho e duplicado seu conteúdo, ela se divide em duas **células-filhas**. Então as células-filhas crescem e, subseqüentemente, também se dividem. Considerando-se que as células individuais crescem apenas para se dividir em dois novos indivíduos, o **crescimento microbiano** é definido não em termos de tamanho celular, mas como o aumento do número de células, que ocorre por divisão celular.

### Perguntas que Vamos Explorar

- A Como se define o crescimento das bactérias?
- B Como ocorre a divisão celular nos microrganismos?
- C Quais são as fases de crescimento nas culturas bacterianas?
- D Como é medido o crescimento bacteriano?
- E Como os fatores físicos afetam o crescimento bacteriano?
- F Como os fatores bioquímicos afetam o crescimento bacteriano?
- G O que ocorre durante a esporulação, e qual a sua importância?
- H Quais são os métodos usados para se obter uma cultura pura de um organismo para estudo em laboratório?
- I Como as diferentes necessidades nutricionais são supridas por diferentes meios?



> Fig. 6.1 Divisão binária. (a) Estágios da divisão binária em uma célula bacteriana. (b) TEM colorida de um corte delgado da bactéria *Staphylococcus* sofrendo divisão binária. (c) Nucleóide de uma célula bacteriana.

Cada centímetro quadrado de pele hospeda, em média, 100.000 organismos. As bactérias se reproduzem tão rápido que sua população é restaurada dentro de horas após a lavagem.

A divisão celular nas leveduras e em algumas bactérias ocorre por **brotamento**. Neste processo, uma pequena célula nova se desenvolve a partir da superfície de uma célula preexistente e, subsequentemente, se separa da célula-mãe (> Fig. 6.2).

## Divisão Celular

A divisão celular nas bactérias, diferentemente daquela nos seres eucariotes, geralmente ocorre por *divisão binária* ou às vezes por *brotamento*. Na *divisão binária*, a célula duplica seus componentes e se divide em duas outras células (> Fig. 6.1a). As células-filhas tornam-se independentes quando um *septo* (divisão) cresce entre elas, fazendo com que se separem (> Fig. 6.1b). Ao contrário das células eucarióticas, as células procarióticas não possuem um ciclo de vida com um período específico para a síntese do DNA. Em vez disso, em células em constante divisão, a síntese do DNA também é contínua e replica o único cromossomo bacteriano imediatamente antes de a célula se dividir. O cromossomo é ligado à membrana da célula, que cresce e separa os cromossomos replicados. A replicação do cromossomo se completa antes da divisão celular, quando a célula pode temporariamente conter dois ou mais nucleóides. Em algumas espécies, a separação incompleta das células produz cadeias lineares (bacilos ligados), **tétrades** (grupos de quatro cocos em forma de cubo), **sarcinas** (grupos de oito cocos em pacotes cúbicos), ou grupos em forma de cachos de uvas (estafilococos) => (> Fig. 4.2). Alguns bacilos sempre formam cadeias ou filamentos; outros os formam apenas em condições desfavoráveis de crescimento. Os estreptococos formam cadeias quando crescem em meios artificiais, mas podem viver em forma de células isoladas ou aos pares quando obtidos de uma lesão que cresce rapidamente em um hospedeiro humano infectado.

## Fases de Crescimento

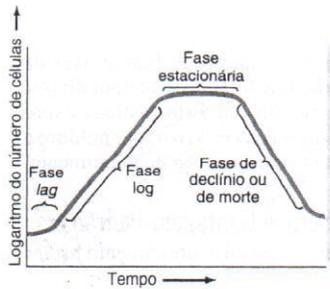
Considere uma população de organismos introduzida em um meio fresco e rico em nutrientes, isto é, uma mistura de substâncias sobre ou dentro da qual os microrganismos crescem. Estes organismos mostram quatro principais fases de crescimento: (1) a fase *lag*, (2) a fase *log* (logarítmica), (3) a fase estacionária e (4) a fase de declínio ou de morte. Estas fases formam a **curva-padrão de crescimento bacteriano** (> Fig. 6.3).

### A Fase Lag

Na **fase lag**, os organismos não aumentam significativamente em número, mas são metabolicamente ativos: crescem em tamanho, sintetizam enzimas e incorporam diversas moléculas provenientes do meio. Durante esta fase, os organismos individuais aumentam em tamanho e produzem grandes quantidades de energia na forma de ATP.



> Fig. 6.2 Brotamento em leveduras.



➤ Fig. 6.3 Curva-padrão de crescimento bacteriano.

A duração da fase *lag* é, em parte, determinada pelas características das espécies bacterianas e, em parte, pelas condições do meio — tanto o meio do qual os organismos provêm como aquele para onde são transferidos. Algumas espécies se adaptam ao novo meio em uma ou duas horas; outras levam vários dias. Os organismos originários de culturas antigas, adaptados a nutrientes escassos e a grande acúmulo de dejetos, levam mais tempo para se ajustarem ao novo meio do que aqueles transferidos de um meio relativamente fresco e rico em nutrientes.

### A Fase Log

Uma vez que os organismos se tenham adaptado ao meio, o crescimento da população ocorrerá em **velocidade exponencial** ou **logarítmica** (log). Quando a escala do eixo vertical é logarítmica, o crescimento nesta **fase log** aparece no gráfico como uma linha diagonal reta, que representa o tamanho da população bacteriana. (Na escala logarítmica de base 10, cada unidade sucessiva representa um aumento de 10 vezes o número de organismos.) ➤ (Apêndice A) Durante a fase log, os organismos se dividem na sua velocidade mais rápida — um intervalo regular, geneticamente determinado, chamado **tempo de geração**. A população de organismos dobra em cada tempo de geração. Por exemplo, uma cultura contendo 1.000 organismos por mililitro com um tempo de geração de 20 minutos conteria 2.000 organismos por mililitro após 20 minutos, 4.000 organismos após 40 minutos, 8.000 após uma hora, 64.000 após duas horas e 512.000 após três horas. Tal crescimento é chamado de *exponencial*, ou *logarítmico*.

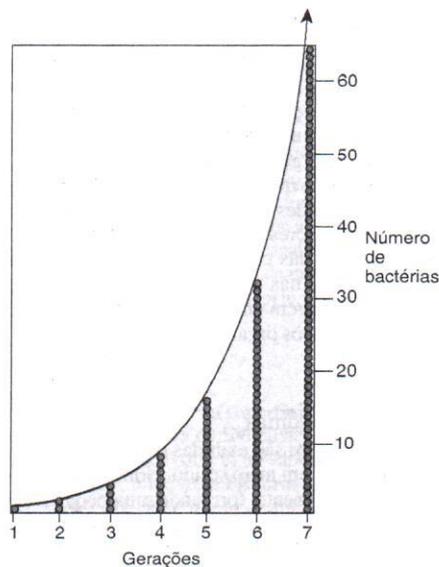
Em condições ideais, uma bactéria pode se multiplicar e originar 2.097.152 novas bactérias num período de 7 horas.

O tempo de geração para a maioria das bactérias fica entre 20 minutos e 20 horas, e é geralmente menor que uma hora. Algumas bactérias, tais como aquelas causadoras da tuberculose e da lepra, possuem tempos de geração bem maiores. Alguns organismos demoram mais um pouco do que outros para irem da fase *lag* para a fase log, e nem todos se dividem precisamente juntos. Se todos se dividissem juntos e se o tempo de geração fosse de exatamente 20 minutos, o número de células em uma cultura aumentaria como os degraus de uma escada, dobrando

exatamente a cada 20 minutos — uma situação hipotética chamada **crescimento sincrônico**. Em uma cultura real, cada célula se divide em algum momento durante o tempo de geração de 20 minutos, com cerca de 1/20 das células se dividindo a cada minuto — uma situação natural chamada **crescimento não-sincrônico**. O crescimento não-sincrônico aparece como uma linha reta, e não como degraus, em um gráfico logarítmico (➤ Fig. 6.4).

Os organismos dentro de um tubo de meio de cultura podem manter o crescimento logarítmico apenas por um limitado período de tempo. À medida que o número de organismos cresce, os nutrientes são consumidos, os resíduos metabólicos são acumulados, o espaço pode se tornar limitado e os organismos aeróbios sofrem de falta de oxigênio. O fator limite para o crescimento logarítmico parece ser a velocidade na qual a energia pode ser produzida na forma de ATP. À medida que a disponibilidade de nutrientes diminui, as células se tornam menos capazes de gerar ATP e sua taxa de crescimento se reduz. A redução da taxa de crescimento é mostrada na ➤ Fig. 6.3 por um decréscimo gradual na curva de crescimento (o segmento curvo à direita da fase log).

O nivelamento do crescimento é seguido pela fase estacionária, a não ser que um meio fresco seja adicionado ou que os organismos sejam transferidos para um novo meio. O crescimento logarítmico pode ser mantido através de um dispositivo bastante semelhante a um termostato, chamado **quimiostato** (➤ Fig. 6.5). O quimiostato possui uma câmara de crescimento e um reservatório do qual meio fresco é continuamente adicionado à câmara de crescimento, à medida que o meio antigo é retirado. Alternativamente, os organismos pertencentes a uma cultura em fase estacionária podem ser transferidos para um meio fresco. Após uma breve fase *lag*, tais organismos retornam rapidamente à fase log de crescimento.



