



GOVERNO DO  
ESTADO DO CEARÁ  
*Secretaria da Educação*

ESCOLA ESTADUAL DE  
EDUCAÇÃO PROFISSIONAL - EEEP  
ENSINO MÉDIO INTEGRADO À EDUCAÇÃO PROFISSIONAL

CURSO TÉCNICO EM BIOTECNOLOGIA

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL





**GOVERNO DO  
ESTADO DO CEARÁ**  
*Secretaria da Educação*

**GOVERNADOR**  
Camilo Santana

**VICE-GOVERNADORA**  
Maria Izolda Cela de Arruda Coelho

**SECRETÁRIO DA EDUCAÇÃO**  
Maurício Holanda Maia

**SECRETÁRIO ADJUNTO DA EDUCAÇÃO**  
Armando Amorim Simões

**SECRETÁRIA EXECUTIVA DA EDUCAÇÃO**  
Antonia Dalila Saldanha de Freitas

**COORDENADORA DO GABINETE**  
Maria da Conceição Avila de Mesquita Viñas

**COORDENADORIA DA EDUCAÇÃO PROFISSIONAL**  
Marta Emília Silva Vieira



## **Apostila de Microbiologia Industrial**

I – Elementos da Microbiologia .....	2
1. Introdução .....	2
2. Morfologia e estrutura de micro-organismos.....	11
3. Nutrição Microbiana e Meios de Cultura.....	20
5. Crescimento Microbiano.....	26
6. Controle de micro-organismos pela ação de agentes químicos e físicos .....	30
II – Técnicas Básicas .....	37
1. Preparo de meios de Cultura .....	37
2. Técnicas de Assepsia .....	41
3. Métodos de inoculação .....	43
4. Culturas Puras .....	45
5. Quantificação de micro-organismos .....	46
6. Coloração de micro-organismos .....	48
III – Genética de micro-organismos .....	50
1. Conceitos Básicos .....	50
2. Mutações .....	51
Referências Bibliográficas.....	56

## **I – Elementos da Microbiologia**

### **1. Introdução**

A ciência da microbiologia abrange dois temas: (1) o entendimento dos processos básicos da vida, e (2) a aplicação de nosso entendimento acerca da microbiologia para benefício da humanidade. Como uma ciência biológica básica, a microbiologia utiliza e desenvolve ferramentas para a análise dos processos fundamentais da vida. Os cientistas foram capazes de adquirir um conhecimento sofisticado sobre a base química e física da vida a partir dos estudos dos micro-organismos devido ao fato de as células microbianas compartilharem várias características com as células de organismos multicelulares; de fato, todas as células apresentam muito em comum.

Além disso, as células microbianas podem crescer em meios de cultura artificiais, atingindo densidades extremamente altas, tornando-as prontamente disponíveis ao estudo bioquímico e genético. Essas propriedades tornam os micro-organismos excelentes modelos para o entendimento dos processos celulares em organismos multicelulares, incluindo os seres humanos.

Como uma ciência biológica aplicada, a microbiologia lida com vários problemas práticos importantes da medicina, agricultura e indústria. Por exemplo, a maioria das doenças de animais e plantas é causada por micro-organismos. Os micro-organismos desempenham papéis importantes como agentes de fertilização do solo e na base da produção a partir de animais domésticos. Muitos processos industriais em larga escala, como a produção de antibióticos e proteínas humanas, são amplamente baseados em micro-organismos. Assim, tanto os aspectos prejudiciais como os benéficos dos micro-organismos afetam a vida diária dos seres humanos.

Os micro-organismos desempenham papéis centrais nas atividades humanas e em toda a vida na Terra. Embora os micro-organismos sejam as menores formas de vida, eles constituem, coletivamente, a maior massa de matéria viva na Terra e realizam muitos processos químicos necessários a outros organismos. Na ausência de micro-organismos, outras formas de vida jamais teriam surgido e, atualmente, não poderiam ser mantidas. De fato, o oxigênio que respiramos é resultante da atividade microbiana realizada no passado (Figura 1.1).

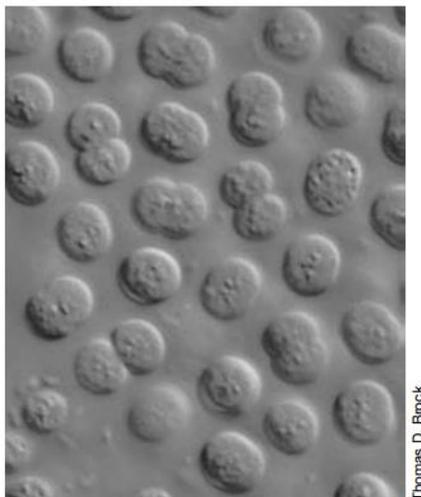


Figura 1.1 – As cianobactérias foram os primeiros organismos produtores de O<sub>2</sub> na terra, portanto, as responsáveis pela oxigenação da atmosfera.

Além disso, veremos como os seres humanos, as plantas e os animais estão intimamente associados às atividades microbianas na reciclagem de nutrientes essenciais e na degradação de matéria orgânica. Nenhuma outra forma de vida é tão importante para a sustentação e manutenção da vida na Terra quanto os micro-organismos. Os micro-organismos já existiam na Terra há bilhões de anos antes do surgimento das plantas e animais, sendo que a diversidade da vida microbiana é significativamente maior do que aquela de plantas e animais.

Essa enorme diversidade é responsável por algumas das propriedades espetaculares dos micro-organismos. Por exemplo, veremos como os micro-organismos são capazes de viver em ambientes inadequados a outros organismos e como as capacidades fisiológicas diversas dos micro-organismos os posicionam como os primeiros químicos da Terra. Acompanharemos a história evolutiva dos micro-organismos e veremos que três grandes grupos celulares podem ser diferenciados a partir de suas relações evolutivas.

Os micro-organismos foram as primeiras formas de vida na Terra a exibir características básicas de sistemas vivos. Vimos anteriormente que as cianobactérias abriram o caminho para a evolução de outras formas de vida, a partir da produção de oxigênio na atmosfera terrestre. No entanto, muito antes das cianobactérias surgirem na Terra, o planeta já encontrava-se pulsando com vida, e diversas comunidades de micro-organismos encontravam-se amplamente disseminadas.

## Breve Histórico da Microbiologia

Os micro-organismos ou micróbios foram descritos pela primeira vez pelo microscopista holandês Anton van Leeuwenhoek no período compreendido entre 1670 a 1680. No entanto, permaneceram na obscuridade ou como meras curiosidades até meados do século XIX, quando Louis Pasteur, considerado o Pai da Microbiologia, e Robert Koch através de experimentos elegantes e clássicos deram à microbiologia a importância devida, fundando-a como ciência e disciplina.

Embora a existência de criaturas pequenas, invisíveis a olho nu, tenha sido especulada há muitos anos, sua descoberta está associada à invenção do microscópio. Robert Hooke (1635- 1703), um matemático e historiador natural inglês, também foi um excelente microscopista. Em seu famoso livro, *Micrographia* (1665), o primeiro livro dedicado às observações microscópicas, Hooke ilustrou, dentre vários outros temas, as estruturas de frutificação de bolores (Figura 1.1). Essa foi a primeira descrição conhecida de micro-organismos.

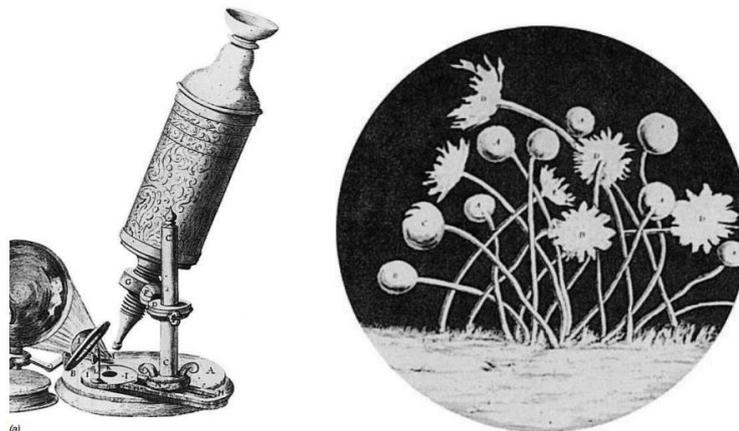


Figura 1.2 – Robert Hooke e um microscópio antigo. Na esquerda, ilustração do microscópio utilizado por Robert Hooke em 1664. Na direita, um desenho de Robert Hooke. Este desenho, publicado em *Micrographia*, em 1665, corresponde à primeira descrição de um micro-organismo. O organismo é um bolor azulado crescendo em uma superfície de couro. As estruturas arredondadas (esporângios) contêm os esporos do bolor.

A primeira pessoa a visualizar bactérias foi o comerciante e construtor holandês amador de microscópios Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723). Em 1684, van Leeuwenhoek, que conhecia o trabalho de Hooke, utilizou microscópios extremamente

simples, de sua própria construção (Figura 1.3), para examinar o conteúdo microbiano de uma variedade de substâncias naturais. Os microscópios de Leeuwenhoek eram rudimentares, quando comparados aos padrões atuais, mas, pela manipulação e focalização precisas, ele foi capaz de visualizar bactérias, micro-organismos consideravelmente menores que bolores. Ele descobriu as bactérias em 1676, enquanto estudava infusões aquosas de pimenta. Ele relatou suas observações em uma série de cartas enviadas à prestigiosa Royal Society of London (Sociedade Real de Londres), que as publicou em 1684, em uma versão em inglês. Desenhos de alguns “pequenos animálculos”, como van Leeuwenhoek os referia, estão ilustrados na Figura 1.3.



Figura 1.3 - O microscópio de van Leeuwenhoek, uma réplica, e seus desenhos de representando bactérias, publicados em 1684.

Durante a segunda metade do século XIX, importantes avanços foram realizados na nova ciência da microbiologia, principalmente devido à atenção dada a duas importantes questões que surgiram na biologia e medicina naquela época: (1) o questionamento a respeito da geração espontânea e (2) da natureza das doenças infecciosas. Respostas a essas questões emergiram a partir do trabalho de dois gigantes no novo campo da microbiologia: o químico francês Louis Pasteur e o médico alemão Robert Koch.

O conceito de geração espontânea existe desde os tempos bíblicos. A ideia básica da geração espontânea pode ser facilmente entendida. Por exemplo, se um alimento for deixado de lado por algum tempo, apodrecerá. Quando o material putrefato for examinado ao microscópio, exibirá enorme quantidade de bactérias e, talvez, até mesmo organismos superiores como larvas e vermes. De onde surgiram esses organismos que não estavam aparentes no alimento fresco?

Algumas pessoas afirmavam que eles se desenvolveram a partir de sementes ou germes que penetraram no alimento pelo ar. Outros diziam que eles surgiram espontaneamente, a partir de matérias inanimadas, isto é, por geração espontânea. Quem estava correto?

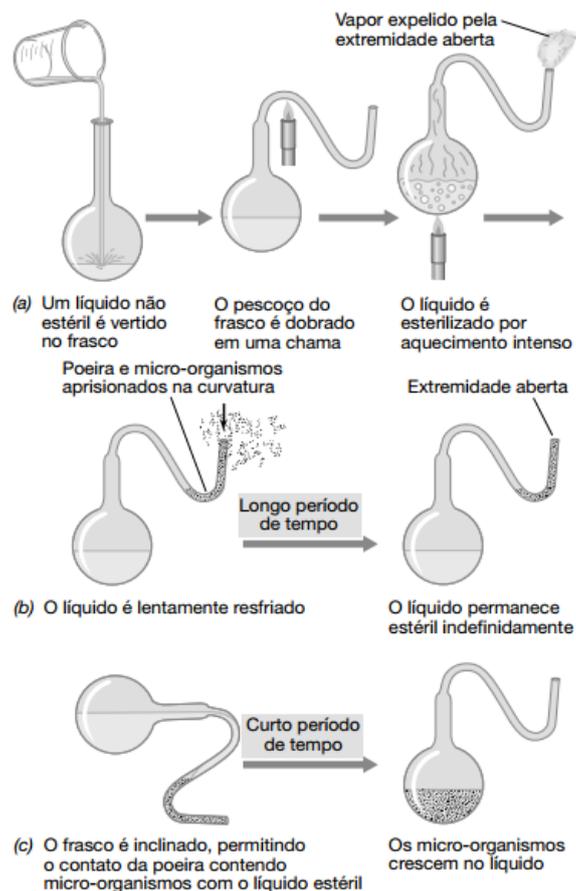
Essa controvérsia requeria uma percepção aguçada para sua solução, e este foi exatamente o tipo de problema que atraiu o interesse de Louis Pasteur. Pasteur era um oponente poderoso à teoria da geração espontânea. Após suas descobertas a respeito da fermentação, Pasteur demonstrou que micro-organismos muito semelhantes àqueles observados em materiais em putrefação podiam ser encontrados no ar. Pasteur concluiu que os organismos encontrados em materiais em putrefação originavam-se de micro-organismos presentes no ar e nas superfícies dos recipientes que continham os materiais.

Ele postulou que as células estavam constantemente sendo depositadas sobre todos os objetos, sendo capazes de crescer quando as condições eram favoráveis. Além disso, Pasteur considerou que, se o alimento fosse tratado de modo a destruir todos os organismos vivos que o contaminavam, isto é, se fosse tornado estéril, e então protegido da contaminação adicional, não apodreceria. Pasteur utilizou o calor para eliminar os contaminantes.

Outros pesquisadores demonstraram que, se uma solução nutriente fosse selada em um frasco de vidro e aquecida até a fervura por vários minutos, não permitiria o crescimento microbiano (obviamente, somente se endósporos não estivessem presentes). O ato de matar todas as bactérias ou outros organismos presentes em objetos ou em sua superfície é um processo que atualmente denominamos esterilização. Aqueles que propunham a geração espontânea criticavam tais experimentos, declarando que o “ar fresco” era necessário para a ocorrência do fenômeno. Alegavam que a fervura afetava de alguma forma o ar existente no frasco selado, de modo que este não permitia a geração espontânea.

Em 1864, Pasteur refutou esta objeção de forma simples e brilhante, ao construir um frasco com pescoço de cisne, atualmente denominado frasco de Pasteur (Figura 1.4). Em tal tipo de frasco, as soluções nutrientes podiam ser aquecidas até a ebulição e esterilizadas. No entanto, após o resfriamento do frasco, a re-entrada de ar era permitida, porém as curvas no pescoço (o formato em “pescoço de cisne”) impediam a entrada de matéria particulada (contendo os micro-organismos) no corpo principal do frasco, o que causaria a putrefação. O caldo esterilizado em um frasco de Pasteur não

sofria putrefação e os micro-organismos jamais surgiam no frasco enquanto não houvesse contato entre o pescoço e o líquido estéril. No entanto, se o frasco fosse inclinado de modo a permitir o contato do líquido estéril com o pescoço contaminado do frasco, ocorria a putrefação e logo o líquido apresentava inúmeros micro-organismos. Esse experimento simples encerrou efetivamente a controvérsia sobre a geração espontânea, permitindo que a ciência da microbiologia avançasse a passos firmes. Casualmente, o trabalho de Pasteur também levou ao desenvolvimento de procedimentos eficientes de esterilização, os quais foram refinados e estendidos às pesquisas microbiológicas tanto básicas como aplicadas. A ciência dos alimentos também deve muito a Pasteur, uma vez que seus princípios são atualmente aplicados no envasamento e na preservação do leite e outros alimentos (pasteurização).



1.4 – Derrota da geração espontânea: o experimento de Pasteur empregando o frasco com pescoço de cisne. (a) Esterilização do conteúdo do frasco. (b) Se o frasco permanecesse na posição vertical, não ocorria crescimento microbiano. (c) Se os micro-organismos aprisionados no pescoço atingissem o líquido estéril, havia o crescimento microbiano.

