

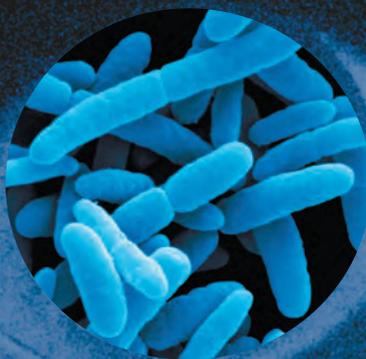
6

Crescimento Microbiano

Quando falamos em crescimento microbiano, estamos nos referindo ao número de células, não ao tamanho delas. Os micro-organismos que crescem estão aumentando em número e se acumulando em colônias (grupos de células que podem ser visualizados sem a utilização de um microscópio) de centenas ou milhares de células ou populações de bilhões de células. Apesar de cada célula poder dobrar de tamanho, essa mudança não é muito significativa em comparação com o aumento de tamanho durante o desenvolvimento das plantas e dos animais.

As populações microbianas podem ficar muito grandes em um espaço de tempo muito curto, como veremos mais tarde neste capítulo. Entendendo as condições necessárias para o crescimento microbiano, podemos determinar como controlar o crescimento dos micro-organismos que causam doenças ou deterioração de alimentos. Podemos também aprender como estimular o crescimento de micro-organismos benéficos e aqueles que queremos estudar.

Neste capítulo, examinaremos os fatores físicos e químicos para o crescimento microbiano, os vários tipos de meios de cultura, a divisão da célula bacteriana, as fases de crescimento e os métodos utilizados para determinar o crescimento microbiano.



SOB O MICROSCÓPIO

Escherichia coli. *E. coli*, um habitante comum do intestino humano, pode viver com ou sem oxigênio.

P&R

O oxigênio na atmosfera é essencial para a vida humana. Como algumas bactérias podem crescer sem oxigênio?

Procure pela resposta neste capítulo.

Fatores necessários para o crescimento

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 6-1** Classificar os micro-organismos em cinco grupos com base na faixa de temperatura ótima.
- 6-2** Identificar como e por que o pH dos meios de cultura é controlado.
- 6-3** Explicar a importância da pressão osmótica para o crescimento microbiano.
- 6-4** Indicar uma utilização para cada um dos quatro elementos (carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo) necessários em grandes quantidades para o crescimento microbiano.
- 6-5** Explicar como os micro-organismos são classificados com base em suas necessidades de oxigênio.
- 6-6** Identificar os mecanismos utilizados pelos anaeróbicos para evitar os efeitos tóxicos das formas de oxigênio.

Os fatores necessários para o crescimento microbiano podem ser divididos em duas categorias principais: físicos e químicos. Os fatores físicos incluem temperatura, pH e pressão osmótica. Os fatores químicos incluem fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio, elementos traços e fatores orgânicos de crescimento.

Fatores físicos

Temperatura

A maioria dos micro-organismos cresce bem nas temperaturas ideais para os seres humanos. Contudo, certas bactérias são capazes de crescer em extremos de temperatura que certamente impediriam a sobrevivência de quase todos os organismos eucarióticos.

Os micro-organismos são classificados em três grupos principais com base em sua faixa preferida de temperatura: em **psicrófilos** (crescem em baixas temperaturas), **mesófilos** (crescem em temperaturas moderadas) e **termófilos** (crescem em altas temperaturas). A maioria das bactérias cresce em uma faixa limitada de temperatura, sendo que há somente 30°C de diferença entre a tem-

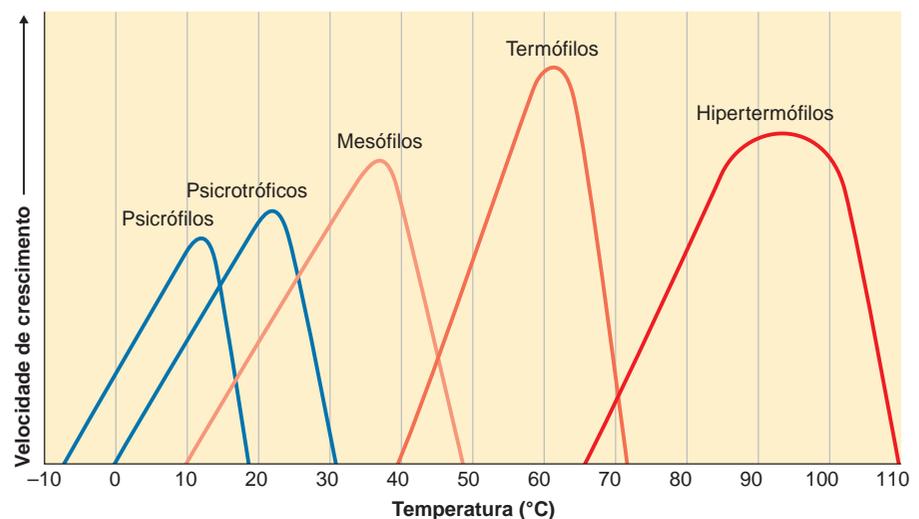
peratura máxima e a mínima de crescimento. Elas crescem pouco nas temperaturas extremas considerando sua faixa ideal.

Cada espécie bacteriana cresce a uma temperatura mínima, ótima e máxima específica. A **temperatura mínima de crescimento** é a menor temperatura na qual a espécie pode crescer. A **temperatura ótima de crescimento** é a temperatura na qual a espécie cresce melhor. A **temperatura máxima de crescimento** é a maior temperatura na qual o crescimento é possível. Quando é feito um gráfico relacionando a resposta do crescimento com a variação da temperatura, pode-se observar que a temperatura ótima de crescimento normalmente está deslocada para perto da variação máxima de temperatura; acima dessa temperatura, a velocidade de crescimento decresce rapidamente (**Figura 6.1**). Isso ocorre provavelmente porque a temperatura elevada inativou os sistemas enzimáticos da célula.

As faixas e as temperaturas máximas de crescimento que definem as bactérias como psicrófilos, mesófilos ou termófilos não estão determinadas de maneira rígida. Os psicrófilos, por exemplo, foram inicialmente considerados micro-organismos capazes de crescer a 0°C. Contudo, existem dois grupos diferentes capazes de crescer nessa temperatura. Um grupo, composto somente por psicrófilos, pode crescer a 0°C, mas tem uma temperatura ótima de crescimento de cerca de 15°C. A maioria desses micro-organismos é tão sensível a temperaturas mais altas que não poderá crescer mesmo em uma temperatura ambiente razoável (25°C). Encontrados essencialmente nas profundezas dos oceanos ou em certas regiões polares, esses micro-organismos não causam problemas na preservação de alimentos. O outro grupo que pode crescer a 0°C tem temperaturas ótimas de crescimento mais elevadas, geralmente de 20 a 30°C, e não pode crescer em temperaturas acima de 40°C. Os organismos desse tipo são mais comuns que os psicrófilos e são os mais prováveis de serem encontrados na deterioração de alimentos em baixa temperatura, pois crescem em temperaturas utilizadas em refrigeradores. Usaremos o termo **psicrotróficos**, bastante usado por microbiologistas de alimentos, para este grupo de micro-organismos deteriorantes.

Figura 6.1 Velocidades de crescimento características de diferentes tipos de micro-organismos em resposta à temperatura. O pico da curva representa o crescimento ótimo (reprodução mais rápida). Observe que a velocidade de crescimento decresce rapidamente para temperaturas somente um pouco acima do ótimo. Nos extremos da faixa de temperatura, a velocidade de reprodução é muito menor que a velocidade na temperatura ótima.

P Por que é difícil definir organismos psicrófilos, mesófilos e termófilos?



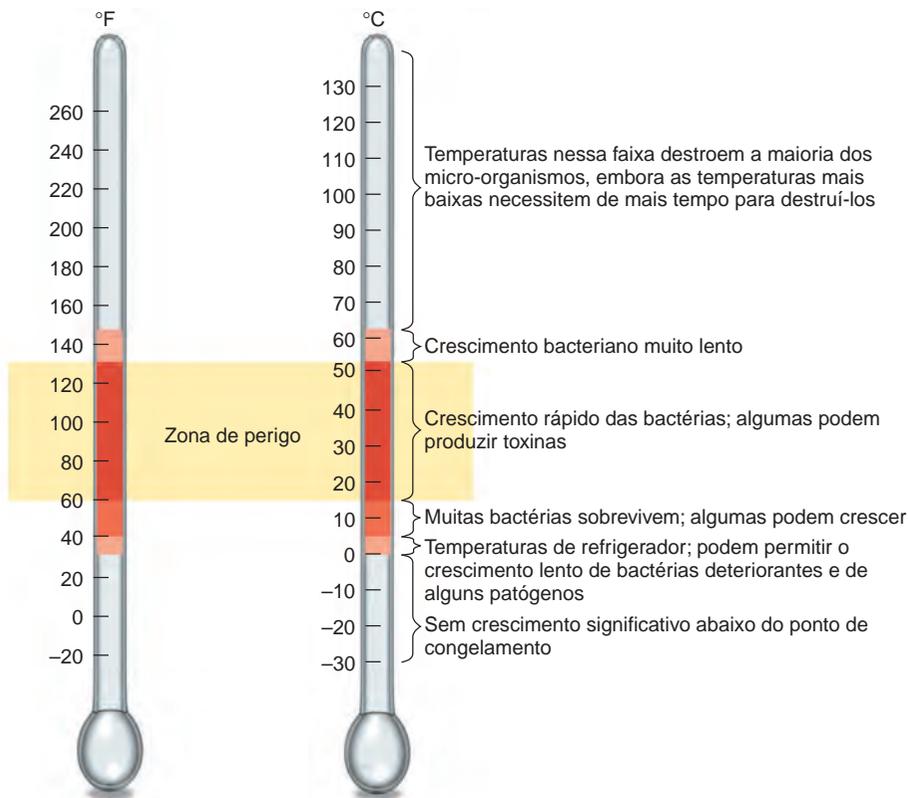


Figura 6.2 Temperaturas de preservação de alimentos. As baixas temperaturas reduzem as velocidades de reprodução microbiana, sendo esse o princípio básico da refrigeração. Sempre há alguma exceção para as respostas às temperaturas mostradas aqui; por exemplo, certas bactérias crescem bem em temperaturas que matariam a maioria das bactérias, e algumas podem na realidade viver em temperaturas bem abaixo do nível de congelamento.

P Qual bactéria teoricamente teria mais probabilidade de crescer na temperatura de um refrigerador: um patógeno humano intestinal ou um patógeno de plantas transmitido pelo solo?

A refrigeração é o método mais comum de preservação dos alimentos. Esse método tem como base o princípio de que as velocidades de reprodução microbiana decrescem em baixas temperaturas. Embora os micro-organismos sobrevivam mesmo em temperaturas próximas do congelamento (podem ficar totalmente dormentes), eles gradualmente diminuem seu número. Algumas espécies diminuem mais rapidamente que outras. Os psicrófilos na realidade não crescem bem em temperaturas baixas, exceto quando comparados com outros micro-organismos; contudo, em um determinado período, eles são capazes de deteriorar lentamente o alimento. Essa deterioração pode tomar a forma de micélio fúngico, limo na superfície do alimento ou alterações de sabor ou cor nos alimentos. A temperatura dentro de um refrigerador bem ajustado retardará muito o crescimento da maioria dos organismos deteriorantes, impedindo totalmente o crescimento da maior parte das bactérias patogênicas. A **Figura 6.2** ilustra a importância das temperaturas baixas para impedir o crescimento de organismos deteriorantes e patogênicos. Quando grandes quantidades de alimentos devem ser refrigeradas, é importante considerar que esses alimentos serão refrigerados e uma velocidade bastante lenta (**Figura 6.3**).

Os mesófilos, com uma temperatura ótima de crescimento de 25 a 40°C, são os micro-organismos mais comuns. Os organismos que se adaptaram a viver dentro dos corpos de animais geralmente têm uma temperatura ótima próxima daquela de seus hospedeiros. A temperatura ótima para a maioria das bactérias patogênicas é de cerca de 37°C, e as estufas para culturas clínicas em geral são

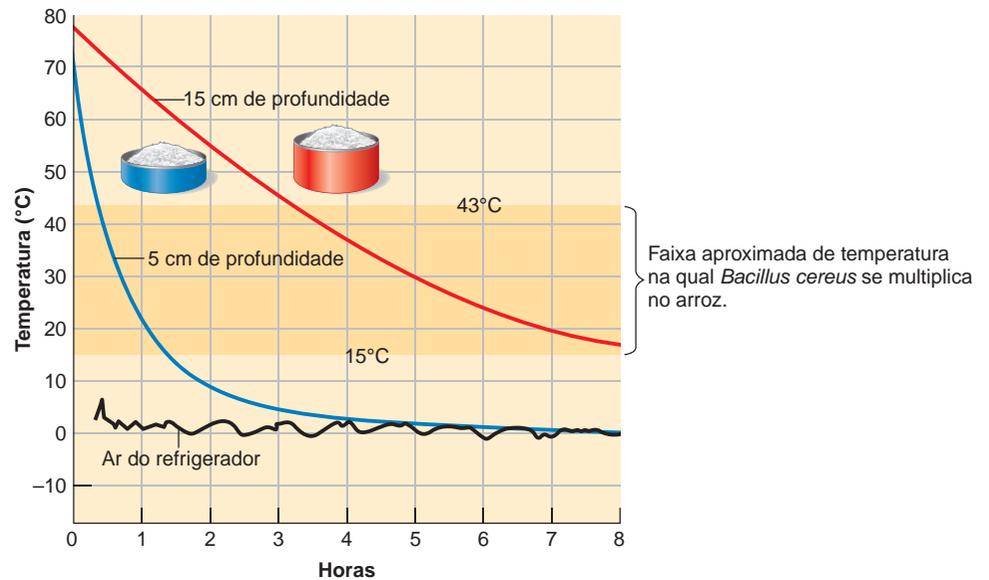
ajustadas nessa temperatura. Os mesófilos incluem a maioria dos organismos deteriorantes e patogênicos.

Os termófilos são micro-organismos capazes de crescer a temperaturas altas. Muitos desses organismos têm uma temperatura ótima de crescimento de 50 a 60°C, a temperatura da água que sai de uma torneira de água quente. Essas temperaturas também podem ser encontradas no solo exposto ao sol e em águas termais. De maneira extraordinária, muitos termófilos não podem crescer em temperaturas abaixo de 45°C. Os endosporos formados por bactérias termófilas são anormalmente resistentes à temperatura e podem sobreviver ao tratamento térmico aplicado aos alimentos enlatados. Embora temperaturas elevadas de estocagem possam causar a germinação e o crescimento desses endosporos, levando à deterioração do alimento, essas bactérias termófilas não são consideradas um problema de saúde pública. Os termófilos são importantes em compostos orgânicos acumulados (veja a Figura 27.10), nos quais a temperatura pode subir rapidamente para 50 a 60°C.

Alguns micro-organismos membros das *Arquibactérias* (página 4) têm uma temperatura ótima de crescimento de 80°C ou mais. Esses organismos são chamados de **hipertermófilos** ou, algumas vezes, **termófilos extremos**. A maioria desses organismos vive em fontes de água quente associadas à atividade vulcânica; o enxofre normalmente é importante na sua atividade metabólica. A temperatura mais alta conhecida para crescimento bacteriano e replicação é de cerca de 121°C perto de chaminés hidrotermais abissais. A enorme pressão nas profundezas dos oceanos evita que a água ferva mesmo em temperaturas bem acima de 100°C.

Figura 6.3 Efeito da quantidade de alimento em relação à velocidade de resfriamento e sua probabilidade de deterioração em um refrigerador. Observe neste exemplo que a panela de arroz com uma profundidade de 5 cm resfriou na faixa de temperatura de incubação de *Bacillus cereus* em cerca de 1 hora, enquanto uma panela de arroz com uma profundidade de 15 cm se manteve nessa temperatura durante cerca de 5 horas.