➤ Fig. 6.4 Crescimento não-sincrônico. Curva de crescimento de uma população em crescimento exponencial, plotada logarítmicamente (linha tracejada) e aritmeticamente (linha contínua).



> Fig. 6.5 Micróbios crescendo em um quimiostato. Um quimiostato renova constantemente os nutrientes em uma cultura, tornando possível que os organismos cresçam continuamente na fase log.

### A Fase Estacionária

Quando a divisão celular decresce a um ponto em que novas células são produzidas com a mesma velocidade com que as células antigas morrem, o número de células vivas permanece constante. A cultura está, então, na **fase estacionária**, representada por uma linha horizontal reta na > Fig. 6.3. O meio contém uma quantidade limitada de nutrientes e pode conter resíduos tóxicos. Além disso, o suprimento de oxigênio pode se tornar inadequado para os organismos aeróbicos, e podem ocorrer mudanças prejudiciais de pH.

### A Fase de Declínio (Morte)

A medida que as condições do meio vão se tornando cada vez menos favoráveis para a divisão celular, muitas células perdem a capacidade de se dividir e morrem. Nesta **fase de declínio**, ou **fase de morte**, o número de células vivas decresce em velocidade logarítmica, como indicado pela linha reta diagonal em declive na > Fig. 6.3. Durante a fase de declínio, muitas células sofrem *involução*, isto é, assumem uma variedade de formas incomuns, o que as torna difíceis de serem identificadas. Em culturas de organismos formadores de esporos, sobrevivem mais esporos do que células vegetativas (metabolicamente ativas). A duração desta fase é altamente variável, tal como a duração da fase de crescimento logarítmico. Ambas dependem principalmente das características genéticas do organismo. Culturas de algumas bactérias passam por todas as fases de crescimento e morrem em alguns dias, ao passo que outras abrigarão alguns poucos organismos vivos após meses ou mesmo anos.

### Crescimento em Colônias

As fases de crescimento são exibidas de diferentes maneiras nas colônias que crescem em meio sólido. Normalmente, uma célula se divide exponencialmente, formando uma pequena **colônia** — todos os descendentes da célula original. A colônia cresce rapidamente em suas extremidades; as células que estão perto do centro crescem mais lentamente, ou começam a morrer, por terem menores quantidades de nutrientes disponíveis e por estarem expostas a mais produtos tóxicos residuais. Em uma colônia, todas as fases da curva de crescimento ocorrem simultaneamente.

## Medida do Crescimento Bacteriano

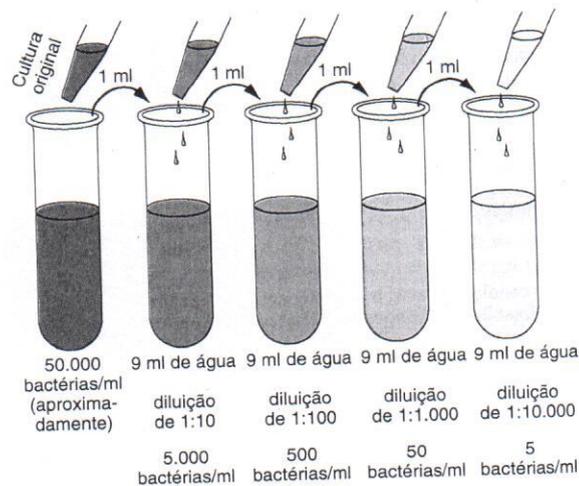
O crescimento bacteriano é medido através da estimativa do número de células que foram geradas por divisão binária durante uma fase de crescimento. Esta medida é expressa como o número de organismos *viáveis* (vivos) por mililitro de cultura. Existem vários métodos de medição do crescimento bacteriano.

### Diluição em Série e Contagem-Padrão em Placas

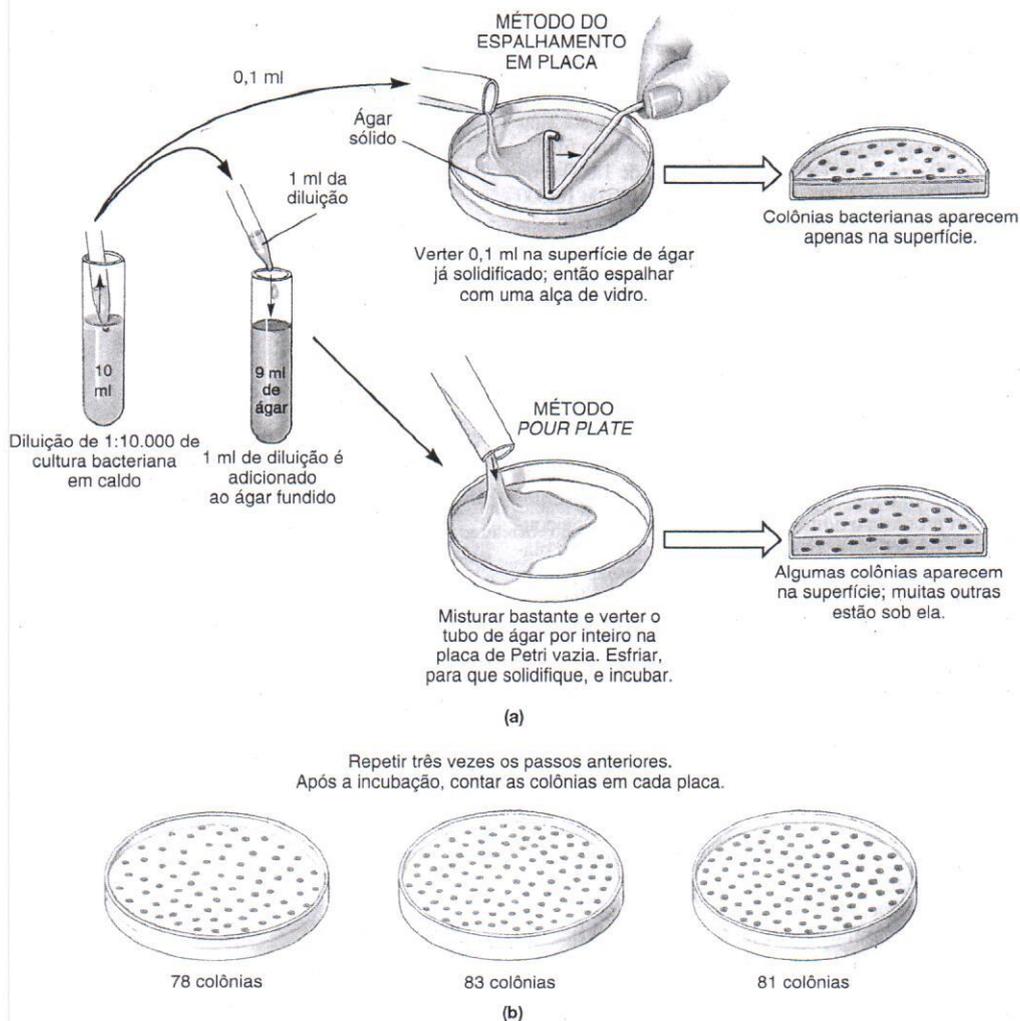
Um método para se medir o crescimento bacteriano é a **contagem-padrão em placas**. Esta técnica baseia-se no fato de que, em condições adequadas, uma bactéria viva isolada se dividirá e formará uma colônia visível em uma placa de ágar. Uma **placa de ágar** é um meio nutritivo solidificado com **ágar**, um polissacarídeo complexo extraído de determinadas algas marinhas. Por ser difícil se contar mais do que 300 colônias em uma placa de ágar, é geralmente necessário diluir a cultura bacteriana original antes de se plaquear (transferir) um volume conhecido de cultura para a placa sólida. A **diluição em série** cumpre este objetivo.

Para se fazer **diluições em série** (> Fig. 6.6), começa-se com organismos em meio líquido. Acrescentando-se 1 ml deste meio a 9 ml de água estéril, cria-se uma diluição de 1:10; acrescentando-se 1 ml da diluição de 1:10 a 9 ml de água estéril, cria-se uma diluição de 1:100; e assim por diante. O número de bactérias por mililitro de fluido é reduzido em 9/10 a cada diluição. As diluições subsequentes são realizadas em proporções de 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000 ou até mesmo 1:10.000.000, caso a cultura original contenha um número extremamente grande de organismos.

De cada diluição, começando geralmente com 1:100, 1 ml da cultura é transferido para a placa de ágar. (Um mililitro da diluição de 1:10, quando transferido para uma placa de Petri, contém normalmente organismos demais para produzir colônias contáveis.) A transferência pode ser feita tanto através do método de **pour plate** como pelo método de espalhamento em placa (> Fig. 6.7). Um **pour plate** é preparado adicionando-se inicialmente 1,0 ml de uma cultura diluída, obtida de uma diluição em série, a



> Fig. 6.6 Diluição em série. Retira-se 1 ml de uma cultura em caldo e acrescentam-se 9 ml de água estéril, de modo a diluir a cultura por um fator 10. Este procedimento é repetido, até que a concentração desejada seja alcançada.