### **ALGUNS MARCOS:**

- **Robert Koch (1843-1910):** Descobriu a etiologia do Antraz, fez o primeiro isolamento bacteriano e descobriu e isolou o bacilo causador da tuberculose. Desenvolveu o primeiro tratamento contra a tuberculose, revolucionou a medicina para diagnóstico e tratamento de doenças e aumentou a expectativa de vida em décadas.
- O conhecimento do processo biológico da fermentação (Pasteur);
- O desenvolvimento da teoria das doenças causadas por micro-organismos (Pasteur e Robert Koch);
- O desenvolvimento de vacinas a partir do bacilo do carbúnculo (*Bacillus anthracis*) morto e do vírus da raiva (Pasteur) atenuado ou enfraquecido.
- O desenvolvimento dos métodos de isolamento de micro-organismos e cultivo na forma de cultura pura em meio nutritivo (Pasteur, Koch, Julius Petri e Frau Hesse);
- O estabelecimento de um procedimento científico para provar a teoria das doenças causadas por micro-organismos, conhecido como postulados de Koch (Figura 1.5):
  - O mesmo patógeno deve estar presente em todos os casos da doença;
  - O patógeno deve ser isolado do hospedeiro doente e crescer em cultura pura;
  - O patógeno da cultura pura deve causar a doença quando inoculado em um animal de laboratório saudável e susceptível;
  - O patógeno deve ser isolado do animal inoculado e é preciso demonstrar que ele é o organismo original;

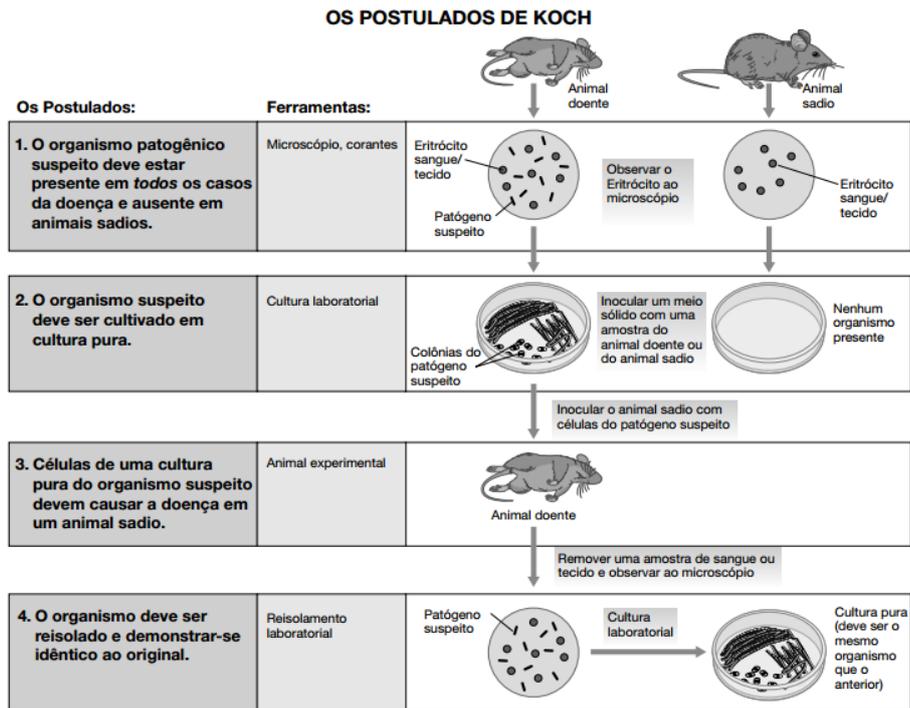


Figura 1.4 - Postulados de Koch para provar que um micro-organismo específico causa uma doença específica.

- 1796 – Edward Jenner, médico britânico, iniciou um experimento com ordenhadeiras de vacas para encontrar uma maneira de proteger as pessoas da varíola, processo que ficou conhecido como vacinação;
- 1835 – Agostino Bassi, microscopista amador, provou que uma doença do bicho da seda era provocada por fungos;
- 1840 – O médico húngaro Ignaz Semmelweis alertava que médicos que não desinfetavam as mãos, costumeiramente transmitiam infecções de uma paciente para outra;
- 1860 – Joseph Lister, cirurgião inglês, aplicou a teoria do germe para procedimentos médicos e começou a indicar o uso de fenol (ácido carbólico) em solução para tratar ferimentos cirúrgicos, o que reduziu drasticamente as infecções e mortes no ambiente hospitalar;
- 1865 – Pasteur, descobriu uma outra doença do bicho da seda provocada por um protozoário e desenvolveu um método de identificação das larvas do bicho da seda contaminadas;

- 1866 – Ernst Haeckel, classificou os seres vivos em animais, vegetais e protistas (seres unicelulares);
- 1882-1883 – Robert Koch descobriu o causador da tuberculose, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e isolou o *Vibrio cholerae* de pacientes com cólera;
- 1892 – Sergei Winogradsky isolou e estudou as bactérias do ciclo do enxofre;
- 1910 – Carlos Chagas, médico brasileiro, isolou e caracterizou o protozoário *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de chagas;
- 1928 – Alexander Fleming e colaboradores (Chain e Florey) descobriram e produziram o antibiótico penicilina, sintetizado pelo fungo *Penicillium notatum*;
- 1969 – Robert Whittaker criou o sistema de cinco reinos (plantae, animalia, protista, fungi e monera para as bactérias), com base em análises da morfologia da célula e na forma de nutrição dos seres vivos;
- 1978 – Carl Woese e colaboradores, com base na análise do RNA ribossomal de diferentes células, propuseram o estabelecimento da classificação dos seres vivos em três domínios: *Eucaria*, *Eubacteria* e *Archaea*.

## 2. Morfologia e estrutura de micro-organismos

Em microbiologia, o termo morfologia refere-se à forma celular. São conhecidas várias morfologias entre os procariotos, sendo as mais comuns descritas por termos que são parte do vocabulário essencial do microbiologista. As bactérias apresentam vários tipos morfológicos, podem ser classificadas cocos (forma esférica), bacilos (forma de bastonete), espirilos (forma espiralada) e os víbrios (forma de vírgula), dentre outros (Figura 2.1). Mas o que determina a forma de uma bactéria?

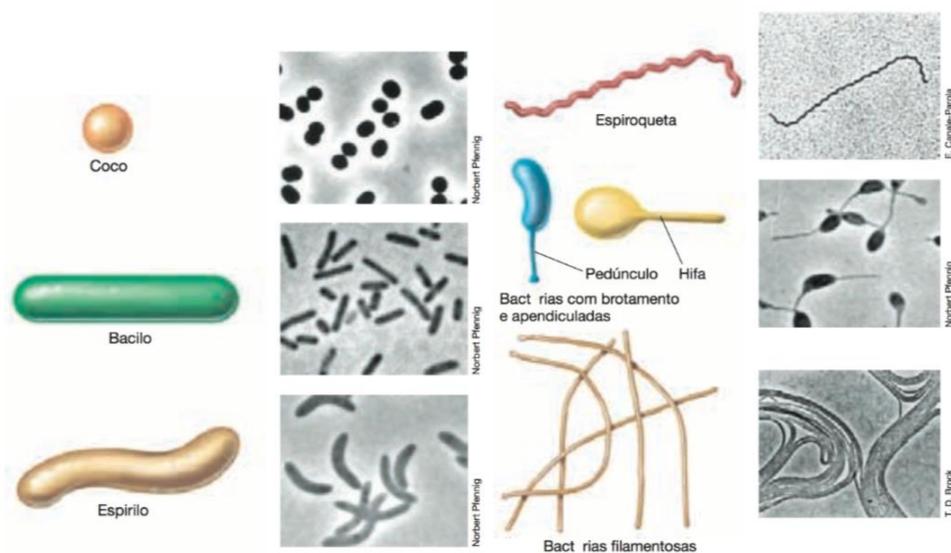


Figura 2.1 – Morfologias celulares representativas de procariotos.

Não há uma resposta definitiva. Várias forças seletivas que podem influenciar na forma, como: melhoria na captação de nutrientes; mobilidade natatória ou motilidade por deslizamento; que são características genéticas direcionadas para melhorar a adequação da espécie em um ambiente particular.

Uma bactéria de morfologia esférica ou ovulada é denominada coccó. Uma bactéria exibindo forma cilíndrica é denominada bacilo. Alguns bacilos são torcidos, assumindo formas espiraladas e são denominadas espirilos. As células de várias espécies procarióticas permanecem unidas em grupos ou conjuntos após a divisão celular e frequentemente, os arranjos são característicos de determinados gêneros. Por exemplo, alguns cocos formam longas cadeias (*Streptococcus*), outros são encontrados como cubos tridimensionais (*Sarcina*) e ainda outros, em conjuntos semelhantes a um cacho de uvas (*Staphylococcus*).

Os procariotos variam em tamanho, desde células muito pequenas, com diâmetro de aproximadamente  $0,2\mu\text{m}$ , até aquelas com mais de  $700\mu\text{m}$ . Velocidade de difusão de

nutrientes e excretas é inversamente proporcional ao tamanho, portanto quanto menor o organismo, mais rápida será essa difusão. Em células de pequenas dimensões, a diferença na razão Superfície/Volume se manifesta sob a forma de maior velocidade de crescimento. A taxa de mutações é maior que em células eucarióticas devido à velocidade de replicação do DNA e quanto maior o número de mutações, maior a capacidade evolutiva, enquanto que células diplóides mascaram o efeito das mutações pela cópia não mutada do gene. Por isso, os micro-organismos conseguem se adaptarem às condições inicialmente adversas, tornando-se interessantes organismos para estudo biotecnológicos.

### Membrana Citoplasmática

É uma estrutura delgada que envolve a célula. Embora muito delgada, essa estrutura vital corresponde à barreira que separa o interior da célula de seu ambiente. Caso a membrana seja rompida, a integridade celular é destruída, havendo o extravasamento do citoplasma para o ambiente, levando a célula à morte. A membrana é também uma barreira de permeabilidade altamente seletiva, que confere à célula a capacidade de concentrar metabólitos específicos e excretar dejetos.

A estrutura é formada por uma bicamada fosfolipídica. Os fosfolipídeos contêm componentes hidrofóbicos (ácidos graxos) e hidrofílicos (glicerol-fosfato), podendo ser encontrados sob diferentes formas químicas. Como os fosfolipídeos agregam-se em uma solução aquosa, eles naturalmente formam estruturas bicamadas (Figura 2.2).

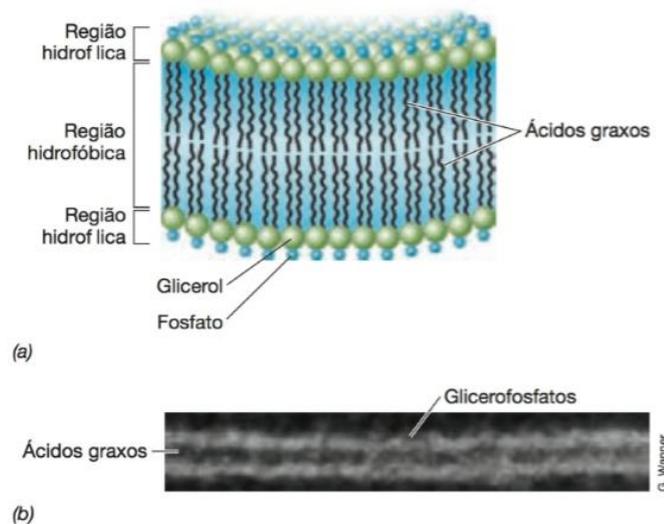


Figura 2.2 – Estrutura de uma bicamada fosfolipídica.

Uma das principais diferenças entre eucariotos e procariotos em relação à composição da membrana citoplasmática está no fato de eucariotos apresentarem esteróis em suas membranas. Os esteróis estão ausentes nas membranas de quase todos os procariotos. Dependendo do tipo celular, os esteróis podem corresponder de 5% a 25% dos lipídeos totais de membranas eucarióticas. Os esteróis são moléculas planas e rígidas, enquanto os ácidos graxos são flexíveis. A presença de esteróis em uma membrana confere resistência e estabilidade. Moléculas similares aos esteróis, denominadas hopanóides, estão presentes nas membranas de muitas bactérias, onde provavelmente exerçam papel similar àquele dos esteróis em células eucarióticas.

Os lipídeos de membrana de *Archaea* diferem daqueles de *Bacteria* e *Eukarya*. Eles apresentam ligações éter entre o glicerol e suas cadeias laterais hidrofóbicas. Além disso, os lipídeos de *Archaea* são desprovidos de ácidos graxos. Em vez disso, as cadeias laterais são compostas por unidades repetitivas do hidrocarboneto de 5 carbonos, o isopreno, formando o fitanil. No interior de uma membrana essa estrutura origina uma membrana lipídica em monocamada, que é bastante resistente à separação. As membranas em monocamadas são amplamente distribuídas em *Archaea* hipotermófilas, capazes de crescer em temperaturas extremamente elevadas, nas quais o calor poderia separar as bicamadas lipídicas. A membrana plasmática tem as seguintes funções (Figura 2.3):

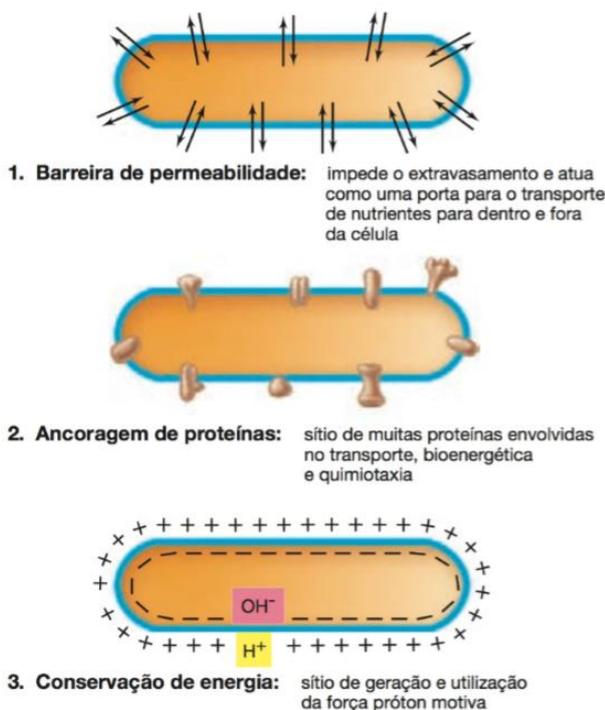


Figura 2.3 – As principais funções da membrana citoplasmática.

## Parede Celular

Devido à alta concentração de solutos dissolvidos no interior de uma célula bacteriana, é estabelecida uma pressão de turgor considerável, estimada em cerca de 2 ATM, o que equivale à pressão de um pneu. Para suportar pressões dessa natureza, as bactérias apresentam paredes celulares, que também atuam conferindo rigidez e mantendo a forma da célula.

Os procariotos do domínio *Bacteria* podem ser divididos em dois grandes grupos, denominados gram-positivos e gram-negativos. Embora essa distinção tenha sido originalmente baseada em um procedimento especial de coloração – coloração de gram – as diferenças entre os dois grupos residem na estrutura da parede celular. Elas exibem acentuada diferença e podem ser observadas na Figura 2.4.

