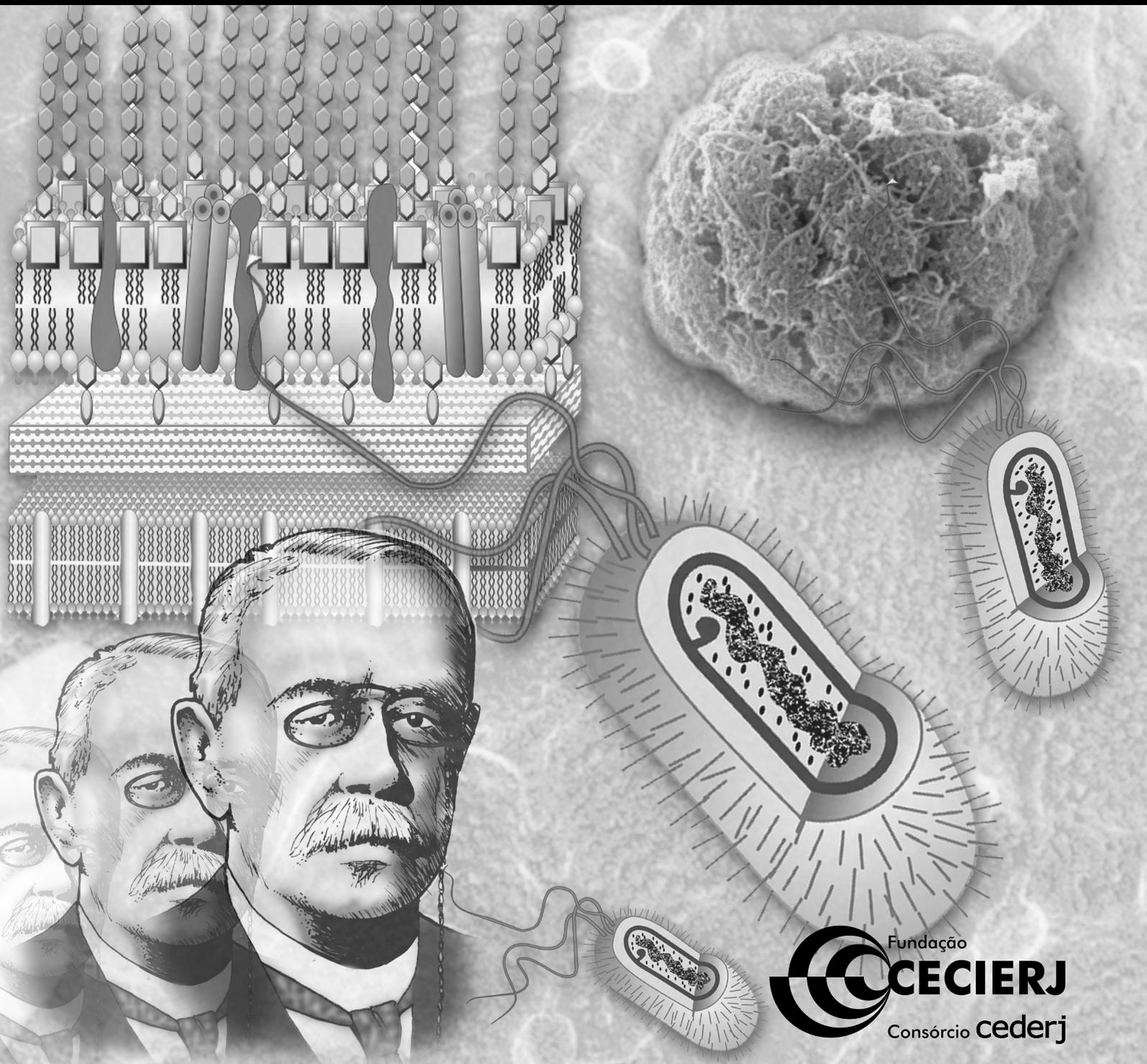


Maria Isabel Madeira Liberto  
Maulori Curié Cabral  
Ulysses Garcia Casado Lins

Microbiologia







Fundação

**CECIERJ**

Consórcio **cederj**

Centro de Educação Superior a Distância do Estado do Rio de Janeiro

# Microbiologia

**Volume 1 - Módulo 1**  
2ª edição

Maria Isabel Madeira Liberto  
Maulori Curié Cabral  
Ulysses Garcia Casado Lins



**SECRETARIA DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA**



**Ministério  
da Educação**



**Apoio:**



# Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Rua Visconde de Niterói, 1364 – Mangueira – Rio de Janeiro, RJ – CEP 20943-001

Tel.: (21) 2334-1569 Fax: (21) 2568-0725

## Presidente

Masako Oya Masuda

## Vice-presidente

Mirian Crapez

## Coordenação do Curso de Biologia

UENF - Milton Kanashiro

UFRJ - Ricardo Iglesias Rios

UERJ - Cibele Schwanke

## Material Didático

### ELABORAÇÃO DE CONTEÚDO

Maria Isabel Madeira Liberto

Maulori Curié Cabral

Ulysses Garcia Casado Lins

### COORDENAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL

Cristine Costa Barreto

### DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL E REVISÃO

Aroaldo Veneu

Luciana Messeder

Marta Abdala

Patrícia Alves

### COORDENAÇÃO DE LINGUAGEM

Maria Angélica Alves

### COORDENAÇÃO DE AVALIAÇÃO DO MATERIAL DIDÁTICO

Débora Barreiros

### AVALIAÇÃO DO MATERIAL DIDÁTICO

Ana Paula Abreu-Fialho

Aroaldo Veneu

## Departamento de Produção

### EDITORA

Tereza Queiroz

### COORDENAÇÃO EDITORIAL

Jane Castellani

### REVISÃO TIPOGRÁFICA

Equipe Cederj

### COORDENAÇÃO DE PRODUÇÃO

Jorge Moura

### PROGRAMAÇÃO VISUAL

Carlos Jorge Santos de Oliveira

Sanny Reis

### ILUSTRAÇÃO

Morvan Neto

### CAPA

Morvan Neto

### PRODUÇÃO GRÁFICA

Patrícia Seabra

Copyright © 2005, Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Nenhuma parte deste material poderá ser reproduzida, transmitida e gravada, por qualquer meio eletrônico, mecânico, por fotocópia e outros, sem a prévia autorização, por escrito, da Fundação.

L695m

Liberto, Maria Isabel Madeira.  
Microbiologia. v. 1 / Maria Isabel Madeira Liberto; Ulysses Garcia Casado Lins; Maulori Curié Cabral. 2. ed. – Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2010.  
152 p.; 19 x 26,5 cm.

ISBN: 85-7648-183-9

1. Microbiologia. 2. Células. I. Lins, Ulysses Garcia Casado. II. Cabral, Maulori Curié. III. Título.

CDD: 579

2010/1

Referências Bibliográficas e catalogação na fonte, de acordo com as normas da ABNT.

# Governo do Estado do Rio de Janeiro

**Governador**  
Sérgio Cabral Filho

**Secretário de Estado de Ciência e Tecnologia**  
Alexandre Cardoso

## Universidades Consorciadas

**UENF - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO  
NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**  
Reitor: Almy Junior Cordeiro de Carvalho

**UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO  
RIO DE JANEIRO**  
Reitor: Ricardo Vieiralves

**UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
Reitor: Roberto de Souza Salles

**UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO**  
Reitor: Aloísio Teixeira

**UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DO RIO DE JANEIRO**  
Reitor: Ricardo Motta Miranda

**UNIRIO - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO  
DO RIO DE JANEIRO**  
Reitora: Malvina Tania Tuttman



### SUMÁRIO

<b>Aula 1</b> – Estudo dos micróbios: os fósseis vivos do nosso planeta _____	<b>7</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Aula 2</b> – A dinâmica populacional dos micróbios em vários ambientes – Aula prática _____	<b>23</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Aula 3</b> – Células e suas estruturas _____	<b>31</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Aula 4</b> – Células e seus produtos _____	<b>47</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Aula 5</b> – Coloração de esfregaço de material biológico pelo método de Gram – Aula prática _____	<b>61</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Aula 6</b> – Crescimento populacional microbiano _____	<b>71</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Aula 7</b> – Ação dos agentes físicos e químicos sobre os micróbios _____	<b>87</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Aula 8</b> – Ação do calor e de agentes químicos sobre as células microbianas – Aula prática _____	<b>101</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Aula 9</b> – Caracterização e identificação de bactérias _____	<b>113</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Aula 10</b> – Micróbios no meio ambiente _____	<b>129</b>
<i>Maria Isabel Madeira Liberto / Maulori Curié Cabral / Ulysses Garcia Casado Lins</i>	
<b>Referências</b> _____	<b>147</b>



# Estudo dos micróbios: os fósseis vivos do nosso planeta

AULA

1

## Meta da aula

Apresentar evidências da existência dos micróbios e a importância destes para os outros seres vivos do nosso planeta.

## objetivos

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Identificar a participação dos micróbios na Natureza.
- Fazer relação entre o tempo de permanência dos micróbios e dos seres humanos em relação ao tempo de existência na Terra.
- Reconhecer a importância dos micróbios para os demais seres vivos do nosso planeta.

## Pré-requisitos

Para o entendimento do conteúdo desta aula, você deve rever o conceito de ser vivo (apresentado na Aula 8 da disciplina Diversidade dos Seres Vivos), a Aula 1 de Biologia Celular I e recordar suas noções acerca de sistema métrico, progressão geométrica e medida de volume, aprendidos no Ensino Fundamental e no Médio.

## INTRODUÇÃO

### PROTISTA

Como você viu na disciplina Diversidade dos Seres Vivos, os protistas são eucariontes microscópicos e unicelulares, autotróficos ou heterotróficos, que integram um dos cinco reinos em que se dividem os seres vivos. Vivem na água e se reproduzem por bipartição. Neste reino agrupam-se as algas inferiores: euglenófitas, pirrófitas (dinoflagelados) e crisófitas diatomáceas), que são autotróficas; e os protozoários, que são heterotróficos.

Os micróbios foram os primeiros seres vivos a aparecer em nosso planeta e são indispensáveis à sobrevivência de qualquer dos demais habitantes. Eles são encontrados em qualquer dos ambientes da biosfera, inclusive aqueles que o ser humano não consegue suportar. São seres unicelulares de muita versatilidade metabólica que contribuíram e contribuem para tornar a Terra habitável pelos outros seres, sejam eles animais, vegetais ou **PROTISTAS**. Os micróbios são responsáveis pela reutilização cíclica dos compostos ou elementos químicos que participam da cadeia alimentar nos ecossistemas.

Nesta aula, você iniciará uma viagem ao mundo dos seres infinitamente pequenos que, na maioria das vezes, são benéficos à espécie humana. Considerando o seu corpo como um ecossistema, você também saberá como os micróbios estão intimamente associados com você. Já preparou seu passaporte?

**Micróbios** – o termo define os seres unicelulares que primeiro apareceram no nosso planeta e continuam aqui, em um número incontável, fazendo parte de todos os ambientes. Por isso, podem ser considerados como verdadeiros seres pré-históricos.

Vamos também apresentar a você os trabalhos de Louis Pasteur, considerado o pai da Microbiologia por ter demonstrado a existência dos micróbios, pondo abaixo a teoria da geração espontânea.

## BREVE HISTÓRIA DOS MICRÓBIOS

Como já falamos anteriormente, os micróbios são os seres vivos mais primitivos. Através de achados arqueológicos, sabe-se que eles já existiam na Terra há, pelo menos, 3,9 bilhões de anos, enquanto os seres humanos só apareceram nos últimos 500 mil anos. Os micróbios foram modificando gradualmente as condições atmosféricas e nutricionais ao longo do tempo, possibilitando, assim, que novos ecossistemas fossem estabelecidos. Como é do seu conhecimento, estima-se que o planeta Terra exista há, aproximadamente, 4,65 bilhões de anos, já visto por você na disciplina Diversidade dos Seres Vivos. Pode conferir, vendo a **Figura 1.1**.