> **Fig. 6.7 Cálculo do número de bactérias por mililitro de cultura utilizando-se a diluição em série.** (a) Um mililitro de uma diluição de 1:10.000 é misturado a 9 ml de ágar fundido, que deve estar quente o suficiente para permanecer em estado líquido, mas não para matar os microrganismos que estão sendo misturados a ele. Após bem misturado, o ágar aquecido é rapidamente vertido em uma placa de Petri vazia e estéril (pelo método *pour plate*). Seguem-se o resfriamento, a solidificação e a incubação. Alternativamente, 0,1 ml de uma diluição de 1:10.000 é vertido em uma superfície de ágar já solidificado e então espalhado com uma alça de vidro (pelo método do espalhamento em placa). Em seguida, é incubado. (b) As colônias que se desenvolvem são contadas. Uma única medição não é muito confiável, de modo que o procedimento é repetido pelo menos três vezes, e calcula-se a média dos resultados. O número médio de colônias é multiplicado pelo fator de diluição, para se determinar o número total de organismos por mililitro da cultura original.

9 ml de ágar nutriente fundido. Após ter-se misturado o meio, este é derramado sobre uma placa de Petri vazia. Após o meio de ágar esfriar, solidificar-se e ser incubado, as colônias irão se desenvolver tanto dentro do meio quanto em sua superfície. As células suspensas no ágar fundido durante a preparação podem estar danificadas pelo calor e, assim, não formarão colônias. Aquelas que crescem dentro do ágar formarão colônias menores do que aquelas que crescem na superfície. O **método do espalhamento em placa** elimina tais problemas, pois todas as células permanecem na superfície do meio sólido. A amostra diluída é inicialmente colocada no centro de um meio de ágar sólido e esfriado. Depois,

é espalhada homogeneamente na superfície do meio com o auxílio de uma alça de vidro (alça de Drigalsky) estéril. Após a incubação, as colônias se desenvolvem na superfície do ágar.

Em qualquer lugar onde uma bactéria viva isolada for depositada em uma placa de ágar, ela se dividirá e formará uma colônia. Cada bactéria representa uma *unidade formadora de colônias (UFC)*. Uma ou mais placas deverão apresentar um número pequeno de colônias, o suficiente para que cada uma seja claramente distinta e possa ser contada. Se as diluições forem feitas de maneira correta, o resultado serão placas com um **número contável** de colônias (de 30 a 300 por placa).

Para se contar o número real de colônias presentes, deve-se colocar a placa sob a lente de aumento de um *contador de colônias* ( $\geq$  Fig. 6.8), e as colônias existentes na placa inteira serão contadas. Para se determinar o número de unidades formadoras de colônias na cultura original, deve-se multiplicar o número de colônias encontradas na placa pelo *fator de diluição*; se este for uma fração, deve-se usar o denominador. Um fator de diluição de 1.000 seria expresso por 1:1.000 ou 1/1.000, e um fator de diluição de 10.000 seria expresso por 1:10.000. O cálculo típico de uma contagem média de colônias de 81 bactérias que foram produzidas plaqueando-se uma diluição de 1/100.000 (fator de diluição = 100.000) seria o seguinte:

$$81 \times 100.000 = 8.100.000, \text{ ou } 8,1 \times 10^6 \text{ UFC/ml}$$

A precisão do método da diluição em série e do método de contagem em placa depende da dispersão homogênea dos organismos em cada diluição. Os erros podem ser minimizados agitando-se cada cultura antes de se tirar a amostra e fazendo-se diversas placas para cada diluição. A precisão também é afetada pela morte das células. Considerando-se que o número de colônias contadas representa o número de organismos vivos, a contagem não inclui aqueles que possam ter morrido durante o plaqueamento; também não inclui os organismos que não podem crescer no meio escolhido. O uso de culturas jovens na fase log de crescimento diminui este tipo de erro.

### Contagem Microscópica Direta

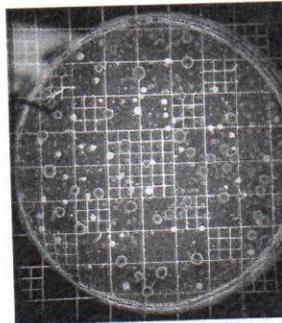
O crescimento bacteriano pode ser medido pela **contagem microscópica direta**. Neste método, um volume conhecido de meio é colocado em uma lâmina de vidro especial, calibrada, contendo uma grade de contagem chamada *câmara de contagem de Petroff-Hausser* ( $\geq$  Fig. 6.9). Uma suspensão bacteriana é introduzida na câmara com uma pipeta calibrada. Depois de as bactérias se terem assentado e de as correntes líquidas terem ficado mais lentas, os microrganismos são contados em áreas calibradas específicas. Seu número por unidade de volume da suspensão original é calculado usando-se uma fórmula apropriada. O número de bactérias por mililitro de meio pode ser determinado com um grau razoável de precisão. A precisão da contagem microscópica direta depende da presença de mais de 10 milhões de bactérias por mililitro de cultura. Isto ocorre porque as câmaras de contagem são projetadas de modo a permitir contagens precisas apenas quando um grande número de células se faz presente. Uma contagem precisa também requer que as bactérias estejam homogêneamente distribuídas por toda a cultura. Esta técnica possui a desvantagem de, em geral, não distinguir entre células vivas e mortas.

### Número Mais Provável

Quando as amostras contêm muito poucos organismos para propiciar contagens confiáveis do tamanho da população através do método de contagem-padrão, como no caso de estudos de água e alimentos, ou quando os organismos não crescem em ágar, utiliza-se o método do **número mais provável (NMP)**. Com este método, o técnico observa a amostra, calcula o número de células e realiza uma série de diluições progressivamente maiores. À medida que o fator de diluição aumenta, será alcançado um ponto no qual alguns tubos irão conter um único organismo, e outros, nenhum. Um teste de NMP típico é realizado em três baterias de cinco tubos, cada bateria correspondendo a um volume (10, 1 e 0,1 ml) de uma dada diluição ( $\geq$  Fig. 6.10). Aqueles que contêm organismos mostrarão crescimento pela produção de bolhas de gás e/ou tornando-se turvos quando incubados. O nú-



(a)



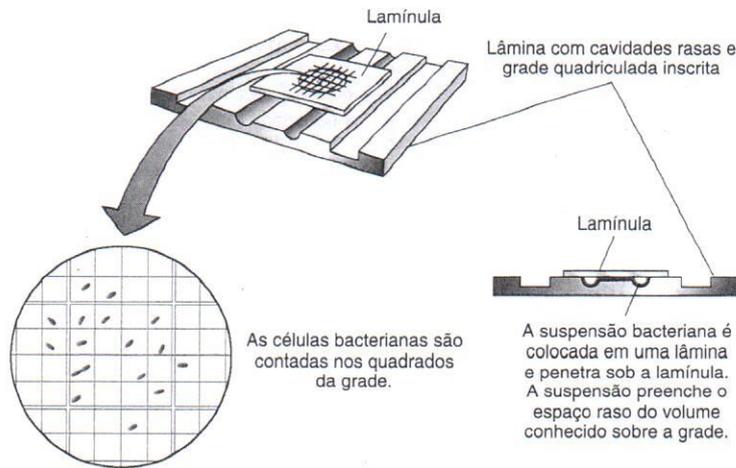
(b)



(c)

$\geq$  Fig. 6.8 Contagem de colônias. (a) Com o uso de um contador de colônias bacterianas. (b) Colônias bacterianas vistas através da lente de aumento contra uma grade de contagem de colônias. A placa foi produzida pelo método *pour plate*. Quantas colônias diferentes podem-se identificar nesta placa? (c) Qual destas placas seria a correta para se contar? Por quê?

mero de organismos na cultura original é estimado a partir de uma tabela de números mais prováveis. Os valores na tabela, que são baseados em probabilidades estatísticas, especificam que o número de organismos na cultura original possui 95% de chan-



> Fig. 6.9 Câmara de contagem de Petroff-Hausser. É conhecido o volume de suspensão que preenche o estreito espaço entre o quadriculado de fundo e a lâminula de proteção, logo o número de bactérias por unidade de volume pode ser calculado.

ces de cair dentro de uma faixa específica. A tabela completa de NMP é apresentada no Apêndice A. Quanto maior a quantidade de tubos que mostram crescimento, especialmente em diluições maiores, mais organismos estavam presentes na amostra.

Volume de Diluição Adicionado	Resultados das Culturas	Número de Tubos Positivos
10 ml		5
1 ml		2
0,1 ml		0

> Fig. 6.10 Teste do número mais provável (NMP). Os tubos nos quais bolhas de gás são visíveis (marcados com +) contêm organismos.

### Filtração

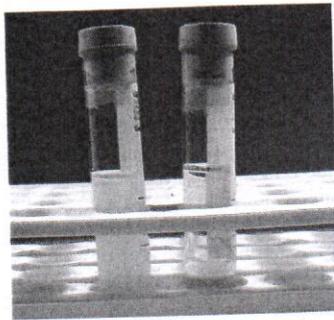
Um outro método para se estimar o tamanho de populações bacterianas pequenas é a **filtração**. Um volume conhecido de água ou ar é passado através de um filtro dotado de poros muito pequenos para permitir a passagem de bactérias. Quando o filtro é colocado em meio sólido, cada colônia que cresce representa originalmente um organismo. Assim, o número de organismos por litro de água ou de ar pode ser calculado. (A > Fig. 25.18 mostra o processo de filtração e as colônias que cresceram no ágar a partir do filtro.)