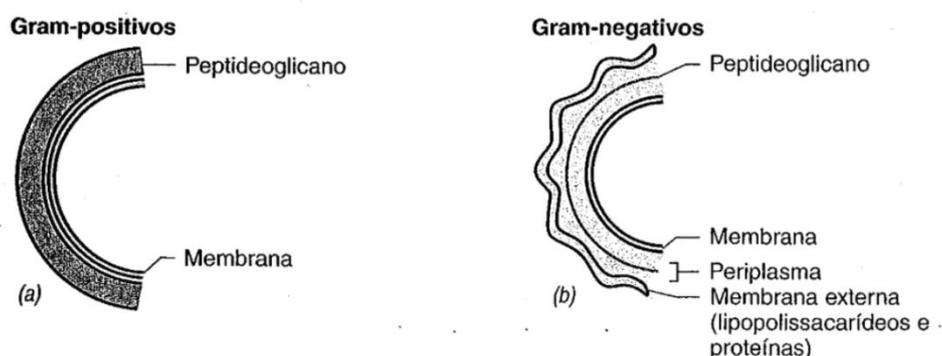


Figura 2.4 – Parede celular de *Bacteria*.

A parede celular de gram-negativos é mais complexa e formada por várias camadas, enquanto que em gram-positivos ela é mais espessa e consiste em um único tipo de molécula. As paredes celulares de *Bacteria* apresentam uma camada espessa, primariamente responsável pela rigidez dessa estrutura. As gram-negativas apresentam ainda camadas adicionais, localizadas externamente a essa camada rígida. A camada rígida apresenta composição química similar em gram-positivas e negativas, sendo denominada peptidoglicano (mureína).

Em gram-positivas, cerca de 90% da parede celular corresponde ao peptidoglicano, embora outro tipo de constituinte, o ácido teicóico, também seja normalmente encontrado. O ácido teicóico regula o fluxo de cátions para dentro e fora da célula. Em gram-negativas, apenas 10% da parede corresponde ao peptidoglicano, sendo a parede composta predominantemente pela membrana externa, composta por lipopolissacarídeo (LPS). Essa camada corresponde a uma segunda bicamada lipídica,

diferenciando-se da membrana plasmática por apresentar polissacarídeos e proteínas (as porinas, que controlam entrada e saída de substâncias).

Em *Archaea*, a parede celular é formada por um polissacarídeo muito semelhante ao peptídeoglicano, denominado pseudopeptídeoglicano. Algumas espécies de *Archaea* não apresentam parede com peptídeoglicano, sendo composta por polissacarídeos, glicoproteínas ou proteínas.

## **Estruturas externa à célula bacteriana**

### **Glicocálix**

Muitos organismos procarióticos secretam compostos limosos ou viscosos em suas superfícies. Várias dessas estruturas são de natureza polissacarídica, enquanto poucas têm natureza protéica. Os termos cápsula e camada limosa são frequentemente empregados para descrever camadas polissacarídicas, o termo mais abrangente, glicocálix, é também utilizado. O glicocálix é definido como um material de natureza polissacarídica, depositado externamente à células. Além da composição destas camadas ser muito variável nos diferentes organismos, estas podem ser espessas ou delgadas, rígidas ou flexíveis, de acordo com sua natureza química. As camadas rígidas são organizadas em uma matriz compacta, que exclui partículas como a tinta nanquim, tal forma é referida como cápsula. Quando o glicocálix é mais frouxo, incapaz de excluir partículas e de visualização mais difícil, é referido como camada limosa.

As camadas de glicocálix apresentam várias funções nas bactérias. Camadas polissacarídicas externas desempenham importante papel na aderência de certos micro-organismos patogênicos a seus hospedeiros. Os micro-organismos patogênicos podem penetrar no corpo de animais por meio de vias específicas, sendo o processo mediado por reações de ligação entre componentes da superfície celular (como o glicocálix) e tecidos específicos do hospedeiro.

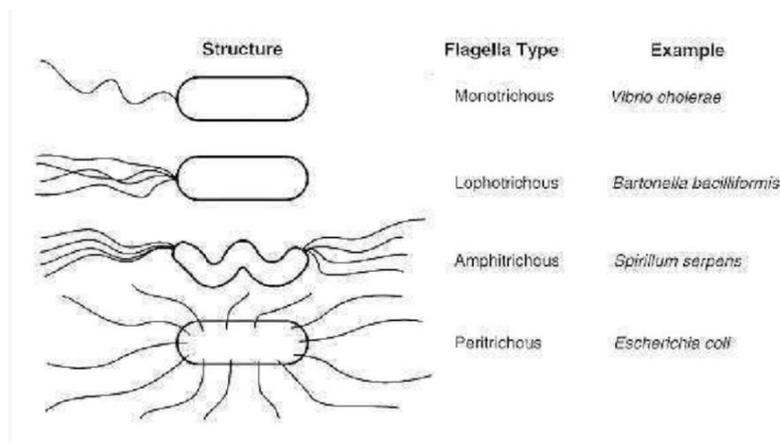
O glicocálix desempenha ainda outros papéis. Algumas evidências indicam que bactérias capsuladas são mais dificilmente reconhecidas e destruídas por células fagocitárias do sistema imune, Além disso, como as camadas polissacarídicas externas provavelmente se associam a quantidades significativas de água, acredita-se que o glicocálix possa conferir certa resistência à dessecação.

## Flagelos

Os flagelos bacterianos correspondem a apêndices longos e finos, ligados à célula por uma de suas extremidades. São tão finos (cerca de 20nm) que é impossível a visualização de um único destes ao microscópio óptico. Somente após procedimentos de coloração específicos para flagelos ( que aumentam seu diâmetro) essas estruturas se tornam observáveis. É possível encontrar flagelos em diferentes arranjos nas bactérias (Figura 2.5).

Na flagelação polar (monotríquio), os flagelos encontra-se ligados a uma ou a ambas extremidades da célula. Ocasionalmente, um tufo de flagelos pode ser encontrados em uma das extremidades, originando um arranjo denominado lofotríquio. Os flagelos amfitríquios estão dipostos como tufos em dois polos celulares. Na flagelação peritríquia, os flagelos encontram-se inseridos em vários pontos ao redor da célula bacteriana. Além de conferir motilidade, os diferentes arranjos apresentados pelos flagelos correspondem a uma das características utilizadas na classificação das bactérias.

Tufos de flagelos podem ser observados em células vivas, pela microscopia de campo escuro, em que os flagelos aparecem como estruturas claras associadas às células brilhantes contra um fundo escuro. Em procariontos extremamente grandes, também é possível observar tufos de flagelos por meio de microscopia de contraste de fase.



2.5 – Fotomicrografias ópticas de procariontos que apresentam diferentes arranjos flagelares. (a) Peritríquio, (b) Polar e (c) Lofotríquio.

## Respostas Comportamentais

Embora nem todos os procariontos sejam móveis, muitos exibem tal comportamento. Desse modo, é razoável considerar que a motilidade confere uma

vantagem seletivas sob certas condições ambientais. Frequentemente, os procariotos encontram gradientes físicos e químicos na natureza, com a maquinaria de motilidade respondendo de maneira positiva ou negativa a esses gradientes, promovendo a movimentação da célula na direção ou afastando-a da molécula sinalizadora, respectivamente. Tais tipos de movimentos direcionados são denominados taxia, havendo uma variedade dessas respostas em micro-organismos. A quimiotaxia é uma resposta a agentes químicos, enquanto a fototaxia corresponde a uma resposta à luz; os dois processos são bastante conhecidos. A quimiotaxia foi bastante estudada em bactérias capazes de se locomover em meios líquidos (natatórias). A maneira pela qual os sinais químicos do meio externo são transmitidos ao aparelho flagelar é bastante conhecida em nível genético.

### **Pili**

Os pili se assemelham estruturalmente às fímbrias, sendo em geral mais longos e presentes em uma ou poucas cópias, na superfície celular. Tais estruturas podem ser facilmente observadas ao microscópio eletrônico, pois, como são receptores de certos tipos de partículas virais, tem seu diâmetro aumentado quando se encontram revestidas pelo vírus. Fortes evidências indicam que os pili estão envolvidos no processo de conjugação. Os pili podem também participar dos processos de aderência em tecidos humanos por algumas bactérias patogênicas.

### **Fímbrias**

As fímbrias são consideravelmente mais curtas e mais numerosas que os flagelos, porém, como os flagelos, consistem em proteínas. Embora as funções das fímbrias não sejam claramente conhecidas, fortes evidências sugerem que estas conferem capacidade de adesão microbiana às superfícies, incluindo tecidos animais no caso de algumas bactérias patogênicas ou de formação de películas ou biofilmes em superfícies.

### **Endósporo**

Algumas espécies de bactérias, quando submetidas a condições ambientais desfavoráveis, como escassez de nutrientes ou de água, são capazes de formar estruturas denominadas esporos, ou endósporos (do grego, endos, dentro), por um processo denominado esporulação, ou esporogênese.

Um esporo resulta de desidratação da célula bacteriana e da formação de uma parede grossa e resistente em todo o citoplasma desidratado. Dessa forma, o esporo consegue suspender completamente a sua atividade metabólica, sobrevivendo a situações adversas como calor intenso e falta de água.

No processo de formação do esporo, o cromossomo duplica-se e uma das cópias cromossômicas produzidas é isolada do restante da célula e envolta por uma membrana plasmática, o ácido dipicolínico. Esse ácido é exclusivo do processo de esporulação e é responsável pela forma estrutural do mesmo, juntamente com o cálcio. Após isso, há a formação de uma grossa parede em torno dessa membrana, constituindo o esporo (assim chamado porque se forma dentro da célula). A outra porção do conteúdo celular é degradada e a parede é rompida, libertando o esporo. Em ambiente propício, o esporo se reidrata, reconstituindo uma nova bactéria, que passa a reproduzir-se por fissão binária.

Os esporos bacterianos são muito relevantes para áreas de Medicina e indústria alimentícia, principalmente pelo fato de serem resistentes ao calor e à esterilização química, quando comparados com células em estado vegetativo, podendo contaminar alimentos e, conseqüentemente, provocar doenças. Uma das formas de eliminar definitivamente os esporos é a autoclavagem, técnica pela qual materiais como roupas, alguns alimentos, instrumentos hospitalares e laboratoriais são tratados com vapor de água em elevadas temperaturas (acima de 120°C) durante um período de, no mínimo, 20 minutos, num aparelho denominado autoclave. Materiais que não podem ser submetidos à autoclavagem, como alimentos e materiais que não resistem a altas temperaturas, podem ser esterilizados por meio da irradiação.

Para combater a germinação de esporos e conservar os alimentos, são utilizadas substâncias conhecidas como conservantes químicos. Essas substâncias são, geralmente, ácidos orgânicos simples, tais como o ácido sórbico e o ácido benzoico. Dentre as bactérias de interesse econômico que formam esporos, pode-se mencionar o *Bacillus anthracis*, uma bactéria anaeróbia facultativa que causa a doença conhecida como antraz em gado bovino, ovino e equino, podendo eventualmente ser transmitida também a seres humanos. Seus esporos podem permanecer durante anos nas pastagens, infectando o gado.

Outras bactérias formadoras de esporos, importantes para a humanidade, são as do gênero *Clostridium*. Essas são anaeróbias obrigatórias e provocam doenças como tétano (*Clostridium tetani*), a gangrena gasosa (causada por *Clostridium perfringens*) e o botulismo (*Clostridium botulinum*). Essa última doença bacteriana é

transmitida por alimentos industrializados mal esterilizados (conservas, embutidos, enlatados). Nas condições anaeróbias em que o alimento se encontra, os esporos germinam e originam populações de bactérias, que produzem a toxina botulínica, letal se ingerida.

### **Exercício**

1. O que determina a forma de uma célula bacteriana?
2. Quais os tipos celulares bacterianos?
3. Quais os arranjos celulares bacterianos?
4. Cite as vantagens dos micro-organismos serem pequenos.
5. Cite as estrutura externa à parede celular e a função principal de cada uma.
6. Qual a diferença de uma bactéria gram-positiva para uma gram-negativa?
7. Diferencie a membrana de *Bacteria* e *Archaea*.
8. Por que uma célula bacteriana forma esporos? Quais sua características?

### 3. Nutrição Microbiana e Meios de Cultura

As células consistem principalmente em macromoléculas e água. As macromoléculas são compostas por unidade menores, os monômeros. Assim, a nutrição microbiana pode ser definida como um mecanismo que fornece às células as ferramentas químicas necessárias à síntese dos diversos monômeros. Essas ferramentas químicas correspondem aos nutrientes. Organismos distintos requerem diferentes conjuntos de nutrientes, sendo geralmente necessário sob uma ou outra forma específica. Nem todos os nutrientes são necessários nas mesmas quantidades; alguns, denominados macronutrientes, são necessários em grandes quantidades. Em contrapartida, outros nutrientes, os micronutrientes, são requeridos em menores quantidades, muitas vezes apenas traços, denominados elementos-traço.

Meios de cultura correspondem a soluções nutrientes utilizadas para promover o crescimento microbiano em laboratório. Existem duas grandes classes de meios de cultura utilizados em microbiologia: os quimicamente definidos e os indefinidos (complexos). Os meios quimicamente definidos são preparados pela adição de quantidades precisas de compostos químicos inorgânicos ou orgânicos altamente purificados a uma determinada quantidade de água destilada. Assim, a composição química exata de um meio definido é conhecida.

Em muitos casos, no entanto, o conhecimento preciso da composição de um meio não é crítico. Nessas condições, os meios complexos podem ser suficientes ou até mesmo vantajosos, por várias razões. Os meios complexos frequentemente empregam produtos da digestão de caseína, de carne, de soja, de levedura ou de várias outras substâncias altamente nutritivas. Tais produtos de digestão encontram-se disponíveis comercialmente na forma de pós, que podem ser pesados e prontamente dissolvidos em água destilada, originando um meio de cultura.

Uma vez que um meio de cultura tenha sido preparado, este pode ser inoculado (isto é, acrescido de organismos) e incubado em condições que permitam o crescimento microbiano. Na maioria dos casos, o crescimento resultará em uma cultura pura, contendo um único tipo de micro-organismo. Para obter ummamnter uma cultura pura, é essencial que outros organismos não penetrem. Tais organismos indesejáveis, denominados contaminantes, são ubíquos, havendo uma série de técnicas microbiológicas para evitá-los. Um dos principais métodos para a obtenção de cultura

puras e avaliação de sua pureza, corresponde à utilização de meios sólidos, especificamente de meios sólidos acondicionados em placas de Petri.

Meios de cultura de consistência semi-sólida são frequentemente preparados pela adição de um agente gelificante aos meios líquidos. Tais meios de cultura sólidos imobilizam as células e permitem que estas cresça e originem massas isoladas, visíveis, denominadas colônias. As colônias bacterianas podem apresentar várias formas e tamanhos, dependendo do organismo, das condições de cultivo, dos nutrientes fornecidos, além de vários outros parâmetros fisiológicos. Algumas bactérias produzem pigmentos que tornam a colônia colorida. Independentemente de apresentarem ou não pigmentação, as colônias permitem ao microbiologista analisar a pureza da cultura. Placas que contem mais de um tipo colonial não são oriundas de uma cultura pura. Nesse sentido, o cultivo em meios sólidos, acondicionados em placas de Petri, tem sido utilizado como critério de avaliação da pureza de uma cultura há mais de 100 anos.

Os meios de cultura sólidos são preparados da mesma maneira que os líquidos, exceto pela adição de ágar, como agente gelificante, normalmente a 1,5%, antes da esterilização do meio. Durante o processo de esterilização, o ágar é fundido; o meio ainda líquido é vertido em placas de Petri plásticas ou de vidro, aguardando sua solidificação para posterior uso.

### Classificação dos meios de Cultura de acordo com o crescimento microbiano

#### **Meios Seletivos**

São meios de cultura que favorecem o crescimento de micro-organismos desejados e impedem o crescimento de outros micro-organismos. Para isso, são adicionadas substâncias específicas para o metabolismo do micro-organismo de interesse, que não são metabolizadas por contaminantes.