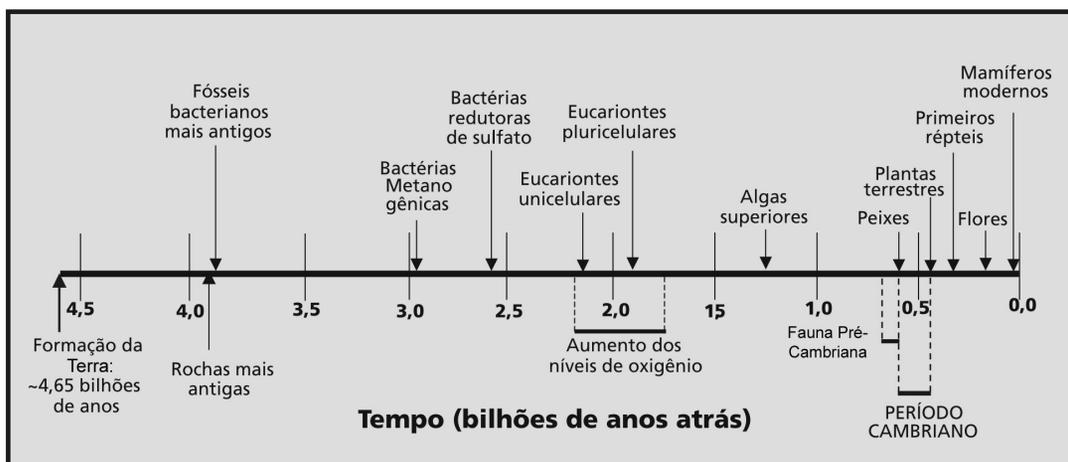


Figura 1.1: Evolução dos seres vivos no planeta.

Os micróbios são seres unicelulares que habitam todos os locais da Terra, ou seja, estão presentes em toda a biosfera. No cotidiano, os micróbios são conhecidos por bactérias, fungos (bolores, leveduras), algas e limos. Estudos de fósseis geológicos estimam que as cianobactérias sejam os micróbios mais antigos, muito anteriores ao **PERÍODO CAMBRIANO**.

As cianobactérias foram os primeiros organismos fotossintetizantes com clorofila-A a aparecerem no planeta. Elas podem viver em diversos ambientes e em condições extremas. Muito provavelmente foram as responsáveis pelo acúmulo de  $O_2$  na atmosfera primitiva, o que possibilitou o aparecimento da camada de Ozônio ( $O_3$ ) que retém grande parte da UV cósmica, permitindo a existência de organismos mais sensíveis a esse tipo de radiação.

Especula-se que a explosão da diversidade de organismos durante o **PERÍODO CAMBRIANO** tenha sido o resultado das mudanças climáticas acontecidas em virtude dos seguintes fatores: 1) aporte de oxigênio, produzido no processo de fotossíntese pelas cianobactérias; 2) resfriamento gradativo da crosta terrestre; 3) alteração do pH do ambiente aquático. Como você pode perceber, essas alterações se constituíram em barreiras seletivas, favorecendo a predominância dos seres mais aptos à sobrevivência de acordo com as novas condições vigentes.

#### PERÍODO CAMBRIANO

Classificado pelo geólogo inglês Adam Sedwick, em 1835, o período Cambriano teve início há cerca de 543 milhões de anos. Esse período é considerado o marco inicial da expansão da vida na Terra.

Você poderia perguntar: De que mecanismos depende a adaptação das diversas espécies de micróbios ao ambiente?

A resposta a essa questão envolve quatro aspectos:

- síntese de pigmentos, que os tornam mais resistentes a altos índices de luminosidade;
- formação de vacúolos gasosos ou lipídicos, que diminuem a densidade celular, possibilitando a flutuação nas massas de água;
- presença de envoltório, que possibilita a permeabilidade seletiva dos líquidos;
- resistência a agentes nocivos.

A permanência dos micróbios na Terra representa, portanto, um registro vivo da história evolutiva da biosfera de nosso planeta.

Os micróbios estão relacionados à degradação de compostos orgânicos e inorgânicos, dos quais retiram os nutrientes e/ou energia para sobreviverem. O principal exemplo disso é o que ocorre com a degradação dos corpos de animais ou vegetais mortos. Por isso, os micróbios participam dos principais ciclos biogeoquímicos do planeta, como decompositores e/ou produtores, tendo papel preponderante na reciclagem dos átomos de carbono, nitrogênio e enxofre, que compõem todos os ocupantes do planeta.

A relação harmônica entre seres vivos eucarióticos e procarióticos permite uma vida saudável e produtiva, sendo os micróbios fornecedores de uma série de elementos necessários à sobrevivência dos seres “superiores”, como você pode ver em alguns exemplos apresentados na Figura 1.2.

## MICRÓBIOS OPERÁRIOS

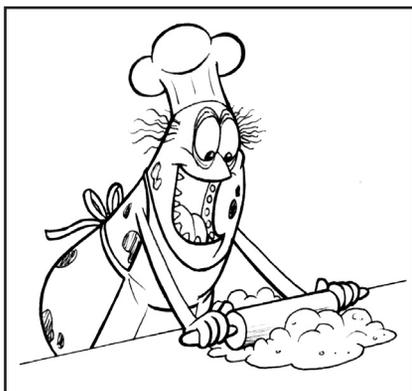
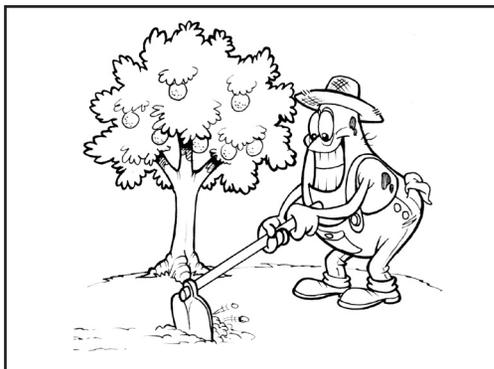
### Mineiros

Micróbios do gênero *Thiobacillus*. Eles absorvem e acumulam muitos minérios nas jazidas de baixo teor de cobre e de urânio nos Estados Unidos. Para absorver um grama de minério, são necessários mais de um milhão de bactérias. Mais tarde, o concentrado mineral é extraído da massa viva dos micróbios.



## Adubadores

São as bactérias que conseguem captar o nitrogênio do ar. Elas vivem associadas às raízes das plantas, suprindo-as de metabólitos nitrogenados.

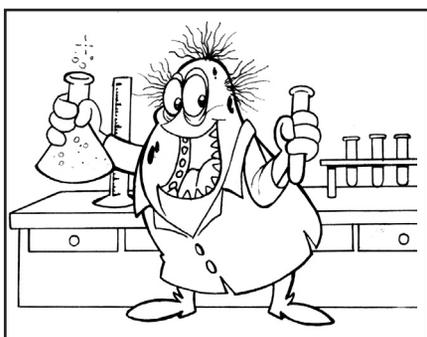


## Produtores de alimentos

Estão entre os mais antigos seres utilizados pela Humanidade. Fungos e bactérias participam de forma ativa na fabricação de pães, chocolates, queijos, vinhos e cervejas.

## Geneticistas

A *Agrobacterium tumefaciens* tem habilidade para penetrar nas células vegetais, sendo, por isso, utilizada como vetor para o transporte de genes de uma planta para outra.

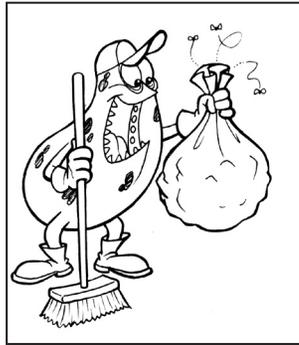


## Farmacêuticos

Cerca de 75% dos antibióticos conhecidos são produzidos por micróbios encontrados no solo, chamados actinomicetos, que são responsáveis pela produção dos gases que exalam da terra quando chove, gerando o cheiro característico (cheiro de chuva). Micróbios também nos fornecem vitaminas, principalmente as do complexo B. Transformados por engenharia genética, fornecem insulina e outros hormônios proteicos.

## Lixeiros

Bactérias naturais ou selecionadas em laboratório são capazes de degradar centenas de resíduos industriais e domésticos, atuando na despoluição de rios, lagoas e mares, além de purificarem água potável.



Micróbios também participam da produção do linho usado em confecções. Participam também da fermentação de matéria-prima (caldo-de-cana) que, depois de destilada, pode ser utilizada como álcool



Figura 1.2: Várias atividades associadas à atividade microbiana.



### ATIVIDADE

1.a. Reveja a **Figura 1.1**. Considerando a idade do planeta Terra como sendo de 4,65 bilhões de anos, calcule a que percentual corresponde o tempo de existência dos micróbios e dos seres humanos no nosso planeta?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

1.b. Antes de passarmos ao próximo assunto da aula, que tal fazermos uma revisão da importância dos micróbios para os demais seres vivos? Nas frases a seguir, marque (V) para as que forem verdadeiras e (F) para as que forem falsas:

- (a) Os micróbios prepararam a Terra para outros seres a povoarem. ( )
- (b) Os micróbios desempenham importantes funções para a vida na Terra, como produtores e decompositores de compostos orgânicos e inorgânicos. ( )

- (c) Muitas atividades microbianas contribuem para a saúde e o lazer dos seres humanos. ( )
- (d) Se não existissem os micróbios, a Humanidade viveria melhor. ( )
- (e) Os micróbios fazem parte do nosso corpo. ( )

#### RESPOSTAS COMENTADAS

1.a. Se 4,65 bilhões correspondem a 100%, usando a regra de três simples, você consegue os seguintes valores: 3,9 bilhões correspondem a 83,87%, e 500 mil anos são 0,01%.

Se você acertou, além de ter bom raciocínio matemático, entendeu o texto lido. Parabéns! Você percebeu que os micróbios apareceram no planeta muito antes dos seres humanos. Por isso, podemos dizer que são os “donos” do planeta, porque fizeram “usucapião”.

1.b. Somente a opção (d) é falsa! Como você percebeu, os micróbios tiveram papel fundamental na evolução das condições de vida no planeta e desempenham funções importantes, das quais a Humanidade se beneficia. Doenças são exceções e estão, na maioria das vezes, relacionadas a comportamentos errados de pessoas ou mesmo sociedades, tais como higiene e alimentação inadequadas.

## RELAÇÃO DOS MICRÓBIOS COM O NOSSO CORPO

Para você ter uma idéia da nossa estreita relação com os micróbios, lembramos que a massa corpórea de um ser humano adulto é composta, aproximadamente, de  $10^{14}$  micróbios e  $10^{13}$  células eucarióticas. Isto significa que somos, em número de células, dez vezes mais procarióticos do que eucarióticos. Como as células eucarióticas são dez vezes maiores do que as procarióticas, isso faz aquelas contribuírem com 90% do peso corpóreo, e os restantes 10% correspondem à **MICROBIOTA**, conforme você pode ver na **Figura 1.3**, sob a forma de equação matemática ou carta enigmática, se preferir. Na **Figura 1.4** está representada a relação de tamanho entre as células procarióticas e eucarióticas.

### MICROBIOTA

A expressão microbiota, que você talvez tenha estranhado, refere-se aos micróbios que vivem em simbiose com nosso organismo, intimamente associados à epiderme e às diversas mucosas que revestem nosso corpo. Embora você ainda encontre o termo “flora intestinal”, ele não é adequado, porque os micróbios são diferentes dos vegetais.

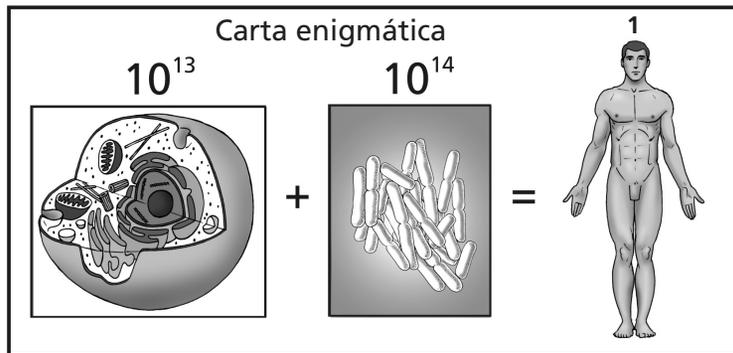


Figura 1.3: Corpo constituído por células eucarióticas e procarióticas.