P Considerando uma panela rasa e um pote fundo com o mesmo volume, qual vai resfriar mais rápido?



pH

Como descrito no Capítulo 2 (página 35), pH se refere à acidez ou alcalinidade de uma solução. A maioria das bactérias cresce melhor em uma faixa estreita de pH perto da neutralidade, entre pH 6,5 e 7,5. Poucas bactérias crescem em um pH ácido abaixo de 4. Essa é a razão pela qual muitos alimentos como o chucrute, os pickles e muitos queijos são protegidos da deterioração pelos ácidos produzidos pela fermentação bacteriana. No entanto, algumas bactérias, chamadas de **acidófilas**, são resistentes à acidez. Um tipo de bactéria quimioautotrófica, encontrada na água de drenagem das minas de carvão e que oxida enxofre para formar ácido sulfúrico, pode sobreviver em pH 1. Os fungos e as leveduras crescem em uma faixa maior de pH que as bactérias, mas o pH ótimo dos fungos e das leveduras geralmente é menor que o bacteriano, entre pH 5 e 6. A alcalinidade também inibe o crescimento microbiano, mas raramente é utilizada para preservar os alimentos.

Quando bactérias são cultivadas no laboratório, elas com frequência produzem ácidos que algumas vezes interferem com o seu próprio crescimento. Para neutralizar os ácidos e manter o pH apropriado, tampões químicos são incluídos no meio de cultura. As peptonas e os aminoácidos atuam como tampões em alguns meios, e muitos meios também contêm sais de fosfato. Os sais de fosfato têm a vantagem de exibir o seu efeito de tampão na faixa de pH de crescimento da maioria das bactérias. Eles também não são tóxicos; de fato, eles fornecem fósforo, um nutriente essencial.

Pressão osmótica

Os micro-organismos obtêm a maioria dos seus nutrientes da água presente no seu meio ambiente. Portanto, eles requerem água para seu crescimento, sendo que sua composição é de 80 a 90% de água. Pressões osmóticas elevadas têm como efeito remover a água necessária para a célula. Quando uma célula microbiana está em uma solução cuja concentração de solutos é mais elevada que dentro da célula (o ambiente é *hipertônico*), a água atravessa a membrana celular para o meio com a concentração mais elevada de soluto. (Veja a discussão sobre osmose no Capítulo 4, páginas 92 a 94, e a Figura

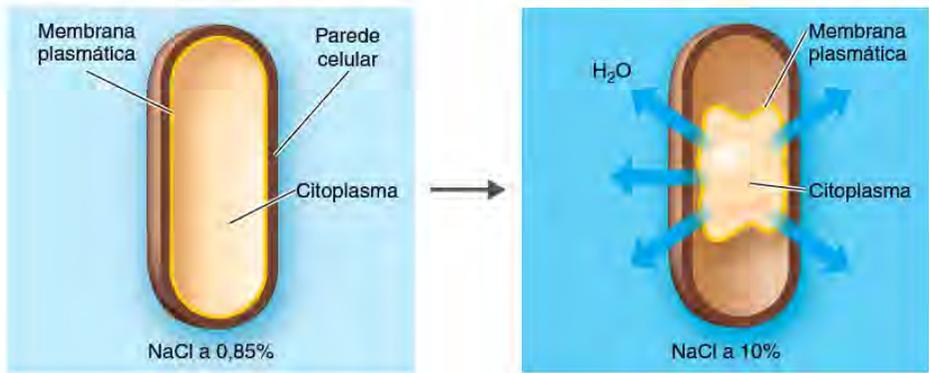
4.18 para os três tipos de soluções ambientais que uma célula pode encontrar.) Essa perda osmótica de água causa uma **plasmólise**, ou encolhimento do citoplasma celular (**Figura 6.4**)

A importância desse fenômeno é que o crescimento da célula é inibido assim que a membrana plasmática se separa da parede celular. Portanto, a adição de sais (ou outros solutos) em uma solução, e o aumento resultante na pressão osmótica, pode ser utilizada para preservar alimentos. Peixe salgado, mel e leite condensado são preservados por esse mecanismo, sendo que as concentrações elevadas de sal ou açúcar removem a água fora de qualquer célula microbiana presente e conseqüentemente impedem seu crescimento. Esses efeitos da pressão osmótica estão em parte relacionados com o número de moléculas e íons dissolvidos em um volume de solução.

Alguns micro-organismos, chamados de **halófilos extremos**, são tão adaptados a concentrações elevadas de sais que acabam de fato requerendo sua presença para que ocorra seu crescimento. Nesse caso, eles podem ser denominados **halófilos obrigatórios**. Os organismos de águas salinas como o Mar Morto requerem frequentemente cerca de 30% de sal, e a alça de inoculação (equipamento usado no laboratório para manipulação de bactérias) utilizada para transferência deve ser mergulhada em uma solução saturada de sal. Mais comuns são os **halófilos facultativos**, que não requerem concentrações elevadas de sal, mas são capazes de crescer em concentrações de até 2% de sal, o que inibe o crescimento de muitos organismos. Algumas espécies de halófilos facultativos podem tolerar mesmo 15% de sal.

A maioria dos micro-organismos, contudo, deve ser cultivada em meio constituído quase que somente de água. Por exemplo, a concentração de ágar (um polissacarídeo complexo isolado de uma alga marina) utilizada para solidificar os meios de cultura normalmente é de cerca de 1,5%. Se concentrações bem mais altas são utilizadas, a pressão osmótica aumentada pode inibir o crescimento de algumas bactérias.

Se a pressão osmótica é anormalmente baixa (o ambiente é *hipotônico*) – tal como na água destilada, por exemplo – a água tende a entrar na célula em vez de sair. Alguns micro-organismos que têm



(a) Célula normal em solução isotônica. Sob essas condições, a concentração de solutos na célula é equivalente a uma concentração de soluto de 0,85% de cloreto de sódio (NaCl). Veja a Figura 4.18.

(b) Célula plasmolisada em solução hipertônica. Se a concentração do soluto como NaCl é maior no ambiente circundante que na célula (o ambiente é hipertônico), a água tende a deixar a célula. O crescimento celular é inibido.

Figura 6.4 Plasmólise.

P Cite um alimento preservado pela pressão osmótica elevada.

uma parede celular relativamente frágil podem ser lisados com esse tratamento.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Por que os hipertermófilos que crescem em temperaturas acima de 100°C são aparentemente limitados às profundezas marinhas? **6-1**
- ✓ Além de controlar a acidez, qual é a vantagem de utilizar sais de fosfato como tampões em meios de cultura? **6-2**
- ✓ Por que as civilizações primitivas podem ter utilizado técnicas de preservação de alimentos que dependem da pressão osmótica? **6-3**

Fatores químicos

Carbono

Além da água, um dos fatores mais importantes para o crescimento microbiano é o carbono. O carbono é o esqueleto estrutural da matéria viva; ele é necessário para todos os compostos orgânicos que constituem uma célula viva. Metade do peso seco de uma célula bacteriana típica é composta de carbono. Os quimio-heterotróficos obtêm a maior parte do seu carbono de sua fonte de energia – materiais orgânicos como proteínas, carboidratos e lipídeos. Os quimioautotróficos e os fotoautotróficos derivam seu carbono do dióxido de carbono.

Nitrogênio, enxofre e fósforo

Além do carbono, os micro-organismos necessitam de outros elementos para sintetizar material celular. Por exemplo, a síntese de proteínas requer quantidades consideráveis de nitrogênio e enxofre. A síntese de DNA e RNA também requer nitrogênio e algum fósforo, assim como para a síntese de ATP, a molécula responsável pelo armazenamento e pela transferência de energia dentro da célula. O nitrogênio constitui cerca de 14% do peso seco da célula bacteriana, e o enxofre e o fósforo juntos constituem cerca de 4%.

Os organismos utilizam o nitrogênio essencialmente para formar o grupo amino dos aminoácidos das proteínas. Muitas bactérias obtêm esses compostos da decomposição de material contendo proteína e incorporando de volta os aminoácidos em novas proteí-

nas e outros compostos nitrogenados sintetizados. Outras bactérias utilizam o nitrogênio dos íons amônio (NH_4^+), que já estão na forma reduzida e geralmente são encontrados no material celular orgânico. Ainda outras bactérias são capazes de derivar o nitrogênio dos nitratos (compostos que se dissociam para produzir íon nitrato NO_3^- em solução).

Algumas bactérias importantes, incluindo muitas das cianobactérias fotossintéticas (página 140), utilizam o nitrogênio gasoso (N_2) diretamente da atmosfera. Esse processo é chamado de **fixação do nitrogênio**. Alguns organismos que podem utilizar esse método são de vida livre, a maioria no solo, mas outros vivem cooperativamente em simbiose com as raízes de leguminosas como trevo, soja, alfafa, feijões e ervilhas. O nitrogênio fixado na simbiose é utilizado tanto pela planta quanto pela bactéria (veja o Capítulo 27).

O enxofre é utilizado para sintetizar os aminoácidos contendo enxofre e vitaminas como a tiamina e a biotina. Fontes naturais importantes de enxofre incluem o íon sulfato (SO_4^{2-}), o sulfeto de hidrogênio e os aminoácidos contendo enxofre.

O fósforo é essencial para a síntese dos ácidos nucleicos e dos fosfolipídeos das membranas celulares. Entre outros lugares, ele é encontrado também nas ligações de energia do ATP. Uma fonte de fósforo é o íon fosfato (PO_4^{3-}). Potássio, magnésio e cálcio também são elementos que os micro-organismos requerem, frequentemente como cofatores para as reações enzimáticas (veja o Capítulo 5, páginas 116 e 117).

Elementos traços

Os micro-organismos requerem quantidades muito pequenas de outros elementos minerais, como ferro, cobre, molibdênio e zinco, que são referidos como **elementos traços**. A maioria é essencial para as funções de certas enzimas, geralmente como cofatores. Embora esses elementos algumas vezes sejam adicionados ao meio de cultivo laboratorial, eles costumam estar naturalmente presentes na água de torneira e em outros componentes dos meios de cultivo. Mesmo que a água destilada contenha quantidades adequadas de minerais traços, o uso da água de torneira algumas vezes é recomendado para confirmar que esses minerais estão presentes nos meios de cultura.

Tabela 6.1 O efeito do oxigênio no crescimento de vários tipos de bactérias					
	a. Aeróbicos obrigatórios	b. Anaeróbicos facultativos	c. Anaeróbicos obrigatórios	d. Anaeróbicos aerotolerantes	e. Microaerófilos
Efeito do oxigênio no crescimento	Somente crescimento aeróbico.	Crescimento aeróbico e anaeróbico; crescimento maior na presença de oxigênio.	Crescimento somente anaeróbico; não há crescimento na presença de oxigênio.	Crescimento somente anaeróbico, mas continua na presença de oxigênio.	Crescimento somente aeróbico; oxigênio requerido em baixa concentração.
Crescimento bacteriano em tubo com meio de cultura sólido					
Explicações para os padrões de crescimento	Crescimento somente em altas concentrações difundidas.	Crescimento melhor onde mais oxigênio está presente, mas ocorre em todo o tubo.	Crescimento somente onde não há oxigênio.	Crescimento igual; o oxigênio não tem efeito.	Crescimento onde há uma baixa concentração de oxigênio difundido.
Explicações para os efeitos do oxigênio	A presença das enzimas catalase e superóxido-dismutase (SOD) permite que as formas tóxicas do oxigênio sejam neutralizadas	A presença das enzimas catalase e SOD permite que as formas tóxicas do oxigênio sejam neutralizadas; pode utilizar oxigênio.	Ausência das enzimas que neutralizam as formas tóxicas do oxigênio; não tolera oxigênio.	A presença de uma enzima, SOD, permite que as formas tóxicas do oxigênio sejam parcialmente neutralizadas; tolera oxigênio.	Produção de quantidades letais de formas tóxicas do oxigênio se expostos à atmosfera normal de oxigênio.

Oxigênio

Estamos acostumados a pensar no oxigênio molecular (O_2) como um elemento necessário à vida, mas em algumas circunstâncias esse elemento pode se tornar um gás venenoso. Houve pouco oxigênio molecular na atmosfera durante a maior parte da história da Terra – na realidade, é possível que a vida não tivesse surgido se houvesse oxigênio. Contudo, muitas formas comuns de vida têm sistemas metabólicos que requerem oxigênio para a respiração aeróbica. Como vimos, os átomos de hidrogênio extraídos dos compostos orgânicos combinam-se com o oxigênio para formar água, como mostrado na Figura 5.14 (página 129). Esse processo fornece uma grande quantidade de energia e ao mesmo tempo neutraliza um gás potencialmente tóxico – uma solução muito engenhosa afinal.

Os micro-organismos que utilizam o oxigênio molecular (aeróbicos) produzem mais energia a partir dos nutrientes que os micro-organismos que não utilizam o oxigênio (anaeróbicos). Os organismos que requerem oxigênio para viver são chamados de **aeróbicos obrigatórios** (Tabela 6.1a)

P&R Os aeróbicos obrigatórios têm uma desvantagem já que o oxigênio é pouco solúvel na água do seu ambiente. Por isso, muitas das bactérias aeróbicas têm desenvolvido, ou mantido, a capacidade de continuar a crescer na ausência do oxigênio. Tais organismos são chamados de **anaeróbicos facultativos** (Tabela 6.1b). Em outras palavras, os anaeróbicos facultativos podem utilizar o oxigênio quando ele está presente, mas são capazes de continuar a crescer utilizando a fermentação ou a respiração anaeróbica

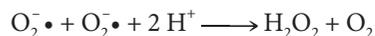
quando o oxigênio não está disponível. Contudo, a sua eficácia em produzir energia é reduzida na ausência do oxigênio. Um exemplo de anaeróbico facultativo é a *Escherichia coli*, encontrada no trato intestinal humano. Muitas leveduras também são anaeróbicos facultativos. Lembre-se da discussão sobre respiração anaeróbica no Capítulo 5 (página 132) por muitos micro-organismos são capazes de substituir o oxigênio por outros receptores de elétrons, como os íons nitrato, algo que os seres humanos são incapazes de fazer.

Os **anaeróbicos obrigatórios** (Tabela 6.1c) são bactérias incapazes de utilizar o oxigênio molecular para as reações produtoras de energia. De fato, isso é prejudicial para muitos deles. O gênero *Clostridium*, que contém espécies que causam o tétano e o botulismo, é o exemplo mais conhecido. Essas bactérias podem utilizar os átomos presentes nos materiais celulares. Esses átomos geralmente são obtidos da água.

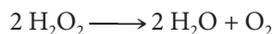
Entender como os organismos podem ser danificados pelo oxigênio requer uma breve discussão sobre as formas tóxicas do oxigênio:

1. O **oxigênio singlet** (1O_2) é o oxigênio molecular normal (O_2) que foi induzido a um estado de alta energia sendo extremamente reativo.
2. Os **radicais superóxidos** (O_2^-), ou **ânions superóxidos**, são formados em pequenas quantidades durante a respiração normal dos organismos que utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons, produzindo água. Na presença de oxigênio, os anaeróbicos obrigatórios parecem formar também alguns radicais superóxidos, que são tão tóxicos para os componentes celulares

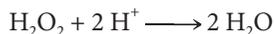
que todos os organismos tentando crescer no oxigênio atmosférico devem produzir uma enzima, a **superóxido-dismutase (SOD)**, para neutralizar esses radicais. Sua toxicidade é causada por sua grande instabilidade, que faz com que sejam retirados elétrons das moléculas vizinhas, produzindo um efeito de remoção de elétrons em cascata. Os aeróbicos, os anaeróbicos facultativos crescendo aerobicamente e os anaeróbicos aerotolerantes (discutidos em breve) produzem SOD, com a qual eles convertem o radical superóxido em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2):



3. O peróxido de hidrogênio produzido na reação contém o **ânion peróxido** O_2^{2-} , que também é tóxico. No Capítulo 7 (página 202), ele será apresentado como o princípio ativo nos agentes antimicrobianos peróxido de hidrogênio e peróxido benzoico. Como o peróxido de hidrogênio produzido durante a respiração aeróbica normal é tóxico, os micro-organismos desenvolveram enzimas para sua neutralização. A mais comum é a **catalase**, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio:



A catalase é facilmente detectada por sua ação no peróxido de hidrogênio. Quando uma gota de peróxido de hidrogênio é adicionada a uma colônia de células bacterianas produzindo catalase, bolhas de oxigênio são liberadas. Quando se coloca uma gota de peróxido de hidrogênio em um ferimento, observa-se que as células de tecido humano também produzem catalase. Outra enzima que quebra o peróxido de hidrogênio é a **peroxidase**, que difere da catalase por não produzir oxigênio:



Outra forma importante de oxigênio reativo, o **ozônio** (O_3), também é discutida na página 202.