#### **Meios Diferenciais**

Meios que possibilitam diferenciar colônias do organismo de interesse. Nesse meio, cada micro-organismo presente irá desenvolver colônias com características diferentes, baseadas no seu metabolismo.

#### **Meios Redutores**

Servem para o cultivo de micro-organismos anaeróbios obrigatórios.

### **Meio de Enriquecimento**

Semelhante ao meio seletivo, porém, a finalidade principal é aumentar o número de bactérias de interesse, tornando-a detectável. Utilizado para

### **Meio de Estocagem**

Servem para a manutenção da viabilidade e das características de uma cultura em condições de armazenamento.

### **Fatores Ambientais**

O entendimento das influências ambientais ajuda a explicar a distribuição dos micro-organismos na natureza, tornando possível o desenvolvimento de métodos para o controle ou a otimização das atividades microbianas. Nesse sentido, muitos fatores ambientais podem ser considerados. Entretanto, quatro fatores principais foram identificados por desempenharem importantes papéis no controle do crescimento microbiano: temperatura, pH, disponibilidade de água e oxigênio.

#### Temperatura

Embora os micro-organismos exibam diferentes faixas de temperatura, estes podem ser classificados em quatro grandes grupos, no que se refere às temperaturas ótimas de crescimento: psicrófilos, com ótimo situado em baixas temperaturas, mesófilos, com ótimo em altas temperaturas medianas, termófilos, com ótimo em altas temperaturas e hipertermófilos, com ótimo correspondendo a temperaturas muito elevadas (Figura 3.1).

Os mesófilos são encontrados em animais de sangue quente e em ambientes terrestres e aquáticos de latitudes tropicais. Psicrófilos e termófilos são encontrados em ambientes muito frios e muito quentes, respectivamente. Os hipertermófilos são encontrados em habitats extremamente quentes, tais como fontes termais, gêiseres e fendas hidrotermais no fundo do mar.

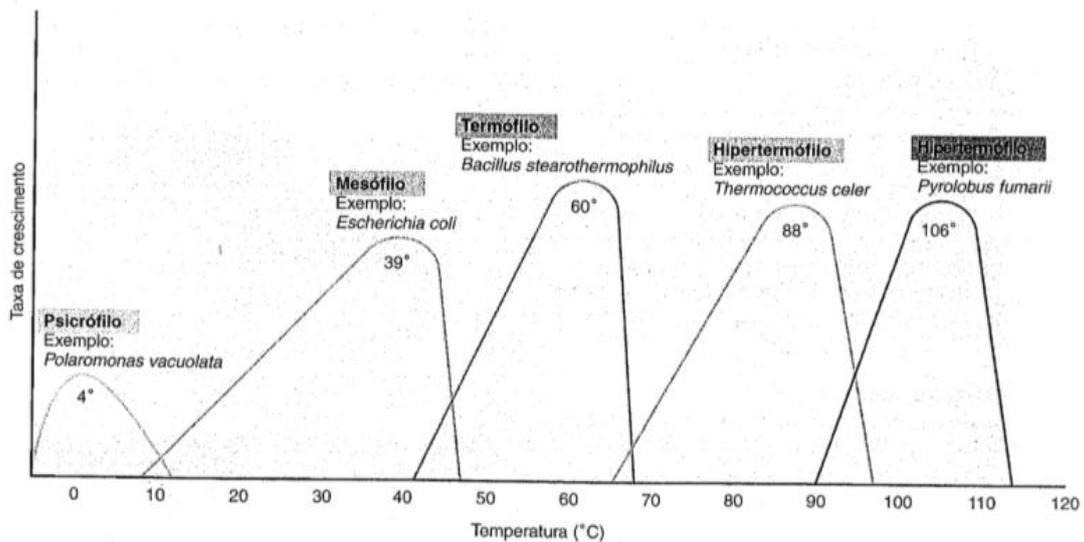


Figura 3.1 – Classificação dos micro-organismos de acordo com as temperaturas ótimas de crescimento.

## pH

A acidez ou alcalinidade de uma solução é expressa por seu pH, em uma escala onde a neutralidade corresponde a pH 7. Valores inferiores a 7 são referidos como ácidos, enquanto aqueles acima de 7 são alcalinos (básicos). Cada organismo possui uma faixa de pH onde seu crescimento é possível, exibindo, no entanto, um pH ótimo, bem definido. A maioria dos organismos tem uma faixa de pH que varia de 2 a 3 unidades.

A maioria dos ambientes naturais apresenta valores de pH variando entre 5 e 9, sendo os organismos cuja faixa de pH corresponde a esses valores os mais comuns. Apenas algumas espécies são capazes de crescer em pHs inferiores a 2 ou superiores a 10. Organismos que crescem em pHs baixos são considerados extremófilos, sendo denominados acidófilos. Os fungos tendem a ser mais tolerantes ao ácido que as bactérias. Muitos fungos apresentam crescimento ótimo em pH 5 ou inferior, enquanto outros crescem de modo abundante em pH 2. Várias bactérias são também acidófilas. Na realidade, algumas são acidófilas obrigatórias, incapazes de crescer em pH neutro.

Alguns extremófilos apresentam valores elevados de pH ótimo, o qual, às vezes, atinge o valor 10; estes são conhecidos como alcalifílicos. Micro-organismos alcalifílicos são normalmente encontrados em habitats muito básicos, como lagos ricos em carbonato de sódio e em solos contendo carbonato. Os procariontes alcalifílicos mais bem estudados são as bactérias aeróbias não marinhas.

## Pressão Osmótica

A água é o solvente universal da vida. Todos os organismos precisam de água, e sua disponibilidade é um importante fator que afeta o crescimento dos micro-organismos. A disponibilidade de água não depende somente do conteúdo aquoso do ambiente, isto é, quão úmido ou seco um hábitat microbiano sólido pode ser. Tal parâmetro é também função da concentração de solutos, como sais, açúcares e outros compostos dissolvidos na água, pois, como as substâncias em solução têm afinidade pela água, moléculas de água associadas aos solutos tornam-se indisponíveis aos micro-organismos.

A disponibilidade de água é geralmente expressa em termos físicos como a atividade de água ( $a_w$ ), com que podem variar de 0 a 1. No processo de osmose, a água se difunde a partir de uma região onde está em baixa concentração para uma região com alta concentração. Na maioria dos casos, o citoplasma apresenta concentrações de soluto superiores às do meio externo, um estado denominado equilíbrio aquoso positivo, com a água tendendo a entrar na célula. No entanto, quando a célula se encontra em um ambiente de baixa atividade de água, esta tende a sair para o meio externo.

A água do mar contém cerca de 3% de cloreto de sódio (NaCl), além de pequenas quantidades de outros minerais e elementos. Os micro-organismos marinhos, que apresentam crescimento ótimo na atividade de água do mar, geralmente têm necessidades específicas de íon de sódio, tais organismos são denominados halófilos. Para seu desenvolvimento, os halófilos requerem certa quantidade de NaCl, que variam nas diferentes espécies.

A maioria dos micro-organismos não é capaz de sobreviver em ambientes com atividade de água muito baixa, pois morrem ou sofrem desidratação em tais condições. Organismos halotolerante suportam certo grau de redução na  $a_w$  ambiental, geralmente com crescimento ótimo na ausência do soluto adicionado. Por outro lado, alguns organismos prosperam em ambientes com atividade de água muito baixa. Estes são interessantes não somente pelas adaptações desenvolvidas para a sobrevivência em tais ambientes, mas também por questões de ordem prática, como por exemplo na indústria alimentícia, em que solutos como sais ou açúcares são adicionados como conservantes. Organismos capazes de crescer em ambientes com altíssimas concentrações de sal são denominados halófilos extremos, com algumas espécies requerendo de 15 a 30% de NaCl para um ótimo crescimento (Figura 3.2).

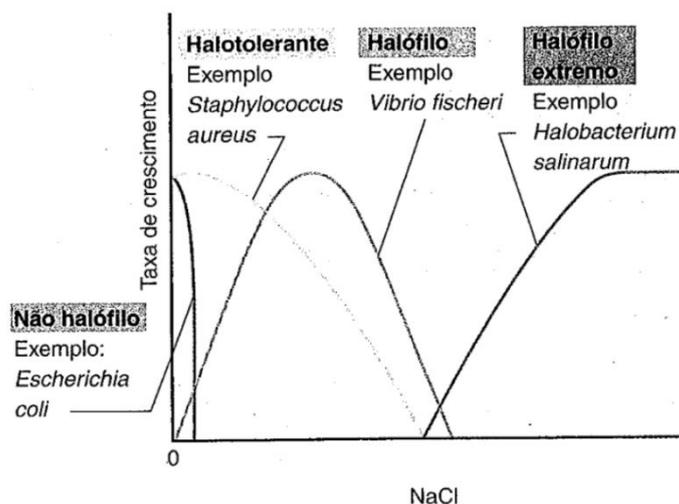


Figura 3.2 – Classificação dos micro-organismos de acordo com os níveis de íons de sódio (NaCl).

## Oxigênio

Os micro-organismos variam quanto suas necessidades ou tolerância ao oxigênio. Estes podem ser divididos em vários grupos, dependendo dos efeitos do oxigênio. Espécies aeróbias são capazes de crescer em grandes tensões de oxigênio e muitas toleram concentrações ainda mais elevadas. Os microaerófilos, contrariamente, são aeróbios que utilizam o O<sub>2</sub> apenas quando este se encontra presente em níveis inferiores ao do ar, devido à sua capacidade limitada de respirar, ou pela presença de alguma molécula sensível ao oxigênio, como uma enzima. Muitos aeróbios são facultativos, isto é, em condições culturais e nutricionais apropriadas podem crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio.

Alguns organismos não são capazes de respirar oxigênio, sendo denominados anaeróbio. Existem dois tipos de anaeróbio: anaeróbios aerotolerantes, que toleram e crescem na presença de oxigênio, embora sem utilizá-lo, e anaeróbios obrigatórios (ou estritos), que são inibidos ou mortos pelo oxigênio. A razão pela qual os anaeróbios estritos são mortos pelo oxigênio é desconhecida, embora possa ser devido à incapacidade de detoxificar alguns dos produtos originados no metabolismo do oxigênio.

## 5. Crescimento Microbiano

A célula bacteriana corresponde à uma usina Biosintética, capaz de se duplicar. Os processos sintéticos do crescimento celular bacteriano envolvem cerca de 2.000 reações químicas com uma ampla variedade de tipos. Algumas dessas reações envolvem transformações de energia, enquanto outras envolvem a biossíntese de pequenas moléculas — blocos constituintes das macromoléculas. Assim como os vários cofatores e coenzimas necessários às reações enzimáticas. Entretanto, as principais reações de síntese celular correspondem a reações de polimerização, processos pelos quais polímeros (macromoléculas) são originados a partir de monômeros. A partir da formação dos polímeros, o cenário está preparado para os eventos finais do crescimento celular.

### Fissão binária

Na maioria dos procariotos, o crescimento de uma única célula individual ocorre até que esta se divida, originando duas novas células - processo denominado fissão binária. Quando bactérias em forma de bacilo - como *Escherichia coli* – encontram-se crescendo em uma cultura, as células se alongam até atingirem aproximadamente o dobro de seu comprimento, quando então formam uma partição, que eventualmente as separa em duas células. Essa partição, referida como *septo*, é resultante do crescimento da membrana citoplasmática e da parede celular para o interior da célula, em direções opostas, até a individualização das células filha.

Durante o ciclo de crescimento há um aumento no número de todos os constituintes celulares, de maneira que cada célula filha receba um cromossomo completo e cópias suficientes de todas as outras macromoléculas, monômeros e íons inorgânicos, garantindo assim sua existência como célula independente.

Em bactérias, o tempo necessário para que um ciclo completo de crescimento ocorra (tempo de geração) é altamente variável, pois depende de fatores tanto nutricionais, quanto genéticos. A bactéria *Escherichia coli*, quando nas melhores condições nutricionais, pode completar o ciclo em cerca de 20 min; algumas bactérias podem crescer ainda mais rapidamente, enquanto outras o fazem de maneira mais lenta.

O crescimento é definido como o aumento do número de células microbianas em uma população; este também pode ser medido em termos do aumento de massa microbiana. A taxa de crescimento corresponde à variação do número de células ou da

massa celular por unidade de tempo. Durante o ciclo de divisão celular, todos os componentes estruturais de uma célula são duplicados.

O intervalo em que uma célula origina duas novas é denominado geração, enquanto o tempo necessário para que isso ocorra recebe a denominação tempo de geração. Assim, o tempo de geração corresponde ao tempo necessário para uma população dobrar de número. Conseqüentemente, tal conceito pode também ser denominado tempo de duplicação. Observe que em uma única geração tanto o número de células como a massa são duplicados. Os tempos de geração variam muito nos diferentes organismos.

Muitas bactérias apresentam tempo de geração de 1 a 3h, embora sejam conhecidos organismos que se dividem a cada 10 min e outros que levam vários dias para se dividir. Além disso, o tempo de geração de determinado organismo depende, até certo ponto, do meio de cultura utilizado e das condições de incubação empregadas.

O crescimento microbiano apresenta diferentes fases e serem descritas a seguir. O crescimento de micro-organismos em um recipiente fechado - denominado cultura em batelada - permite a construção de uma curva de crescimento típica, ilustrada na Figura 5.1. Essa curva de crescimento pode ser dividida em várias fases distintas denominadas: fase lag, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte (ou de declínio).

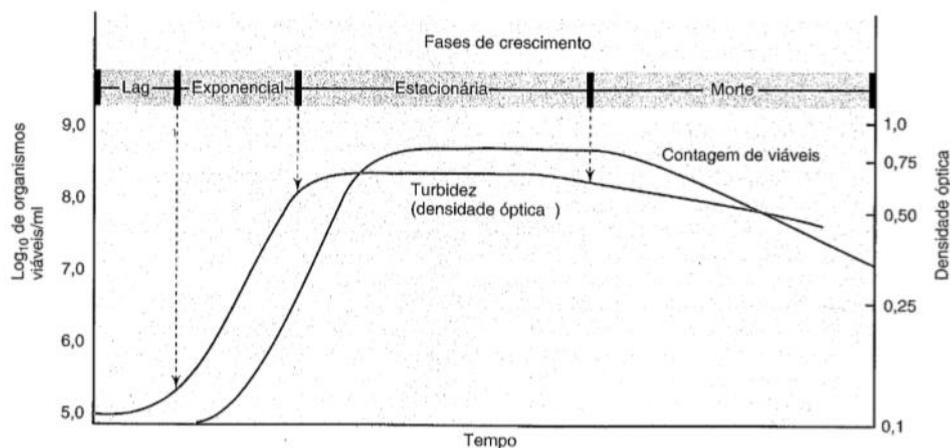


Figura 5.1 – Fases do crescimento microbiano.

### Fase lag

Quando uma população microbiana é inoculada em um novo meio de cultura, o crescimento geralmente não se inicia de imediato. Esse período corresponde à fase lag, que pode ser curta ou longa, dependendo do histórico da cultura e das condições de cultivo. Se uma cultura em crescimento exponencial for inoculada em um mesmo meio,

nas mesmas condições de cultivo, a fase lag não ocorrerá, havendo o estabelecimento imediato de um crescimento exponencial. Entretanto, se um inóculo originado a partir de uma cultura antiga (em fase estacionária) for transferido para um mesmo meio de cultura, haverá uma fase lag, mesmo que todas as células do inóculo sejam viáveis, isto é, capazes de se reproduzir. Isso ocorre porque, geralmente nessas condições, as células encontram-se depletadas de vários constituintes essenciais e requerem tempo para sintetizá-los novamente.