### Outros Métodos

Existem vários outros métodos de monitoramento do crescimento bacteriano. Eles incluem a simples observação com ou sem instrumentos especiais, a medição de produtos metabólicos por detecção de gás ou produção de ácidos e a determinação do peso seco de células.

A **turbidez** (aspecto turvo) em um tubo de cultura indica a presença de organismos (> Fig. 6.11). Estimativas suficientemente precisas do crescimento podem ser obtidas medindo-se a turbidez através de recursos fotoelétricos, como por exemplo o *colorímetro* ou o *espectrofotômetro* (> Fig. 6.12). Este método é particularmente útil no monitoramento da taxa de crescimento sem que se interrompa a cultura. Amostras com densidades celulares altas, entretanto, devem ser diluídas, para assegurar leituras mais exatas. As medidas do crescimento bacteriano baseadas na turbidez estão também sujeitas a erro quando as culturas contêm menos de 1 milhão de células por mililitro. Tais culturas podem exibir pouca ou nenhuma turvação, mesmo quando o crescimento está ocorrendo. Por outro lado, a turvação pode ser produzida por uma grande concentração de células mortas presentes na cultura.

A medida dos produtos metabólicos de uma população pode ser utilizada para se estimar indiretamente o crescimento bacteri-



➤ Fig. 6.11 Turbidez. A turbidez, ou aparência turva, é um indicador do crescimento bacteriano na urina contida no tubo à esquerda.

ano. A velocidade na qual os produtos metabólicos, tais como gases e/ou ácidos, são formados por uma cultura reflete a quantidade de bactérias presentes. A produção de gás pode ser detectada (em vez de medida) captando-se os gases em pequenos tubos invertidos colocados dentro de tubos maiores de meio líquido contendo bactérias. A produção de ácidos pode ser detectada através da incorporação de *indicadores de pH* — substâncias químicas que mudam de cor de acordo com as mudanças do pH — em um meio líquido contendo bactérias metabolicamente ativas.

A velocidade na qual um substrato como a glicose ou o oxigênio é consumido também reflete a quantidade de bactérias. Um método para se estimar grandes quantidades de bactérias é, por exemplo, o teste de redução do corante, que mede, direta ou indiretamente, o consumo de oxigênio. Neste teste, um corante como o azul de metileno é incorporado a um meio contendo leite. As bactérias inoculadas no meio utilizam o oxigênio à medida que metabolizam o

leite. O azul de metileno é azul na presença de oxigênio e torna-se incolor na sua ausência. Assim, quanto mais rápido o meio perde a cor, mais rápido o oxigênio está sendo consumido, e pressupõe-se que mais bactérias estejam presentes. A velocidade na qual o corante é descolorado (redução do corante) é uma abordagem altamente enganosa; não é uma medida precisa da quantidade de bactérias.

Finalmente, o número de células em uma cultura pode ser determinado pelas *medidas de peso seco*. Para se calcular o peso seco das células, elas devem ser separadas do meio através de recursos físicos como a filtração ou a centrifugação. As células são então secas e a massa resultante é pesada.

- ✓ Quais são as diferenças entre a fase *lag* e a fase *log* de uma curva de crescimento bacteriano?
- ✓ De que maneira a taxa logarítmica de crescimento difere da taxa aritmética de crescimento? Que tipo de taxa de crescimento é exemplificado pela seqüência 1, 2, 4, 8, 16, 32 células?
- ✓ Se uma cultura em caldo contendo inicialmente 37.000 bactérias/ml for diluída a 1:1.000, quantas bactérias/ml da cultura em caldo diluído estarão presentes, em média?
- ✓ Por que uma contagem microscópica direta de bactérias usando a câmara de Petroff-Hausser não fornece uma contagem viável? Como este método difere dos métodos de espalhamento em placa e *pour plate*?

## Fatores Que Afetam o Crescimento Bacteriano

Os microrganismos são encontrados praticamente em quase todos os ambientes da terra, inclusive em meios nos quais nenhuma outra forma de vida pode sobreviver. Os micróbios podem



➤ Fig. 6.12 Espectrofotômetro. Este instrumento pode ser utilizado para se medir o crescimento bacteriano pela determinação do grau de transmissão de luz através da cultura. Amostras de culturas contidas em tubos especiais opticamente transparentes são colocadas dentro do espectrofotômetro (dentro de um suporte à direita do aparelho) e são medidas em relação aos padrões.

viver em um grande número de ambientes, pois são pequenos e facilmente dispersáveis, ocupam pouco espaço, necessitam apenas de pequenas quantidades de nutrientes e são diversificados quanto às suas necessidades nutricionais. Eles também possuem grande capacidade de adaptação às mudanças ambientais. Para praticamente qualquer substância, há algum micróbico que pode metabolizá-la como nutriente; para praticamente qualquer mudança ambiental, há algum micróbico que pode sobreviver.

Nós, como mamíferos que possuem sangue quente, que respiram o ar e que vivem em terra, tendemos a nos esquecer de que 72% da superfície do nosso planeta são formados por água, que 90% desta água é salgada e que os ambientes que contêm organismos vivos possuem temperatura média de 5°C. Ao contrário dos seres humanos, os microrganismos vivem a maior parte do tempo na água, e muitos se adaptam a temperaturas acima ou abaixo daquelas consideradas ótimas. Os organismos de interesse particular nas ciências da saúde representam apenas uma fração de todos os microrganismos — aqueles que se adaptaram às condições encontradas no corpo humano.

Diferentes espécies de microrganismos podem crescer em uma ampla gama de ambientes — desde as condições altamente ácidas até aquelas um tanto alcalinas, do gelo da Antártida às fontes termais, em fontes de águas puras ou em pântanos salgados, em oceanos com ou sem oxigênio e até mesmo sob grande pressão e em fendas de vapor fervente no fundo do oceano. Os microrganismos usam uma variedade de substâncias para obter energia, e alguns requerem nutrientes especiais.

As espécies de organismos encontradas em um dado ambiente e as velocidades nas quais elas crescem podem ser influenciadas por uma série de fatores, tanto físicos como bioquímicos. Os **fatores físicos** incluem o pH, a temperatura, a concentração de oxigênio, a umidade, a pressão hidrostática, a pressão osmótica e a radiação. Os **fatores nutricionais** (bioquímicos) incluem a disponibilidade de carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo, os oligoelementos e, em alguns casos, as vitaminas.

Estima-se em 10.034 trilhões de toneladas o peso total do número de bactérias que vivem no solo e no subsolo.

## Fatores Físicos

### pH

Lembre-se de que a acidez ou alcalinidade de um meio é expressa em termos de pH. (Cap. 2) Apesar de a escala de pH ser agora amplamente utilizada na química, ela foi inventada pelo químico dinamarquês Søren Sørensen para definir os limites do crescimento de microrganismos em vários meios. Os microrganismos possuem um **pH ótimo** — o pH no qual eles crescem melhor. O pH ótimo para os microrganismos está geralmente próximo da neutralidade (pH 7). A maioria dos micróbios não cresce em um pH com uma unidade acima ou abaixo de seu pH ótimo.

De acordo com sua tolerância à acidez ou à alcalinidade, as bactérias são classificadas em:

- acidófilas,
- neutrófilas ou
- alcalófilas.

No entanto, espécie alguma consegue tolerar por completo a faixa inteira de pH de qualquer uma destas categorias, e

muitas delas toleram uma faixa que se sobrepõe a duas categorias. As **acidófilas**, ou seja, organismos que têm afinidade por meios ácidos, desenvolvem-se melhor em valores de pH de 0,1 a 5,4. O *Lactobacillus*, que produz ácido láctico, é um acidófilo, mas suporta apenas uma acidez moderada. Algumas bactérias que oxidam o enxofre a ácido sulfúrico, entretanto, podem gerar e tolerar condições tão baixas quanto o pH de 1. As **neutrófilas** vivem entre valores de pH de 5,4 a 8,5. A maioria das bactérias que causam doenças nos seres humanos pertence ao grupo das neutrófilas. As **alcalófilas**, ou bactérias que gostam de ambientes alcalinos, vivem em valores de pH entre 7 e 11,5. O *Vibrio cholerae*, o agente causador da doença chamada cólera asiático, cresce melhor em pH em torno de 9. O *Alcaligenes faecalis*, que às vezes infecta os seres humanos já enfraquecidos por outra doença, pode criar e tolerar condições alcalinas de pH de 9 ou ainda maiores. A bactéria do solo *Agrobacterium* cresce em solo alcalino de pH de 12.

Os efeitos do pH sobre os organismos podem estar em parte relacionados à concentração de ácidos orgânicos no meio e à proteção que as paredes celulares bacterianas às vezes proporcionam. O *Lactobacillus* e outros organismos que produzem ácidos orgânicos durante a fermentação inibem seu próprio crescimento quando ácidos como o láctico e o pirúvico se acumulam no meio. Parece que os próprios ácidos, e não os íons de hidrogênio, inibem o crescimento. As mudanças de pH podem levar à desnaturação de enzimas e de outras proteínas e interferir com o bombeamento de íons na membrana celular. Outros organismos possuem paredes celulares relativamente impermeáveis, o que impede que a membrana celular seja exposta a um pH extremo no meio. Estes organismos parecem tolerar a acidez ou a alcalinidade dos ambientes, pelo fato de a célula ser mantida em pH próximo da neutralidade.