4. O **radical hidroxila** ($OH\cdot$) é outra forma intermediária do oxigênio, sendo provavelmente a mais reativa. Ele é formado no citoplasma celular por radiação ionizante. A maioria da respiração aeróbica produz traços de radicais hidroxila, mas eles são transitórios.

Essas formas tóxicas do oxigênio são um componente essencial de uma das mais importantes defesas do corpo contra os patógenos, a fagocitose (veja a página 457 e a Figura 16.7). No fagolisossomo da célula fagocítica, os patógenos ingeridos são mortos pela exposição ao oxigênio singlet, aos radicais superóxidos, aos ânions peróxidos do peróxido de hidrogênio e aos radicais hidroxila e outros compostos oxidativos relacionados.

Os anaeróbicos obrigatórios geralmente não produzem nem superóxido-dismutase nem catalase. Como as condições aeróbicas provavelmente conduzam a um acúmulo de radicais superóxidos no citoplasma, os anaeróbicos obrigatórios são extremamente sensíveis ao oxigênio.

Os **anaeróbicos aerotolerantes** (Tabela 6.1d) não podem utilizar o oxigênio para crescimento, mas o toleram relativamente bem. Na superfície de um meio sólido, eles crescerão sem a utilização das técnicas especiais (discutidas mais tarde) requeridas pelos anaeró-

bicos obrigatórios. Muitas das bactérias aerotolerantes fermentam de modo característico os carboidratos em ácido láctico. À medida que o ácido láctico se acumula, ele inibe o crescimento dos competidores aeróbicos e estabelece um nicho ecológico favorável aos produtores de ácido láctico. Um exemplo comum de anaeróbicos aerotolerantes produtores de ácido láctico são os lactobacilos utilizados na produção de muitos alimentos ácidos fermentados, como pickles e queijo. No laboratório, eles são manuseados e cultivados como outras bactérias, mas não utilizam o oxigênio do ar. Essas bactérias podem tolerar o oxigênio porque possuem uma SOD ou um sistema equivalente que neutraliza as formas tóxicas do oxigênio discutidas anteriormente.

Poucas bactérias são **microaerófilas** (Tabela 6.1e). Elas são aeróbicas, requerendo oxigênio. Contudo, crescem somente em concentrações de oxigênio inferiores à do ar. Em um tubo teste de meio nutritivo sólido, essas bactérias crescem apenas no fundo, onde somente pequenas quantidades difundiram-se no meio; elas não crescem perto da superfície rica em oxigênio, nem abaixo da faixa estreita de oxigênio adequado. Essa tolerância limitada provavelmente seja devida a sua sensibilidade aos radicais superóxidos e peróxidos que são produzidos em concentrações letais sob condições ricas em oxigênio.

Fatores orgânicos de crescimento

Os compostos orgânicos essenciais que um organismo é incapaz de sintetizar são conhecidos como **fatores orgânicos de crescimento**. Eles devem ser obtidos diretamente do ambiente. Um grupo de fatores orgânicos de crescimento para os seres humanos é o das vitaminas. A maioria das vitaminas funciona como coenzimas, os cofatores orgânicos requeridos por certas enzimas para seu funcionamento. Muitas bactérias podem sintetizar suas próprias vitaminas e não dependem de fontes externas. Contudo, algumas bactérias não possuem as enzimas necessárias para a síntese de certas vitaminas, que são para elas fatores orgânicos de crescimento. Outros desses fatores requeridos por certas bactérias são aminoácidos, purinas e pirimidinas.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Se células bacterianas recebem uma fonte de enxofre contendo enxofre radioativo (^{35}S) em seus meios de cultura, em que moléculas o ^{35}S poderia ser encontrado nas células? **6-4**
- ✓ Como pode-se determinar se um micro-organismo é anaeróbico estrito? **6-5**
- ✓ O oxigênio está presente no ambiente de um modo que seria muito difícil para um micro-organismo evitar sempre o seu contato. Qual é, portanto, a maneira mais óbvia para o micro-organismo evitar danos? **6-6**

Biofilmes

OBJETIVO DO APRENDIZADO

- 6-7** Descrever a formação de biofilmes e seu potencial para causar infecção.

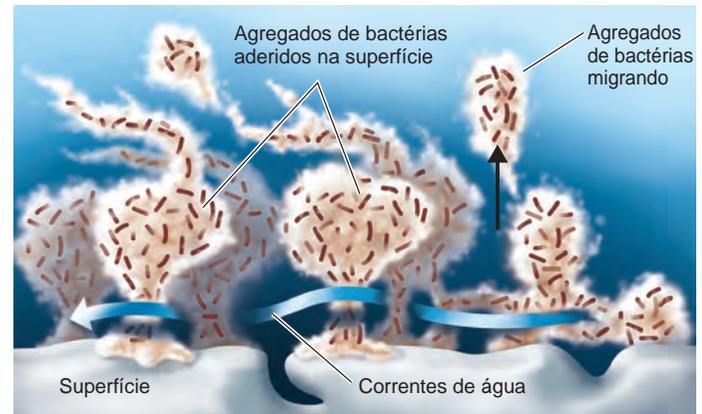
Na natureza, os micro-organismos raramente vivem em colônias isoladas de uma única espécie, como vemos no laboratório. Mais tipicamente, eles vivem em comunidades chamadas de **biofilmes**. Esse fato não foi comprovado até o desenvolvimento da micros-

copia confocal (veja a página 62), o que permitiu que a estrutura tridimensional dos biofilmes fosse visualizada. Os biofilmes residem em uma matriz feita essencialmente de polissacarídeos, mas contendo também DNA e proteínas, com frequência chamada de *limo*. Um biofilme também pode ser considerado um *hidrogel*, um polímero complexo contendo uma quantidade de água que corresponde a várias vezes seu peso seco. Uma comunicação química entre as células ou *quorum sensing*, permite às bactérias coordenarem sua atividade e se agrupar em comunidades que fornecem benefícios não muito diferentes daqueles de organismos multicelulares (veja o quadro no Capítulo 3, página 57). Portanto, os biofilmes não são somente camadas limosas bacterianas, mas sistemas biológicos; as bactérias são organizadas em uma comunidade funcional coordenada. Os biofilmes geralmente são fixados em superfícies como uma pedra em um lago, um dente humano (placa; veja a Figura 25.3, página 708) ou uma membrana mucosa. Essa comunidade pode ser de uma única espécie ou de grupos diversos de micro-organismos. Os biofilmes também podem ter outras formas. A espuma que se forma em certos tipos de tratamento de efluentes (veja a Figura 27.20, página 786) é um exemplo. Em fluxo de corrente rápida, o biofilme pode tomar a forma de serpentinas filamentosas. Dentro da comunidade de um biofilme, as bactérias são capazes de compartilhar nutrientes e são protegidas de fatores danosos do ambiente, como a dissecação, os antibióticos e o sistema imune corporal. A proximidade estreita entre os micro-organismos dentro do biofilme também pode ter a vantagem de facilitar a transmissão de informação genética por conjugação, por exemplo.

Um biofilme geralmente começa a se formar quando uma bactéria livre nadadora (planctônica) se fixa em uma superfície. Se essa bactéria crescesse em uma monocamada uniformemente fina, esta ficaria superlotada, os nutrientes não seriam disponíveis na parte mais profunda e resíduos tóxicos se acumulariam. Os micro-organismos nas comunidades de biofilme algumas vezes evitam esses problemas formando estruturas em forma de pilares (Figura 6.5) com canais entre eles através dos quais a água pode introduzir nutrientes e retirar resíduos. Isso constitui um sistema circulatório primitivo. Micro-organismos individuais e agregados de limo eventualmente deixam o biofilme e se movem para um novo local, para onde o biofilme vai se estender. Esse biofilme geralmente é composto de uma camada superficial de cerca de 10 µm de espessura, com pilares que se elevam até 200 µm acima dela.

Os micro-organismos nos biofilmes podem trabalhar em cooperação para desenvolver tarefas complexas. Por exemplo, o sistema digestório dos animais ruminantes, como o gado, requer muitas espécies diferentes de micro-organismos para quebrar a celulose. Os micro-organismos no sistema digestório dos ruminantes estão localizados essencialmente em comunidades de biofilmes. Os biofilmes também são elementos essenciais para o funcionamento adequado dos sistemas de tratamento de resíduos, discutidos no Capítulo 27. Contudo, eles podem ser um problema em canos e tubulações, onde seu acúmulo impede a circulação.

Os biofilmes são um importante fator para a saúde humana. Por exemplo, os micro-organismos em um biofilme provavelmente sejam 1.000 vezes mais resistentes aos microbicidas. Especialistas do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimam que 70% das infecções bacterianas humanas en-



As correntes de água se movem, como mostrado pela seta azul, entre os pilares de limo formados pelo crescimento das bactérias aderidas nas superfícies sólidas. Isso permite um acesso eficiente dos nutrientes e uma remoção dos produtos residuais. Bactérias individuais formadoras de limo ou agregados de limo se desprendem e migram para um novo local. Veja a Figura 1.8.

Figura 6.5 Biofilmes.

P Como é chamado o biofilme formado nos dentes?

volvam biofilmes. A maioria das infecções nosocomiais (infecções hospitalares) está relacionada à presença de biofilmes nos cateteres médicos (veja a Figura 1.8 na página 19 e a Figura 21.3 na página 587). De fato, os biofilmes se formam em quase todos os equipamentos médicos, incluindo as válvulas mecânicas cardíacas. Os biofilmes, que podem incluir aqueles formados por fungos como *Candida*, são encontrados em muitas situações de doença, tais como as infecções relacionadas ao uso de lentes de contato, cáries dentárias (veja a página 707) e infecções por bactérias do gênero *Pseudomonas* (veja a página 308). Veja o quadro na página 164.

Uma abordagem para prevenir a formação de biofilme é a aplicação de antimicrobianos sobre as superfícies nas quais os biofilmes podem se formar (veja a página 57). Como os sinais químicos que permitem o *quorum sensing* são essenciais para a formação de biofilme, pesquisas estão sendo realizadas para esclarecer o funcionamento desses sinais e talvez os bloquear. Outra abordagem envolve a descoberta de que a lactoferrina (veja a página 470), que é abundante em muitas secreções humanas, pode inibir a formação de biofilme. A lactoferrina fixa o ferro, particularmente nas pseudomonadas responsáveis pelos biofilmes da fibrose cística, a causa da patologia dessa doença hereditária. A falta de ferro inibe a mobilidade superficial, importante para a agregação das bactérias nos biofilmes.

A maioria dos métodos laboratoriais na microbiologia atual utiliza organismos cultivados no seu modo planctônico. Contudo, os microbiologistas acreditam que o foco das pesquisas com micro-organismos será a relação de vida entre eles, e isso será considerado também na pesquisa industrial e médica.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Identifique uma razão pela qual os patógenos encontram uma vantagem em formar biofilme. **6-7**



Infecção sanguínea após cateterização

Neste quadro você encontrará uma série de questões que os agentes de controle de infecção se perguntam quando tentam descobrir a fonte de uma infecção. Tente responder cada questão antes de passar à próxima.

1. No início de março, uma solução intravenosa de heparina foi recolhida após pacientes de quatro estados ter desenvolvido infecções sanguíneas por *Pseudomonas fluorescens*.

Após examinar a Figura A, você considera que o recolhimento foi eficiente?

2. Três meses após o recolhimento, pacientes em dois estados diferentes desenvolveram infecções sanguíneas.

O que é preciso saber?

3. A última exposição à heparina contaminada foi de 84 a 421 dias antes do começo das infecções. Esses pacientes não desenvolve-

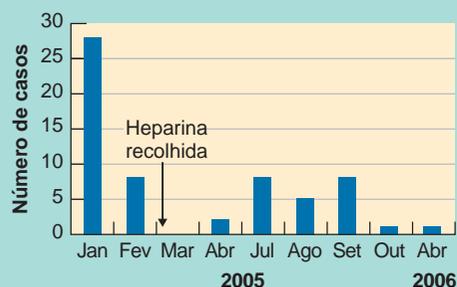


Figura A Ocorrência de infecções sanguíneas por *P. fluorescens* em pacientes com cateteres intravenosos.

ram infecções durante o episódio de janeiro a fevereiro. Todos os pacientes tiveram cateteres venosos; esses tubos são inseridos em uma veia para administração a longo prazo de soluções concentradas, como drogas anticancerosas.

Qual é o próximo passo?

4. Investigações locais confirmaram que as clínicas dos pacientes não usavam mais e tinham devolvida a heparina recolhida. Culturas da nova heparina utilizada não recuperaram organismos.

O que fazer a seguir?

5. Culturas sanguíneas e dos cateteres foram feitas (Figura B).

Qual é o resultado mostrado na Figura B?

6. *P. fluorescens* foi cultivado de 15 pacientes e 17 cateteres. Estes foram os primeiros casos conhecidos de infecções sanguíneas substancialmente retardadas (84 a 421 dias) após exposição a uma solução intravenosa contaminada.

Qual foi a fonte das infecções?

7. Microscopia eletrônica de varredura no Centro para Controle e Prevenção de Doenças mostrou que *P. fluorescens* colonizou o interior dos cateteres pela formação de biofilmes; estudos prévios de microscopia eletrônica indicaram que praticamente todos os cateteres vasculares ficam colonizados por micro-organismos encravados em uma camada de biofilme. A heparina foi descrita como estimulante da formação de biofilme.



Figura B. *P. fluorescens* é um bastonete aeróbico gram-negativo que cresce melhor em temperaturas de aproximadamente 25 a 30°C e cresce pouco na temperatura de incubação padrão das estufas microbiológicas hospitalares (cerca de 36°C). As bactérias produzem um pigmento que aparece fluorescente sob luz ultravioleta.

Por que *P. fluorescens* causa infecção em uma média de 237 dias após exposição à heparina contaminada?

8. Embora *P. fluorescens* possa não ter entrado na circulação sanguínea dos pacientes em quantidades suficientes para causar sintomas na exposição inicial à heparina contaminada, a formação do biofilme permitiu às bactérias persistir nos cateteres. As bactérias podem ter proliferado no biofilme, tendo sido retiradas pelas soluções intravenosas não contaminadas subsequentes e liberadas na corrente sanguínea, causando finalmente os sintomas.

Fonte: adaptado do *MMWR* 55 (35): 961-963 (8/9/06).

Meio de cultura

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 6-8 Diferenciar os meios quimicamente definido e complexo.
- 6-9 Justificar a utilização dos seguintes itens: técnicas anaeróbicas, células hospedeiras vivas, jarras com velas, meios seletivos e diferenciais e meio de enriquecimento.
- 6-10 Diferenciar os níveis de biossegurança 1, 2, 3 e 4.

O material nutriente preparado para o crescimento de micro-organismos em um laboratório é chamado de **meio de cultura**. Algumas bactérias podem crescer bem em qualquer meio de cultura; outras requerem meios especiais, e outras ainda não podem crescer em qualquer dos meios não vivos até agora desenvolvidos. Os micro-organismos introduzidos em um meio de cultura para iniciar o

crescimento são chamados de **inóculo**. Os micro-organismos que crescem e se multiplicam dentro ou sobre um meio de cultura são denominados **cultura**.