Uma fase lag também é observada quando o inóculo consiste em células que sofreram algum tipo de dano (mas ainda estão vivas) decorrente de tratamento térmico, radiações, ou de compostos químicos tóxicos, pois essas células também precisam de algum tempo para reparar os danos sofridos.

Quando uma cultura proveniente de um meio rico é transferida para um meio de cultura mais pobre, observa-se uma fase lag. Nesse caso, as células precisam sintetizar uma série de enzimas necessárias à biossíntese de metabólitos essenciais, os quais são fornecidos pelo meio. Assim, quando transferidas para um novo meio de cultura, as células necessitam de algum tempo para sintetizar as novas enzimas.

### Fase log

A fase exponencial é uma consequência da divisão da célula em duas, que se dividem originando outras duas novas células, e assim por diante. Células em crescimento exponencial geralmente se encontram nas condições mais saudáveis. Por esta razão, células que se encontram na metade da fase exponencial de crescimento são frequentemente utilizadas para estudos enzimáticos ou de outros componentes celulares.

A maioria dos micro-organismos unicelulares apresentam crescimento exponencial, embora com taxas de crescimento bastante variáveis. A taxa de crescimento exponencial é influenciada pelas condições ambientais e pelas características genéticas do próprio organismo. Em geral, os micro-organismos procarióticos crescem mais rapidamente que os eucarióticos, sendo que os organismos eucarióticos menores crescem mais rápido que os maiores.

### Fase estacionária

Em uma cultura em batelada (tubo ou frasco), o crescimento exponencial não pode ocorrer indefinidamente. Cálculos indicam que, se uma única bactéria, com tempo de geração de 20min, apresentasse crescimento exponencial contínuo por 48H, produziria uma população cujo peso seria cerca de 4000 vezes maior que o peso da terra! Esse dado é particularmente impressionante, pois uma única célula bacteriana pesa apenas cerca de um trilionésimo ( $10^{-12}$ ) de um grama.

Obviamente algo deve ocorrer, limitando o crescimento da população antes que tal fato aconteça. Normalmente, os eventos que ocorrem são (1) o consumo de um nutriente essencial presente no meio de cultura ou (2) a presença de algum produto de excreção que atinge uma concentração inibitória e promove a interrupção do crescimento exponencial — ou muitas vezes ambos. Nesse momento, a população atingiu a fase estacionária

Na fase estacionária não se observam aumento ou diminuição líquida no número de células. Embora normalmente não ocorra crescimento nessa fase, muitas funções celulares podem ainda estar ativas, inclusive o metabolismo energético e alguns processos biossintéticos. Em alguns organismos, pode haver um crescimento lento durante a fase estacionária; algumas células se dividem, enquanto outras morrem; os dois processos são equilibrados e não promovem alterações líquidas do número de células (esse fenômeno é denominado crescimento críptico).

#### Fase de morte (ou de declínio)

Se uma população que atingiu a fase estacionária permanecer nas mesmas condições de incubação, observaremos que as células poderão permanecer vivas (metabolizando) ou morrer. Se estas morrerem, podemos dizer que atingiram a fase de morte. Em alguns casos, a morte é acompanhada da lise celular. A fase de morte, no ciclo celular, é também exponencial; na maioria dos casos, no entanto, a taxa de morte celular é muito inferior à taxa de crescimento exponencial.

Para encerrar, reiteramos que as fases da curva de crescimento bacteriano refletem eventos que ocorrem em uma população de células e não em células individuais. Os termos fase lag, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte não se aplicam a células individuais, mas apenas a populações de células.

## 6. Controle de micro-organismos pela ação de agentes químicos e físicos

### Agentes Químicos

Utilizamos uma variedade de produtos químicos para controlar o crescimento microbiano em situações rotineiras, nos lares e no trabalho. Os detergentes e sabões utilizados na lavagem de roupas e no banho têm como finalidade, pelo menos em parte, reduzir a carga microbiana ou a morte dos micro-organismos presentes nas roupas ou na superfície da pele. Na cozinha, utilizamos uma variedade de produtos químicos para inibir ou destruir micro-organismos nas louças, superfícies de trabalho e utensílios. Em um laboratório de microbiologia, assim como nos equipamentos industriais, agentes químicos são rotineiramente utilizados no controle do crescimento indesejado de micro-organismos. Aqui, classificamos e discutimos os mecanismos de ação de alguns produtos químicos empregados no controle de micro-organismos em nosso meio ambiente.

Um agente antimicrobiano corresponde a um produto químico natural ou sintético que mata ou inibe o crescimento de micro-organismos. Agentes que matam organismos são frequentemente denominados agentes “cidas”, sendo o termo associado a um prefixo que indica o tipo de organismo morto. Assim, temos agentes bactericidas, fungicidas e viricidas. Um agente bactericida mata bactérias e pode ou não matar outros tipos de micro-organismos. Agentes que não matam, mas apenas inibem o crescimento, são denominados agentes “státicos”, e podemos nos referir a agentes bacteriostáticos, fungistáticos e viristáticos.

Agentes antimicrobianos variam quanto à toxicidade seletiva. Alguns atuam de forma relativamente não seletiva, provocando efeitos similares em todos os tipos de células. Outros são muito mais seletivos e tóxicos aos micro-organismos que aos tecidos animais. Agentes antimicrobianos que possuem toxicidade seletiva são especialmente úteis no tratamento de doenças infecciosas, uma vez que podem ser utilizados para matar os micro-organismos causadores de doenças *in vivo*, sem causar danos ao hospedeiro.

#### Efeitos dos agentes químicos

Três efeitos distintos podem ser observados quando um agente antimicrobiano é adicionado a uma cultura bacteriana em crescimento exponencial: bacteriostático, bactericida e bacteriolítico. Um efeito bacteriostático é observado quando o crescimento

é inibido, sem que haja morte das células. Agentes bacteriostáticos frequentemente inibem a síntese protéica em decorrência de sua ligação aos ribossomos. No entanto, como essa ligação não é forte, quando a concentração do agente é diminuída, este se desliga do ribossomo, e o crescimento é restabelecido. Muitos antibióticos atuam por esse mecanismo.

Agentes bactericidas matam as células sem que haja a lise ou ruptura celular. Estes correspondem a uma classe de agentes químicos que em geral se ligam fortemente a seus alvos celulares, não sendo removidos pela diluição. Agentes bacteriolíticos induzem à morte pela lise celular, a ruptura das células, que pode ser observada como uma diminuição do número de células ou da turbidez, após a adição do agente. Agentes bacteriolíticos incluem antibióticos que inibem a síntese da parede celular, como a penicilina.

#### Medida da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana é medida determinando a menor quantidade de agente necessária para inibir o crescimento de um organismo teste; esse valor é denominado concentração inibitória mínima (CIM). Para a determinação do CIM, uma série de tubos de cultura é preparada pela adição de uma concentração diferente do agente em cada tubo, os quais são, posteriormente, inoculados. Após a incubação, os tubos são inspecionados, verificando-se a ocorrência de um crescimento visível (turbidez). O tubo contendo a menor concentração de agente capaz de inibir completamente o crescimento do organismo teste define a CIM (Figura 6.1). A CIM não é constante para um determinado agente, uma vez que pode ser afetada pela natureza do organismo teste utilizado, tamanho e condições de incubação, tais como temperatura, pH e aeração.

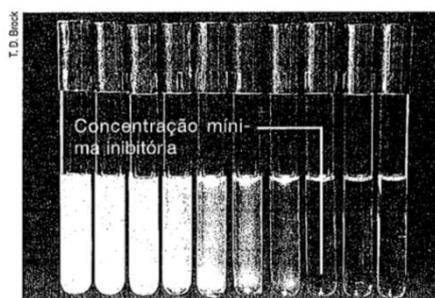


Figura 6.1 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Outro procedimento habitualmente utilizado para o estudo da ação antimicrobiana corresponde ao método de difusão em ágar. Prepara-se uma placa de

Petri com meio sólido, uniformemente inoculada com o organismo teste. Concentrações conhecidas do agente microbiano são adicionadas a discos de papel de filtro, os quais são colocados sobre a superfície do meio sólido. Durante a incubação, o agente difunde-se do papel filtro para o Agar; quanto maior a distância do papel de filtro, menor a concentração do agente. Em uma determinada distância do disco, a CIM é alcançada (Figura 6.2). Além desse ponto o crescimento ocorre, embora próximo ao disco o crescimento não seja observado. Desse modo, cria-se uma zona de inibição; o diâmetro dessa zona é proporcional à quantidade de agente antimicrobiano adicionado ao disco, à solubilidade do agente, ao coeficiente de difusão e à eficácia geral do agente. Esse método é utilizado rotineiramente nos testes de sensibilidade de patógenos a antibióticos.



Figura 6.2 – Método de difusão em Agar para a determinação da atividade antimicrobiana.

### Coeficiente Fenólico

Útil para analisar quanto um desinfetante é mais eficiente que o fenol. As soluções de fenol e do desinfetante teste são diluídas e inoculadas com a cultura do micro-organismo por determinados intervalos de tempo. A viabilidade da cultura é analisada por subcultivo em placa com meio sem o desinfetante.

Exemplo: Diluição do desinfetante 1:100; Diluição do fenol 1:50.

CF = Maior diluição do desinfetante que foi eficiente/Maior diluição do fenol com mesmo efeito

$$CF = 100/50$$

$$CF = 2$$

Isso significa que o desinfetante teste é 2 vezes mais eficiente que o fenol.

## **Agentes Físicos**

Os métodos físicos são muito utilizados para promover a descontaminação, a desinfecção e a esterilização. Os métodos mais utilizados para atingir estes objetivos usam como princípio o calor, as radiações e a filtração.

### Temperatura: Calor seco e úmido

O calor é um dos mais importantes métodos para o controle do crescimento para eliminar os micro-organismos. Acima da temperatura ideal de crescimento, o calor vai promover a desnaturação de proteínas estruturais e enzimas, levando a perda da integridade celular e à morte.

O calor seco elimina os micro-organismos por processo de oxidação. O calor úmido na forma de vapor tem o maior poder de penetração e eliminar as formas vegetativas dos procarióticos, vírus e fungos e seus poros. A morte pelo o calor é uma função exponencial. Deste modo, são necessárias rápidas exposições à temperatura alta para grande redução no número dos micro-organismos viáveis.

#### Calor seco

Estufa e formo: Tem menor poder de penetração do que calor úmido e usam temperatura e tempos maiores. A característica em comum entre os métodos é ausência de umidade, o que torna o processo menos eficiente e demorado.

Flambagem: Ocorre combustão completa dos micro-organismos em alças e agulhas de inoculação microbiológicas, as quais são aquecidas diretamente na chama do bico de Bunsen até ficarem vermelhas.

Incineração: É a combustão completa para descontaminação de material hospitalar de uso descartável (luvas, material plástico) e lixo contaminado em geral. Consiste em colocar o material em temperaturas superiores à 600 °C até a obtenção de cinzas.

Baixas temperaturas: A baixa temperatura é um método de controle dos micro-organismos que causa diminuição na taxa de crescimento e na atividade enzimática, com a diminuição ou interrupção do metabolismo. Pode não causar a morte celular. Os

micro-organismos patogênicos são geralmente mesófilos (não crescem a 5° C), embora existam exceções como certas amostras de *Clostridium botulinum* que crescem a 5°C.

### Calor úmido

Autoclave: Equipamento que emprega vapor d'água sob processo que produz a temperatura mínima de 121°C à 1 ATM. Quanto maior a pressão da autoclave, maior a temperatura atingida. Estes métodos destroem as formas vegetativas e esporuladas de procaríotos e fungos, promovendo a esterilização. A autoclavação é um método muito usado em laboratórios e hospitais.

Pasteurização: Métodos muito usados na indústria de alimentos que só podem ser submetidos ao calor em condições controladas para não desnaturar os nutrientes. Na pasteurização ocorre uma redução no número dos micro-organismos pela exposição breve a uma temperatura relativamente alta. Não esteriliza. Existem basicamente três tipos:

- Clássico: 63 °C por 30 minutos.
- Ultra-alta temperatura (UHT): de 74 °C para 140 °C, retornando para 74 °C em poucos segundos.
- Alta temperatura e curto tempo (HTST): 72 °C por 15 segundos.

Fervura: É o vapor d'água livre (100°C/20 min.). Destroi as formas vegetativas e alguns endósporos (dependendo da temperatura e da espécie de bactérias). A maioria dos endósporos e alguns vírus, como o da hepatite podem sobreviver 30 minutos na fervura. Não é um método de esterilização apenas permite o controle do crescimento microbiano.

### Baixa temperatura

O efeito das baixas temperaturas sobre os micro-organismos depende da intensidade da aplicação.

Refrigeração: Nos os micro-organismos comuns (0-7°C) a taxa metabólica da maioria é tão reduzida que eles não podem se reproduzir. A refrigeração comum tem mais efeito bacteriostático, entretanto, micro-organismos psicrófilos crescem lentamente em baixas temperaturas, alterando o sabor dos alimentos após algum tempo. O método é usado para a preservação de alimentos durante período limitado de tempo.

Congelamento: Usado para preservar alimentos nas residências e na indústria alimentícia. As temperaturas abaixo do congelamento obtidas rapidamente tendem a tornar os micro-organismos dormentes, mas não necessariamente os matam. O

congelamento lento faz com que cristais de gelo se formem e cresçam rompendo as estruturas celular e molecular das bactérias.

### Outros Métodos

**Filtração:** A filtração pode ser usada para esterilizar gases e líquidos que são sensíveis ao calor. Os filtros são compostos por grande variedade de matérias sintéticas podendo ser filtros de celulose, acetado, amianto, policarbonato, teflon ou outro material sintético com poros de 0,2-0,25 $\mu$ m. Impedem a passagem de bactérias, exceto o *Mycoplasma* sp. Entretanto, existem diferentes tamanhos de poros de acordo com o tipo de filtração que se deseja. O uso da filtração é recomendado para materiais termolábeis em solução e na descontaminação do ar, em fluxos laminares e sistemas de ventilação nos quais o controle micro-organismo é especialmente importante como salas de cirurgias, enfermarias e unidades de queimados.

**Ressecamento ou Dessecação:** Os métodos que utilizam como princípio a remoção da água e, como os micro-organismos necessitam dela para seu crescimento, estes procedimentos são eficazes para o controle do crescimento microbiano. O mais usado é a liofilização, que consiste o congelamento rápido do material sob N<sub>2</sub> e posterior remoção da água por sublimação, sendo convertida diretamente do estado sólido para o gasoso. Este método bacteriostático é menos destrutivo que o congelamento. É usado na indústria de alimentos (café, leite) e na preservação de cultura bacterianas.

**Radiação:** As radiações constituem um método eficaz para reduzir ou eliminar os micro-organismos. Existem vários tipos de radiações, eletromagnéticas como o raio x feixes de elétrons e micro-ondas.

**Radiação ionizante:** Raio x como comprimento de onda de 0,1-40nm e radiação gama ( $\gamma$ ) com comprimentos até menores são radiações ionizantes porque possuem energia para retirada dos elétrons das moléculas, ionizando-as (formando íons) A principal molécula ionizada é água, com a formação das radicais livres(OH<sup>•</sup>). A ação mais prejudicial é no DNA, mas atinge outras moléculas como proteínas. Leva a morte celular. A radiação é rotineiramente usada para processos de esterilização e descontaminação de suprimentos médicos e de produtos alimentícios.

**Radiação Ultravioleta:** Esta radiação não ionizante tem sua atividade microbicida na faixa de comprimento de onda 240-280 nm, sendo 260 nm o comprimento mais efetivo para eliminar micro-organismos. Este tipo de radiação é mutagênico e leva a formação de dímeros de timina, que impedem a ação da DNA

polimerase. Tem ação microbicida, mas baixo poder de penetração, por isso seu uso é recomendado apenas em superfícies (não atravessa sólidos muito pouco em líquidos). Muito eficaz na inativação dos vírus.