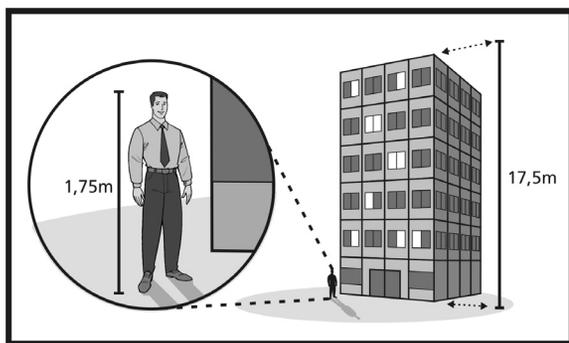


Figura 1.4: Relação entre uma célula procariótica e uma eucariótica, tendo como parâmetro uma pessoa de 1,75m ao lado de um prédio de 5 andares (~ 17,5m).

Para ter uma idéia do tamanho dos seres microbianos, você precisa de muita imaginação, pois as menores coisas que os nossos olhos conseguem ver têm o tamanho de 0,2 mm (como os pequenos ácaros).

Você pode observar na Figura 1.5, o espectro de ondas magnéticas em ordem crescente de comprimento de onda, e perceber porque os micróbios são invisíveis a olho nu:

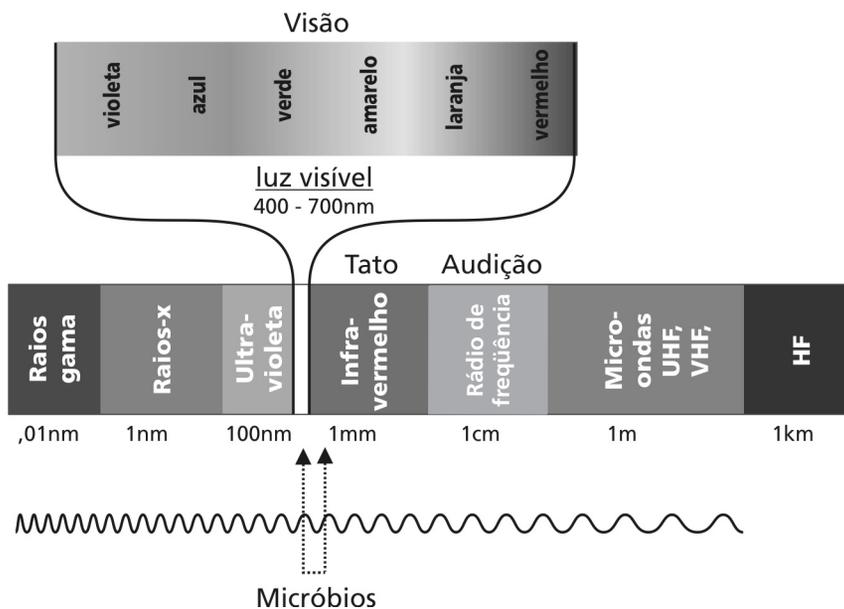


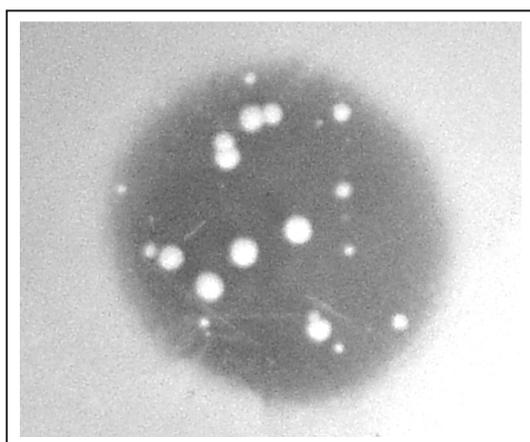
Figura 1.5: Espectro de ondas magnéticas.

! Você poderá ver mais detalhes sobre o espectro eletromagnético visitando o site (<http://leobenez.tripod.com/muitas-luzes.html>).

A dimensão média dos micróbios é de um micrômetro ( $\mu\text{m}$ ), que corresponde à milésima parte do milímetro. Portanto, eles só podem ser observados ao microscópio. Como você já viu (Aula 1 da disciplina Biologia Celular I), o holandês Antoine von Leeuwenhoek, em 1674, foi o primeiro a perceber a presença de seres microscópicos ao observar gotículas de água e de saliva com lentes fabricadas por ele mesmo. Aqueles seres tinham diferentes tamanhos e formas, e foram denominados “animálculos” pelo cientista.

Mas, apesar do tamanho diminuto das células procarióticas, há uma forma de vê-las sem o microscópio. Depois de muito se multiplicarem, elas formam aglomerados denominados colônias, que podem ser vistos a olho nu. Para isto, é necessário haver condições adequadas de crescimento (nutrientes, pH, salinidade, umidade e temperatura adequados) e tempo. Em condições ótimas, a maioria dos micróbios têm um tempo de geração médio de 30 minutos.

Portanto, se você colocar uma célula bacteriana em meio favorável, após 10 horas serão gerados 1.048.576 células clonadas (uma vez que cada uma dá origem a duas iguais). Forma, assim, uma coleção visível desses seres, conforme você pode observar várias delas no interior do círculo da **Figura 1.6**. Sabendo que uma bactéria tem  $1\mu\text{m}^3$ , uma colônia com 1.000.000 de bactérias terá um volume de  $100\mu\text{m}^3$ , ou  $0,1\text{mm}^3$ ; bem pequena, mas possível de ser observada.



**Figura 1.6:** Colônias bacterianas de tamanho variado, observadas como estruturas redondas, esbranquiçadas, no interior do círculo.



**Desafio:** E então, vamos fazer um exercício comum à indústria farmacêutica?

Se você tiver dificuldade em resolver este desafio, não fique desmotivado, pois isso é apenas questão de costume, abordaremos o fenômeno do crescimento bacteriano em outra aula.

Imagine que você trabalha em uma grande empresa da indústria farmacêutica que pesquisa novos produtos. O chefe do seu laboratório pediu uma preparação com, aproximadamente,  $10^6$  bactérias, para fazer o teste de uma nova formulação. Levando em consideração que você dispõe de uma amostra contendo  $10^3$  bactérias, de condições ótimas para desenvolvimento da cultura, e que o pedido foi feito às 18h, você poderá dizer ao seu chefe que entregará a amostra:

- a) Antes da meia-noite.
- b) Antes das seis da manhã do dia seguinte.
- c) Antes do meio-dia do dia seguinte.
- d) Antes das duas da tarde do dia seguinte.

### **Resposta para o desafio**

a) Você disse, com certeza, para seu chefe que à meia-noite teremos 4.096.000 ou  $4,096 \times 10^6$ . Este resultado pode ser calculado passo a passo (em meia hora, teremos 2.000 micróbios; em uma hora, 4.000 ...) ou usando a fórmula que você talvez se lembre, do Ensino Médio:  $T_n = T_i \cdot (1 + j)^n$  na qual  $T_n$  é o  $n^{\circ}$  total,  $T_i$  é o  $n^{\circ}$  inicial de micróbios,  $n$  é o número de períodos de geração (6 horas correspondem a 12 períodos de 30 minutos) e  $j$  é a razão da taxa de crescimento exponencial ( $100/100 = 1$ , uma vez que a cada 30 minutos há um rendimento de 100%). Portanto,  $T_n = 1.000 \cdot (1 + 1)^{12} = 1.000 \times 2^{12} = 1.000 \times 4.096 = 4.096 \times 10^3$ .

Às 23h haverá um número de 1.024.000 micróbios, o que poderá ser comprovado aplicando na fórmula  $n = 10$  (5 horas têm 10 períodos de  $\frac{1}{2}$  hora).

A Microbiologia, como ciência, deve-se à genialidade de Louis Pasteur, que desenvolveu os trabalhos pioneiros, na França, durante a segunda metade do século XIX. Por isso, vamos apresentar a você uma breve biografia desse cientista que tanto contribuiu para a melhoria da qualidade de vida humana.

## **A CONTRIBUIÇÃO DE PASTEUR À CIÊNCIA**

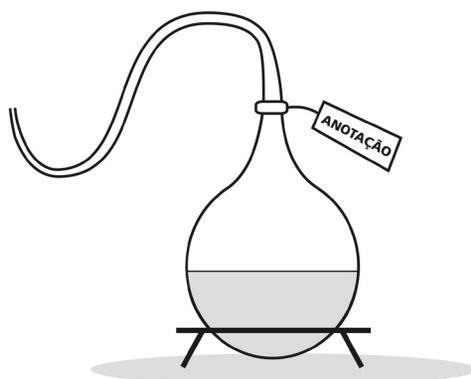
Ao químico francês **LOUIS PASTEUR** devem-se os conceitos que regem a Microbiologia.

Para comprovar a existência dos micróbios na Natureza, ele realizou a célebre experiência dos balões com caldo nutritivo. Estes foram submetidos à fervura e, posteriormente, abertos no centro de Paris e nas províncias situadas em diferentes altitudes na região dos Alpes franceses. No centro de Paris, todos os balões contaminavam, mostrando que o ar estava contaminado (“impuro”). Em contrapartida, à medida que subiam os Alpes, os mesmos balões não contaminavam, gerando a concepção do ar “puro” das montanhas.

### **LOUIS PASTEUR**

Nasceu em 27/12/1822 em Dole, na França, e faleceu em 28/9/1895. Foi professor de Química da Universidade de Strasbourg e diretor da Faculdade de Ciências da Universidade de Lille. Pela importância de seus trabalhos científicos que comprovaram a existência dos micróbios, é considerado o pai da Microbiologia.

Posteriormente Pasteur mostrou que, se os balões fossem confeccionados com o gargalo longo, em forma de pescoço de ganso (como pode ser visto na **Figura 1.7**), o caldo, contido no interior do frasco, continuaria estéril porque as curvas do gargalo impediriam que os micróbios chegassem ao líquido, embora permitissem a chegada de ar. Foi esta experiência que derrubou a hipótese do surgimento de seres vivos por geração espontânea.

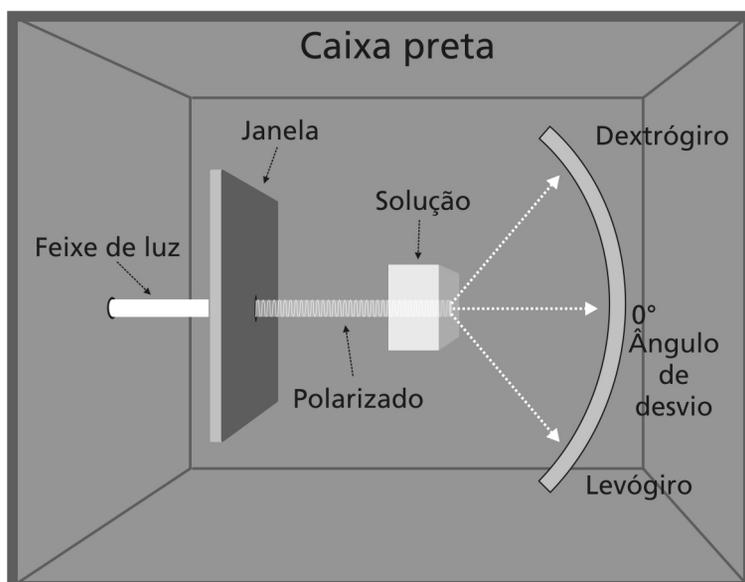


**Figura 1.7:** Balão de Pasteur.  
<http://www.Kpu.ac.jp/agricul/microbio/Pasteur.html>

Filho de um curtidor de peles, Pasteur graduou-se em Letras aos 17 anos e obteve o grau de doutor em Ciências aos 25. Em sua tese de doutorado, descobriu o fenômeno da isomeria óptica, constatando que os compostos orgânicos obtidos por síntese química eram diferentes daqueles produzidos pelos seres vivos. Os naturais desviam o feixe de luz polarizada para a esquerda (levógiro) ou para a direita (dextrógiro), enquanto os artificiais não desviam. Isso se dá porque os produtos orgânicos sintéticos são constituídos por moléculas levóginas e dextróginas em quantidades idênticas e, por isso, são chamados **RACÊMICOS**. Essas evidências permitiram que ele concluísse ser impossível gerar seres vivos a partir da matéria inorgânica, derrubando assim a teoria da geração espontânea.