Supondo que queremos cultivar determinado micro-organismo, talvez de uma amostra clínica em particular, que critérios o meio de cultura deve apresentar? Primeiro, ele deve conter os nutrientes adequados para o micro-organismo específico que queremos cultivar. Ele deve conter também uma quantidade de água suficiente, um pH apropriado e um nível conveniente de oxigênio ou talvez nenhum. O meio deve ser **estéril** – isto é, deve inicialmente não conter micro-organismos vivos – dessa forma a cultura conterá somente os micro-organismos (e sua descendência) que foram introduzidos. Finalmente, a cultura em crescimento deve ser incubada em temperatura apropriada.

Uma grande variedade de meios está disponível para o crescimento de micro-organismos no laboratório. A maioria desses meios, que estão disponíveis de fontes comerciais, tem componentes pré-misturados e requer somente a adição de água e a esterilização. Meios são constantemente desenvolvidos ou atualizados para utilização no isolamento e na identificação de bactérias que são de interesse para os pesquisadores em campos como a microbiologia de alimentos, de água e clínica.

Quando se deseja o crescimento das bactérias em meio sólido, um agente solidificante como o ágar é adicionado ao meio. Um polissacarídeo complexo derivado de uma alga marinha, o **ágar** tem sido utilizado há muito tempo para deixar alimentos como geleias e sorvetes mais espessos.

O ágar tem algumas propriedades muito importantes que o tornam valioso em microbiologia, nunca tendo sido encontrado um substituto satisfatório. Poucos micro-organismos podem degradar o ágar, o que permite que ele permaneça sólido. Além disso, o ágar se liquefaz a cerca de 100°C (o ponto de ebulição da água) e ao nível do mar ele permanece líquido até a temperatura diminuir até cerca de 40°C. Para utilização no laboratório, o ágar é mantido em banho-maria a 50°C. Nessa temperatura, ele não destrói a maioria das bactérias quando adicionado sobre elas (como mostrado na Figura 6.17a, página 176). Uma vez solidificado, ele pode ser incubado a cerca de 100°C antes de se liquefazer de novo; essa propriedade é particularmente útil quando bactérias termófilas são cultivadas.

Os meios com ágar geralmente são contidos em tubos de ensaio ou *placas de Petri*. Os tubos de ensaio são chamados de *inclinados* quando a solidificação é feita com o tubo inclinado em um ângulo de modo que uma grande área de superfície esteja disponível para o crescimento. Quando o ágar é solidificado em um tubo mantido na vertical, ele é chamado de *profundo*. As placas de Petri, denominadas em homenagem a seu inventor, são placas rasas com uma tampa que as recobre até o fundo para evitar contaminações; quando preenchidas, são chamadas de culturas sólidas em *placas de Petri*.

Meio quimicamente definido

Para sustentar o crescimento microbiano, um meio deve fornecer uma fonte de energia, assim como fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e quaisquer outros fatores orgânicos de crescimento que o organismo seja incapaz de sintetizar. Um **meio quimicamente definido** é aquele cuja composição exata é conhecida. Para um quimio-heterotrófico, o meio quimicamente definido deve conter fatores de crescimento orgânicos que servem como fonte de carbono e energia. Por exemplo, como mostrado na **Tabela 6.2**, a glicose é incluída no meio para crescimento do quimio-heterotrófico *E. coli*.

Como a **Tabela 6.3** mostra, muitos fatores de crescimento orgânicos devem ser fornecidos no meio quimicamente definido utilizado para cultivar uma espécie de *Neisseria* (página 306). Os organismos que requerem muitos fatores de crescimento são descritos como *fastidiosos*. Organismos desse tipo, como os *Lactobacillus* (página 318), algumas vezes são utilizados em testes que determinam a concentração de uma vitamina específica em uma substância. Para a realização de um *ensaio microbiológico* desse tipo, um meio de cres-

Tabela 6.2 Meio quimicamente definido para o crescimento de um quimio-heterotrófico típico como <i>Escherichia coli</i>	
Componentes	Quantidades
Glicose	5,0 g
Fosfato de amônio, monobásico (NH ₄ H ₂ FO ₄)	1,0 g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0,2 g
Fosfato de potássio, dibásico (K ₂ HPO ₄)	1,0 g
Água	1 litro

cimento é preparado com todos os fatores de crescimento exceto a vitamina a ser testada. Então, o meio, a substância a ser testada e a bactéria são combinados, e o crescimento da bactéria é mensurado. Esse crescimento microbiano, que é refletido pela quantidade de ácido láctico produzida, será proporcional à quantidade de vitamina na substância testada. Uma quantidade de ácido láctico maior significa que mais células de *Lactobacillus* foram capazes de crescer, e portanto maior quantidade de vitamina era presente.

Meio complexo

Os meios quimicamente definidos geralmente são reservados para trabalhos experimentais no laboratório ou para o crescimento de bactérias autotróficas. A maioria das bactérias e dos fungos, como aqueles analisados em um curso de introdução ao laboratório, é cultivada rotineiramente em **meios complexos** feitos de nutrientes como extratos de leveduras, de carnes ou de plantas, ou produtos de digestão destas ou de outras fontes. A composição química exata varia um pouco de acordo com o lote. A **Tabela 6.4** mostra uma formulação muito utilizada.

Nos meios complexos, as necessidades de energia, carbono, nitrogênio e enxofre dos micro-organismos em cultura são fornecidas essencialmente pelas proteínas. Uma proteína é uma molécula grande e relativamente insolúvel que alguns micro-organismos podem utilizar diretamente, mas uma digestão parcial por ácidos ou enzimas reduz a proteína em cadeias de aminoácidos mais curtas chamadas de *peptonas*. Esses fragmentos pequenos e solúveis podem ser digeridos pela maioria das bactérias.

Vitaminas e outros fatores orgânicos de crescimento são fornecidos pelos extratos de carne e de levedura. As vitaminas solúveis e os minerais das carnes e das leveduras são dissolvidos na água de extração, que é então evaporada para concentrar esses fatores. (Esses extratos também fornecem nitrogênio orgânico e compostos de carbono.) Os extratos de levedura são particularmente ricos em vitaminas B. Se um meio complexo apresenta forma líquida, ele é chamado de **caldo nutriente**. Quando ágar é adicionado, ele é chamado de **ágar nutriente**. (Essa terminologia pode ser confusa. Deve-se ressaltar que somente o ágar em si não é um nutriente.)

Tabela 6.3

Meio quimicamente definido para o crescimento de uma bactéria quimio-heterotrófica fastidiosa como *Neisseria gonorrhoeae*

Componentes	Quantidades	Componentes	Quantidades
Fontes de Carbono e Energia		Aminoácidos	
Glicose	9,1 g	Cisteína	1,5 g
Amido	9,1 g	Arginina, prolina (cada)	0,3 g
Acetato de sódio	1,8 g	Ácido glutâmico, metionina (cada)	0,2 g
Citrato de sódio	1,4 g	Asparagina, isoleucina, serina (cada)	0,2 g
Oxaloacetato	0,3 g	Cistina	0,06 g
Sais		Fatores Orgânicos de Crescimento	
Fosfato de potássio, dibásico (K_2HPO_4)	12,7 g	Pantotenato de cálcio	0,02 g
Cloreto de sódio (NaCl)	6,4 g	Tiamina	0,02 g
Fosfato de potássio, monobásico (KH_2PO_4)	5,5 g	Nicotinamida adenina dinucleotídeo	0,01 g
Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$)	1,2 g	Uracila	0,006 g
Sulfato de potássio (K_2SO_4)	1,1 g	Biotina	0,005 g
Sulfato de sódio (Na_2SO_4)	0,9 g	Hipoxantina	0,003 g
Cloreto de magnésio ($MgCl_2$)	0,5 g	Agente Redutor	
Cloreto de amônio (NH_4Cl)	0,4 g	Tioglicolato de sódio	0,00003 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,4 g	Água	
Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)	0,006 g	1 litro	
Nitrato de ferro [$Fe(NO_3)_3$]	0,006 g		

Fonte: R. M. Atlas, *Handbook of Microbiological Media*, Ann Arbor, MI: CRC Press, 1993.

Tabela 6.4

Composição do ágar nutriente: um meio complexo para o crescimento de bactérias heterotróficas

Componentes	Quantidades
Peptona (proteína parcialmente digerida)	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Cloreto de sódio	8,0 g
Ágar	15,0 g
Água	1 litro

Meios e métodos para o crescimento anaeróbico

A cultura de bactérias anaeróbicas apresenta um problema particular. Como os anaeróbicos podem ser mortos pela exposição ao oxigênio, meios especiais, chamados de **meios redutores**, devem ser utilizados. Esses meios contêm ingredientes, como o tioglicolato de sódio, que combinam-se quimicamente com o oxigênio dissolvido

e o eliminam no meio de cultura. Para cultivar e manter culturas puras de anaeróbicos obrigatórios, os microbiologistas utilizam meios redutores armazenados em tubos de ensaio firmemente tampados. Esses meios são aquecidos rapidamente antes de ser utilizados, para eliminar o oxigênio absorvido.

Quando placas de Petri são utilizadas para o crescimento e a observação de colônias isoladas, vários métodos estão disponíveis. Laboratórios que trabalham com relativamente poucas placas de cultura de cada vez podem utilizar sistemas para a incubação dos micro-organismos em caixas e jarras seladas das quais o oxigênio é removido quimicamente após as placas de cultura terem sido introduzidas e a jarra selada. Alguns sistemas requerem que água seja adicionada em uma embalagem contendo compostos químicos antes da jarra ser fechada, como mostrado na **Figura 6.6**, e requerem um catalisador. Os compostos químicos produzem hidrogênio e dióxido de carbono (em torno de 4 a 10%) e removem o oxigênio da jarra por sua combinação, na presença de um catalisador, com hidrogênio para formar água. Em outro sistema disponível comercialmente, a embalagem de compostos químicos (o ingrediente ativo é o ácido ascórbico) é simplesmente aberta para sua exposição ao oxigênio na atmosfera da jarra. Não é necessário o uso de água ou catalisador. A atmosfera nas jarras em geral tem menos que 5% de oxigênio, cerca de 18% de CO_2 e nenhum hi-

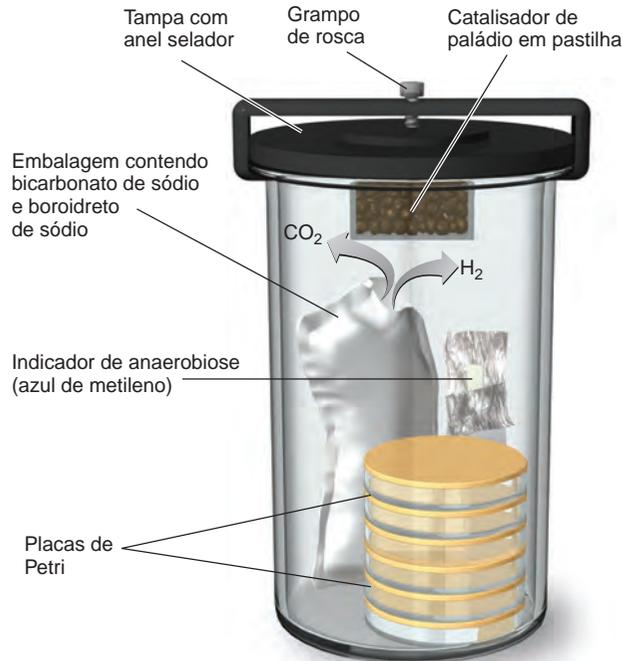


Figura 6.6 Uma jarra para cultivar bactérias anaeróbicas em placas de Petri. Quando água é adicionada à embalagem química contendo bicarbonato de sódio e boroidreto de sódio, hidrogênio e dióxido de carbono são gerados. O catalisador de paládio está localizado em uma câmara separada, que também pode ser incorporada na embalagem química, e na sua superfície ocorrerá a reação entre o hidrogênio e o oxigênio do interior da jarra, que combinados formarão água. O oxigênio é assim removido. Na jarra há também um indicador de anaerobiose contendo azul de metileno, que tem a coloração azul quando oxidado, tornando-se incolor quando o oxigênio é removido (como mostrado aqui).

P Qual é o nome técnico das bactérias que requerem uma concentração de CO_2 maior que a atmosférica para seu crescimento?

drogênio. Em um sistema desenvolvido recentemente, cada placa de Petri (OxyPlate) se transforma em uma câmara anaeróbica. O meio na placa contém uma enzima, a oxirase, que combina o oxigênio com o hidrogênio, removendo o oxigênio à medida que água é formada.

Os laboratórios que realizam muitos trabalhos com anaeróbicos com frequência utilizam uma câmara anaeróbica, como a mostrada na **Figura 6.7**. A câmara é preenchida com gases inertes (geralmente cerca de 85% N_2 , 10% H_2 e 5% CO_2) e equipada com sistemas de transferência para a introdução e a retirada de culturas e materiais.

Técnicas especiais de cultura

Muitas bactérias nunca foram cultivadas com sucesso em meios artificiais de laboratório. *Mycobacterium leprae*, o bacilo da lepra, geralmente é crescido em tatus, pois eles têm uma temperatura corporal relativamente baixa que atende às necessidades do micro-organismo. Outro exemplo é a espiroqueta da sífilis, ainda que algumas linhagens não patogênicas desses micro-organismos tenham crescido em meio de laboratório. Com poucas exceções, as bactérias intracelulares obrigatórias, como riquetsias e clamídias, não



Figura 6.7 Uma câmara anaeróbica. O técnico está pipetando uma suspensão bacteriana em um frasco dentro da câmara anaeróbica preenchida com um gás inerte livre de oxigênio. Seus braços e mãos estão em luvas. Organismos e materiais entram e saem através de um sistema de transferência visível à esquerda.

P Em que uma câmara anaeróbica é parecida com o Laboratório Espacial que orbita no vácuo do espaço?

crescem em meios artificiais. Como os vírus, elas somente podem se reproduzir em célula hospedeira viva. Veja a discussão sobre cultura de células, página 378.

Muitos laboratórios clínicos têm *estufas de dióxido de carbono* especiais para o crescimento de bactérias aeróbicas que requerem concentrações de CO_2 mais altas ou mais baixas que a encontrada na atmosfera. Os níveis desejados de CO_2 são mantidos por controles eletrônicos. Níveis de CO_2 elevados também são obtidos com uma simples *jarra com vela*. As culturas são colocadas em uma jarra grande selada contendo uma vela acesa que consome o oxigênio. A vela apaga quando o ar dentro da jarra tem uma concentração baixa de oxigênio (mas ainda suficiente para o crescimento de bactérias aeróbicas). Uma concentração elevada de CO_2 também está presente. Os micro-organismos que crescem melhor em altas concentrações de CO_2 são chamados de **capnofílicos**. As condições de oxigênio baixo e CO_2 alto são similares àquelas encontradas no trato intestinal, no trato respiratório e em outros tecidos corporais onde bactérias patogênicas crescem.

As jarras com velas ainda são utilizadas, mas estão sendo substituídas pelas embalagens comerciais contendo reagentes químicos para a produção de uma atmosfera rica em dióxido de carbono. Quando somente uma ou duas placas de Petri com culturas devem ser incubadas, os pesquisadores de laboratório clínico frequentemente utilizam sacos plásticos com geradores químicos próprios de gás que são ativados por esmagamento do



Figura 6.8 Técnicos em um laboratório de biossegurança de nível 4 (BSL-4). Os profissionais trabalhando em instalações BSL-4 vestem uma “roupa espacial” conectada com um fornecimento de ar externo.

P Se um técnico estava trabalhando com prions patogênicos, como o material que sai do laboratório pode ser tratado para deixar de ser infeccioso?

pacote ou adição de alguns mililitros de água. Esses pacotes algumas vezes são desenvolvidos especialmente para fornecer concentrações definidas de dióxido de carbono (em geral maiores que as obtidas em uma jarra de vela) e de oxigênio para o cultivo de organismos como a bactéria microaerofílica *Campylobacter* (página 312).

