

➤ 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 sequência 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 micróbio que pode metabolizá-la como nutriente; para praticamente qualquer mudança ambiental, há algum micróbio 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

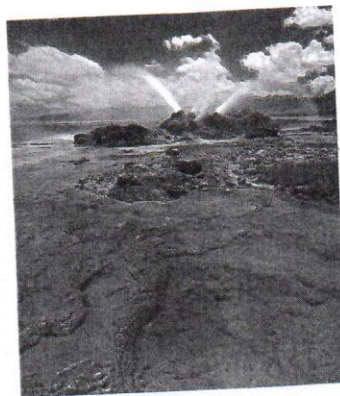
A maioria das espécies bacterianas pode se desenvolver em uma faixa de temperatura superior a 30°C, mas as temperaturas máxima e mínima variam consideravelmente entre as diferentes espécies. A água do mar permanece líquida abaixo de 0°C, e os organismos que lá vivem conseguem tolerar temperaturas negativas. 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.)

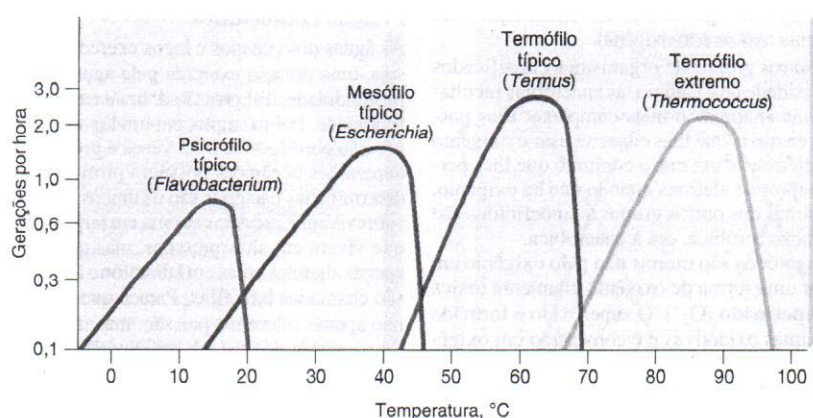
A faixa de temperatura na qual um organismo se desenvolve é amplamente determinada pelas temperaturas nas quais suas enzimas atuam. Dentro desta faixa, podem ser identificadas três temperaturas críticas:

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°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.

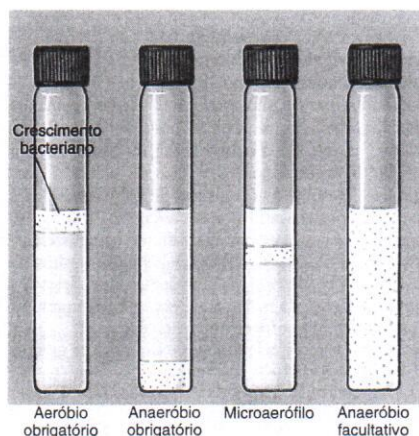
Oxigênio

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 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 conseqüência 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.

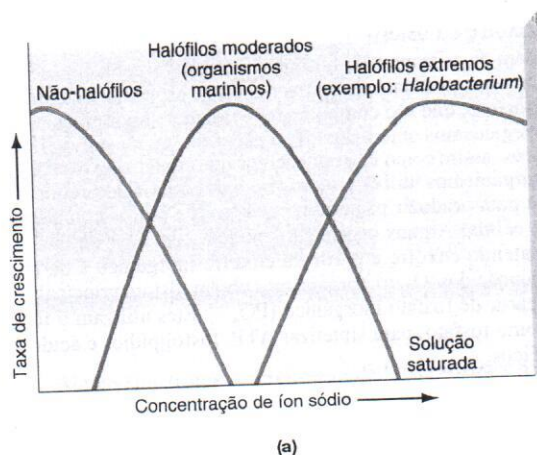
O uso do sal como preservativo na conservação de *pernil e bacon* e na preparação de pickles baseia-se no fato de que altas concentrações de substâncias dissolvidas exercem pressão osmótica suficiente para matar ou inibir o crescimento microbiano. O uso do açúcar como conservante no preparo de gelatinas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

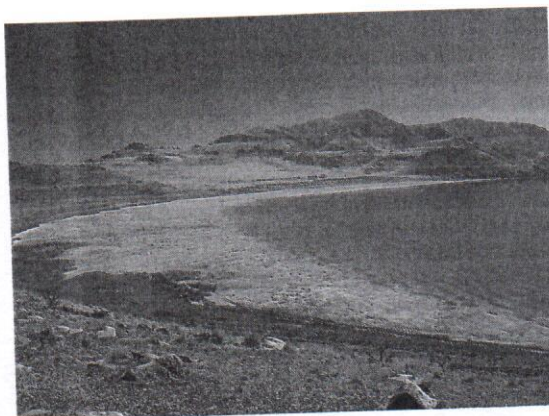
As halófilas são normalmente encontradas nos oceanos, onde a concentração de sal (3,5%) é ótima para seu crescimento. Halófilas extremas requerem concentrações de sal de 20 a 30% (> Fig. 6.16). Elas são encontradas em corpos d'água excepcionalmente salgados, tais como o Mar Morto, e às vezes até mesmo 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 plasmídios 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 íon 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 (NO_3^-) a grupos amino (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 proteí-

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 (PO_4^{3-}). Eles utilizam o fósforo (como fosfato) para sintetizar ATP, fosfolípidios 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 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 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.

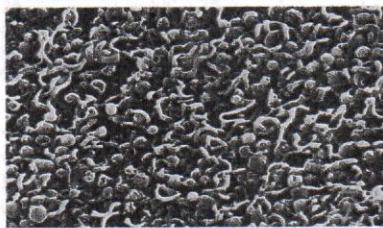
Complexidade Nutricional

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
Enzimas que agem em carboidratos complexos	
Carboidrases	Quebram grandes moléculas de carboidratos em moléculas menores
Amilase	Quebra o amido em maltose
Celulase	Quebra a celulose em celobiose
Enzimas que agem em açúcares	
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
Enzimas que agem em lipídios	
Lipases	Quebram gorduras em glicerol e ácidos graxos
Enzimas que agem em proteínas	
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.