Visite o *síte*  
<http://oficina.cienciaviva.pt/~piv172/Actividades%20em%20ppt/Actividade%20n%BA2.ppt>  
para ter mais detalhes sobre a experiência de Pasteur.



**Figura 1.8:** Representação gráfica do fenômeno de isomeria óptica.

#### RACÊMICO

Utilizado para definir uma mistura de quantidades iguais das formas dextrógiro e levógiro de um composto opticamente ativo. Uma mistura racêmica (somente obtida através de síntese química) não apresenta atividade óptica, ou seja, não desvia o plano da luz polarizada para a esquerda (levógiro) ou para a direita (dextrógiro), como você pode ver na **Figura 1.8**.

Patriota convicto, Pasteur ganhou muito prestígio ao resolver vários problemas de âmbito nacional nas áreas de saúde pública, indústria, pecuária, agricultura e medicina. Ele contribuiu com os vicultores que se deparavam com a acidificação do vinho, comprovando que aquele prejuízo era devido à ação de micróbios. Ainda descobriu que eles morriam quando eram submetidos a um aquecimento de 60°C, seguido de rápido resfriamento. Esse procedimento mostrou-se tão eficiente que passou a ser utilizado também na cerveja e no leite, e hoje é denominado pasteurização.

Pasteur também descobriu que a pebrina, uma doença que acometia o bicho da seda levando os sericultores a grandes prejuízos, devia-se à presença de parasitas da espécie *Nosema bombycis* nas folhas de amoreira, causando a infecção das lagartas que se alimentavam delas.

Em 1881, utilizando os princípios de Edward Jenner, Pasteur criou uma vacina contra o **ANTRAZ (CARBÚNCULO)**, doença que dizimava os rebanhos ovinos e bovinos, conseguindo reduzir enormemente a taxa de mortalidade dessa doença. Também foi o criador de uma vacina contra a cólera aviária, que ocorria sob forma epidêmica nos aviários franceses. Foi o inventor da vacina anti-rábica, aplicando-a em animais e seres humanos.

#### **CARBÚNCULO OU ANTRAZ**

Refere-se ao aspecto negro, como carvão, das lesões pustulares que aparecem no corpo dos animais infectados. O termo carvão é oriundo de carbúnculo, em latim, e antraz, em grego. Esta doença é resultante da infecção por *Bacillus anthracis*.

Edward Jenner (1749 - 1823), médico inglês que ficou conhecido pela invenção do processo de vacinação (por isso considerado o pai da Imunologia). Em 1796 ele inoculou, em uma criança de oito anos de idade, material retirado de vesículas da mão de uma ordenhadora, resultantes do contato com as lesões de varíola bovina presentes nos úberes das vacas. Algumas semanas depois, a mesma criança foi posta em contato com um paciente que apresentava varíola, e não contraiu a doença. Posteriormente, o método passou a utilizar o material obtido diretamente das lesões das vacas com varíola bovina (associada à infecção por vírus do mesmo grupo dos da varíola humana), o que deu origem ao nome "vacina" (proteína de vaca) para o processo de imunização.

Você pode, de forma bastante prática, reproduzir o experimento de Pasteur que comprovou a existência de micróbios, desenvolvendo o teste a seguir:



### RESPOSTA COMENTADA

*Parabéns, se você respondeu que micróbios do ar cairão no frasco destampado e, ao se multiplicarem no caldo, este se tornará turvo e putrefato. Já o frasco tampado não apresentará turvação, pois a tampa impede que os micróbios atinjam o meio de cultura. Não é uma forma simples de comprovar a existência de micróbios no ar? Na Natureza, os micróbios participam da degradação da matéria orgânica; por isso, os alimentos estragam se não forem devidamente conservados.*

### CONCLUSÃO

Agora você pôde perceber que os micróbios são indispensáveis à manutenção da vida no nosso planeta, por suas propriedades de produtores e decompositores. Eles sintetizam uma série de produtos benéficos e/ou necessários à existência de animais e vegetais, e decompõem matéria orgânica. Contribuem, desta forma, para a reciclagem dos átomos de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre entre as várias gerações de seres vivos.

Os micróbios tiveram grande importância na transformação das condições climáticas do nosso planeta, pois, através do processo de fotossíntese, retiravam gás carbônico do ar e liberavam oxigênio. Dessa forma alteraram, gradualmente, as condições atmosféricas da Terra.

Após esta aula, como você vai “vender” os micróbios para os seus futuros alunos? Como seres maléficos ou benéficos? Uma viagem ao fascinante mundo dos micróbios lhe será oferecida nas próximas aulas.

### ATIVIDADE FINAL

Faça de conta que você é um átomo de carbono de uma molécula de gás carbônico na atmosfera primitiva de nosso planeta. De repente, você é capturado e fixado a outros átomos de carbono, formando glicose pelo processo de fotossíntese. Da molécula de glicose, você foi transferido para uma molécula de aminoácido e, depois, proteína. O mamute onde você estava morreu e ficou conservado congelado nas calotas polares. Um dia, foi encontrado e trazido para uma região quente. Durante o percurso, o animal apodreceu, foi abandonado e depois desapareceu. Você aparece novamente na atmosfera como CO<sub>2</sub>. Responda: quem o/a pegou e quem o/a libertou?



## RESUMO

Os micróbios (seres unicelulares) medem  $1\mu\text{m}$ ; são os seres vivos mais numerosos que existem na Terra e estão em toda parte. O homem moderno só surgiu no planeta há aproximadamente quinhentos mil anos, e evoluiu na presença de um mar de micróbios. Estes já habitam o planeta há, pelo menos, 3,9 bilhões de anos, adaptando-se e modificando gradualmente as condições atmosféricas e nutricionais aqui existentes, possibilitando a formação de novos ecossistemas. Os micróbios participam dos ciclos biogeoquímicos dos compostos orgânicos. Como decompositores e/ou produtores, têm papel preponderante na reciclagem dos átomos na Natureza e mantêm uma relação harmônica com os demais seres vivos.

Eles nos acompanham, associados à epiderme e às mucosas que revestem nosso corpo, desde que nascemos até a nossa morte, representando 90% das células que constituem o organismo humano.

Devido ao seu tamanho, individualmente, são invisíveis a olho nu, mas podem ser vistos com a ajuda de um microscópio. Quando se multiplicam, formam colônias que podem ser vistas a olho nu.

Louis Pasteur demonstrou a importância dos micróbios na medicina, saúde pública, indústria e agricultura. Provou que eles existem no ar e estão presentes em todos os ambientes da biosfera.

## INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, que será prática, você terá oportunidade de criar micro-ambientes diferentes para observar a diversidade microbiana, de acordo com as condições ambientais.

# A dinâmica populacional dos micróbios em vários ambientes – Aula prática

## AULA 2

### Meta da aula

Demonstrar a presença de diferentes tipos de micróbios no solo e em sedimentos, de acordo com as condições ambientais disponíveis e com as formas como eles se associam.

## objetivos

Esperamos que, após o desenvolvimento desta aula prática, você seja capaz de:

- Demonstrar que a diversidade de populações microbianas se desenvolve de acordo com as condições nutricionais e físico-químicas (luz e temperatura) encontradas nos ambientes, ao longo do tempo.
- Descrever a forma de associação que os micróbios utilizam para formar comunidades e, assim, sobreviver na Natureza.

### Pré-requisito

É importante, para um bom aproveitamento desta aula, rever os conceitos sobre micróbios estabelecidos na Aula 1 desta disciplina, bem como as Aulas 4, 5, 6 e 7 do Módulo 1 da disciplina Elementos de Ecologia e Conservação.

## INTRODUÇÃO

### BIOFILMES

São comunidades de micróbios que vivem harmonicamente nos mais variados ambientes (Figura 2.1). Várias espécies de micróbios (Figura 2.2), tanto procariontes quanto eucariontes, habitam um mesmo biofilme constituindo uma comunidade ecológica ou microbiota.

Agora que você já conhece a importância dos micróbios para a evolução das condições de vida na Terra, nada melhor do que criar ecossistemas que alojem diferentes microbiotas em função das condições ambientais. Com isto, você perceberá, na prática, como os micróbios foram se adaptando e modificando o ambiente no planeta, ao longo do tempo. Você vai ver também que, no meio ambiente, os micróbios vivem em associações chamadas **BIOFILMES**.

Um exemplo típico de biofilme na Natureza é a camada de limo que cobre as pedras de um riacho, tornando-as muito lisas e escorregadias, conforme pode ser visto em detalhes na **Figura 2.1**, assinalada com um asterisco branco. De acordo com a barra incluída nessa figura (10 cm), você pode deduzir o tamanho real da imagem. Preste atenção para esse detalhe pois, na **Figura 2.2**, a barra corresponde a 200  $\mu\text{m}$ , ou seja, 0,2 mm.

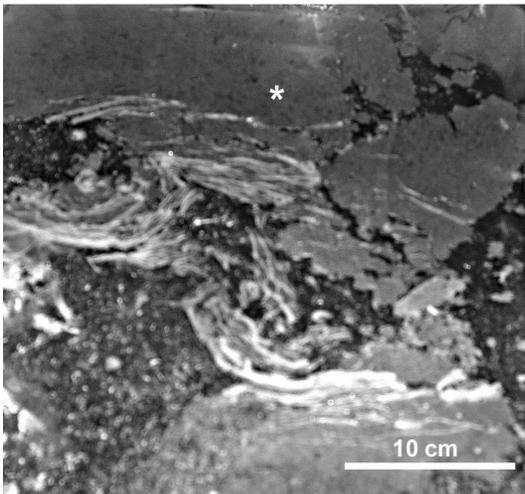


Figura 2.1: Biofilme (\*) numa superfície limosa.

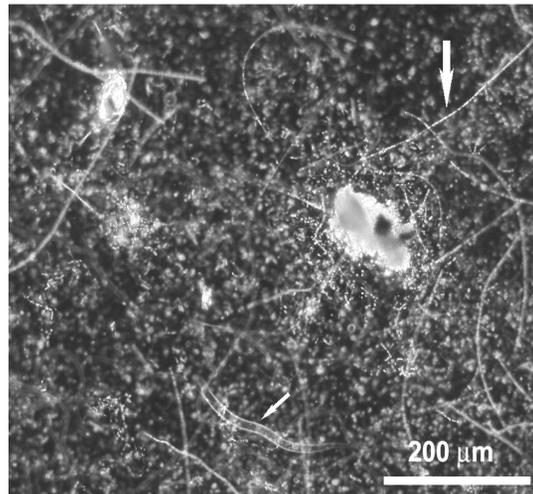


Figura 2.2: Micrografia de um biofilme, com alguns micróbios formando estruturas filamentosas (seta grande). A seta pequena indica um nematódeo.

## ATIVIDADES



1. Para você perceber a dinâmica das populações microbianas no meio ambiente, em função do tempo e das condições físicas (luz e temperatura) e da disponibilidade de nutrientes, realizaremos duas atividades práticas que apresentam resultados muito interessantes. Vamos lá!

Esta atividade prática deve ser iniciada o mais rápido possível, pois quanto maior for o tempo de observação, mais rica a discussão. Períodos compreendidos entre três e oito semanas são desejáveis.

Pense no bairro onde você mora e responda às seguintes questões:

Quantos tipos de seres vivos habitam nele? Onde eles podem ser encontrados? O que determina onde os seres vivos podem sobreviver?

Você alguma vez cavou um buraco para plantar uma árvore ou enterrar algo? Por que o solo, à medida que cavamos, tem cores diferentes? Há organismos vivos na água? Há organismos vivos no solo?

Como as condições físico-químicas do ambiente influenciam no desenvolvimento dos seres vivos, entre eles os micróbios? Relacione todas essas questões com os diferentes nichos ecológicos existentes na Terra (leão na África, anta no Brasil, canguru na Austrália ou, nas populações microbianas, as bactérias de água doce e as de água salgada, as presentes nos poços de petróleo e aquelas que vivem nas águas gelidas dos pólos).

Ao final da atividade, você deverá apresentar os resultados obtidos para serem comparados e discutidos com seu tutor e com os seus colegas. Anote, com detalhes: os materiais utilizados, as condições de trabalho e o tempo decorrido. Quanto mais registros forem anotados, mais elementos você terá para a discussão e, assim, reforçar a compreensão do fenômeno que está sendo estudado. A discussão dos resultados, que poderá ser feita na Web, será muito proveitosa.