Alguns micro-organismos são tão perigosos que só podem ser manuseados com sistemas de contenção extremamente complexos chamados de biossegurança de nível 4 (BSL-4, de Biosafety level 4). Os laboratórios de nível 4 são popularmente conhecidos com “zonas quentes”. Somente alguns desses laboratórios existem nos Estados Unidos. O laboratório é um ambiente selado dentro um prédio grande e tem uma atmosfera com pressão negativa, de modo que aerossóis contendo patógenos não podem escapar. As entradas e as saídas de ar são filtradas com filtros de ar (veja os filtros HEPA na página 191); o ar de saída é duplamente filtrado. Todos os materiais residuais que saem do laboratório são desinfetados. A equipe veste “roupas espaciais”, que são conectadas com um fornecimento externo de ar (Figura 6.8).

Organismos menos perigosos são manuseados com níveis de biossegurança menores. Por exemplo, um laboratório de aula de microbiologia básica pode ser BSL-1. Os organismos que apresentem um risco moderado de infecção podem ser manuseados em BSL-2, ou seja, em bancadas abertas de laboratório com luvas apropriadas, avental de laboratório e, se necessário, proteção para o rosto e os olhos. Os laboratórios BSL-3 são destinados aos patógenos do ar altamente infecciosos, como o agente da tuberculose. Gabinetes de segurança biológica com aparência similar a de uma câmara anaeróbica, mostrada na Figura 6.7, são utilizados. O laboratório em si pode ter pressão negativa e ser equipado com filtros de ar para evitar a liberação do patógeno.

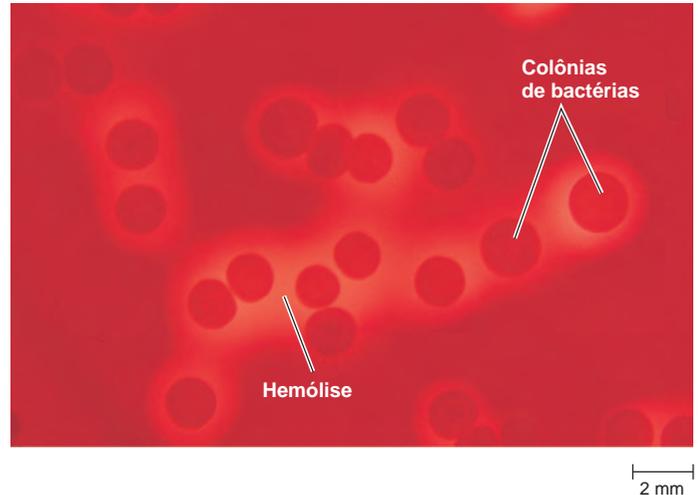


Figura 6.9 Ágar sangue, um meio diferencial contendo hemácias. As bactérias provocaram a lise das hemácias (β -hemólise), produzindo zonas claras ao redor das colônias.

P Qual é o valor das hemolisinas para os patógenos?

Meios de cultivo seletivo e diferencial

Na microbiologia clínica ou de saúde pública, frequentemente é necessário detectar a presença de micro-organismos específicos associados com doenças ou saneamento deficiente. Para essa tarefa, meios seletivos e diferenciais são utilizados. Os meios seletivos são elaborados para impedir o crescimento de bactérias indesejadas e favorecer o crescimento dos micro-organismos de interesse. Por exemplo, o ágar sulfeto de bismuto é um meio utilizado para isolar a bactéria da tifoide, a gram-negativa *Salmonella typhi*, a partir das fezes. O sulfeto de bismuto inibe as bactérias gram-positivas e a maioria das bactérias intestinais gram-negativas (além de *S. typhi*). O ágar Sabouraud dextrose, com pH de 5,6, é utilizado para isolar os fungos que dominam a maioria das bactérias neste pH.

Os meios diferenciais facilitam a diferenciação das colônias de um micro-organismo desejado em relação a outras colônias crescendo na mesma placa. De maneira similar, culturas puras de micro-organismos têm reações identificáveis com meios diferenciais em tubos ou placas. O ágar sangue (que contém hemácias) é um meio utilizado com frequência pelos microbiologistas para identificar espécies bacterianas que destroem hemácias. Essas espécies, como o *Streptococcus pyogenes*, a bactéria que causa infecção de garganta, mostram um anel claro ao redor de suas colônias (β -hemólise, página 319), onde elas têm lisadas as hemácias circundantes (Figura 6.9).

Algumas vezes, as características seletivas e diferenciais são combinadas no mesmo meio. Suponha que queremos isolar a bactéria *Staphylococcus aureus*, encontrada comumente nas fossas nasais. Esse organismo é tolerante a altas concentrações de cloreto de sódio; ele também pode fermentar o carboidrato manitol para formar ácido. O ágar hipertônico manitol contém 7,5% de cloreto de sódio, impedindo o crescimento de organismos competidores e, portanto, selecionando ou favorecendo o crescimento de *S. au-*

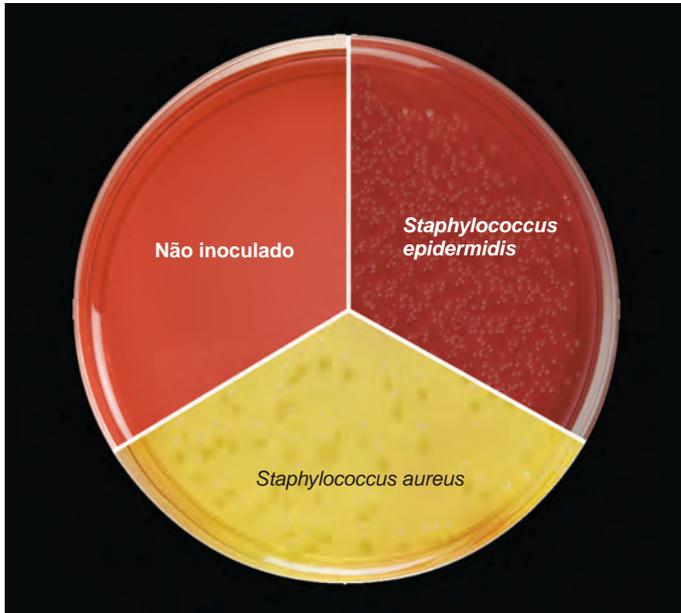


Figura 6.10 Meio diferencial. As colônias de bactérias no meio diferencial têm uma aparência diferente. Esse meio é o ágar hipertônico manitol, e as bactérias nas colônias capazes de fermentar o manitol do meio em ácidos levam a uma mudança na coloração. Na realidade, esse meio também é seletivo por causa da alta concentração de sal que previne o crescimento da maioria das bactérias, exceto os *Staphylococcus* spp.

P As bactérias capazes de crescer em pressão osmótica elevada poderiam crescer no muco encontrado no nariz?

reus. Esse meio salino também contém um indicador de pH que muda de cor se o manitol do meio é fermentado a ácido; as colônias fermentadoras de manitol de *S. aureus* são assim diferenciadas das colônias de bactérias que não fermentam o manitol. As bactérias que crescem em concentração elevada de sal e fermentam o manitol podem ser facilmente identificadas pela mudança de coloração (Figura 6.10). Provavelmente elas sejam colônias de *S. aureus*, e sua identificação pode ser confirmada por testes adicionais. A utilização de meio diferencial para identificar *E. coli* produtora de toxina é discutida no Capítulo 5, página 139.

Meios de enriquecimento

Como as bactérias em pequeno número podem ser perdidas, em particular se outras bactérias estiverem presentes em maior número, algumas vezes é necessário utilizar uma **cultura de enriquecimento**. Com frequência essa metodologia é empregada com amostras de solo ou fezes. O meio (meio enriquecido) para enriquecer uma cultura geralmente é líquido e fornece nutrientes e condições ambientais que favorecem o crescimento de um micro-organismo específico e não de outros. Nesse sentido, também é um meio seletivo, mas elaborado para amplificar até níveis detectáveis um número muito pequeno do micro-organismo de interesse.

Suponha que queremos isolar de uma amostra de solo um micro-organismo que pode crescer com fenol e que está presente em número menor que outras espécies. Se a amostra de solo é colocada em um meio líquido de enriquecimento no qual o fenol é a única

Tabela 6.5 Meios de cultura	
Tipo	Finalidade
Quimicamente definido	Crescimento de quimioautotróficos e fotoautotróficos; ensaios microbiológicos.
Complexo	Crescimento da maioria dos organismos quimioheterotróficos.
Redutor	Crescimento de anaeróbicos obrigatórios.
Seletivo	Supressão de micro-organismos indesejados; favorecimento dos micro-organismos de interesse.
Diferencial	Diferenciação das colônias dos micro-organismos de interesse em relação aos outros.
Enriquecimento	Similar ao meio seletivo, mas elaborado para aumentar o número de micro-organismos de interesse até níveis detectáveis.

fonte de carbono e energia, os micro-organismos incapazes de metabolizar o fenol não irão crescer. O meio de cultura é incubado durante alguns dias, e então uma pequena quantidade é transferida para outro frasco do mesmo meio. Após uma série de transferências, a população sobrevivente consistirá das bactérias capazes de metabolizar o fenol. As bactérias têm um determinado tempo para crescer no meio entre as transferências; esse é o estágio de enriquecimento (veja o quadro no Capítulo 28, página 801). Qualquer nutriente trazido pelo inóculo original é rapidamente eliminado por diluição com as transferências sucessivas. Quando a última diluição é semeada em um meio sólido com a mesma composição, somente as colônias do organismo capaz de utilizar o fenol poderão crescer. Um aspecto admirável dessa técnica é que o fenol normalmente é letal para a maioria das bactérias.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Os seres humanos poderiam se desenvolver em um meio quimicamente definido, pelo menos em condições de laboratório? **6-8**
- ✓ Louis Pasteur, nos anos de 1800, poderia ter crescido o vírus da raiva em cultura de células em vez de animais vivos? **6-9**
- ✓ Que nível de BSL o seu laboratório tem? **6-10**

* * *

A Tabela 6.5 resume os propósitos dos principais tipos de meios de cultura.

Obtenção de culturas puras

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 6-11** Definir colônia.
- 6-12** Descrever como culturas puras podem ser isoladas pelo método de semeadura por esgotamento.

A maioria dos materiais infecciosos, como pus, escarro e urina, contém diversos tipos de bactérias; da mesma forma que amostras

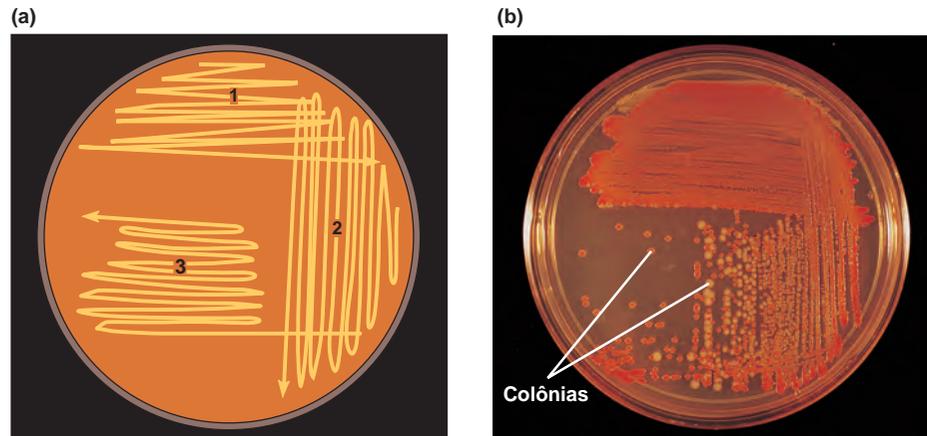


Figura 6.11 Método de esgotamento utilizado para isolar culturas puras de bactérias. **(a)** As setas indicam a direção da semeadura por esgotamento. A série de estrias 1 é feita com a cultura bacteriana original. A alça de inoculação é esterilizada após cada série de estrias. Nas séries 2 e 3, a alça retira bactérias da série anterior, reduzindo cada vez mais o número de células. Há inúmeras variações dessa técnica. **(b)** Na série 3, observe que foram obtidas colônias de bactérias bem isoladas de dois tipos diferentes, vermelho e amarelo.

P Uma colônia formada por esgotamento em placa é sempre derivada de uma única bactéria?

de solo, água ou alimento. Quando esses materiais são semeados na superfície de meio sólido, as colônias formam cópias exatas do organismo original. Uma **colônia** visível teoricamente vem de um único esporo ou célula vegetativa ou de um grupo dos mesmos micro-organismos juntos em agregados ou cadeias. As colônias microbianas frequentemente têm aparência diferente, o que permite distinguir um micro-organismo do outro (veja a Figura 6.10). As bactérias devem ser espalhadas de maneira suficientemente ampla na placa para que as colônias possam ser separadas umas das outras.

A maioria dos trabalhos de microbiologia requer culturas puras ou clones da bactéria. O método de isolamento mais comumente utilizado para obter culturas puras é o **método de esgotamento por estrias** (Figura 6.11). Uma alça de inoculação estéril é mergulhada dentro de uma cultura mista, que contém mais de um tipo de micro-organismo, e é semeada em estrias na superfície de um meio nutritivo. Ao longo da estria, as bactérias são depositadas quando a alça entra em contato com o meio. As últimas células depositadas na alça são afastadas o suficiente para crescer em colônias isoladas. Essas colônias podem ser repicadas com uma alça de inoculação e transferidas para um tubo de ensaio com meio nutritivo para a obtenção de uma cultura pura contendo somente um tipo de bactéria.

O método de esgotamento por estrias funciona bem quando o organismo a ser isolado está presente em grande número em relação à população total. Contudo, quando o micro-organismo a ser isolado está presente em um número muito pequeno, sua quantidade pode ser aumentada por enriquecimento seletivo antes do isolamento com o método de esgotamento por estrias.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Você pode pensar em alguma razão para uma colônia não crescer infinitamente, ou pelo menos preencher toda uma placa de Petri? **6-11**

- ✓ Uma cultura pura da bactéria poderia ser obtida pelo método de esgotamento por estrias se tivesse somente um micro-organismo de interesse em uma suspensão de bilhões de bactérias? **6-12**

Preservação de culturas bacterianas

OBJETIVO DO APRENDIZADO

- 6-13** Explicar como os micro-organismos são preservados por congelamento em baixas temperaturas e liofilização (congelamento-dessecação).

A refrigeração pode ser utilizada para o armazenamento de culturas bacterianas por curtos períodos. Dois métodos comuns de preservação de culturas microbianas por longos períodos são o congelamento em baixa temperatura e a liofilização. O **congelamento em baixa temperatura** é um processo no qual uma cultura pura de micro-organismos é colocada em um líquido de suspensão e rapidamente congelada em uma faixa de temperatura de -50°C a -95°C . A cultura normalmente pode ser descongelada e cultivada mesmo após vários anos. Durante a **liofilização (congelamento-dessecação)**, uma suspensão de micro-organismos é rapidamente congelada em uma faixa de temperatura de -54°C a -72°C , e a água é removida por alto vácuo (sublimação). Ainda sob vácuo, o container é selado, derretendo o vidro com uma chama de alta temperatura. O pó obtido desse processo, contendo os micro-organismos sobreviventes, pode ser armazenado por anos. Os organismos podem ser reativados a qualquer momento por hidratação com um meio nutriente líquido apropriado.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Se a Estação Espacial em órbita na Terra sofresse uma ruptura repentina, os humanos a bordo morreriam instantaneamente pelo frio e pelo vácuo do espaço. Todas as bactérias na cápsula também seriam mortas? **6-13**

Crescimento de culturas bacterianas

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 6-14** Definir *crescimento bacteriano*, incluindo *fissão binária*.
- 6-15** Comparar as fases do crescimento microbiano e descrever sua relação com o tempo de geração.
- 6-16** Explicar quatro métodos diretos de medida do crescimento celular.
- 6-17** Diferenciar métodos diretos e indiretos na determinação do crescimento celular.
- 6-18** Explicar três métodos indiretos de medida do crescimento celular.