Muitas bactérias, freqüentemente, produzem quantidades suficientes de ácidos como subprodutos metabólicos que eventualmente interferem em seu próprio crescimento. Para evitar tal situação no cultivo de bactérias em laboratório, são incorporados *tampões* ao meio de cultura, de modo a manter níveis adequados de pH. Para este propósito, sais de fosfato são freqüentemente utilizados.

### Temperatura

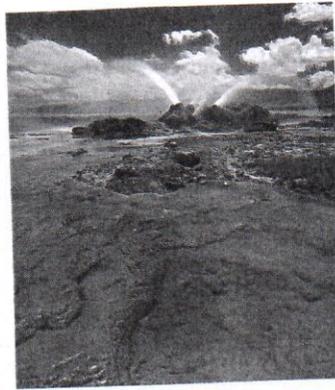
A maioria das espécies bacterianas pode se desenvolver em uma faixa de temperatura superior a 30°C, mas as temperaturas máxima e mínima variam consideravelmente entre as diferentes espécies. A água do mar permanece líquida abaixo de 0°C, e os organismos que lá vivem conseguem tolerar temperaturas negativas. De acordo com suas faixas de temperatura de crescimento, as bactérias podem ser classificadas como organismos:

- psicrófilos,
- mesófilos ou
- termófilos.

No entanto, a maioria das bactérias não tolera completamente todo o intervalo de temperatura de uma dada categoria, e algumas toleram um intervalo que se sobrepõe às outras categorias. Dentro destes grupos, as bactérias são também classificadas em obrigatórias e facultativas. O termo **obrigatória** significa que o organismo *necessita* de condição ambiental específica. **Facultativa** significa que o organismo é capaz de se ajustar e tolerar a condição ambiental, mas pode também viver em outras condições.

### Em Toda a Parte

As bactérias podem habitar eficazmente qualquer local adequado à existência de vida — nosso intestino ecologicamente complexo, as geleiras congeladas da Antártida e sob pressões barométricas extremas e em temperaturas como aquelas encontradas nas fendas do fundo dos oceanos. Em temperaturas superiores a 160°F, toda a vida na terra é bacteriana. A bactéria *Thermophila acidophilum* desenvolve-se à temperatura de 140°F, em pH 1 ou 2. Este organismo, encontrado na superfície do carvão em chamas e em fontes termais, “congela” até morrer a 100°F. Recentemente, comunidades microbianas foram encontradas vivas 3.000 pés abaixo da superfície terrestre, no basalto do rio Colúmbia. Tais bactérias são anaeróbias e conseguem energia a partir da reação do hidrogênio produzido entre os minerais no basalto e as águas subterrâneas infiltradas entre as pedras. A caracterização das bactérias que vivem em ambientes extremos proporciona uma percepção sobre a diversidade de estratégias de vida, assim como sobre as oportunidades de se produzir e usar moléculas biológicas com habilidades singulares.



➤ Fig. 6.13 Termófilos. Fontes termais de um gêiser, deserto de Black Rock, Nevada. Apesar da temperatura próxima à da fervura, as bactérias termofílicas do enxofre conseguem viver e crescer nas correntes formadas por estes gêiseres.

Os **psicrófilos**, ou organismos que gostam do frio, crescem melhor a temperaturas de 15 a 20°C, apesar de alguns viverem bem a 0°C. Eles se subdividem em **psicrófilos obrigatórios**, como o *Bacillus globisporus*, que não cresce a temperaturas acima de 20°C, e **psicrófilos facultativos**, como a *Xanthomonas pharmicola*, que se desenvolve melhor a temperaturas abaixo de 20°C, mas que também cresce acima desta temperatura. Os psicrófilos vivem principalmente em águas e solos frios. Nenhum deles sobrevive no corpo humano, mas alguns são conhecidos por causarem deterioração em alimentos refrigerados.

Os **mesófilos**, entre os quais se inclui a maioria das bactérias, são organismos que crescem melhor a temperaturas entre 25 e 40°C. Os patógenos humanos estão incluídos nesta categoria e, em sua maioria, crescem melhor a uma temperatura próxima à do corpo humano (37°C). Os organismos **termodúricos** vivem geralmente como os mesófilos, mas conseguem resistir a curtos períodos de exposição a altas temperaturas. O aquecimento inadequado durante os processos de enlatamento e pasteurização pode manter vivos tais organismos, com a conseqüente deterioração dos alimentos.

Os **termófilos**, ou organismos que gostam do calor, desenvolvem-se melhor a temperaturas de 50 a 60°C. Muitas destas bactérias são encontradas em pilhas de adubo, e algumas toleram temperaturas de 110°C em fontes termais ferventes. Elas podem ainda ser classificadas como **termófilas obrigatórias**, que se desenvolvem apenas a temperaturas acima de 37°C, ou **termófilas facultativas**, que se desenvolvem tanto acima quanto abaixo de 37°C. O *Bacillus stearothermophilus*, que geralmente é considerado um termófilo obrigatório, cresce em seu ritmo máximo a 65-75°C, mas pode apresentar crescimento pequeno e causar a deterioração de alimentos a temperaturas não tão altas, como, p. ex., 30°C. As bactérias termofílicas do enxofre apresentam zonas de temperaturas ótimas de crescimento nas fendas de vazão dos gêiseres (➤ Fig. 6.13). Diferentes espécies são coletadas em locais distintos ao longo do canal. As espécies mais tolerantes ao calor encontram-se próximas ao gêiser, e aquelas menos tolerantes estão distribuídas em regiões onde a água tenha esfriado até sua temperatura ótima. Em canais profundos, as espécies mais tolerantes ao calor são encontradas nas maiores profundidades, e as menos tolerantes, próximas à superfície, onde a

água tenha esfriado. Em condições de laboratório que utilizam alta pressão para aumentar a temperatura da água acima de 100°C, as arqueobactérias provenientes das fendas das profundezas marinhas cresceram a 115°C (238°F). (O Cap. 9 fornece mais informações sobre estes extraordinários organismos.)

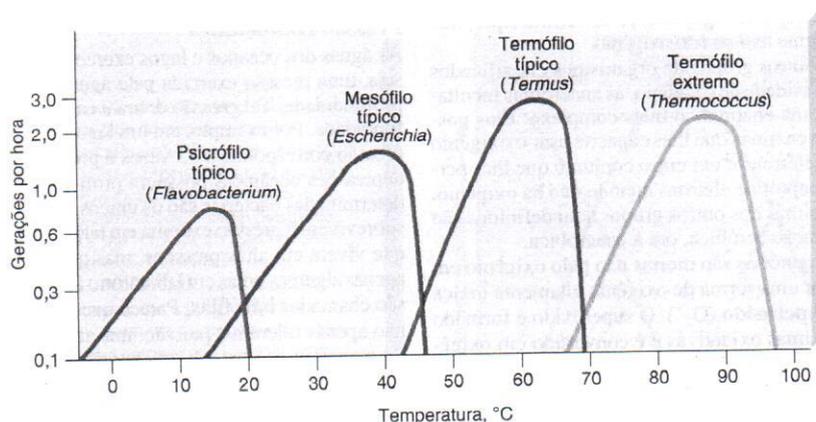
A faixa de temperatura na qual um organismo se desenvolve é amplamente determinada pelas temperaturas nas quais suas enzimas atuam. Dentro desta faixa, podem ser identificadas três temperaturas críticas:

1. A **temperatura mínima de crescimento**, que é a menor temperatura em que as células se dividem;
2. A **temperatura máxima de crescimento**, que é a temperatura mais alta em que as células se dividem;
3. A **temperatura ótima de crescimento**, que é a temperatura em que as células se dividem mais rapidamente, isto é, possuem o tempo de geração mais curto.

Bactérias isoladas de montes sulfídicos submarinos superaquecidos devem ser crescidas em laboratório a 480°F e a 265 ATM.

Sem levarmos em consideração o tipo de bactéria, o crescimento aumenta gradualmente da temperatura mínima para a temperatura ótima e cai rapidamente da temperatura ótima para a máxima. Além disso, a temperatura ótima está freqüentemente bem próxima da temperatura máxima (➤ Fig. 6.14). Estas propriedades do crescimento são devidas a mudanças na atividade enzimática. ➤ (Cap. 5) A atividade enzimática geralmente se duplica a cada aumento de 10°C na temperatura, até que a alta temperatura comece a desnaturar todas as proteínas, inclusive as enzimas. Este rápido declínio na atividade enzimática, a uma temperatura apenas ligeiramente superior à temperatura ótima, ocorre quando as moléculas da enzima se tornam tão alteradas pela desnaturação que não conseguem mais catalisar as reações.