Para desenvolver as duas atividades sugeridas nesta aula, você vai precisar dos seguintes materiais:

- fita adesiva;
- uma garrafa de plástico transparente de 2 litros, para cada experimento;
- caneta de retroprojeter;
- uma espátula;
- dois baldes pequenos;
- papel-toalha;
- um funil (pode ser o gargalo de uma garrafa de refrigerante);
- uma xícara ou caneca;
- uma colher grande ou uma pá;
- cinco xícaras de lama ou de terra, recolhidas de, pelo menos quatro locais diferentes, tais como lagoa, pântano, lago, jardim, quintal ou bosque para cada garrafa;
- cinco xícaras de água, à escolha (água de chuva, lago, rio, aquário ou água mineral sem gás);
- uma colher de sopa para medida;
- um bastão de madeira;
- uma folha de jornal picada em pedaços bem pequenos;
- lâminas para microscopia;
- lamínulas para microscopia;
- microscópio óptico;
- uma colher de sopa de giz branco polvilhado.

O giz ( $\text{CaCO}_3$ ) tem como funções liberar  $\text{CO}_2$  para a síntese de ácidos nucleicos pelos micróbios e formar hidróxido de cálcio que, com seu pH alcalino, compensará a acidez gradativa do ambiente.

#### *Procedimentos para realização da prática*

Como medidas de precaução, use luvas de látex ou de borracha para manipular a terra, ou lave bem as mãos com escova e sabão, depois da atividade. Fique atento ao trabalhar com terra e material cortante.

Siga as seguintes etapas:

1.1. Coloque as cinco xícaras de terra ou de lama em um balde pequeno. Cate todos os galhos, folhas e pedras. Mexendo com o bastão de madeira, acrescente água lentamente até que a terra ou lama adquiram a consistência de nata grossa. Acrescente à mistura o jornal picado e uma colher de sopa de giz pulverizado. Misture os conteúdos suavemente. Deixe em repouso por 10 minutos para que os novos ingredientes absorvam a água. Tenha certeza de que a mistura possui uma consistência que a permita passar facilmente pelo funil. Se houver necessidade acrescente mais água.

1.2. Faça um rótulo para a garrafa, anotando o local de origem da lama ou da terra, e a natureza da água empregada. Fixe o funil na boca da garrafa com fita adesiva. Segure com firmeza no lugar. Vá acrescentando a mistura de lama ou terra na garrafa até atingir a altura de aproximadamente um centímetro (1 cm). Bata gentilmente a base da garrafa na mesa, uniformizando a mistura. Repita esse procedimento até a mistura alcançar quatro ou cinco centímetros antes do topo da garrafa. Tampe-a. Veja o esquema na **Figura 2.3**.

1.3. Prepare outras garrafas usando lama ou terra de locais diferentes. **ATENÇÃO:** Não esqueça de que cada garrafa deve estar corretamente rotulada.

Este experimento permite inúmeras variações, tais como:

- Na composição da mistura, a lama ou terra podem ser de locais diferentes, um tipo para cada garrafa;
- A água utilizada pode ser de diferentes qualidades: mineral, de torneira, de poço, destilada;
- As garrafas podem ficar expostas à luz (artificial ou natural) ou no escuro; no frio ou no calor, ou combinações entre essas variáveis;
- Como fonte de **CELULOSE** podem ser usados fragmentos de papel-jornal, de palha, ou folhas secas;
- As garrafas podem conter o mesmo tipo de terra ou lama, mas podem ser divididas em dois grupos: um irá receber materiais biodegradáveis, e o outro, materiais não biodegradáveis.

1.4. Escolha um lugar para colocar a(s) garrafa(s) que não seja sob a luz direta do Sol ou sob calor intenso.

1.5. Mantenha a(s) garrafa(s) em uma só posição, sem movê-la(s), e observe-a(s) diariamente. Anote as suas observações, atentando para mudanças que ocorrem na coluna, a cada centímetro da altura da garrafa, relacionadas à cor e à presença de bolhas.

Embora algumas mudanças como formação de bolhas, devido à produção de gás ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  ou  $\text{NH}_3$ ) possam ser vistas em poucos dias, normalmente são necessárias aproximadamente seis semanas para que ocorra mudança na cor do ambiente que você preparou.

A seguir vamos comentar algumas situações com as quais você pode se deparar:

- As bolhas que aparecem são o resultado da formação de gás decorrente do metabolismo das células microbianas.

#### CELULOSE

Polissacarídeo constituído de moléculas de glicose ligadas entre si, presente em abundância na parede das células dos vegetais.

- As diferentes tonalidades que aparecem no ambiente da garrafa são decorrentes da proliferação de micróbios com diferentes pigmentos fotossintéticos (clorofila=verde, ficocianina=azul e ficoeritrina=vermelha).
- Se você mantiver uma das garrafas no escuro, não haverá crescimento de bactérias fotossintéticas. Porém, outros tipos microbianos podem proliferar utilizando energia a partir de compostos orgânicos ou inorgânicos.
- Garrafas mantidas numa estufa com temperatura acima de 50°C (120°F) não apresentarão alterações pois a maioria dos micróbios que conhecemos não conseguem sobreviver nestas condições, a não ser que o solo que você utilizou seja oriundo de regiões próximas às áreas vulcânicas.
- Garrafas mantidas em baixas temperaturas não mostrarão crescimento ou este será muito lento, demandando um tempo muito maior, pois os micróbios terão seu crescimento bloqueado ou retardado, a não ser que a terra seja proveniente de regiões frias.

1.6. Escreva as observações em um diário, e faça um desenho colorido do que observar a cada semana.

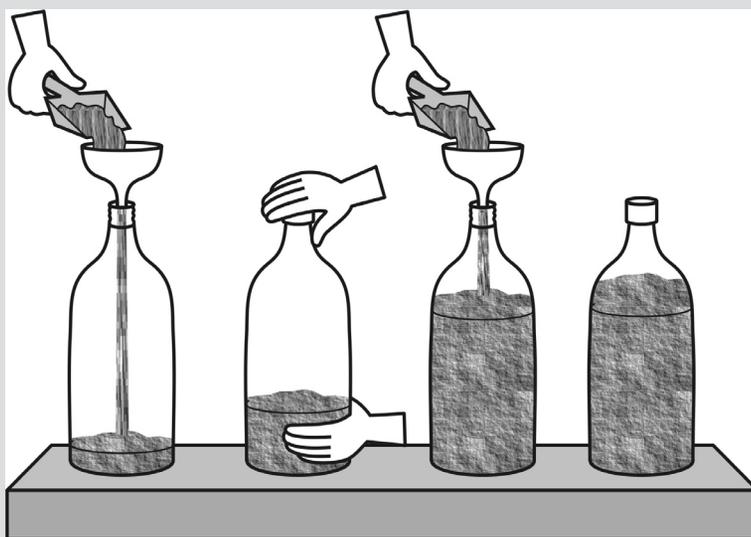


Figura 2.3: Montagem dos ambientes nas garrafas.

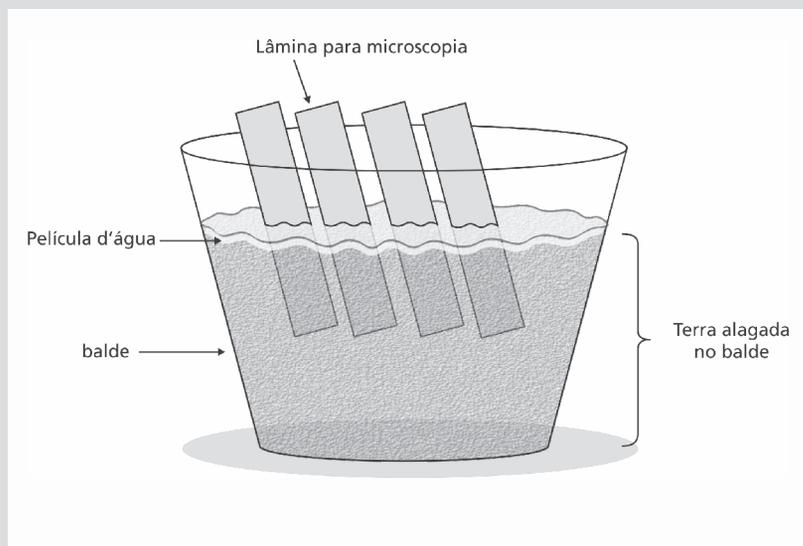
Ao final desta atividade, você terá percebido as modificações nos solos e terá notado a importância das condições ambientais para a seleção da “microbiota da vez”, de acordo com a disponibilidade de nutrientes e as condições climáticas vigentes. Se você extrapolar este experimento, que durou algumas semanas, para bilhões de anos, poderá fazer uma idéia aproximada da importância dos micróbios para a evolução do planeta, além de perceber que a seleção ocorre naturalmente, de acordo com as condições vigentes.

Você já se perguntou se as populações microbianas que estão se desenvolvendo na garrafa podem ser vistas ao microscópio? A resposta é sim. Inclusive a dinâmica populacional que ocorre em um nicho ecológico pode ser acompanhada. Uma das formas

de você visualizar esse fenômeno é executando a Atividade 2, pela qual você poderá observar a formação de biofilme em lâminas de vidro, utilizadas para microscopia.

## 2. Observação microscópica de lâminas com biofilme.

- No outro balde pequeno, coloque também cinco ou seis xícaras de terra recolhida de um local à sua escolha. Acrescente água até alagar todo o conteúdo. Nessa terra alagada, enterre três ou quatro lâminas de vidro para microscopia, conforme a **Figura 2.4**. Deixe o balde guardado durante pelo menos três semanas, adicionando mais água, caso necessário, para manter o alagado.
- Após esse tempo, desenterre delicadamente uma das lâminas. Limpe um dos lados da lâmina com papel toalha, para evitar sujar o microscópio. No outro lado, deposite cuidadosamente uma lamínula em cima e leve ao microscópio.
- Focalize a lâmina ao microscópio com objetiva de 10x ou 40x.
- Escreva as diferentes formas de micróbios que você observa procurando distinguir os seres procariontes, filamentosos ou não, que coabitam com diferentes eucariontes. Desenhe as estruturas encontradas.



**Figura 2.4:** Lâminas enterradas no alagado de terra.

Após a observação dos resultados da Atividade 2, você pode concluir que existem verdadeiras comunidades microbianas que vivem em associações, que dão origem ao que denominamos biofilme. Desta forma, os micróbios conseguiram colonizar os mais variados ambientes da biosfera de nosso planeta.





## Células e suas estruturas

# AULA 3

### Meta da aula

Apresentar os componentes estruturais das células procarióticas e suas funções, relacionando-os com os das células eucarióticas.

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Relacionar as estruturas dos seres procarióticos com suas funções.
- Descrever as características morfológicas que as células microbianas assumem para resistirem às condições adversas no meio ambiente.
- Reconhecer as principais diferenças estruturais entre células procarióticas e eucarióticas.

### Pré-requisitos

Para o melhor acompanhamento desta aula, recomendamos que você faça uma revisão da Aula 1 desta disciplina.

Além disso, você precisará rever os conceitos de microscopia óptica e eletrônica e recordar seu aprendizado sobre estrutura e composição química das membranas celulares, vistos na disciplina Biologia Celular I (Volume 1, Aula 7, Módulo 2). Também será muito produtivo recordar a Aula 11 da disciplina Diversidade dos Seres Vivos, na qual foi abordada a diversidade dos procariontes (bactérias e arqueias).