### **Indicadores de Esterilização**

Os indicadores de esterilização servem para garantir que o processo de esterilização foi eficiente, através métodos físico-químicos ou biológicos. Nos métodos físico-químicos são utilizados indicadores visuais para indicarem que o processo de esterilização ocorreu, como por exemplos as fitas indicadoras que mudam sua coloração quando esterilizadas. Nos métodos biológicos, considerados os mais efetivos na para indicar a esterilização, podem ser utilizadas fitas impregnadas de esporos bacterianos ou ampolas contendo cultura bacteriana.

### **Exercício**

1. Os agentes químicos utilizados no controle químico são classificados em 2 tipos: antissépticos e desinfetante. Diferencie-os. Qual o objetivo de sua utilização?
2. Como um agente bacteriostático funciona?
3. Diferencie efeito bactericida de efeito bacteriolítico.
4. Por que um agente químico deve ser altamente tóxico, mas inócuo para humanos e animais?
5. Explique por que o álcool 70 °GL é a concentração mais indicada para o controle de micro-organismos.
6. Qual a finalidade de medir a atividade antibacteriana de uma substância?
7. Qual o objetivo dos seguintes métodos: CIM, difusão em ágar e coeficiente fenólico?
8. No que consiste a morte por calor seco e calor úmido?
9. Para que serve os indicadores de esterilização? Cite exemplos.
10. Por que a autoclavagem é a esterilização mais confiável?
11. Diferencie pasteurização clássica, HTST e UHT.
12. Por que a filtração é eficiente no controle de micro-organismos?
13. Como o uso de baixas temperaturas controla os micro-organismos?
14. Explique como o ressecamento controla os micro-organismos.
15. Diferencie radiação ionizante da não ionizante para controle de micro-organismos.

## II – Técnicas Básicas

### 1. Preparo de meios de Cultura

Os micro-organismos necessitam, para o seu crescimento, de nutrientes próprios e condições físicas e químicas específicas. Um meio de cultura é um conjunto de ingredientes formulados no laboratório ou adquiridos desidratados, que é empregado com o objetivo de possibilitar a multiplicação de micro-organismos. Cada micro-organismo ou grupo possui exigências nutritivas específicas.

A maior parte dos meios de cultura pode ser obtida na forma desidratada e neste caso alguns aspectos devem ser obtidos:

#### Armazenamento e Conservação

Anotar em livro próprio e a data de recepção dos meios de cultura e ingredientes empregados na formulação; Armazená-lo de acordo com as especificações contidas no rótulo, em uma área de pouca umidade, afastada da luz direta do sol, das autoclaves, estufa de secagem e qualquer outra fonte de calor; Quando especificado no rótulo, manter sob refrigeração; Após o uso, assegurar-se de que o frasco está bem fechado e armazená-lo em local próprio; descartar o meio caso o pó não esteja fluindo facilmente ou se houver alteração na cor e/ou consistência.

#### Pesagem

Ao preparar meios de cultura deve-se usar primeiro o estoque mais velho. Não se deve abrir um novo lote de meio até que o anterior tenha esgotado. Usar uma balança cuja exatidão se verifique frequentemente. Os meios desidratados são higroscópicos e desta forma, a pesagem deve ser feita rapidamente e em local de pouca umidade.

#### Dissolução

Usar vidros bem lavados e enxaguados. Não usar água suspeita de conter cloro, cobre ou detergentes. Usar água deionizada ou destilada. Antes de aplicar calor ou dissolver os meios, deve-se ler o rótulo. Alguns meios não devem ser submetidos a temperaturas acima de 55 °C (Caldo ureia, Ágar ureia), enquanto que outros meios desidratados devem ser aquecidos a fim de garantir a completa dissolução e distribuição uniforme dos ingredientes.

O aquecimento deve ser feito sob agitação contínua e suave, evitando que o mesmo se queime no fundo do frasco. A agitação do meio durante o aquecimento deve

ser feita com cautela, por que alguns meios, especialmente os que contem ágar, podem formar espuma e transbordar. Os meios que contem Agar devem permanecer, em geral durante 5 a 10 minutos em repouso na água, antes de serem aquecidos, para permitir que as partículas de ágar se reidratem adequadamente, elevando a solubilidade do Agar resultando em gel mais uniforme.

O meio preparado deve ser distribuído em frasco ou tubo (permitindo uma pequena folga da tampa) apropriado e levado para esterilização. Ao distribuir o meio em recipientes adequados, não devemos colocar mais de 2/3 da capacidade do mesmo.

### Esterilização

Alguns meios não devem ser esterilizados em autoclave. Em alguns casos, os meios devem ser filtrados, outros são tão seletivos que não necessitam de calor e nem de filtro (Agar Salmonella shiquella, Agar citrato desoxicolato, caldo tetrionato, caldo selenito). A atividade seletiva destes meios é destruída durante a autoclavagem.

Na esterilização por autoclave, o meio não deve ser tratado excessivamente ou deficientemente. O excesso de tratamento em um meio pode acarretar um erro pioro do que a subesterilização. É necessário pré-aquecer meios em volumes maiores, para evitar demora em alcançar a temperatura de esterilização. Nunca deve ser autoclavados mais de 2 litros por recipiente. Antes de esterilizar, o pH do meio deve ser comprovado em potenciômetro. Esta medida deve ser tirada a 25 °C e normalmente não precisa ser ajustada. A adição de componentes pode afetar o equilíbrio do meio.

### Armazenamento do meio pronto

De forma geral, os meios prontos devem ser armazenados a temperatura entre 2 e 8 °C (geladeira). O efeito nocivo comumente associado ao armazenamento é a desidratação. Esta não será problema em meios líquidos e sim em meios em placas, principalmente em laboratórios pequenos onde certos meios são usados ocasionalmente. Estes meios em placas devem ser conservados em sacos plásticos, selados, para minimizar contaminações e a perda de umidade, e estocados em posição invertida. Todos os meios devem ser levados a temperatura ambiente antes de seu uso.

## **Roteiro de Aula Prática**

O estudo das bactérias necessita normalmente do seu prévio isolamento e identificação. Para tanto diversos meios de cultura são utilizados. Define-se meio de

cultura como uma mistura de nutrientes, incluindo fontes de carbono, nitrogênio, sais minerais e água, que propiciam o crescimento *in vitro* de bactérias. A maioria das bactérias cresce em meios de cultura. Exceções são as riquetsias e clamídias. A inoculação das bactérias em diferentes meios envolve várias técnicas de semeadura. Toda a manipulação de culturas bacterianas, meios e instrumental necessário deve ser feita seguindo-se procedimentos básicos de assepsia e antissepsia, visando evitar qualquer tipo de contaminação.

Para uma melhor compreensão das diversas finalidades e usos dos meios de cultura, apresentamos a seguir uma breve classificação dos mesmos:

A) Quanto à composição:

1) Naturais – são aqueles de origem vegetal (um pedaço de batata, pão, frutas) ou animal (gema de ovo).

2) Artificiais – são aqueles constituídos de substâncias químicas podendo ser definidos ou indefinidos (complexos).

B) Quanto ao seu estado físico:

1) Líquido – são os caldos, desprovidos de ágar.

2) Semi-sólido – são aqueles que apresentam em sua composição até 1% de ágar.

3) Sólido – são aqueles que apresentam em sua composição 1,5 a 2,5% de ágar.

Objetivo: Fornecer artifícios práticos para a elaboração de meios de cultura.

Procedimento:

1) Ver a embalagem do meios de cultura e verificar quantas gramas do meio é necessário para preparar 100ml.

2) Pesar em erlenmeyer a quantidade necessária e dissolver em água destilada.

3) Aquecer o meio e cultura até fundir e em seguida colocar 5ml do meios em 2 tubos de ensaio e deixar o restante no erlenmeyer.

4) Esterilizar o meio à 121 °C, por 20 minutos à 1 ATM.

5) Quando a temperatura estiver em torno de 55 °C, inclinar o tubos sobre uma pipeta e adicionar o ágar restante, contido no erlenmeyer em placas de Petri. Esse procedimento deve ser realizado em torno da chama do bico de Bunsen.

Pós-laboratório

1. Qual é o agente responsável pela solidificação do meio de cultura? Por que ele foi importante para a Microbiologia? Quais podem ser os estados físicos dos meios de cultura?
2. Por que devemos fundir o ágar antes da esterilização?
3. O meio que utilizamos era definido ou indefinido?
4. Qual a importância da utilização da chama do bico de bunsen?

## 2. Técnicas de Assepsia

Uma vez que um meio de cultura tenha sido preparado, este pode receber um inóculo de uma cultura pura, previamente crescida, de maneira a reiniciar o processo de crescimento. Para tanto, é necessário o emprego de uma técnica asséptica. Essa técnica corresponde a uma série de procedimentos utilizados para impedir a contaminação durante a manipulação de culturas e de meios de cultura estéreis. O domínio dessas técnicas é necessário para o sucesso nos diferentes procedimentos executados em um laboratório de microbiologia. Contaminantes presentes no ar correspondem ao principal problema, pois o ar sempre contém partículas de poeira, que em geral, apresentam uma grande comunidade de micro-organismos. Quando recipientes são abertos, estes devem ser manipulados de maneira a impedir a entrada de ar contaminado (Figura 2.1).

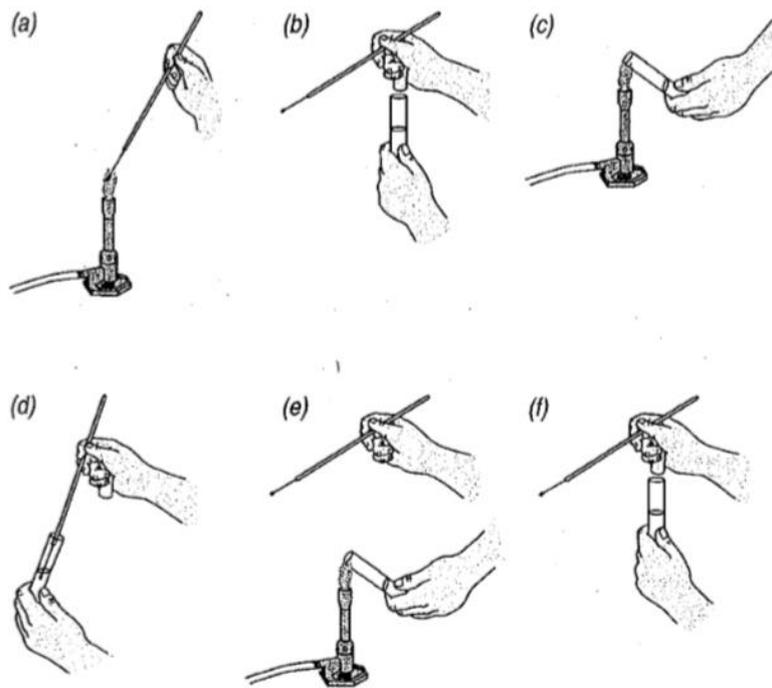


Figura 2.1 – Transferência asséptica. (a) A alça é aquecida até a incandescência, sendo rapidamente resfriada no ar. (b) O tubo é destampado. (c) A ponta do tubo é passada pela chama (flambada). (d) A amostra é coletada com alça estéril. (e) Após a remoção da amostra, o tubo é novamente flambado. (f) O tubo é fechado e a alça é novamente aquecida, antes de ser dispensada.

A transferência asséptica de uma cultura de um tubo para outro normalmente é realizada com o auxílio de uma alça ou agulha inoculadora, previamente esterilizada em uma chama. Culturas que apresentam crescimento também podem ser transferidas para a

superfície de meios sólidos, onde as colônias desenvolvem-se a partir do crescimento e divisão celular (Figura 2.2).

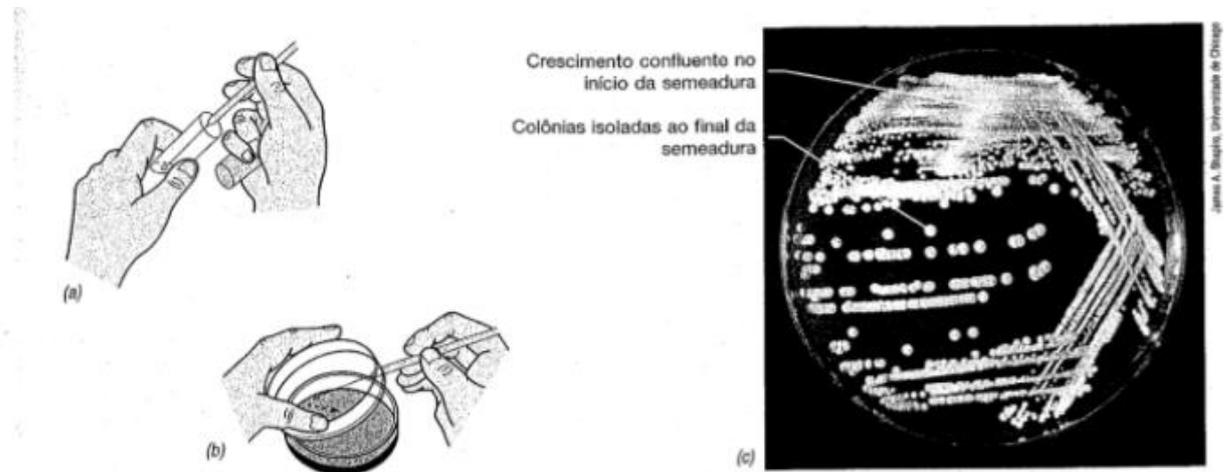


Figura 2.2 – Inoculação de um micro-organismo de um meio líquido em meio sólido, assepticamente.

A semeadura por esgotamento de uma colônia isolada corresponde a um dos principais métodos na obtenção de culturas puras, a partir de comunidades microbianas que contem diferentes micro-organismos.

### 3. Métodos de inoculação

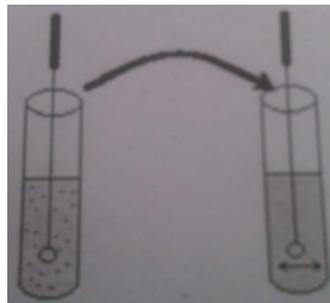
A escolha da técnica para cultivo de micro-organismos varia de acordo com o tipo de meio de cultura e a finalidade do cultivo, porém, algumas regras devem ser seguidas nas inoculações.

- ✓ A agulha ou alça de níquel-cromo (também chamada de agulha e alça de platina) devem ser esterilizadas por flambagem antes e após qualquer cultivo. Tome cuidado de esfriá-las antes da coleta.
- ✓ Os recipientes devem sempre ser abertos próximos à chama do bico de Bunsen.
- ✓ Deve-se evitar ao máximo que as tampas dos tubos e placas fiquem sobre a bancada durante o cultivo.

Para garantir uma sementeira correta, deve-se evitar ao máximo perfurar ou rasgar o Agar, pois poderá ocorrer acúmulo de bactérias neste setor do meio, além de alterar as condições de crescimento bacteriano.

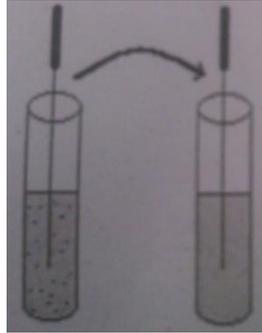
#### Meio líquido

1. Mergulhar a alça de platina esterilizada na cultura bacteriana que lhe é apresentada.
2. Mergulhar a alça carregada de bactérias no tubo com o meio de cultivo e agite a alça.