A temperatura é importante não apenas para proporcionar condições ao crescimento bacteriano, mas também para evitá-lo. A refrigeração de alimentos, feita geralmente a 4°C, reduz o cres-



> Fig. 6.14 Taxas de crescimento de bactérias psicrófilas, mesófilas e termófilas. Observe a superposição dos intervalos de temperatura nos quais estes organismos podem sobreviver. As taxas de crescimento são bem mais baixas nas extremidades dos intervalos.

cimento dos psicrófilos e impede o crescimento da maioria das demais bactérias. Entretanto, os alimentos e outros materiais, como o sangue, podem permitir o crescimento de bactérias mesmo quando refrigerados. Por esta razão, se precisarem ser guardados por muito tempo, os materiais que podem suportar o congelamento são armazenados a temperaturas de  $-30^{\circ}\text{C}$ . Altas temperaturas também podem impedir o crescimento bacteriano (Cap. 12). Os equipamentos de laboratório e os meios de cultura são geralmente esterilizados através do calor, e os alimentos são freqüentemente preservados mediante o aquecimento e armazenamento em recipientes fechados. As bactérias estão mais aptas a sobreviver em extremos de frio do que em extremos de calor; as enzimas não são desnaturadas pelo resfriamento, mas podem ser permanentemente desnaturadas pelo calor.

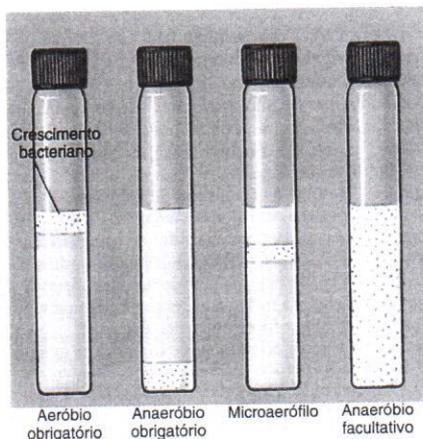
### Oxigênio

As bactérias, especialmente as heterotróficas, podem ser divididas em aeróbias, que necessitam de oxigênio para se desenvolver, e anaeróbias, que não o requerem. (Cap. 5) Entre as aeróbias, as culturas de células que se dividem rapidamente necessitam mais de oxigênio do que aquelas de divisão lenta. As **aeróbias obrigatórias**, como a *Pseudomonas*, que é uma causa comum de infecções hospitalares, necessitam de oxigênio livre para a respiração aeróbia, ao passo que as **anaeróbias obrigatórias**, como o *Bacteroides*, morrem na presença do oxigênio. Em um tubo de cultura contendo caldo nutritivo, as bactérias aeróbias obrigatórias crescem próximo à superfície, onde o oxigênio atmosférico se difunde para o meio; as anaeróbias obrigatórias desenvolvem-se próximo ao fundo do tubo, onde pouco ou nenhum oxigênio livre as alcança (> Fig. 6.15).

Em relação aos aeróbios, o oxigênio é freqüentemente o fator ambiental que limita sua taxa de crescimento. O oxigênio é pouco solúvel em água e, por isso, às vezes emprega-se uma série de métodos para manter uma alta concentração de  $\text{O}_2$  nas culturas. Um destes métodos é a agitação vigorosa, ou aeração, forçada através do borbulhamento de ar na cultura, como é feito em um aquário de peixes. Este procedimento é especialmente importante em processos comerciais como a produção de antibióticos e no tratamento de esgotos.

Entre os extremos das bactérias aeróbias obrigatórias e das bactérias anaeróbias obrigatórias estão as **microaerófilas**, as **anaeróbias**

**facultativas** e as **anaeróbias aerotolerantes**. As **microaerófilas** desenvolvem-se melhor na presença de uma pequena quantidade de oxigênio livre. Em uma cultura em tubo, elas crescem abaixo da superfície do meio, em um nível onde a disponibilidade de oxigênio lhes é suficiente. As microaerófilas, como o *Campylobacter*, que pode causar distúrbios intestinais, são também **capnófilas**, ou seja, organismos que gostam do dióxido de carbono. Elas sobrevivem em ambientes com baixa concentração de oxigênio e alta concentração de dióxido de carbono. Quando o oxigênio está presente, as **anaeróbias facultativas** geralmente mantêm seu metabolismo aeróbio; porém, na falta dele, mudam para o metabolismo anaeróbio. O *Staphylococcus* e a *Escherichia coli* são anaeróbias facultativas; geralmente são encontradas nos tratos intestinal e urinário, onde apenas uma pequena quantidade de oxigênio está disponível. As **anaeróbias aerotolerantes** conseguem sobreviver na presença de oxigênio, mas não fazem uso dele em seu metabolismo. O *Lactobacillus*,



> Fig. 6.15 Padrões de uso do oxigênio. Diferentes organismos incubados por 24 horas em tubos de caldo nutritivo e acumulados em regiões diferentes, de acordo com sua necessidade ou sensibilidade em relação ao oxigênio.

por exemplo, sempre capta energia através da fermentação, não importando se o ambiente tem ou não oxigênio.

Se comparadas a outros grupos de organismos classificados de acordo com a necessidade de oxigênio, as anaeróbias facultativas possuem o sistema enzimático mais complexo. Elas possuem um conjunto de enzimas que lhes capacita usar o oxigênio como um aceptor de elétrons e um outro conjunto que lhes permite usar um outro aceptor de elétrons quando não há oxigênio. Por outro lado, as enzimas dos outros grupos aqui definidos são limitadas ora à respiração aeróbica, ora à anaeróbica.

As anaeróbias obrigatórias são mortas não pelo oxigênio em forma de gás, mas por uma forma de oxigênio altamente tóxica e reativa, chamada **superóxido** ( $O_2^-$ ). O superóxido é formado por determinadas enzimas oxidativas e é convertido em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e em peróxido de hidrogênio tóxico ( $H_2O_2$ ) por uma enzima chamada **superóxido dismutase**. O peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio molecular pela enzima **catalase**. As aeróbias obrigatórias e a maior parte das anaeróbias facultativas possuem ambas as enzimas. Algumas bactérias anaeróbias facultativas e aerotolerantes possuem a enzima superóxido dismutase, mas não possuem a enzima catalase. As anaeróbias obrigatórias, em sua maioria, não possuem nem uma nem outra e morrem em consequência dos efeitos tóxicos do superóxido e do peróxido de hidrogênio.

## Umidade

Todas as células ativamente metabolizantes geralmente requerem um meio aquoso. Ao contrário de organismos maiores, que possuem revestimentos protetores e ambientes internos líquidos, os organismos unicelulares são expostos diretamente a seus meios. A maioria das células vegetativas sobrevive apenas algumas horas sem umidade; apenas os esporos de organismos formadores de esporos podem sobreviver em um estado inativo em um ambiente seco.

### Quando a Situação Ficar Difícil, Esconda-se Dentro de uma Rocha

Poucas bactérias vivem nas depressões extremamente frias e secas da Antártida, onde pouquíssimos outros organismos conseguem sobreviver. A umidade relativa é tão baixa que a água passa diretamente do estado sólido para o gasoso e raramente é encontrada em estado líquido. Entretanto, os organismos que ali vivem procuram realizar suas atividades metabólicas, seja usando o vapor d'água, seja derretendo quantidades mínimas de gelo através de seu calor metabólico. Mas eles não sobrevivem às severas condições da atmosfera da Antártida. As bactérias precisam se esconder dentro de pedras translúcidas (tais como o quartzo, o feldspato e certos tipos de mármore), que permitem que os raios de sol penetrem para que as bactérias possam realizar a fotossíntese. Por não produzirem substâncias químicas que dissolvem minerais, estes organismos endolíticos só podem habitar as pedras porosas. Eles são geralmente capazes de penetrar vários milímetros no interior da rocha, onde encontram um refúgio seguro até que a rocha sofra erosão pelo vento.

O planeta Marte foi originalmente um planeta quente, mas esfriou quando perdeu a sua atmosfera. Se a vida tivesse evoluído em Marte durante sua fase quente, esta forma de vida procuraria abrigo na superfície das rochas? Pesquisas sobre meteoritos de Marte revelam evidências de possíveis formas de vida anteriores que se assemelham a bactérias enterradas no que possa ter sido o seu último refúgio.

## Pressão Hidrostática

As águas dos oceanos e lagos exercem **pressão hidrostática**, ou seja, uma pressão exercida pela água parada proporcional à sua profundidade. Tal pressão dobra a cada aumento de 10 m na profundidade. Por exemplo, em um lago de 50 m de profundidade, a pressão corresponde a 32 vezes a pressão atmosférica. Algumas depressões oceânicas possuem profundidades de até 7.000 m, e determinadas bactérias são os únicos organismos conhecidos que sobrevivem à pressão extrema em tais profundidades. As bactérias que vivem em altas pressões, mas que morrem se deixadas por apenas algumas horas em laboratório à pressão atmosférica padrão, são chamadas **barófilas**. Parece que suas membranas e enzimas não apenas toleram a pressão, mas também a requerem a fim de funcionarem de maneira satisfatória. A alta pressão é necessária para manter suas moléculas de enzima na configuração tridimensional característica. Sem ela, as enzimas perdem sua forma e se desnaturam, causando a morte do organismo.

## Pressão Osmótica

Vimos no Cap. 4 que as membranas de todos os microrganismos são seletivamente permeáveis. A membrana celular permite à água se mover entre o citoplasma e o meio através da osmose. ➡ (> Fig. 4.31) Meios que contêm substâncias dissolvidas exercem pressão osmótica, e a pressão pode ultrapassar aquela exercida pelas substâncias dissolvidas nas células. As células em meios **hiperosmóticos** perdem água e sofrem **plasmólise**, ou enrugamento da célula. Nos microrganismos que possuem parede celular, a membrana celular ou plasmática separa-se da parede celular. Inversamente, as células em água destilada possuem pressão osmótica maior do que a de seu meio e, assim, ganham água. Nas bactérias, a parede celular rígida impede que a célula inche ou se rompa, mas as células se enchem de água e tornam-se **túrgidas** (distendidas).