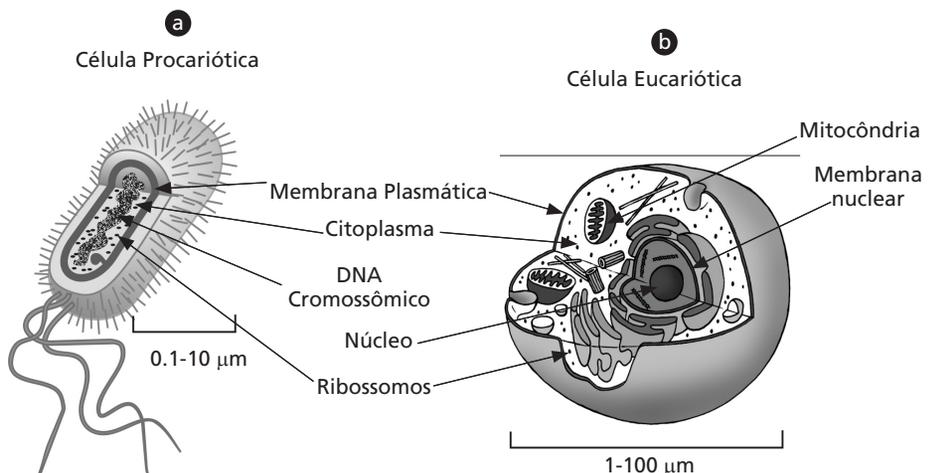
## INTRODUÇÃO

Você já sabe que todos os organismos vivos conhecidos são constituídos por células. Estas podem existir sob a forma isolada (organismos unicelulares) ou em grupos (pluricelulares). As células que constituem os seres vivos podem ser classificadas como procarióticas ou eucarióticas, de acordo com a forma como os seus componentes genômicos estão distribuídos no protoplasma. Quando o material genético está individualizado, ou seja, envolvido por uma dupla camada de membrana, a célula é dita eucariótica (núcleo verdadeiro).

O protoplasma celular corresponde aos elementos contidos pela membrana plasmática. O protoplasma de células eucarióticas contém o núcleo, compartimentalizado pela membrana nuclear, e o citoplasma. Núcleo é a parte de uma célula eucariótica, delimitada por uma membrana, onde se encontra o material genético. Nos procariontes, o material nuclear está disperso pelo protoplasma até o momento da divisão celular, quando este material se condensa, formando uma estrutura denominada nucleóide.

Como você viu na primeira aula desta disciplina, uma célula eucariótica tem, em média, 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro (1/100 do mm). A procariótica mede, de maneira geral, 1  $\mu\text{m}$  (1/1000 do mm), embora haja exceções em ambas (para mais ou para menos).

Além do tamanho, outra diferença entre os dois tipos é que nas células eucarióticas há a presença de um núcleo definido por uma dupla camada de membrana, e outras organelas individualizadas por uma monocamada de membrana. Nas células procarióticas, estas funções são exercidas por estruturas não individualizadas (Figura 3.1).



**Figura 3.1:** Preste atenção nas dimensões estabelecidas pelas escalas presentes junto às ilustrações. A figura mostra a organização estrutural das células procarióticas (a) e eucarióticas (b).

As células eucarióticas já foram estudadas na disciplina Biologia Celular. Nesta aula, daremos ênfase às principais características das células procarióticas e seus componentes.

## A CÉLULA PROCARIÓTICA

Quando observamos células ao microscópio, percebemos que elas se apresentam em várias formas e tamanhos. No caso das células bacterianas, a forma mais simples é a dos cocos, que são células esféricas. A forma de bastões ou bastonetes também é comum, e podem ser retos ou em formato de vírgula. Existem ainda aquelas em parafuso, que recebem o nome de espirilos ou espiroquetas (Figura 3.2.).

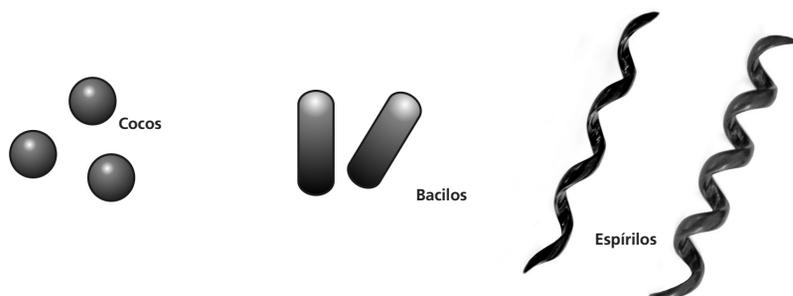


Figura 3.2: Exemplos esquemáticos de tipos morfológicos bacterianos.

O estudo da forma celular está diretamente ligado à observação. Para que as células sejam observadas ao microscópio, devemos promover o contraste, que pode ser obtido por intermédio de técnicas de coloração. A mais importante técnica de coloração em Microbiologia foi desenvolvida por **HANS CHRISTIAN JOACHIM GRAM**, em 1885. Esta técnica serve para classificar micróbios em Gram-positivos e Gram-negativos, em função da cor que estes micróbios adquirem. Você terá oportunidade de praticar essa técnica de coloração na Aula 5.

## O ENVOLTÓRIO CELULAR

### Membrana

Você já sabe que o conteúdo de todas as células está separado do ambiente por uma membrana de natureza fosfolipídica. A membrana citoplasmática desempenha funções de importância vital na fisiologia microbiana, pois, de maneira seletiva, preside as trocas entre a célula e os nutrientes do meio externo. Nela estão acoplados importantes sistemas

**HANS  
CHRISTIAN  
JOACHIM GRAM  
(1853-1938)**

Médico bacteriologista e farmacologista dinamarquês, nascido em Copenhague, que estabeleceu uma maneira de diferenciar bactérias por um método de coloração.

**FOSFOLÍPIDIOS**

Componente presente nas membranas plasmáticas, formado por duas moléculas de ácidos graxos e uma de ácido fosfórico unidas por ligação éster às três hidroxilas de uma molécula de glicerol.

**PEPTIDIOLIGCANO OU MUREÍNA**

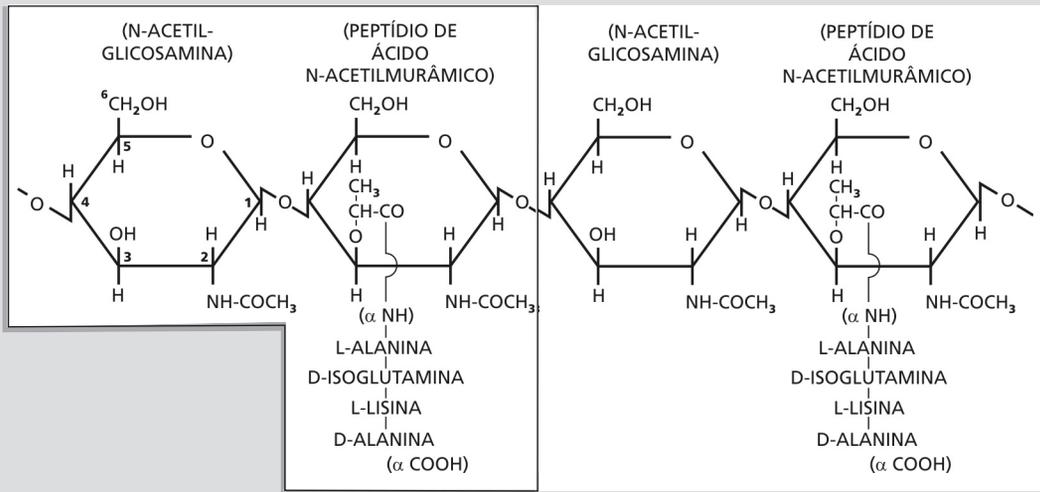
Responsável pela forma das células e pela proteção do citoplasma frente às diferenças de pressão osmótica entre os meios externo e interno. Ela confere rigidez ao corpo bacteriano.

enzimáticos, em particular o sistema citocromo, essencial à respiração aeróbica. Nas membranas das células de animais de sangue quente, além dos **FOSFOLÍPIDIOS**, estão incluídas moléculas de colesterol.

**Parede**

Sobrepondo a camada de membrana, existe uma estrutura rígida formada por várias camadas de uma substância chamada **PEPTIDIOLIGCANO** ou **MUREÍNA**. Esta estrutura recebe o nome de parede. A parede apresenta, entre diferentes grupos de micróbios, variações na sua composição química e arranjo estrutural. É responsável pela definição da forma da célula microbiana e por proteger o protoplasma contra a explosão decorrente de sua alta tonicidade. Também representa uma camada impermeável às moléculas volumosas. A parede celular possui uma espessura de 10 a 20nm, e constitui aproximadamente 20% do peso seco da célula.

Cada unidade de mureína é formada por duas moléculas de açúcar (N-acetil-glicosamina e N-acetil-murâmico) ligadas por um peptídeo, formado por cinco aminoácidos. Veja a representação química da estrutura do monômero, destacado na figura a seguir.



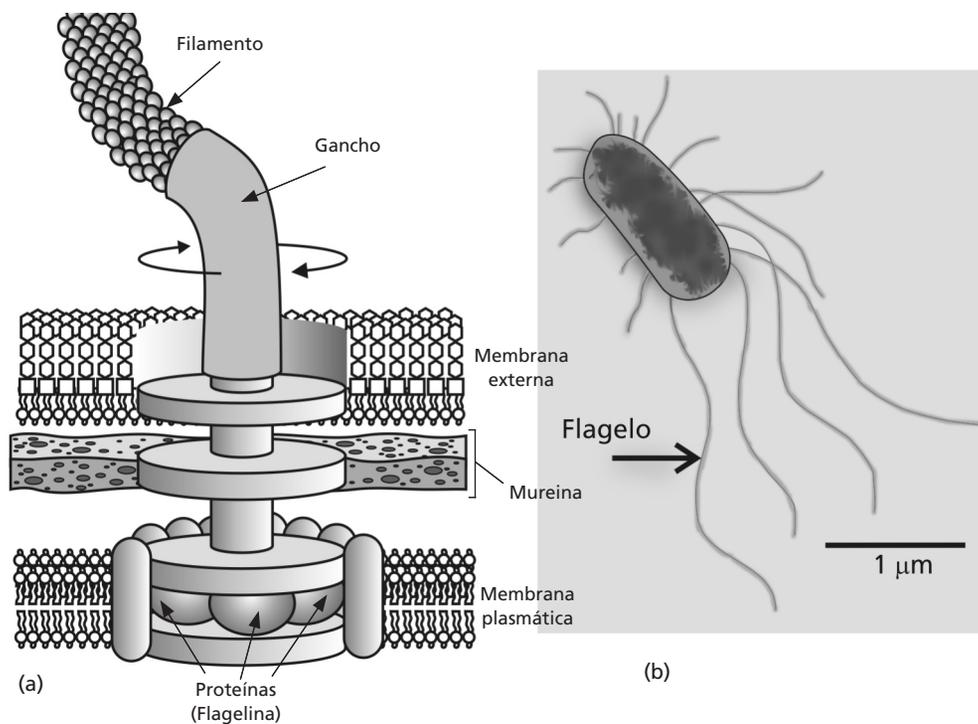
Embora a parede de peptidoglicana seja uma estrutura típica de bactérias, os *Mycoplasma* são um gênero bacteriano desprovido desse componente, e não explodem porque a pressão interna do protoplasma é isotônica em relação às células animais.

Lembre-se de que a composição química das estruturas dos procariontes está relacionada às funções a que se destinam para permitir a adaptação das células às condições ambientais.



## Flagelo

O flagelo é uma organela especial utilizada pelos micróbios para se movimentarem. Você precisa saber que os flagelos são estruturas protéicas filamentosas, com cerca de 20nm de espessura e de comprimento variável, que pode chegar a vários micrômetros. Em razão da espessura, eles só podem ser visualizados ao microscópio eletrônico. Na **Figura 3.3** você pode observar uma micrografia eletrônica que mostra uma bactéria com flagelo, e também a representação esquemática dos componentes funcionais da base dessa organela.



**Figura 3.3:** Ilustração artística da estrutura da base do flagelo (a). Fonte: modificado de [http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.htm?File\\_name=Bact009b&File\\_type=gif](http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.htm?File_name=Bact009b&File_type=gif) e micrografia eletrônica de uma *Escherichia coli* (b) Fonte: ([swiss.csail.mit.edu/~jaffer/GTOL/chap3](http://swiss.csail.mit.edu/~jaffer/GTOL/chap3)) [www.npn.jst.go.jp/movie1.html](http://www.npn.jst.go.jp/movie1.html)

### NANOTECNOLOGIA

É a ciência que estuda as propriedades físicas e químicas das estruturas nanométricas (nano =  $10^{-9}$ m), com o objetivo de desenvolver possíveis aplicações tecnológicas.

### FLAGELINA

Proteína que constitui o filamento dos flagelos das bactérias.