A possibilidade de representar graficamente as enormes populações resultantes do crescimento de culturas bacterianas é uma parte essencial da microbiologia. A determinação das quantidades de micro-organismos tanto diretamente, por contagem, quanto indiretamente, pela medida de sua atividade metabólica, também é um aspecto importante da microbiologia.

Divisão bacteriana

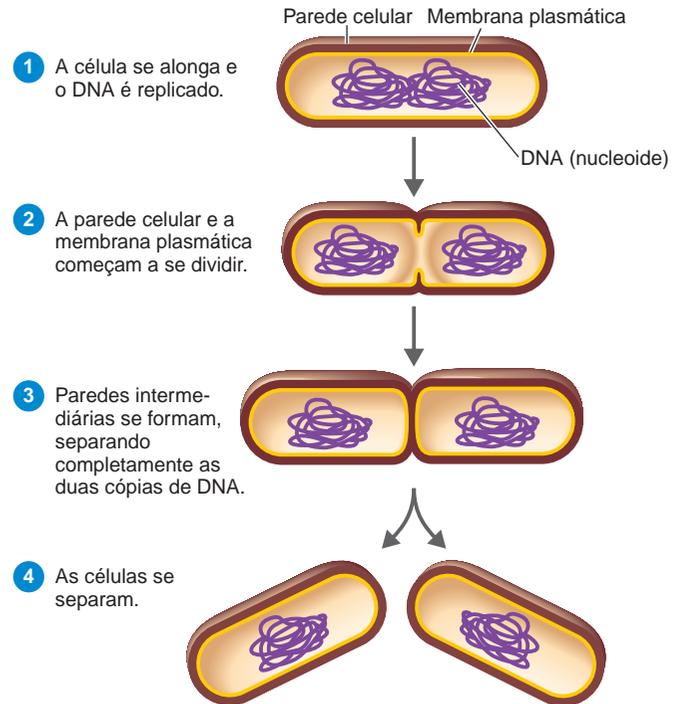
Como mencionado no início do capítulo, o crescimento bacteriano se refere ao aumento do número de bactérias e não a um aumento no tamanho das células individuais. As bactérias normalmente se reproduzem por **fissão binária** (Figura 6.12).

Algumas espécies bacterianas se reproduzem por **brotamento**; elas formam uma pequena região inicial de crescimento (o broto), que vai se alargando até atingir um tamanho similar ao da célula parental, e então se separam dela. Algumas bactérias filamentosas (certos actinomicetes) se reproduzem pela produção de cadeias de conidiósporos carregados externamente na ponta dos filamentos. Algumas espécies simplesmente se fragmentam, e os fragmentos iniciam o crescimento de novas células.

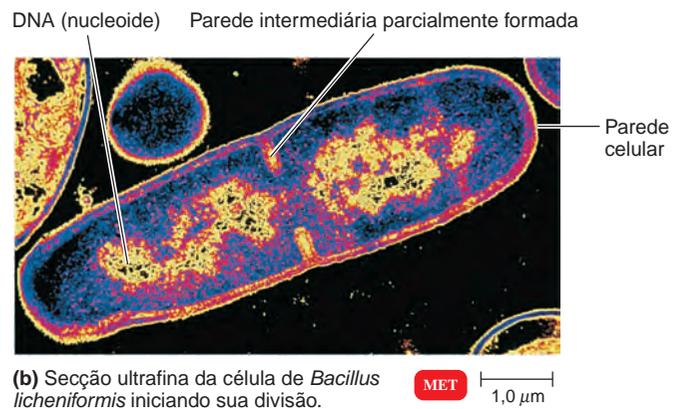
Tempo de geração

Para o cálculo do tempo de geração das bactérias, consideraremos somente a reprodução por divisão binária, que é o método mais comum. Como pode ser analisado na Figura 6.13, a divisão de uma célula produz duas células, a divisão dessas duas células produz quatro células, e assim por diante. Quando o número de células em cada geração é expresso na potência de 2, o expoente reflete o número de duplicações (gerações) que ocorreram.

O tempo necessário para uma célula se dividir (e sua população duplicar) é chamado de **tempo de geração**. Ele varia consideravelmente entre os organismos e com as condições ambientais, como a temperatura. A maioria das bactérias tem um tempo de geração de 1 a 3 horas; outras requerem mais de 24 horas por geração. (O método matemático para calcular os tempos de geração é apresentado no Apêndice B.) Se a fissão binária não é controlada, uma grande quantidade de células será produzida. Se a divisão ocorre a cada 20 minutos, que é o caso da *E. coli* em condições favoráveis, após 20 gerações, uma única célula inicial poderá ter gerado mais de um milhão de células. Esse aumento ocorrerá em cerca de 7 horas. Em 30 gerações, ou 10 horas, a população poderá ser de um bilhão, tendo atingido um número com 21 zeros em 24 horas. É difícil de representar graficamente variações de populações tão grandes utilizando números aritméticos. Essa é a razão pela qual



(a) Diagrama da sequência da divisão celular.



(b) Seção ultrafina da célula de *Bacillus licheniformis* iniciando sua divisão.

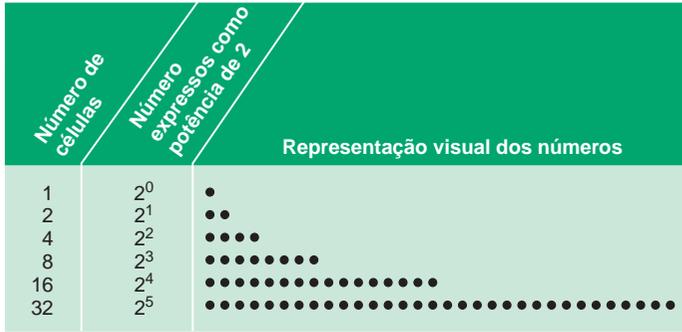
Figura 6.12 Fissão binária em bactéria.

P Todas as bactérias se reproduzem por fissão binária?

escalas logarítmicas em geral são utilizadas para representar graficamente o crescimento bacteriano. A compreensão das representações logarítmicas de populações bacterianas requer conhecimento em matemática, que é fundamental para os microbiologistas (veja o Apêndice B).

Representação logarítmica das populações bacterianas

Para ilustrar a diferença entre representação gráfica logarítmica e aritmética de populações bacterianas, analisaremos 20 gerações bacterianas. Em cinco gerações (2^5), haverá 32 células; em dez gera-



(a) Representação visual do aumento do número de bactérias durante cinco gerações. O número de bactérias dobra a cada geração. O número sobrescrito indica a geração, ou seja, $2^5 = 5$ gerações.

Número de gerações	Número de células	\log_{10} do número de células
0	$2^0 = 1$	0
5	$2^5 = 32$	1,51
10	$2^{10} = 1.024$	3,01
15	$2^{15} = 32.768$	4,52
16	$2^{16} = 65.536$	4,82
17	$2^{17} = 131.072$	5,12
18	$2^{18} = 262.144$	5,42
19	$2^{19} = 524.288$	5,72
20	$2^{20} = 1.048.576$	6,02

(b) Conversão do número de células de uma população na expressão logarítmica desse número. Para obter os números da coluna central, utilize a função y^x da sua calculadora. Aperte o 2 e depois y^x ; aperte o 5 e depois o sinal =. A calculadora mostrará o número 32. Portanto, a população da quinta geração das bactérias totaliza 32 células. Para obter os números da coluna da direita, utilize a função log da sua calculadora. Aperte o número 32 e depois log. A calculadora mostrará, arredondando, que o \log_{10} de 32 é 1,51.

Figura 6.13 Divisão celular.

P Se uma única bactéria se reproduz a cada 20 minutos, qual o número de bactérias em duas horas?

ções (2^{10}), serão 1.024 células, e assim sucessivamente. (Utilizando uma calculadora com as funções y^x e log, pode-se duplicar os números da terceira coluna da Figura 6.13.)

Na Figura 6.14, observe que a curva utilizando os valores aritméticos (linha cheia) não mostra claramente as mudanças de população nos passos iniciais da curva de crescimento com essa escala. De fato, as dez primeiras gerações permanecem na linha de base. Além disso, a representação de mais uma ou duas outras gerações na mesma forma gráfica aumentaria os valores no eixo de y de modo que acabaria saindo da página.

A linha pontilhada na Figura 6.14 mostra como os problemas de representação gráfica podem ser evitados utilizando a representação no \log_{10} dos números das populações. O \log_{10} da população é

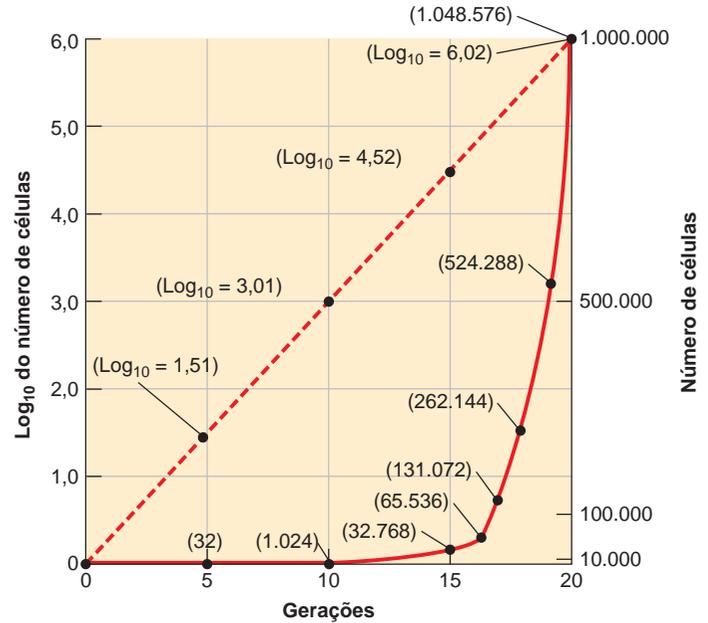


Figura 6.14 Curva de crescimento para uma população crescendo exponencialmente, representada logarítmica (linha pontilhada) e aritmeticamente (linha cheia). Essa figura demonstra porque, em vista do grande número das populações bacterianas, é necessária a mudança gráfica da representação aritmética para a logarítmica. Por exemplo, observe que, até a décima geração, a curva da representação aritmética ainda não se ergueu de maneira perceptível da linha de base, enquanto a curva logarítmica para a décima geração já está no meio do gráfico.

P Se os valores aritméticos (linha cheia) fossem aplicados para duas gerações suplementares, a curva ainda estaria dentro do gráfico?

representado pelas gerações 5, 10, 15 e 20. Observe que uma linha reta é obtida e que populações mil vezes maiores (1.000.000.000 ou $\log_{10} 9,0$) ainda poderiam ser acomodadas em um pequeno espaço complementar. Contudo, essa vantagem é obtida ao custo de uma distorção da nossa percepção intuitiva da real situação. Não estamos acostumados a raciocinar em termos de relações logarítmicas, mas elas são necessárias para uma compreensão apropriada dos gráficos das populações microbianas.

TESTE SEU CONHECIMENTO

✓ Um organismo complexo, como um besouro, pode se dividir por fissão binária? **6-14**

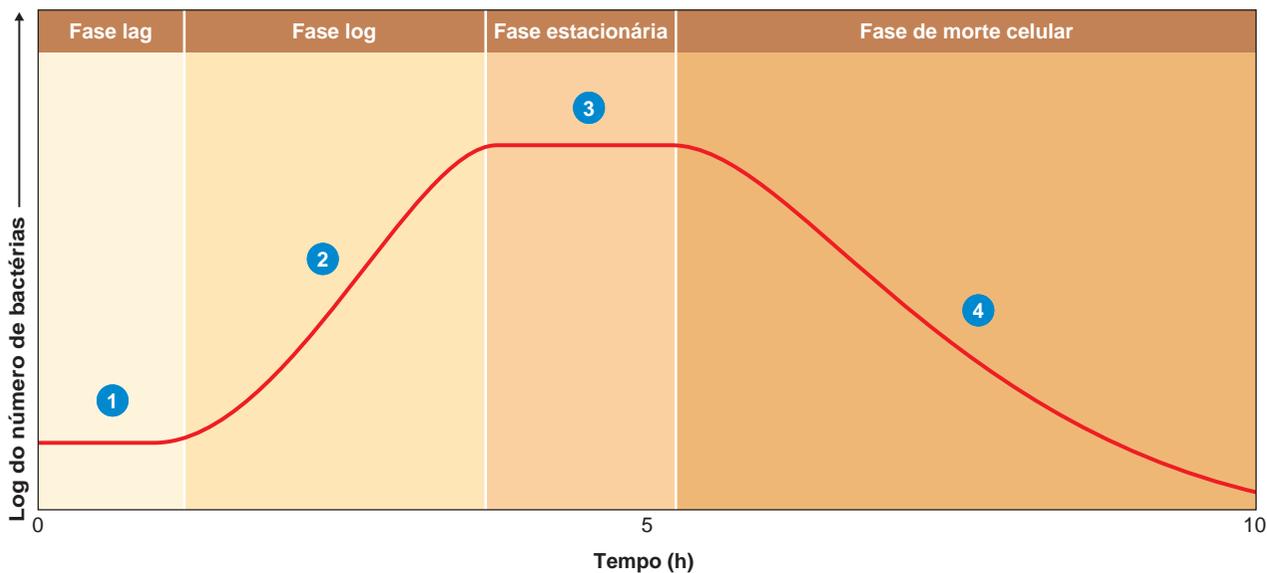
Fases do crescimento

Quando algumas bactérias são inoculadas em um meio líquido de crescimento e a população é contada em intervalos regulares, é possível representar graficamente a curva de crescimento bacteriano, que mostra o crescimento das células em função do tempo (Figura 6.15). Há quatro fases básicas de crescimento: a fase lag, a fase log, a fase estacionária e a fase de morte celular.

Figura 6.15

FIGURA FUNDAMENTAL A curva de crescimento bacteriano

O conceito da curva de crescimento bacteriano é fundamental para entendermos a dinâmica das populações e o controle durante, por exemplo, a preservação ou a deterioração de alimentos, a microbiologia industrial, como a produção de etanol, e o curso e o tratamento de doenças infecciosas.



- 1** Intensa atividade de preparação para o crescimento populacional, mas sem aumento da população.
- 2** Aumento logarítmico ou exponencial da população.
- 3** Período de equilíbrio; as mortes microbianas são equilibradas pela produção de novas células.
- 4** A população se reduz em uma taxa logarítmica.

Conceito-chave

As populações bacterianas seguem uma série de fases de crescimento: as fases lag, log, estacionária e de morte celular.

A fase lag

Durante um certo tempo, o número de células muda pouco, pois elas não se reproduzem imediatamente em um novo meio. Esse período de pouca ou nenhuma divisão é chamado de **fase lag**, podendo durar de uma hora a vários dias. Durante esse tempo, contudo, as células não estão dormentes. A população microbiana passa por um período de intensa atividade metabólica, envolvendo principalmente a síntese de enzimas e várias moléculas. (A situação é análoga a uma usina sendo equipada para produzir automóveis, ou seja, há atividade de preparação, mas não há produção imediata de automóvel.)

A fase log

Finalmente, as células começam a se dividir e entram em um período de crescimento, ou aumento logarítmico, chamado de **fase log** ou **fase exponencial de crescimento**. A reprodução celular é mais ativa durante esse período, e o tempo de geração atinge um valor constante. Como o tempo de geração é constante, uma repre-

sentação logarítmica do crescimento durante a fase log gera uma linha reta. A fase log é o momento de maior atividade metabólica, sendo o preferido para fins industriais, pois o produto precisa ser produzido de maneira eficiente.

A fase estacionária

Se a fase de crescimento continua sem controle, ocorre a formação de um grande número de células. Por exemplo, uma única bactéria (com peso de $9,5 \times 10^{-13}$ g por célula) se dividindo a cada 20 minutos por somente 25,5 horas pode teoricamente produzir uma população equivalente em peso a de um avião de carga de 80.000 toneladas. Na realidade, isso não ocorre. No final do crescimento, a velocidade de reprodução se reduz, o número de mortes microbianas é equivalente ao número de células novas, e a população se estabiliza. Esse período de equilíbrio é chamado de **fase estacionária**.