A maioria das células bacterianas pode tolerar uma ampla gama de concentrações de substâncias dissolvidas. Suas membranas celulares contêm sistemas de transporte que regulam o movimento das substâncias dissolvidas através da membrana. ➡ (Cap. 5) Mesmo assim, caso as concentrações fora da célula se tornem muito altas, a perda de água pode inibir o crescimento, ou até matar as células.

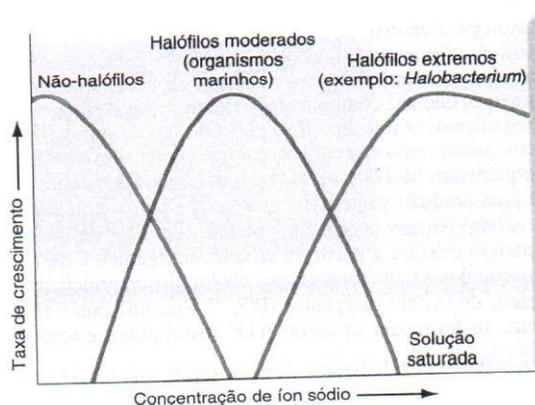
O uso do sal como preservativo na conservação de pernil e *bacon* e na preparação de pickles baseia-se no fato de que altas concentrações de substâncias dissolvidas exercem pressão osmótica suficiente para matar ou inibir o crescimento microbiano. O uso do açúcar como conservante no preparo de gelatinas e geléias baseia-se no mesmo princípio.

As bactérias **halófilas**, ou organismos que gostam de sal, requerem quantidades de sal (cloreto de sódio) de médias a grandes. Seu sistema de transporte de membrana transporta ativamente os íons sódio para fora das células e concentra os íons potássio em seu interior. Já foram propostas duas possíveis explicações sobre o porquê de as bactérias halófilas requererem sódio. Uma propõe que as células precisam de sódio para manter uma alta concentração intracelular de potássio, para que suas enzimas funcionem. A outra sugere que elas necessitam do sódio para manter a integridade de suas paredes celulares.

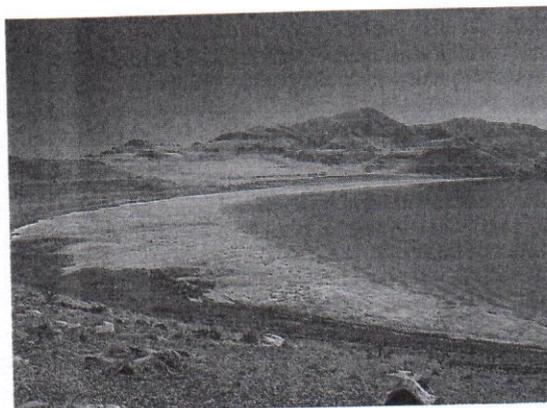
As halófilas são normalmente encontradas nos oceanos, onde a concentração de sal (3,5%) é ótima para seu crescimento. Halófilas extremas requerem concentrações de sal de 20 a 30% (> Fig. 6.16). Elas são encontradas em corpos d'água excepcionalmente salgados, tais como o Mar Morto, e às vezes até mesmo em barris de conserva em salmoura, onde podem deteriorar os pickles que estão sendo preparados.

### Cor-de-rosa

O Grande Lago Salgado (*Great Salt Lake*) é um meio extremamente salgado que permite o crescimento bacteriano. Ele é quase dez vezes mais salgado do que as águas dos oceanos e abriga muitas variedades de halobactérias. Pelo fato de nenhuma das halobactérias possuir peptidoglicano em sua parede celular, elas são também Gram-negativas. Além disso, são insensíveis à maioria dos antibióticos, contêm plasmídeos extraordinariamente grandes e são aeróbias obrigatórias. As halobactérias necessitam de grandes quantidades de sódio para seu crescimento, uma necessidade que não é satisfeita quando um fon semelhante é usado em seu lugar. Certas espécies de halófilas extremas usam um mecanismo mediado pela luz para produzir ATP. Ao contrário dos vegetais verdes, os pigmentos usados para a síntese de ATP dependente de luz são os carotenóides vermelho-laranja e as bacteriorrubrinas e bacteriorrodopsinas de coloração vermelho-púrpura. A cor brilhante destas bactérias pode ser vista quando lagos de alta salinidade e pequenas lagoas são fotografados do alto — dando a nítida aparência de uma colcha de retalhos cor-de-rosa.



(a)



(b)

➤ **Fig. 6.16 Respostas ao sal.** (a) As taxas de crescimento dos organismos halofílicos (organismos que gostam do sal) e não-halofílicos estão relacionadas à concentração do íon sódio. (b) O Grande Lago Salgado (*Great Salt Lake*), em Utah, um exemplo de ambiente onde se desenvolvem organismos halofílicos. Observe as áreas brancas de sal seco às margens do lago.

nas. Alguns microrganismos obtêm nitrogênio a partir de fontes inorgânicas, e uns poucos até mesmo conseguem energia metabolizando substâncias inorgânicas que contêm nitrogênio. Muitos microrganismos reduzem íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) e utilizam o grupo amino para produzir aminoácidos. Alguns organismos podem sintetizar todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, ao passo que outros necessitam ter um ou alguns aminoácidos fornecidos pelo meio. Certos organismos fastidiosos requerem todos os 20 aminoácidos e outros exigem blocos de construção em seus meios. Muitos organismos causadores de doenças obtêm aminoácidos para produzir proteínas e outras moléculas nitrogenadas a partir de células humanas ou de outros organismos que eles invadem.

Uma vez sintetizados ou obtidos do meio, os aminoácidos podem ser usados na síntese de proteínas. Semelhantemente, as purinas e pirimidinas podem ser utilizadas na produção de DNA e RNA. O processo pelo qual as proteínas e os ácidos nucleicos são sintetizados está diretamente relacionado às informações genéticas contidas na célula. Deste modo, a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos será discutida nos Caps. 7 e 8.

### Radiação

As energias radiantes, como por exemplo os raios gama e a luz ultravioleta, podem causar mutações (mudanças no DNA) e até mesmo matar os organismos. Entretanto, alguns microrganismos possuem pigmentos que filtram a radiação e ajudam a prevenir danos ao DNA. Outros possuem sistemas enzimáticos que podem reparar certos tipos de danos ao DNA.

### Fatores Nutricionais

O crescimento dos microrganismos é afetado por fatores nutricionais, assim como por fatores físicos. Os nutrientes necessários aos microrganismos incluem o carbono, o nitrogênio, o enxofre, o fósforo, certos oligoelementos e as vitaminas. Embora nós estejamos interessados aqui nos modos pelos quais os microrganismos suprem suas próprias necessidades nutricionais, podemos observar que, ao suprir tais necessidades, eles também auxiliam a reciclar elementos no meio ambiente. As atividades dos micróbios nos ciclos do carbono, do nitrogênio, do enxofre e do fósforo são descritas no Cap. 26. Alguns micróbios são **fastidiosos**, isto é, possuem necessidades nutricionais especiais que podem ser difíceis de se encontrar em laboratório. Alguns organismos fastidiosos, inclusive aqueles que causam a gonorréia, crescem bem no corpo humano, mas ainda não se pode fazê-los crescer facilmente em meios nutritivos de laboratório.

### Fontes de Carbono

A maioria das bactérias utiliza compostos que contêm carbono como fonte de energia, e muitas utilizam compostos que contêm carbono como blocos de construção para sintetizar componentes celulares. Os organismos foto-autotróficos reduzem o dióxido de carbono a glicose e a outras moléculas orgânicas. Tanto os organismos autotróficos quanto os heterotróficos podem obter energia da glicose através da glicólise, da fermentação e do ciclo de Krebs. Eles também sintetizam alguns componentes celulares a partir de intermediários destas vias.

### Fontes de Nitrogênio

Todos os organismos, inclusive os microrganismos, precisam de nitrogênio para sintetizar ácidos nucleicos, enzimas e outras proté-

### Enxofre e Fósforo

Além do carbono e do nitrogênio, os microrganismos necessitam do suprimento de certos minerais, especialmente enxofre e fósforo, que são componentes celulares importantes. Os microrganismos obtêm enxofre a partir de sais de sulfato inorgânicos, assim como de aminoácidos que contêm enxofre. Os microrganismos utilizam o enxofre e os aminoácidos com enxofre para produzir proteínas, coenzimas e outros componentes da célula. Alguns organismos podem sintetizar aminoácidos contendo enxofre a partir do enxofre inorgânico e de outros aminoácidos. Os microrganismos obtêm fósforo principalmente a partir de fosfato inorgânico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Eles utilizam o fósforo (como fosfato) para sintetizar ATP, fosfolipídios e ácidos nucleicos.