Viu como é fascinante a miniaturização da estrutura de um flagelo bacteriano? Serve, inclusive, de inspiração para aqueles que atuam na área da **NANOTECNOLOGIA**. Na **Figura 3.3.a** você pôde observar que o flagelo bacteriano é composto por três partes fundamentais: o filamento, o gancho e a base. O filamento é uma estrutura rígida, constituída por um tipo de proteína denominada **FLAGELINA**. A região onde o filamento está ligado é chamada gancho. Este está fixado à base que, por sua vez, está inserida na parede da célula.

Nas bactérias em forma de bastonete, os flagelos podem estar localizados em diferentes posições. Dependendo da quantidade e do local em que estão fixados no corpo microbiano, recebem uma denominação que é utilizada como critério para classificação desses micróbios. O **Quadro 3.1** apresenta este tipo de classificação, com alguns exemplos.

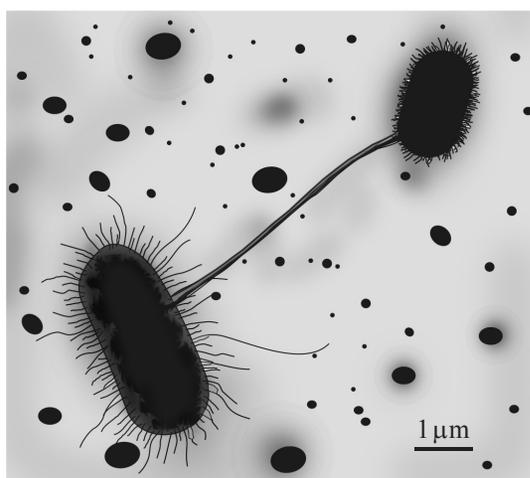
**Quadro 3.1:** Classificação de bactérias de acordo com a distribuição dos flagelos

Nº e distribuição dos flagelos	Denominação	Exemplo
Sem flagelos	Atríquias	Bacilo do carbúnculo
Único – unipolar	Monotríquias	Vibrião colérico
Único – bipolar	Anfitríquias	Alguns vibriões saprófitos
Tufo (dois ou mais) polar ou bipolar	Lofotríquias	Alguns grandes espirilos
Distribuídos em torno de toda a bactéria	Peritríquias	Bacilo da febre tifóide

## Fímbrias e pili

As fímbrias são estruturas compostas por proteínas relacionadas à adesão das bactérias aos diferentes substratos. Elas são mais curtas e finas do que os flagelos (3 a 10nm), e podem atingir números de 1.000 – ou mais – nas células em que ocorrem (**Figura 3.4**).

Muitas bactérias podem, ainda, apresentar outro tipo de apêndice, denominado pilus F ou fímbria sexual. Este tipo de estrutura é encontrado em um número que varia de 1 a 10 por célula, e está relacionada ao processo de recombinação genética denominado **CONJUGAÇÃO** (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4:** Conjugação entre bactérias.

Fonte: [www.palaeos.com/.../Prokaryotes/Eubacteria.htm](http://www.palaeos.com/.../Prokaryotes/Eubacteria.htm)

### CONJUGAÇÃO

É um fenômeno de recombinação genética observado entre células procarióticas, através de contato físico feito pelos *pili*.



### ATIVIDADE

2. Que estrutura bacteriana está envolvida no processo de transferência de material genético entre duas células?

---

---

---

---

---

---

---

---

### RESPOSTA COMENTADA

Com certeza você não se esqueceu de que algumas bactérias também fazem troca de material genético. Isso ocorre quando elas possuem um tipo de fímbria, chamada pilus F bacteriano, que tem função sexual e participa do processo de recombinação genética denominado conjugação.

### POLISSACARÍDIOS

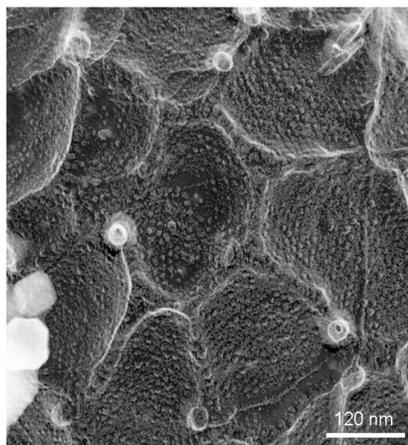
Polímero biológico formado por longa cadeia de açúcares (monossacarídeos), unidos entre si por ligações glicosídicas.

### Cápsula

A cápsula forma uma camada densa na superfície de certas bactérias. Ela fica localizada acima da membrana externa nas células Gram-negativas e acima da mureína nas células Gram-positivas. Dependendo da espécie, a cápsula é formada por **POLISSACARÍDIOS** ou proteína. As cápsulas formam camadas bem densas que participam no processo de adesão dos micróbios. O envoltório glicídico presente em toda e qualquer célula recebe o nome de glicocálice.

### PARACRISTALINOS

Um material paracrystalino apresenta características próximas às de um cristal, ou seja, possui arranjo regular das suas unidades.



### Camada paracrystalina

A camada paracrystalina de superfície (Figura 3.5) é constituída por arranjos regulares de proteínas que ocorrem em vários tipos bacterianos de vida livre. Estes arranjos são ditos **PARACRISTALINOS** e parecem estar envolvidos na resistência mecânica da célula aos elementos do ambiente.

**Figura 3.5:** Exemplo de estrutura de superfície encontrada em algumas bactérias. Fotografia cedida pelo professor Ulysses Lins.

## ESTRUTURAS INTERNAS ENCONTRADAS EM CÉLULAS PROCARIÓTICAS

### Nucleóide e Plasmídios

As células procarióticas são organismos que, geralmente, apresentam apenas um cromossomo disperso pelo protoplasma. Eventualmente, algumas bactérias podem apresentar dois ou três cromossomos. O cromossomo bacteriano é normalmente circular e encontra-se bastante enovelado, em uma região celular denominada nucleóide, onde o material genético é protegido por proteínas de natureza básica. Geralmente o DNA cromossomial corresponde a uma molécula bastante grande, podendo ser 1.000 vezes maior que a própria célula (**Figura 3.6**). Em *E. coli*, o DNA possui cerca de 4,7 milhões de pares de bases nucleotídicas, exibindo aproximadamente 1mm de comprimento, quando linearizado, isto é, quando cortado e estirado.



**Figura 3.6:** DNA cromossomial bacteriano.

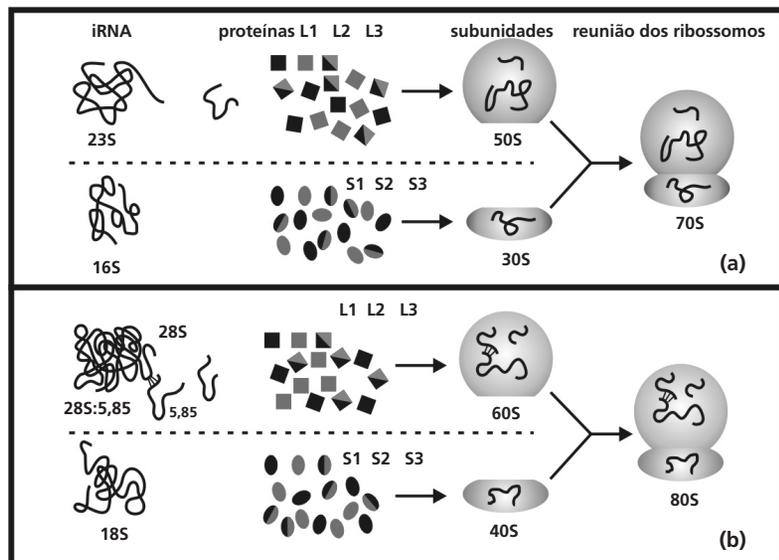
Fonte: Obtida de <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia3/morfologia3.html>

Várias bactérias apresentam também moléculas de DNA extracromossomial, denominadas plasmídios, as quais são circulares, contendo muitas vezes genes que conferem características adaptativas vantajosas ao microrganismo. Seu número e suas dimensões são bastante variáveis. Um dos principais exemplos são os plasmídios que conferem às bactérias resistência contra os antibióticos.

## Ribossomos

A síntese de todas as proteínas necessárias ao funcionamento das células é feita por estruturas denominadas ribossomos, que estão distribuídos pelo protoplasma. Os ribossomos são formados por duas subunidades, ambas constituídas por moléculas de ácido nucléico ligadas a proteínas. Uma dessas subunidades é composta por uma molécula de ácido nucléico e a outra contém duas moléculas deste componente químico. As diferenças entre os ribossomos de células eucarióticas e procarióticas podem ser observadas por você na **Figura 3.7**.

Perceba nesta figura que as estruturas responsáveis pela síntese protéica são ribossomos, que nas células procarióticas constituem uma estrutura de 70S, diferente dos encontrados em células eucarióticas que têm 80S.



**Figura 3.7:** (a) Composição química e estrutural dos ribossomos de células procarióticas e (b) eucarióticas. Fonte obtida de <http://www.icb.ufmg.br/~lbcd/grupo6/rib4.gif>

S → Svedberg (unidade de sedimentação, obtida por ultracentrifugação)

## Corpúsculos de inclusão em células procarióticas

Você até agora viu as estruturas básicas de uma célula procariótica. Além destas estruturas, alguns procariontes apresentam outras inclusões citoplasmáticas internas que exercem as mais variadas funções. Embora variem muito em forma e conteúdo, as principais inclusões citoplasmáticas dos procariontes estão relacionadas ao armazenamento de substâncias de interesse metabólico. Estas inclusões podem ser utilizadas numa situação de carência nutritiva. São grânulos de diferentes

naturezas, geralmente utilizados como fonte de material de reserva ou energia. Podem apresentar-se com ou sem envoltório. O envoltório, quando presente, pode ser constituído por um único folheto lipídico (diferente de uma membrana), ou por proteínas.

As inclusões de armazenamento mais comuns são as de um polímero da substância chamada polihidroxibutirato (ou PHB). Outro tipo de polímero é o glicogênio, que é formado por unidades de glicose. Estes dois tipos de polímeros são formas de armazenamento metabólico. Outros elementos químicos armazenados por procariontes são o fósforo, na forma de inclusões de fosfato, e o enxofre. Além destas inclusões, existem bactérias que formam cristais magnéticos, chamados **MAGNETOSSOMOS** (Figura 3.8). Há ainda micróbios aquáticos que formam vesículas de gás que ajudam a fazê-los boiar na água até à superfície, onde há maior disponibilidade de luz para a fotossíntese.

### MAGNETOSSOMOS

São partículas intracelulares de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), que originam um dipolo magnético na célula, que pode responder aos campos geomagnéticos. Estes foram descritos em algumas bactérias aquáticas e algas.



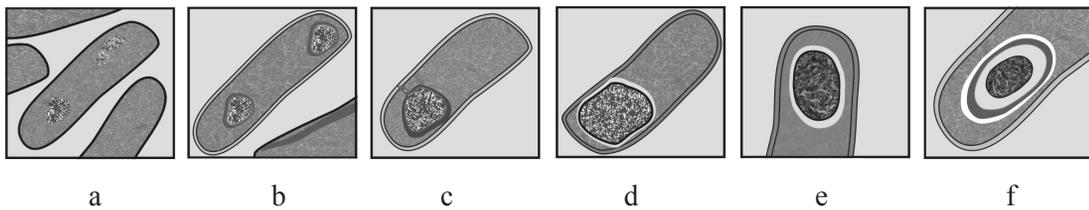
**Figura 3.8:** Uma bactéria apresentando inclusões cristalinas (seta) em seu interior. As inclusões são chamadas de magnetossomos e as bactérias são ditas magnetotáticas. Fotografia cedida pelo professor Ulysses Lins.

## Endosporos

Estruturas desidratadas que se caracterizam pela extraordinária resistência ao calor, às radiações e aos desinfetantes. As espécies bacterianas capazes de formar esporos são dos gêneros *Clostridium*, *Bacillus* e *Sporosarcina*. Quando essas bactérias se encontram em ambientes desfavoráveis, iniciam o processo de esporulação, garantindo assim a manutenção de seu material genético. Quando observados por micros-

cópia eletrônica, os esporos revelam uma estrutura complexa, formada por várias camadas envoltórias. Na composição do esporo é detectada a presença de ácido dipicolínico associado com íons cálcio, sob a forma de dipicolinato de cálcio. Esta substância confere a rigidez do endosporo e assegura o estado de dessecação da estrutura celular.