A causa da interrupção do crescimento exponencial não é sempre clara. O esgotamento dos nutrientes, o acúmulo de resíduos e mudanças no pH danosas à célula podem ser os motivos.

A fase de morte celular

O número de mortes finalmente ultrapassa o número de células novas formadas, e a população entra na **fase de morte** ou **declínio logarítmico**. Essa fase continua até que a população tenha diminuído para uma pequena fração da população da fase anterior ou morre totalmente. Algumas espécies passam por toda a sequência de fases em somente poucos dias; outras mantêm algumas células sobreviventes indefinidamente. A morte microbiana será discutida no Capítulo 7.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Se um casal de camundongos inicia uma reprodução em uma gaiola com um fornecimento de alimento fixo, a sua curva de população é similar a uma curva de crescimento bacteriano? **6-15**

Medida direta do crescimento microbiano

O crescimento de populações microbianas pode ser medido de diversas maneiras. Alguns métodos medem o número de células, outros medem a massa total da população, que muitas vezes é proporcional ao número de células. A quantificação de uma população normalmente é registrada como o número de células por mililitro de líquido ou grama de material sólido. Como as populações bacterianas geralmente são muito grandes, a maioria dos métodos de contagem tem como base enumerações diretas ou indiretas de amostras pequenas; um cálculo determina depois o tamanho total da população. Vamos assumir, por exemplo, que um milionésimo de mililitros (10^{-6} mL) de leite azedo contém 70 bactérias. Portanto, deve existir 70 vezes mais células, ou 70 milhões de células por mililitro.

No entanto, não é prático medir em um milionésimo de mililitro ou de grama de alimento. Assim, o procedimento é feito indiretamente em uma série de diluições. Por exemplo, se adicionamos 1 mL de leite em 99 mL de água, cada mililitro dessa diluição terá um centésimo das bactérias que um mililitro da amostra original tinha. Realizando uma série de diluições, podemos rapidamente estimar o número de bactérias da amostra original. Para contar as populações microbianas em alimentos sólidos (como um hambúrguer), uma parte do alimento será misturada com nove partes de água formando um homogenado. Amostras da diluição inicial de 100 vezes podem ser transferidas com uma pipeta para diluições posteriores ou contagem de células.

Contagem em placas

O método utilizado com mais frequência para medir populações bacterianas é a **contagem em placas**. Uma grande vantagem desse método é que ele mede o número de células viáveis. Uma desvantagem é que são necessárias 24 horas ou mais para que colônias visíveis sejam formadas. Isso pode ser um problema sério para certas aplicações, como o controle de qualidade do leite, quando não é possível manter um lote do produto durante esse tempo.

As contagens em placas consideram que cada bactéria viva cresce e se divide para produzir uma única colônia. Isso não é sempre verdadeiro, pois as bactérias frequentemente crescem unidas em agregados ou cadeias (veja a Figura 4.1, página 78). Por-

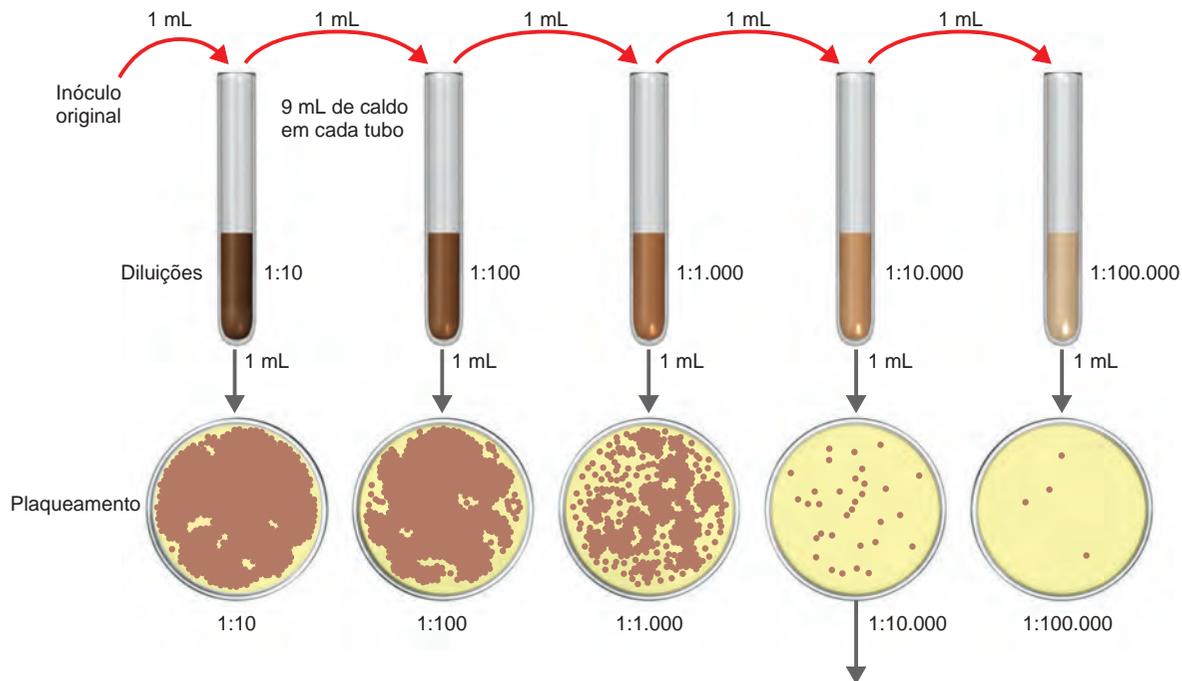
tanto, uma colônia muitas vezes resulta não de uma única bactéria, mas de um curto fragmento de uma cadeia ou de um agregado bacteriano. Para refletir essa realidade, as contagens em placas muitas vezes são denominadas **unidades formadoras de colônias (UFC)**.

Quando uma contagem em placas é feita, é importante que somente um número limitado de colônias se desenvolva na placa. Quando muitas colônias estão presentes, algumas células são reprimidas e não podem se desenvolver. Obviamente, isso não produz uma placa adequada para contagem; essas condições causam imprecisão na contagem. Uma recomendação da Food and Drug Administration é a contagem de placas com somente 25 a 250 colônias, mas muitos microbiologistas preferem placas com 30 a 300 colônias. Para assegurar que algumas contagens de colônias estejam nessa faixa, o inóculo inicial é diluído várias vezes, em um processo chamado de **diluição seriada** (Figura 6.16).

Diluições seriadas. Digamos, por exemplo, que uma amostra de leite tem 10.000 bactérias por mililitro. Se 1 mL dessa amostra fosse semeado em placa, teoricamente 10.000 colônias deveriam se formar no meio da placa de Petri. Obviamente, isso não produziria uma placa contável. Se 1 mL dessa amostra fosse transferido para um tubo contendo 9 mL de água estéril, cada mililitro do fluido dentro do tubo conteria 1.000 bactérias. Se 1 mL dessa amostra fosse inoculado em uma placa de Petri, ainda teriam colônias demais na placa para a realização da contagem. Portanto, outra diluição deveria ser feita. Um mililitro contendo 1.000 bactérias deveria ser transferido para um segundo tubo de 9 mL de água. Cada mililitro nesse tubo conteria agora somente 100 bactérias, e se 1 mL do conteúdo do tubo fosse inoculado em placa, 100 colônias potenciais seriam formadas, um número facilmente contável.

Incorporação em placas a espalhamento em placas. A contagem em placas é feita pelo método de incorporação em placas ou pelo método de espalhamento em placas. O método de **incorporação em placas** segue o procedimento mostrado na Figura 6.17a. Um mililitro ou 0,1 mL das diluições da suspensão bacteriana é introduzido em uma placa de Petri. O meio nutritivo, no qual o ágar é mantido líquido por aquecimento em banho-maria a 50°C, é vertido sobre a amostra, que é então misturada com o meio por agitação lenta da placa. Quando o ágar solidifica, a placa é incubada. Com a técnica de incorporação em placas, as colônias crescerão tanto dentro do ágar nutritivo (a partir de células que ficaram em suspensão no meio nutritivo assim que o ágar solidificou) quanto na superfície da placa de ágar.

Essa técnica tem algumas desvantagens, pois alguns micro-organismos relativamente sensíveis ao calor podem ser danificados pelo ágar fundido, sendo incapazes de formar colônias. Além disso, quando certos meios diferenciais são utilizados, a aparência diferenciada da colônia na superfície é essencial para diagnóstico. As colônias que se formam abaixo da superfície de uma placa por incorporação não são adequadas para esses testes. Para evitar esses problemas, o **método de espalhamento em placas** frequentemente é utilizado (Figura 6.17b). Um inóculo de 0,1 mL é adicionado à superfície de um meio de ágar previamente solidificado. O inóculo



Cálculo: número de colônias na placa \times índice de diluição da amostra = número de bactérias/mL (p. ex., se 32 colônias estão na placa de diluição 1:10.000, a contagem pode ser estimada em $32 \times 10.000 = 320.000$ bactérias/mL na amostra).

Figura 6.16 Diluições seriadas e contagens em placas. Nas diluições seriadas, o inóculo original é diluído em uma série de tubos de diluições. Nesse exemplo, cada tubo de diluição subsequente tem apenas um décimo do número de células microbianas do tubo anterior. Posteriormente, amostras de todas as diluições são utilizadas para inocular placas de Petri, nas quais as colônias crescem e podem ser contadas. Essa contagem é então utilizada para estimar o número de bactérias na amostra original.

P Por que as diluições 1:1.000 e 1:100.000 não foram contadas? Teoricamente, quantas colônias deveriam aparecer na placa 1:1.000?

é então espalhado de modo uniforme na superfície do meio com um bastão de vidro em L esterilizado. Esse método espalha todas as colônias na superfície e evita o contato entre as células e o ágar fundido.

Filtração

Quando a quantidade de bactérias é muito pequena, como em lagos ou correntes de água relativamente puras, as bactérias podem ser contadas pelo método de **filtração** (Figura 6.18). Nessa técnica, pelo menos 100 mL de água passam através de uma membrana filtrante fina com poros estreitos o suficiente para não deixar que as bactérias passem, ficando assim retidas na superfície do filtro. Esse filtro é transferido para uma placa de Petri contendo um suporte embebido em um meio líquido nutriente, que permite que as colônias se desenvolvam a partir das bactérias retidas na superfície do filtro. Esse método é aplicado frequentemente para a detecção e o registro de bactérias coliformes, que são indicadoras de contaminação fecal em alimento ou água (veja o Capítulo 27). As colônias formadas por essas bactérias podem ser identificadas quando um meio nutritivo diferencial é utilizado (as colônias mostradas na Figura 6.18b são exemplos de coliformes).

O método do número mais provável

Outro método para determinar o número de bactérias em uma amostra é o **método do número mais provável (MNP)**, ilustrado na Figura 6.19. Essa técnica estatística tem como base o seguinte princípio: quanto maior o número de bactérias em uma amostra, maior será o número de diluições necessárias para reduzir a densidade até um ponto no qual mais nenhuma bactéria esteja presente nos tubos de diluição seriada. O MNP é utilizado quando os micro-organismos não crescem em um meio sólido (como as bactérias quimioautotróficas nitrificantes). Também é prático quando o crescimento de bactérias em um meio líquido diferencial é utilizado para identificar micro-organismos (como bactérias coliformes em água, que fermentam seletivamente lactose produzindo ácido). O mnp fornece somente uma estimativa de 95% de probabilidade de a população bacteriana estar em uma faixa determinada e que o MNP obtido é estatisticamente o número mais provável.

Contagem microscópica direta

No método conhecido como **contagem microscópica direta**, um volume conhecido de uma suspensão bacteriana é colocado em uma área definida da lâmina microscópica. Por considerações de

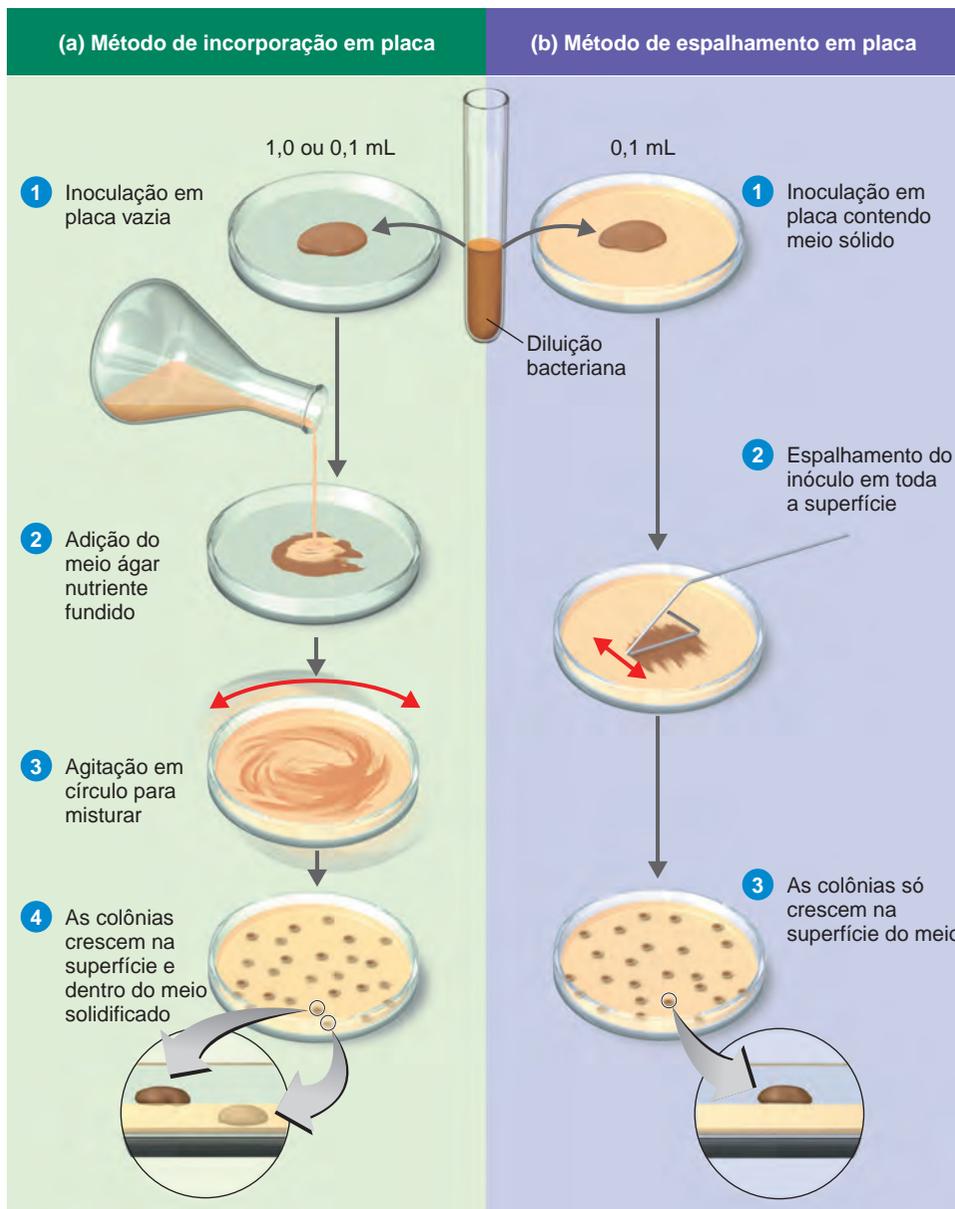


Figura 6.17 Métodos de preparação das placas para contagem. **(a)** Método de incorporação em placa. **(b)** Método de espalhamento em placa.

P Quais são as vantagens de cada método?

tempo, esse método frequentemente é utilizado para contar bactérias no leite. Uma amostra de 0,01 mL é espalhada em uma superfície de um centímetro quadrado da lâmina, um corante é adicionado para visualizar a bactéria, e a amostra é observada com óleo de imersão. Deve ser determinada a área de observação de cada região da lâmina. Após a contagem de diferentes regiões da lâmina, a média do número de bactérias por campo observado pode ser calculada. A partir desses resultados, o número de bactérias no centímetro quadrado contendo a amostra também pode ser calculado. Como essa área da lâmina continha 0,01 mL, o número de bactérias em cada mililitro da suspensão é o número de bactérias na amostra multiplicado por 100.