### Oligoelementos

Muitos microrganismos necessitam de uma variedade de **oligoelementos**, ou seja, pequenas quantidades de minerais como o cobre, o ferro, o zinco e o cobalto, geralmente na forma de íons. Os oligoelementos servem freqüentemente de co-fatores nas reações enzimáticas. Todos os organismos necessitam de uma certa quantidade de sódio e de cloreto, e os halófilos necessitam de grandes quantidades destes íons. O potássio, o zinco, o magnésio e o manganês são usados na ativação de certas enzimas. O cobalto é necessário para os organismos que podem sintetizar vitamina  $\text{B}_{12}$ . O ferro é necessário para a síntese de compostos que contêm heme (tais como os citocromos do sistema de transporte de elétrons) e para determinadas enzimas. Embora seja necessária pequena quantidade de ferro, sua escassez retarda severamente o crescimento. O cálcio é necessário às bactérias Gram-positivas para a síntese das paredes celulares, e pelos organismos formadores de esporos, para a síntese dos esporos.

### Comedores Exigentes

As espécies do *Spiroplasma*, bactérias espirais minúsculas que não possuem parede celular, estão entre os organismos mais fastidiosos conhecidos. Recentemente, Kevin Hackett, cientista do Ministério da Agricultura dos EUA (U.S. Department of Agriculture — USDA), desenvolveu uma fórmula exata de 80 ingredientes, incluindo lipídios, carboidratos, aminoácidos, sais, vitaminas, ácidos orgânicos e penicilina (para suprimir potenciais competidores) para satisfazer as necessidades destas bactérias. Em seu laboratório, ele usa este meio para manter mais de 30 espécies de espiroplasmas vivos e em estado satisfatório, tornando possível aos pesquisadores estudá-los fora das mais de 100 espécies de insetos, carrapatos e plantas que eles geralmente habitam. Até agora, foi impossível manter viva a maioria das espécies de *Spiroplasma* fora de seus hospedeiros.

Os espiroplasmas são responsáveis por centenas de doenças em plantações e em animais. Pesquisadores da área médica estão particularmente interessados em uma espécie que causa tumores experimentais em animais. Outra espécie mata abelhas produtoras de mel, e uma terceira vive inofensivamente no besouro-da-batata do Colorado, um inseto que danifica as plantações de batatas, berinjelas e tomates. Os cientistas pretendem alterar geneticamente esta última espécie de forma que ela mate seu hospedeiro, o besouro-da-batata.

### Vitaminas

Uma **vitamina** é uma substância orgânica de que um organismo necessita em pequenas quantidades e que é geralmente usada como coenzima. Muitos microrganismos produzem suas próprias vitaminas a partir de substâncias mais simples. Outros microrganismos requerem diversas vitaminas em seu meio, por não possuírem enzimas para sintetizá-las. As vitaminas exigidas por alguns microrganismos incluem o ácido fólico, a vitamina  $\text{B}_{12}$  e a vitamina K. Os patógenos humanos geralmente necessitam de uma variedade de vitaminas e, dessa forma, são capazes de crescer bem apenas quando podem obter estas substâncias a partir do hospedeiro. O crescimento de tais organismos em laboratório requer um meio complexo que contenha todos os nutrientes que eles normalmente obtêm de seus hospedeiros. Os micróbios que vivem no intestino humano produzem vitamina K, que é necessária para a coagulação sanguínea, e algumas das vitaminas B, beneficiando assim seu hospedeiro.

### Complexidade Nutricional

A **complexidade nutricional** de um organismo, ou seja, o número de nutrientes que ele deve obter para crescer, é determinada pelo tipo e número de suas enzimas. A falta de uma única enzima pode tornar o organismo incapaz de sintetizar uma substância específica. O organismo, então, deve obter a substância em forma de nutriente a partir de seu meio. Os microrganismos variam quanto ao número de enzimas que possuem. Aqueles com muitas delas possuem necessidades nutricionais simples, pois podem sintetizar praticamente todas as substâncias de que precisam. Aqueles com menor número de enzimas possuem necessidades nutricionais complexas, pois não possuem a capacidade de sintetizar muitas das substâncias de que precisam para crescer. Assim, a complexidade nutricional reflete uma deficiência nas enzimas biossintéticas.



O cientista Kevin Hackett, do USDA, trabalhando na sua "infusão da bruxa" — uma mistura de cerca de 80 ingredientes que irá permitir o crescimento de espiroplasmas fastidiosos fora de seus hospedeiros.

Os cientistas do USDA estão tentando formular meios complexos onde se possam criar organismos semelhantes aos micoplasmas, um grupo correlacionado de bactérias que também não possui parede celular. Estas bactérias causam centenas de doenças em plantações e geram milhões de dólares em perdas econômicas a cada ano. Elas são transferidas de planta a planta por insetos infectados. Um outro meio em desenvolvimento permitirá o cultivo da bactéria *Mycoplasma pneumoniae*, que é a causa de uma forma de pneumonia humana.



Espiroplasma  
(aumento de  
29.000×).

### Localização das Enzimas

A maioria dos microrganismos movimenta uma diversidade de pequenas moléculas através de suas membranas plasmáticas para posterior metabolização. Estas substâncias incluem a glicose, os aminoácidos, os pequenos peptídios, os nucleosídeos e os fosfatos, assim como vários íons inorgânicos. Além das endoenzimas produzidas para uso interno da célula (Cap. 5), muitas bactérias (e fungos) produzem *exoenzimas* e as liberam através da membrana plasmática. Estas enzimas incluem as **enzimas extracelulares**, geralmente produzidas por bastonetes Gram-positivos, que agem no meio existente ao redor do organismo, e as **enzimas periplásmicas**, geralmente produzidas por organismos Gram-negativos, que agem no espaço periplásmico. A maioria das exoenzimas é do tipo hidrolase; elas adicionam água à medida que quebram grandes moléculas de carboidratos, lipídios ou proteínas em moléculas menores que podem ser absorvidas (Quadro 6.1). Embora os micróbios não possam transportar grandes moléculas através da membrana, na natureza eles utilizam grandes moléculas a partir de outros organismos, digerindo-as com exoenzimas antes de absorvê-las.

### Adaptação a Nutrientes em Quantidades Limitadas

Os microrganismos se adaptam a quantidades limitadas de nutrientes de várias maneiras:

1. Alguns sintetizam maiores quantidades de enzimas para a captação e o metabolismo de nutrientes limitados. Isto permite aos microrganismos obter e usar uma quantidade maior das poucas moléculas de nutrientes disponíveis.
2. Outros possuem a capacidade de sintetizar enzimas necessárias para a utilização de um nutriente diferente. Se, por exemplo, há pouco suprimento de glicose, alguns microrganismos podem produzir enzimas que permitem a absorção e a utilização de um nutriente mais abundante, como a lactose.
3. Muitos organismos ajustam a taxa com a qual metabolizam nutrientes e a velocidade com que sintetizam as moléculas necessárias para o crescimento, para ajustarem-se à disponibilidade dos nutrientes menos abundantes. Tanto o metabolismo quanto o crescimento tornam-se mais lentos, mas energia alguma é perdida na síntese de produtos que não podem ser usados. O crescimento será tão rápido quanto as condições o permitirem.

- ✓ O que significa o sufixo *filo*? Diferencie os termos *obrigatório* e *facultativo*.
- ✓ Quais enzimas os microrganismos anaeróbios obrigatórios não possuem? Como esta falta causa a morte deles na presença de oxigênio?
- ✓ A variedade de enzimas de microrganismos fastidiosos é maior ou menor do que a de micróbios com necessidades nutricionais mais simples? Por quê?

### > Quadro 6.1 Exemplos de exoenzimas

Enzimas	Ação
<b>Enzimas que agem em carboidratos complexos</b>	
Carboidrases	Quebram grandes moléculas de carboidratos em moléculas menores
Amilase	Quebra o amido em maltose
Celulase	Quebra a celulose em celobiose
<b>Enzimas que agem em açúcares</b>	
Sacarase	Quebra a sacarose em glicose e frutose
Lactase	Quebra a lactose em glicose e galactose
Maltase	Quebra a maltose em duas moléculas de glicose
<b>Enzimas que agem em lipídios</b>	
Lipases	Quebram gorduras em glicerol e ácidos graxos
<b>Enzimas que agem em proteínas</b>	
Proteases	Quebram proteínas em peptídios e aminoácidos
Caseinase	Quebra a proteína do leite em aminoácidos e peptídios
Gelatinase	Quebra a gelatina em aminoácidos e peptídios

### \* Esporulação

A **esporulação**, ou formação de endosporos, ocorre nos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e em alguns outros gêneros de microrganismos Gram-positivos, mas vem sendo estudada mais cuidadosamente no *B. subtilis* e no *B. megaterium*. As bactérias que formam endosporos geralmente o fazem durante a fase estacionária, em resposta a sinais ambientais, metabólicos e do ciclo celular.

Quando os nutrientes como o carbono ou o nitrogênio tornam-se limitados, são formados dentro das células-mães endosporos altamente resistentes. (Em raros casos, algumas bactérias formam endosporos mesmo quando há nutrientes disponíveis.) Apesar de os endosporos não serem metabolicamente ativos, eles podem sobreviver por longos períodos de seca e são resistentes a temperaturas extremas, à radiação e a algumas substâncias químicas tóxicas. Alguns endosporos podem suportar temperaturas bem mais altas do que as células vegetativas. O endosporo não pode se dividir, e a célula-mãe pode produzir apenas um endosporo, logo a esporulação é um mecanismo de proteção ou sobrevivência, não um meio de reprodução.