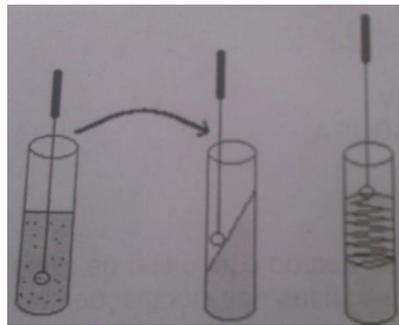
#### Meio semi-sólido

1. Mergulhar a agulha esterilizada na cultura bacteriana que lhe é apresentada.
2. Faça uma “injeção” com a agulha carregada com bactérias no meio de cultivo semi-sólido.



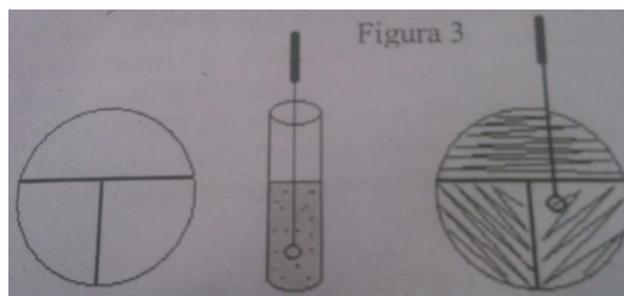
### Meio sólido (ágar inclinado)

1. Mergulhar a alça de platina esterilizada na cultura bacteriana que lhe é apresentada.
2. Encoste levemente a alça na parte mais baixa do plano inclinado e suba fazendo estrias na superfície do ágar.



### Meio sólido (Placa de Petri – Técnica do esgotamento)

1. Imagine a placa de Petri dividida em três partes.
2. Mergulhar a alça de platina esterilizada na cultura bacteriana que lhe é apresentada.
3. Faça estrias em cada divisão, utilizando da melhor forma possível toda a superfície da placa.



#### **4. Culturas Puras**

Uma população microbiana, em condições naturais, contém muitas espécies diferentes. Quando uma cultura de micro-organismos se destina à sua identificação ou a estudos bioquímicos ou fisiológicos, o primeiro passo reside na obtenção de uma cultura pura, ou seja, uma cultura em que apenas se encontra presente um tipo de micro-organismo. Para obter uma cultura pura podem ser utilizadas as técnicas de estrias, de espalhamento ou de incorporação em meio sólido.

A técnica de purificação pelo método das estrias baseia-se no espalhamento de um inóculo, oriundo de uma cultura mista, várias vezes sobre o ágar e permite obter colônias isoladas. Podendo ser utilizada para passar colônias de um meio sólido para outro, bem como para separar misturas de micro-organismos em suspensão.

Logo que os micro-organismos tenham sido isolados em cultura pura, é necessário manter as culturas vivas pelo período de tempo necessário ao seu estudo e caracterização. Com este intuito deve-se proceder com os métodos de conservação dos micro-organismos, seja por períodos mais ou menos longos.

Exceto alguns micro-organismos psicrófilos, a utilização de temperaturas abaixo de 0 °C previne o crescimento dos micro-organismos, uma vez que inibe o seu metabolismo. A conservação por refrigeração (temperaturas entre 4 a 10 °C) é um método adequado para um período de tempo curto (alguns meses), enquanto que os métodos de congelação (-20 °C), liofilização e armazenagem em nitrogênio líquido (-196 °C) permitem uma conservação de longa duração (até alguns anos).

## 5. Quantificação de micro-organismos

Além da identificação do tipo do micro-organismo de um meio, também é importante em alguns casos sua quantificação. Como exemplo de casos em que a quantificação de micro-organismos se torna importante, pode-se citar: quantificação da população de micro-organismos da água e alimentos para avaliar a qualidade microbiológica dos mesmos, na análise da eficiência de agentes antimicrobianos ou a eficácia de práticas higiênico-sanitárias para se verificar a população sobrevivente ao tratamento.

Assim, os micro-organismos podem ser quantificados de forma direta, contando-se microscopicamente o número de células presentes em um determinado material ou superfície, ou indiretamente, efetuando-se análises da turbidez, determinação do peso seco, concentração de substâncias químicas (proteínas, pesquisa de determinada enzima ou produto final de uma via metabólica, DNA, RNA) ou através da contagem do número de micro-organismos viáveis utilizando um meio de cultura apropriado.

Esse último método leva em consideração um “quesito” importante para a técnica de contagem, que é a quantificação de apenas células vivas. Pois, em determinadas circunstâncias, como aquelas em que se avalia as práticas higiênico-sanitárias, é preciso determinar a população de células viáveis. E, para efetuar a contagem total de bactérias em uma determinada suspensão da amostra, faz-se diluições decimais (Figura 5.2) seriadas da amostra e inocula-se, usualmente, pela técnica de “*Pour-Plate*” ou “*Spread-Plate*” (Figura 5.1) com Alça de Drigalsky, em meios de cultura apropriados. Após o período de incubação em condições de temperatura e atmosfera adequadas, é feita a contagem do número de colônias (Figura 5.2).

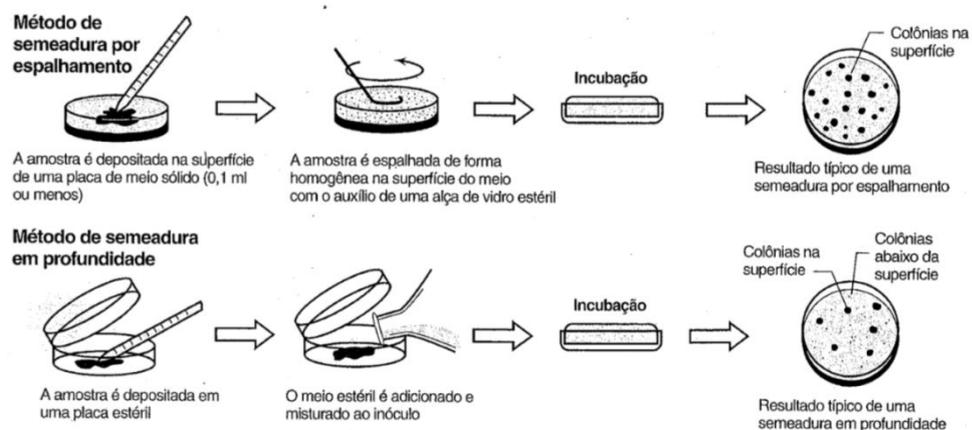


Figura 5.1 – Técnica de “*Spread-Plate*” (Semeadura em por espalhamento) e “*Pour-Plate*” (Semeadura em profundidade).

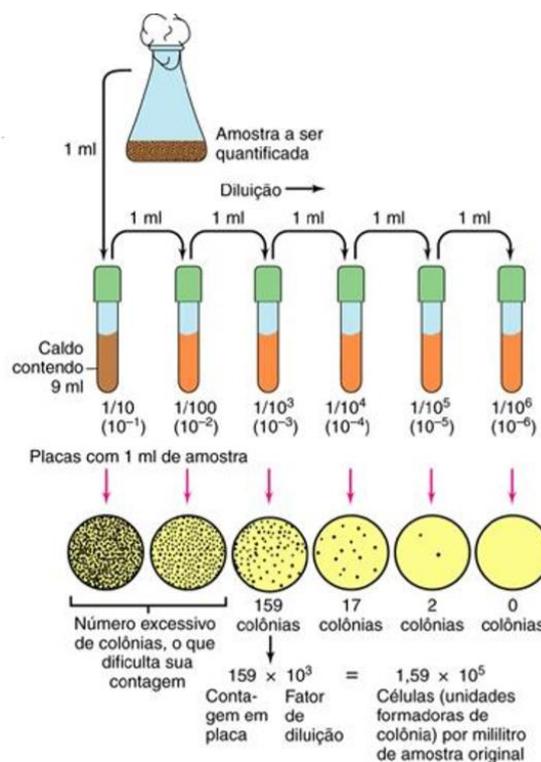


Figura 5.1 – Diluição seriada decimal e contagem de viáveis.

A diferença de um método para o outro é que o método “*Pour-Plate*”, coloca-se primeiramente, a alíquota de 1ml da amostra com os micro-organismos em uma Placa de Petri estéril sem o meio de cultura, pois esse será colocado por cima dos micro-organismos na placa. E, na técnica “*Spread-Plate*”, o meio de cultura já se encontra na placa e os micro-organismos são colocados por cima do meio e são espalhados com o auxílio da Alça de Drigalsky (Figura 5.2).

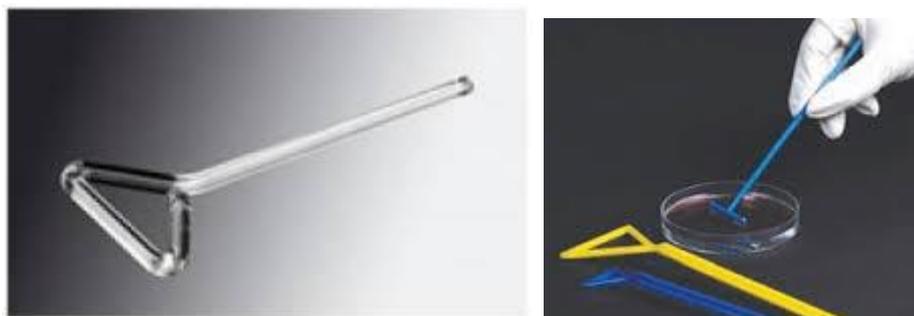


Figura 5.2 – Alça de Drigalsky, de vidro e descartável, utilizada para espalhar os micro-organismos no ágar.

## 6. Coloração de micro-organismos

Coloração de Gram é uma técnica de coloração para diferenciação de micro-organismos através das cores, para serem observados em microscópio óptico. A técnica recebeu este nome em homenagem ao médico dinamarquês Hans Cristian Joaquim Gram.

Por volta de 1884, Hans Gram observou que as bactérias, após serem tratadas com diferentes corantes, adquiriram cores diferenciadas. Isso se deve à composição diferenciada para parede celular. Assim, as que ficavam roxas foram classificadas de Gram-positivas, e as que ficavam vermelhas, foram chamadas de Gram-negativas. A técnica de Gram é fundamental para a taxonomia e identificação das bactérias, sendo muito utilizada atualmente, como técnica de rotina em laboratórios de bacteriologia.

Quando as estruturas celulares são cobertas pelo corante violeta-de-metila, todas se coram em roxo. Com a adição do mordente (Solutio de Lugol), ocorre a formação do complexo iodo-pararosanilina, que tem como propriedade fixar o corante primário nas estruturas coradas. Algumas estruturas perdem a cor violeta rapidamente, quando ocorre a lavagem, com álcool etílico, enquanto outras perdem sua coloração mais devagar ou a perdem completamente. O corante safranina colore novamente as estruturas que foram descoradas.

As bactérias Gram-positivas, que têm a parede celular composta por mureína (peptídeoglicano), durante o processo de descoloração com álcool etílico, retém o corante, permanecendo com a coloração conferida pelo corante primário (roxo). Já as bactérias Gram-negativas com parede celular composta predominantemente por ácidos graxos (lipopolissacarídeos e lipoproteínas), perdem o complexo iodo-pararosanilina, são incapazes de reter o violeta, assumindo a cor do corante de fundo (vermelha).

São as diferenças da estrutura da parede bacteriana, principalmente com relação à espessura da camada de peptidoglicano, que é responsável pelo diferente comportamento das bactérias diante da coloração de Gram.

### Procedimentos da coloração de Gram

1. Em uma lâmina, contendo esfregaço seco, cubra-o pingando gotas de cristal violeta ou violeta-de-metila e deixe agir por 15 segundos;
2. Adicione água ao esfregaço, em cima do violeta-de-metila, cobrindo toda a lâmina. Deixe agir por mais 45 segundos;

3. Após o tempo corrido, escorra o corante e lave o esfregaço em um filete de água corrente. Cubra a lâmina com lugol ou Iodo de Gram e deixe por 60 segundos;
4. Escorra todo o lugol e lave em um filete de água corrente;
5. Aplique álcool etílico a 95%, ou acetona, para descorar a lâmina por 10 a 20 segundos;
6. Lave em um filete de água corrente;
7. Cubra toda a lâmina com safarina e deixe corar por aproximadamente 30 segundos;
8. Lave a lâmina em um filete de água;
9. Seque a lâmina com auxílio de um papel de filtro limpo ou deixe-a secar ao ar livre;
10. Aplique uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e observe no microscópico com objetiva de imersão (100x).

#### Pós- Laboratório

1. O que difere as bactérias gram positivas das gram negativas?
2. Qual a coloração que cada tipo de bactéria assume após a coloração?
3. Por que as bactérias gram positivas se coram de maneira diferente das bactérias gram negativas?

### **III – Genética de micro-organismos**

#### **1. Conceitos Básicos**

As características observadas nos micro-organismos são controladas ou influenciadas pela hereditariedade. Sendo assim, características estruturais (morfologia), reações bioquímicas (metabolismo), motilidade, capacidade de sobreviver em várias condições ambientais, capacidade de interação com outros micro-organismos, são repassadas entre as gerações. O estudo sobre genética é importante, pois os micro-organismos são seres com alta capacidade de mutação ao alterar o material genético.

As doenças e a atividade microbiana desenvolvida são dependentes do código genético. As informações genéticas da bactéria estão organizadas no genoma que é o conjunto de genes de um organismo, sendo um gene um segmento de ácido desoxirribonucléico (DNA) que codifica para a produção de uma proteína. DNA: composto por açúcar (pentose), radicais fosfatos e por sequências de quatro bases nitrogenadas, ligadas por pontes de H, formando uma dupla hélice. São polímeros formados por unidades repetidas (nucleotídeos).

O cromossomo bacteriano é constituído por uma única molécula de DNA, fita dupla de aproximadamente 1mm de comprimento, enovelado, circular e semiconservativa. Todas as informações essenciais à célula estão contidas nessa molécula. Além destas informações, algumas bactérias que contêm plasmídeo trazem outras informações não essenciais, com a mesma estrutura física do cromossomo, porém em menor quantidade de informações. Os tipos de plasmídeo são: F (sexual ou fertilidade), R (resistência), V (virulência) ou M (metabólico).

Outra característica importante é a existência de elementos transponíveis, com capacidade de movimentar-se de um local para outro no genoma, ou seja, ao longo da fita de plasmídeo e deste para o DNA. São denominados de transposons, os quais são variáveis. Os tipos de transposons conhecidos são estes: a) Sequência de inserção (SI): tem somente um gene que codifica a transposase e locais de reconhecimento que são sequências curtas, invertidas de DNA; Transposon (Tn): são maiores que as SI e carregam outros genes, alguns conferindo propriedades importantes ao micro-organismo, como resistência, antagonismo e síntese enzimática. As informações do DNA são transmitidas para um mRNA, sendo no rRNA onde ocorre a síntese protéica e no tRNA se dá o transporte das informações, reconstituindo a nova fita de DNA.

## 2. Mutações

Mutações são definidas como alterações de natureza herdável, que ocorrem na sequência de bases de um ácido nucléico contido no genoma de um organismo. A recombinação genética é o processo pelo qual os elementos genéticos contidos em dois genomas distintos são reunidos em uma unidade. Por meios desse mecanismo, novas combinações de genes podem surgir, mesmo não ocorrendo mutações. Uma vez que os elementos genéticos adquiridos podem conferir a um organismo novas capacidades, a recombinação genética pode favorecer a adaptação à ambiente que sofrem variações. Enquanto as mutações geralmente resultam em pequenas alterações genéticas de uma célula, a recombinação envolve, em geral, alterações mais significativas. Genes completos, conjuntos de genes ou mesmo cromossomos inteiros podem ser transferidos de um organismo para outro.

Os procariotos, contrariamente à maioria dos eucariotos, não apresentam qualquer tipo de reprodução sexuada. Entretanto, possuem mecanismos de troca genética que, embora consideravelmente diferentes daqueles envolvidos na reprodução sexuada de eucariotos, permitem tanto a transferência de genes quanto sua recombinação.