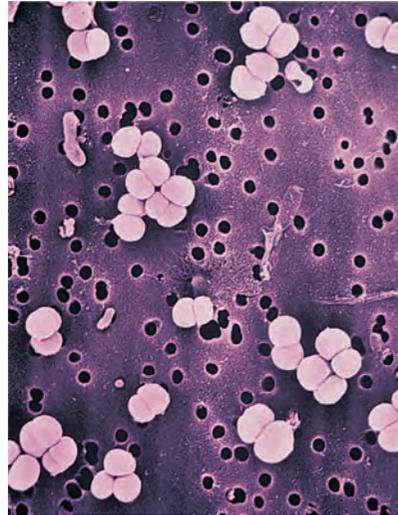
Uma lâmina especialmente desenvolvida chamada de *contador de células Petroff-Hausser* também é utilizado para contagens microscópicas diretas (Figura 6.20).

As bactérias móveis são difíceis de ser contadas com esse método e, como acontece com outros métodos microscópicos, as células mortas acabam sendo contadas como as vivas. Outra desvantagem é que é necessária uma concentração de células bastante elevada para permitir uma contagem satisfatória – em torno de um milhão de bactérias por mililitro. A maior vantagem das contagens microscópicas é que um tempo de incubação não é requerido, e elas geralmente são reservadas para situações nas quais o tempo é essencial. Esse é o caso dos *contadores de células eletrônicos*, também conhecidos como *contadores Coulter*, que contam automaticamente o número de células em um volume líquido determinado.

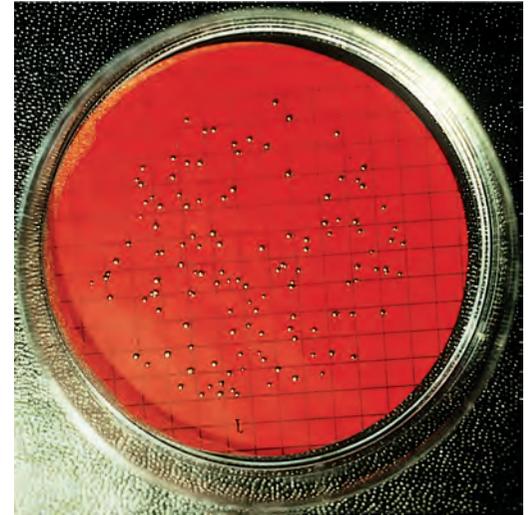
Esses instrumentos são utilizados em alguns laboratórios de pesquisa e em hospitais.

Figura 6.18 Contagem de bactérias por filtração.

P Poderia ser realizada uma contagem por incorporação em uma placa de Petri comum com um inóculo de 10 mL? Se não, por quê?



(a) As bactérias em 100 mL de água são retidas na superfície da membrana de filtro. Observe que os poros no filtro são menores que as bactérias.



(b) Um filtro como o mostrado na foto (a), com as bactérias bastante espalhadas, foi colocado sobre um suporte saturado com o meio líquido Endo, que é utilizado para enumeração de coliformes. As bactérias individuais cresceram como colônias visíveis. Foram contadas 124 colônias visíveis, sendo, portanto, possível estimar que existiam 124 bactérias em 100 mL da amostra de água.

Volume de inóculo para cada grupo de cinco tubos	Tubos de meio nutriente (Grupo de cinco tubos)	Número de tubos positivos por grupo
10 mL		5
1 mL		3
0,1 mL		1

(a) Série de diluições do método do número mais provável (MNP). Neste exemplo, são apresentados três grupos de tubos, cada grupo contendo cinco tubos. Cada tubo do primeiro grupo de cinco tubos recebe 10 mL do inóculo, como uma amostra de água. Cada tubo do segundo grupo de cinco tubos recebe 1 mL da amostra, e do terceiro grupo, 0,1 mL cada. Existiam bactérias o suficiente na amostra para que todos os cinco tubos do primeiro grupo apresentassem crescimento bacteriano, sendo considerados positivos. No segundo grupo, que recebeu somente um décimo do inóculo inicial, apenas três tubos foram positivos. No terceiro grupo, que recebeu um centésimo do inóculo inicial, somente um tubo foi positivo.

Combinação de tubos positivos	Índice de MNP/100 mL	Limites com 95% de confiabilidade	
		Inferior	Superior
4-2-0	22	6.8	50
4-2-1	26	9.8	70
4-3-0	27	9.9	70
4-3-1	33	10	70
4-4-0	34	14	100
5-0-0	23	6.8	70
5-0-1	31	10	70
5-0-2	43	14	100
5-1-0	33	10	100
5-1-1	46	14	120
5-1-2	63	22	150
5-2-0	49	15	150
5-2-1	70	22	170
5-2-2	94	34	230
5-3-0	79	22	220
5-3-1	110	34	250
5-3-2	140	52	400

(b) A tabela do MNP. A tabela do MNP nos permite calcular para uma amostra o número de micro-organismo que estatisticamente são os mais prováveis de terem levado aos resultados obtidos. O número de tubos positivos é anotado para cada grupo: no exemplo sombreado, os tubos 5, 3 e 1. Se levarmos essa combinação para a tabela do MNP, concluiremos que o índice do MNP para 100 mL é 110. Estatisticamente, isso significa que 95% das amostras de água que apresentaram esse resultado contêm entre 34 e 250 bactérias, com 110 sendo o número mais provável.

Figura 6.19 Método do número mais provável (MNP).

P Em quais circunstâncias o MNP é utilizado para determinar o número de bactérias em uma amostra?

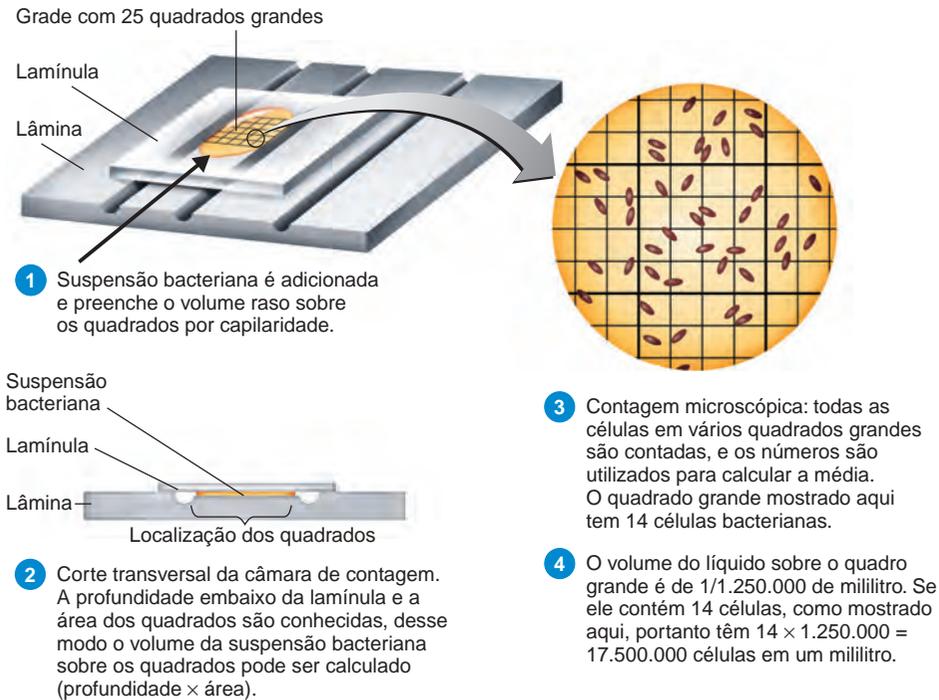


Figura 6.20 Contagem microscópica direta de bactérias com uma câmara de contagem Petroff-Hausser. O número médio de células no quadrado grande multiplicado pelo fator 1.250.000 fornece o número de bactérias por mililitro.

P Esse tipo de contagem, apesar das suas desvantagens óbvias, frequentemente é utilizado para estimar a população bacteriana em laticínios. Por quê?

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Por que é difícil medir de maneira realista o crescimento de um fungo micelial pelo método de contagem em placas? **6-16**

Determinação do número de bactérias por métodos indiretos

Não é sempre necessário contar as células microbianas para estimar seu número. Na pesquisa e na indústria, o número e a atividade dos micro-organismos também são determinados por alguns dos métodos seguintes.

Turbidimetria

Para alguns tipos de experimentos, estimar a **turbidimetria** é uma maneira de monitorar o crescimento bacteriano. À medida que as bactérias se multiplicam em um meio líquido, o meio se torna turvo ou opaco com as células.

O instrumento utilizado para medir a turbidez é um *espectrofotômetro* (ou colorímetro). No espectrofotômetro, um feixe de luz passa através de uma suspensão de bactérias até um detector fotossensível (**Figura 6.21**). Com o aumento do número de bactérias, menos luz atingirá o detector. Essa alteração da luz será registrada na escala do instrumento como *porcentagem de transmissão*. Também será registrada a expressão logarítmica chamada de *absorbância* (algumas vezes denominada *densidade ótica*, ou DO, que é calculada como $Abs = 2 - \log$ de % da transmissão). A absorbância é utilizada para representar graficamente o crescimento bacteriano. Quando as bactérias estão em crescimento logarítmico ou em declínio, o gráfico da absorbância em função do tempo será uma linha quase reta. Se as leituras de absorbância forem combinadas com contagens em placas da mesma cultura, essa correlação poderá ser

utilizada para estimativas futuras do número de bactérias obtidas pela medida de turbidimetria.

Mais de um milhão de células por mililitro devem estar presentes para que os primeiros sinais de turbidez sejam visíveis. Em torno de 10 milhões a 100 milhões de células por mililitro são necessários para que uma suspensão seja turva o suficiente para possibilitar uma leitura no espectrofotômetro. Portanto, a turbidimetria não é uma medida útil de contaminação de líquidos por um número relativamente pequeno de bactérias.

Atividade metabólica

Outra maneira indireta de estimar o número de bactérias é medir a *atividade metabólica* de uma população. Esse método assume que a quantidade de um produto metabólico determinado, como um ácido ou CO_2 , é diretamente proporcional ao número de bactérias presentes. Um exemplo de aplicação prática de um teste metabólico é o ensaio microbiológico no qual a produção de ácido é utilizada para determinar quantidades de vitaminas.

Peso seco

Para bactérias e fungos filamentosos, os métodos comuns de medida são menos satisfatórios. Uma contagem em placas não poderia medir esse aumento em massa micelial. Nas contagens em placas de actinomicetes (veja a Figura 11.22, página 321) e fungos, o número de esporos assexuados é mais frequentemente contado como alternativa, mas essa não é uma boa medida do crescimento. Uma das melhores maneiras de medir o crescimento de organismos filamentosos é pelo *peso seco*. Nesse procedimento, o fungo é removido do meio de crescimento, filtrado para remover outros materiais e seco em dissecador, sendo então pesado. Para bactérias, o mesmo procedimento básico é seguido.

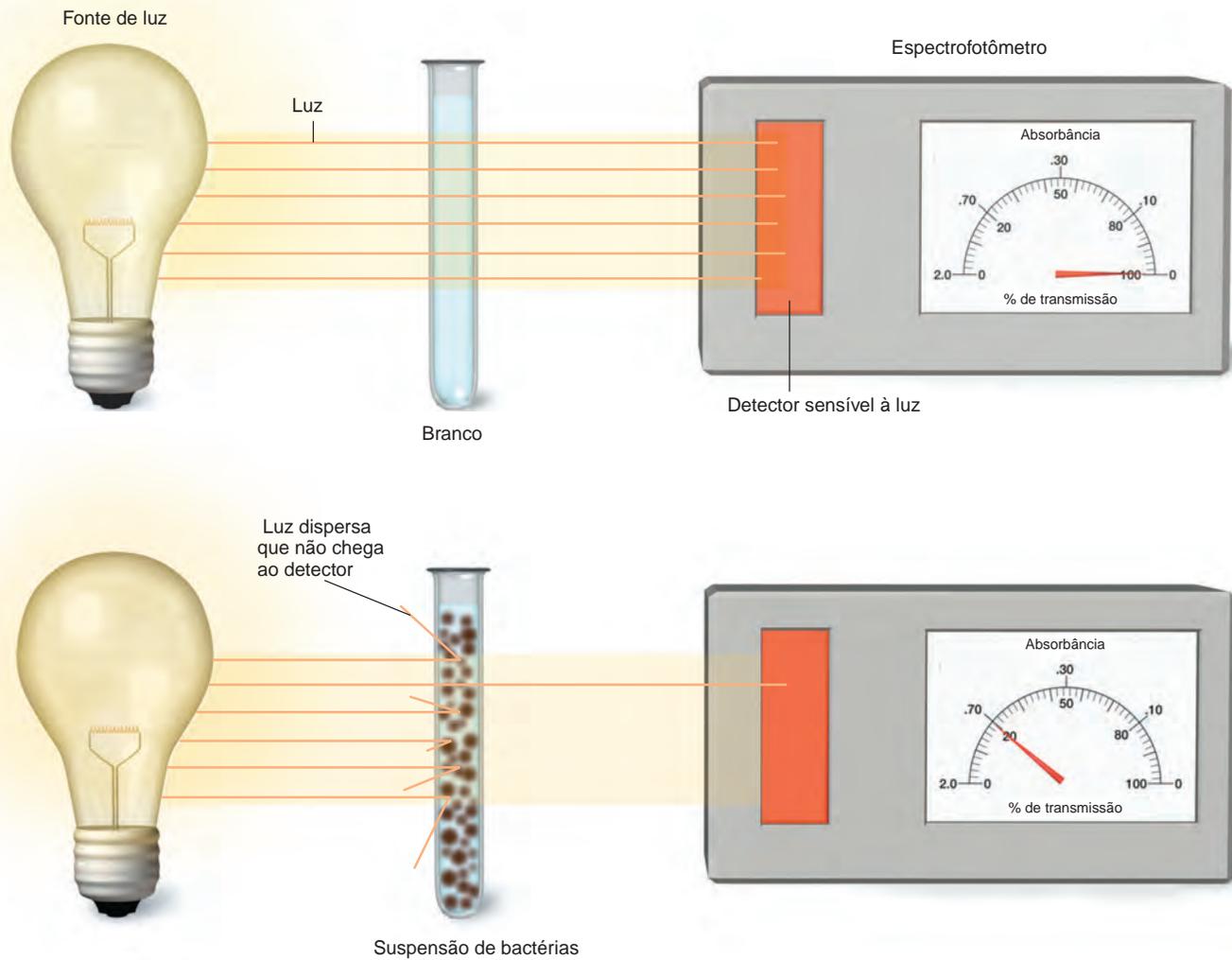


Figura 6.21 Determinação do número de bactérias por turbidimetria. A quantidade de luz que chega ao detector sensível à luz no espectrofotômetro é inversamente proporcional ao número de bactérias sob condições padronizadas. Quanto menos luz é transmitida, mais bactérias estão presentes na amostra. A turbidez da amostra pode ser expressa como sendo de 20% de transmissão ou de 0,7 de absorbância. As leituras de absorbância são uma função logarítmica e algumas vezes úteis para a realização de um gráfico.

P A turbidimetria é um método direto ou indireto de medir o crescimento bacteriano?

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Métodos diretos geralmente requerem um tempo de incubação para obter colônias. Por que isso não é sempre viável para a análise de alimentos? **6-17**
- ✓ Se não existe um método adequado para analisar a quantidade de vitamina de um produto, qual então seria o melhor método para determinar essa quantidade? **6-18**

Você adquiriu um conhecimento básico sobre os fatores para o crescimento microbiano e como ele pode ser medido. No Capítulo 7, analisaremos como este crescimento é controlado em laboratórios, hospitais, indústrias e em nossas casas.