Para que a troca de genes entre dois organismos seja detectada, é necessária a utilização de marcadores genéticos, cuja transferência pode ser observada. Linhagens geneticamente alteradas são empregadas com essa finalidade, sendo as alterações decorrentes de uma ou mais mutações no DNA do organismo. Essas mutações podem envolver alterações em apenas um ou poucos pares de bases ou correspondem à inserção ou deleção de genes completos.

Em todas as células, o genoma é composto por moléculas de DNA de fita dupla. Uma linhagem com tal tipo de alteração é denominada mutante. Um mutante, por definição, diferencia-se de sua linhagem parental quanto ao seu genótipo, que corresponde ao conjunto preciso de genes contidos em um organismo. Além disso, as propriedades observáveis do mutante (seu fenótipo) podem também apresentar-se alteradas em relação à linhagem parental. Tal fenótipo alterado pode ser descrito como um fenótipo mutante. Frequentemente, as linhagens isoladas de ambientes naturais são denominadas linhagens selvagens. Os mutantes podem ser obtidos tanto a partir de linhagens selvagens, como por exemplo, de outro mutante.

Algumas bactérias têm maior capacidade de mutação. Os tipos de mutações são:

- Espontânea: falhas no mecanismo de replicação (1 para  $10^5$  a  $10^8$ ), também

denominada de mutação por deslocamento da fase de leitura, onde um ou alguns pares de nucleotídeos são suprimidos ou inseridos no DNA;

- Induzida: ocorre pela exposição aos agentes mutagênicos (ioniza o DNA), como radiação (raios ultravioleta, raios X, raios gama); análogos de base (5 bromouracil, 2 aminopurina); Corantes, antibióticos, metais pesados, drogas, e calor.

Mutações pontuais envolvem um ou poucos pares de bases, onde estas são substituídas. São classificadas em:

- Mutação de sentido trocado (missense): altera a proteína formada;
- Mutação sem sentido (nonsense): quando a alteração resulta em um códon de parada;
- Mutação silenciosa: também conhecida como mutação neutra, pois mesmo alterando uma base, a proteína não é alterada.

Os micro-organismos são capazes de transferir material genético entre si, e em uma população, sem que se caracterize um processo de multiplicação. Com a transferência gênica, os micro-organismos são capazes de adquirir informações genéticas referentes à resistência a drogas, às condições ambientais, à síntese de enzimas e à produção de toxinas. A transferência de genes pode ocorrer de três formas conhecidas:

a) Transformação bacteriana: fragmentos de genes de uma bactéria destruída, porém viáveis, são captados por outra bactéria. Desta forma, a bactéria receptora, em estado competente (ocorrem alterações fisiológicas na parede celular e na permeabilidade da membrana para a entrada do fragmento de DNA), passa a possuir um genoma recombinante. Ex. de bactérias transformadas: *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* (Figura 2.1).

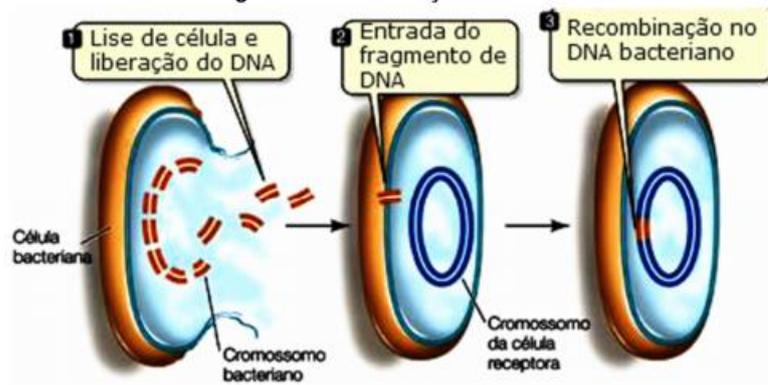


Figura 2.1 – Transferência de genes por transformação.

b) Conjugação bacteriana: o material genético é transferido de uma célula para outra através de um pili (pili sexual). Neste caso, as informações transferidas são as contidas no plasmídeo existente na bactéria doadora (Figura 2.2). Como o plasmídeo é auto replicativo, uma cópia do mesmo é transferido. As informações contidas na cópia do plasmídeo são para síntese de pili sexual (fator F = fertilidade) e outras informações não essenciais, dependendo do plasmídeo transferido. Quando o fator F se integra ao cromossomo transforma-se em uma célula de alta frequência de recombinação (Hfr). Somente a bactéria Hfr pode transferir cópias ou partes do DNA. Ex. *Escherichia coli*.

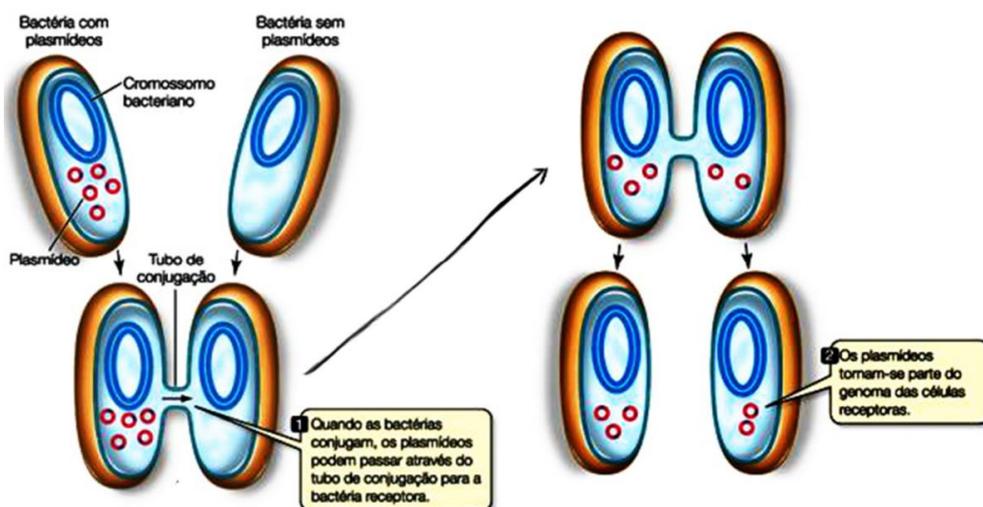


Figura 2.2 – Transferência de genes por conjugação.

c) Transdução: o material genético é transferido dentro de um vetor, um vírus conhecido como bacteriófago ou fago, capaz de infectar bactérias. Ao infectar a célula bacteriana, o fago fixa-se a parede celular e injeta seu DNA na bactéria (Figura 2.3).

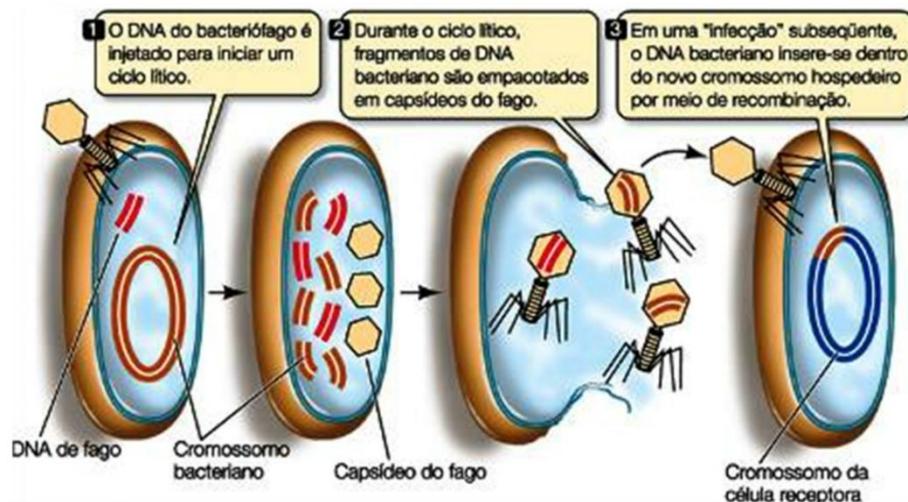


Figura 2.3 – Transferência de genes por transdução.

Uma vez infectada, o fago pode entrar no ciclo lítico ou no ciclo lisogênico:

- Ciclo lítico: o material genético viral se replica no citoplasma bacteriano, libera enzimas líticas que fragmentam o DNA da bactéria e ocorre a síntese protéica de revestimento dos novos fagos. Nesse processo, fragmentos do DNA da bactéria são envelopados juntamente com o DNA viral. Quando ocorre a lise da célula bacteriana, os bacteriófagos são liberados e ao infectar novas células bacterianas, transmitirão o DNA da célula destruída.

- Ciclo lisogênico: conhecido também como fago temperado. Neste, o material genético viral se insere no DNA bacteriano e permanece latente durante várias gerações bacterianas. As populações bacterianas formadas contêm o genoma do bacteriófago. Porém, fatores não determinados levam o fago a entrar no ciclo lítico, para poder haver a transferência do material genético para outra bactéria. Sendo assim, a bactéria infectada promove a replicação viral, este destrói por lise a bactéria e leva também o material genético da bactéria destruída, infectando uma nova bactéria. Ex. *Corynebacterium diphtheriae*: toxina diftérica; *Streptococcus pyogenes*: toxina escarlatínica; *Staphylococcus aureus*: enterotoxinas; *Escherichia coli*: citotoxinas.

#### Isolamento de mutantes

Qualquer característica de um organismo pode ser modificada por meio de mutações. Algumas mutações são selecionáveis: conferem vantagens ao organismo que a possui, enquanto outras são não selecionáveis. Por exemplo, uma mutação não selecionável: perda de coloração de uma colônia (detecção visual do aspecto diferente). E uma mutação selecionável: resistência às drogas confere vantagem ao organismo.

Existem metodologias que permitem a varredura de grandes números de colônias exibindo determinados tipos de mutações. Nesse contexto, mutantes nutricionais podem ser detectados por meio da técnica de plaqueamento de réplica (Figura 2.4).

Mediante o emprego de um pedaço de veludos ou de papel de filtro estéreis, pode-se obter uma réplica das colônias que estão crescendo na superfície de uma placa matriz, as quais serão inoculadas na superfície de um meio desprovido de determinado nutriente. As colônias da linhagem parental crescerão normalmente, enquanto as linhagens mutantes não se desenvolverão no meio carentes daquele determinado nutriente. Assim a incapacidade de uma colônia crescer na placa réplica indica que esta corresponde a um mutante.

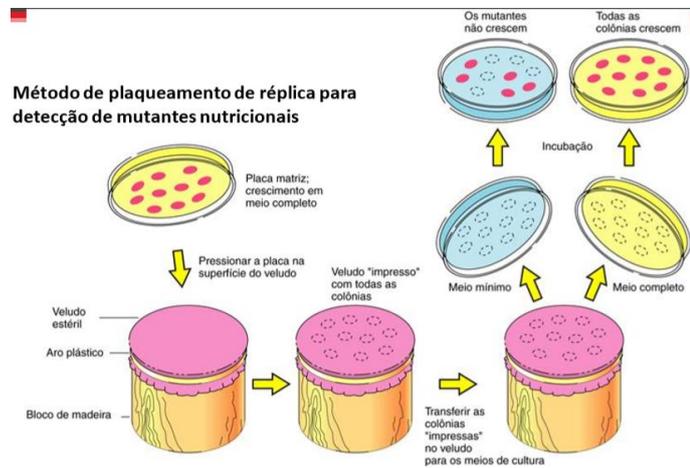


Figura 2.4 – Método de plaqueamento de réplica para detecção de mutantes nutricionais.

## **Referências Bibliográficas**

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MIMS, C.A., PLAYFAIR, J.H., ROITT, I.M., WAKELIN, D., WILLIAMS, R. **Microbiologia médica**. São Paulo: Manole, 1995, p.18-38.

MURRAY, P.R., DREW, W.L., KOBAYASHI, G.S., THOMPSON, J.K. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 5.ed, 2005.

NASCIMENTO, J.S. **Biologia de microrganismos**. In. GUERRA, R.A.T. (Org.). Cadernos CB Virtual 4. João Pessoa: UFPB, 2010, v.4, p.233-306.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 827p.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.



## Hino Nacional

Ouviram do Ipiranga as margens plácidas  
De um povo heróico o brado retumbante,  
E o sol da liberdade, em raios fúlgidos,  
Brilhou no céu da pátria nesse instante.

Se o penhor dessa igualdade  
Conseguimos conquistar com braço forte,  
Em teu seio, ó liberdade,  
Desafia o nosso peito a própria morte!

Ó Pátria amada,  
Idolatrada,  
Salve! Salve!

Brasil, um sonho intenso, um raio vívido  
De amor e de esperança à terra desce,  
Se em teu formoso céu, risonho e límpido,  
A imagem do Cruzeiro resplandece.

Gigante pela própria natureza,  
És belo, és forte, impávido colosso,  
E o teu futuro espelha essa grandeza.

Terra adorada,  
Entre outras mil,  
És tu, Brasil,  
Ó Pátria amada!  
Dos filhos deste solo és mãe gentil,  
Pátria amada, Brasil!

Deitado eternamente em berço esplêndido,  
Ao som do mar e à luz do céu profundo,  
Fulguras, ó Brasil, florão da América,  
Iluminado ao sol do Novo Mundo!

Do que a terra, mais garrida,  
Teus risonhos, lindos campos têm mais flores;  
"Nossos bosques têm mais vida",  
"Nossa vida" no teu seio "mais amores."

Ó Pátria amada,  
Idolatrada,  
Salve! Salve!

Brasil, de amor eterno seja símbolo  
O lábaro que ostentas estrelado,  
E diga o verde-louro dessa flâmula  
- "Paz no futuro e glória no passado."

Mas, se ergues da justiça a clava forte,  
Verás que um filho teu não foge à luta,  
Nem teme, quem te adora, a própria morte.

Terra adorada,  
Entre outras mil,  
És tu, Brasil,  
Ó Pátria amada!  
Dos filhos deste solo és mãe gentil,  
Pátria amada, Brasil!

## Hino do Estado do Ceará

Poesia de Thomaz Lopes  
Música de Alberto Nepomuceno  
Terra do sol, do amor, terra da luz!  
Soa o clarim que tua glória conta!  
Terra, o teu nome a fama aos céus remonta  
Em clarão que seduz!  
Nome que brilha esplêndido luzeiro  
Nos fulvos braços de ouro do cruzeiro!

Mudem-se em flor as pedras dos caminhos!  
Chuvas de prata rolem das estrelas...  
E despertando, deslumbrada, ao vê-las  
Ressoa a voz dos ninhos...  
Há de florar nas rosas e nos cravos  
Rubros o sangue ardente dos escravos.  
Seja teu verbo a voz do coração,  
Verbo de paz e amor do Sul ao Norte!  
Ruja teu peito em luta contra a morte,  
Acordando a amplidão.  
Peito que deu alívio a quem sofria  
E foi o sol iluminando o dia!

Tua jangada afoita enfune o pano!  
Vento feliz conduza a vela ousada!  
Que importa que no seu barco seja um nada  
Na vastidão do oceano,  
Se à proa vão heróis e marinheiros  
E vão no peito corações guerreiros?

Se, nós te amamos, em aventuras e mágoas!  
Porque esse chão que embebe a água dos rios  
Há de florar em meses, nos estios  
E bosques, pelas águas!  
Selvas e rios, serras e florestas  
Brotem no solo em rumorosas festas!  
Abra-se ao vento o teu pendão natal  
Sobre as revoltas águas dos teus mares!  
E desfraldado diga aos céus e aos mares  
A vitória imortal!  
Que foi de sangue, em guerras leais e francas,  
E foi na paz da cor das hóstias brancas!



**GOVERNO DO  
ESTADO DO CEARÁ**  
*Secretaria da Educação*