Quando em condições favoráveis, ocorrerá o processo de germinação, no qual o esporo dará novamente origem à célula fisiologicamente ativa. Observando a **Figura 3.9**, você verá as transformações que ocorrem na célula durante a formação do endosporo. A **Figura 3.10** apresenta a germinação do esporo.



**Figura 3.9:** Seqüência de micrografias mostrando a formação de um endosporo.  
Fonte: adaptado de Prescott, 2002.



**Figura 3.10:** Processo de germinação do esporo. Fonte: adaptado de Prescott, 2002.

Algumas células eucarióticas, em particular os protozoários, também são capazes de assumir um estado dessecado chamado de cisto. Os cistos são estruturas encontradas em amebas, giárdias e ciliados.



**ATIVIDADE**

3. Vamos, agora, verificar se você já é capaz de identificar as principais diferenças estruturais entre células procarióticas e eucarióticas completando a tabela a seguir:

Característica	Célula procariótica	Célula eucariótica
Tamanho médio em $\mu\text{m}$		
Presença de organelas		
Distribuição do material genético		
Tipo de ribossomo (S)		
Estado dessecado		

**RESPOSTA COMENTADA**

*Essa foi muito fácil, certo? Afinal, você encontra tudo no texto desta aula! É só colocar o tamanho médio das células de acordo com o tipo, dizer se as organelas estão ausentes ou presentes, se contêm o material genético de forma compartimentalizada ou não, o tipo de ribossomo de cada uma delas, de acordo com a unidade correspondente à velocidade de sedimentação por **ULTRACENTRIFUGAÇÃO** (Svedberg ou S), e estado de dessecação que as células assumem quando em ambientes adversos.*

**ULTRACENTRIFUGAÇÃO**

Processo de sedimentação de partículas em suspensão, por meio de um aparelho, chamado ultracentrífuga, que atinge um número de rotações por minuto superior a 20.000 (>20.000 rpm). A unidade de sedimentação é o Svedberg (S), que está relacionada à velocidade de sedimentação de um componente durante o processo de centrifugação. Varia com o peso molecular e a forma tridimensional desse componente.

Característica	Célula procariótica	Célula eucariótica
Tamanho médio em $\mu\text{m}$	1	10
Presença de organelas	Ausentes	Presentes
Distribuição do material genético	Disperso	Compartimentalizado
Tipo de ribossomo (S)	70 S (50+30)	80 S (60+40)
Estado dessecado	Endosporo	Cisto

**CONCLUSÃO**

O estudo da anatomia bacteriana permite formar uma idéia sobre as diferentes estruturas, a composição química e a natureza funcional dos vários componentes encontrados nas células procarióticas. Este conhecimento possibilita uma maior compreensão sobre a relação de tamanho entre as células procarióticas e eucarióticas.



**RESUMO**

As principais diferenças entre células procarióticas e eucarióticas são relacionadas ao tamanho, à organização do material genético, à presença de organelas individualizadas (ou não) e ao tipo de ribossomos.

Nas células bacterianas são encontradas as seguintes estruturas de envoltório: 1) membrana plasmática, que envolve o protoplasma e tem permeabilidade seletiva e 2) parede, que é uma camada impermeável a moléculas volumosas, que tem a função de definir a forma da célula microbiana e proteger o protoplasma contra a explosão decorrente de sua alta tonicidade. Outras estruturas, associadas à camada envoltória, são: flagelos, utilizados para o movimento celular; as fímbrias e pili, que atuam nos processos de adesão e transferência de material genético, respectivamente.

Internamente, encontramos o material genético formado por uma molécula de DNA circular que se apresenta bastante enovelado e constitui o cromossomo bacteriano, responsável pela reprodução e transmissão dos caracteres hereditários. As bactérias podem formar corpúsculos de inclusão, de composição diversa, utilizados como reserva nutricional ou energética.

As bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Bacillus* e *Sporosarcina* são capazes de formar endosporos quando se encontram em ambientes desfavoráveis, para garantir a manutenção de seu material genético. Da mesma forma, algumas espécies de protozoários (amebas, giárdias e alguns ciliados) formam cistos com a mesma função.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA**

Na próxima aula, você conhecerá mais sobre o mundo fascinante das células e seus principais produtos metabólicos.



## Células e seus produtos

### Meta da aula

Mostrar que todas as células vivas têm atividades metabólicas, que lhes permitem elaborar produtos que podem ser benéficos ou prejudiciais a outras células.

# objetivos

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Explicar por que os micróbios são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos multicelulares.
- Descrever como as características metabólicas comuns às células procarióticas e eucarióticas podem influenciar na seleção de uma dessas populações celulares.
- Listar alguns produtos secretados por células procarióticas e eucarióticas.

### Pré-requisitos

Para o melhor aproveitamento desta aula, você deve recordar as noções básicas de Bioquímica aprendidas na Aula 10 do Módulo 3, Volume 1, da disciplina Bioquímica II, e deve rever as Aulas 1 e 2 deste módulo.

## INTRODUÇÃO

### HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Fenômeno de degradação dos compostos orgânicos resultante da quebra das ligações químicas, com a introdução de radicais HO- e H<sup>+</sup>, oriundos da molécula da água, pela ação de enzimas. Estas podem ser proteolíticas (quando hidrolisam ligações peptídicas), glicolíticas (quando a ação é sobre ligações envolvendo duas moléculas de carboidrato) e lipolíticas (quando a hidrólise se faz sobre uma ligação do tipo éster, envolvendo álcool e ácido graxo).

Nesta aula, você perceberá como a Microbiologia está ligada aos fenômenos da Natureza e do cotidiano. Quando compreendida, contribui para a melhoria da qualidade de vida das populações humanas. Embora conceitualmente sejam tidos como agentes de doenças, na verdade os micróbios beneficiam as atividades humanas como a agricultura, a pecuária, a produção de alimentos e de medicamentos, além da despoluição ambiental. Os micróbios participam das mais antigas tecnologias dominadas pela humanidade, tais como a fabricação do pão, do vinho, do queijo, do linho, só para citar algumas.

Os micróbios desempenham um papel de maior importância nos ecossistemas do nosso planeta. Geram matéria orgânica a partir de produtos inorgânicos e renovam os produtos orgânicos por **HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**.

Os micróbios existem no nosso mundo há pelo menos 3,9 bilhões de anos e a espécie humana há apenas 500 mil anos. Esses dados sugerem que, a seleção natural dos seres humanos ocorreu na presença dos micróbios, o que torna claro que nós somos uma espécie vencedora, adaptada às ações microbianas.

O conteúdo desta aula pretende levar você à construção dessa idéia, compreendendo a dinâmica da vida em nosso planeta. Com isso, você estará apto a perceber que em um mundo onde os micróbios “reinarão” há tanto tempo, é claro que quem sobreviveu foi selecionado e transmitiu a seus descendentes as características para com eles conviver harmonicamente. As doenças infecciosas observadas na população humana podem ser interpretadas, portanto, como resultantes de alterações genéticas que ocorrem, esporadicamente, nos seres humanos. Corroborando essa idéia, há um sábio provérbio popular que diz: “Não existem doenças, e sim doentes.”



Os seres vivos obtêm dos alimentos energia necessária às suas atividades vitais. As moléculas de glicose representam o produto metabolizado por todos os seres vivos, eucarióticos ou procarióticos. Estes seres degradam o carboidrato até moléculas de piruvato que, depois, podem ser transformadas em ácido láctico. Quando os micróbios que executam esse metabolismo foram “domados” pela humanidade, teve início a produção de queijos, a partir de leite fermentado.

## CARACTERÍSTICAS DOS PRODUTOS CELULARES

Os produtos que as células eucarióticas ou procarióticas secretam para o meio exterior podem ser, pelo menos, de duas naturezas:

- Quando o produto secretado é de natureza protéica, com atividade enzimática;
- Quando o produto secretado é um resíduo dos processos metabólicos.

Como exemplo de atividade enzimática, podemos citar a secreção de enzimas por células microbianas que promovem a degradação de vários produtos orgânicos, de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana. Quem nunca viu um corpo de animal morto, em adiantado estado de putrefação? São os micróbios que liberam as enzimas que hidrolisam as proteínas, liberando os aminoácidos. Estes são degradados enzimaticamente, originando produtos voláteis cujo odor desagradável se reflete no cheiro de podre, característico de carne estragada.

Outros exemplos em que a digestão de produtos do ambiente é efetuada por enzimas secretadas por micróbios podem ser encontrados nos fenômenos de simbiose observados na Natureza. Você já observou formigas carregando pedaços de folhas de plantas para o formigueiro? As formigas-cortadeiras cortam e carregam folhas para alimentar os fungos mantidos nos formigueiros. Os fungos secretam enzimas que hidrolisam a celulose, liberando moléculas de glicose que favorecem o crescimento da população fúngica. O excesso desta população constitui o principal alimento das formigas.

Nos ruminantes, o fenômeno de hidrólise da celulose ocorre na pança ou rúmen, ambiente compartimentalizado no qual os resíduos vegetais são digeridos pela microbiota residente. Depois que a celulose é degradada, o bolo alimentar, agora adocicado (rico em glicose), é regurgitado para, finalmente, ser encaminhado para o estômago do animal.

As populações humanas, desde um passado longínquo, utilizavam enzimas secretadas por micróbios, na produção de pães, vinhos e queijos, embora sem a consciência do fenômeno. As fibras de linho são obtidas depois que os talos da planta (*Linum usitatissimum*) são amassados e deixados submersos em água, para os micróbios degradarem as moléculas de lignina que, como uma cola, unem as fibras da planta. Depois da hidrólise da lignina, as fibras do linho apresentam consistência macia e maleável, que as torna adequadas à confecção de tecidos.

Há evidências de que o homem de Cro-Magnon (aproximadamente cem mil anos atrás) já preparava bebidas fermentadas. Se você quiser saber mais sobre alguns produtos, obtidos graças à intervenção dos micróbios, fabricados pelos mais antigos representantes da humanidade, visite os sites: <http://www.academiadovinho.com.br/biblioteca/historia.htm>; [http://www1.folha.uol.com.br/folha/almanaque/miscelanea\\_18nov02.shtml](http://www1.folha.uol.com.br/folha/almanaque/miscelanea_18nov02.shtml); <http://www.gastronomias.com/queijos/inicio.htm>

Da mesma maneira que os micróbios, células eucarióticas também secretam enzimas. O exemplo mais conhecido diz respeito ao fenômeno da digestão dos alimentos. Depois de mastigado e engolido, o bolo alimentar atinge o estômago, e, neste ambiente, tem início a ação das pepsinas, tipo de enzimas secretadas por células da parede estomacal que têm ação proteolítica, ou seja, promovem a hidrólise das proteínas no ambiente ácido do estômago.

Outro tipo de enzima envolvido na hidrólise dos alimentos é a tripsina. Esta é secretada junto com outros tipos de enzimas, quando o bolo alimentar chega ao intestino delgado. Neste ambiente, sob a ação das proteases, lipases e amilases, tem lugar a hidrólise dos polímeros cujos componentes serão absorvidos pelo nosso corpo. As bactérias que habitam o intestino também se aproveitam dos produtos hidrolisados, crescem e se multiplicam. O excesso populacional dessas bactérias também nos serve de nutrientes.

Agora que você leu alguns exemplos de enzimas secretadas pelas células, conheça alguns exemplos de outros produtos secretados pelas células que, embora sejam resíduos de processos metabólicos, são úteis para outros seres vivos.

O álcool que utilizamos, obtido a partir da cana-de-açúcar, é um exemplo desses produtos. Os micróbios, em particular as leveduras, quando em condições de anaerobiose, obtêm energia para suas funções vitais a partir da fermentação de açúcares. Estes podem ser a sacarose da cana de açúcar ou a frutose do suco de uva ou de outras frutas. Após o processo fermentativo desses açúcares, o produto alcoólico resultante pode ser cerveja ou vinho. Por processos de destilação, o teor alcoólico dessas bebidas pode ser aumentado e, desta forma, o vinho se transforma em conhaque, a cerveja em uísque e o destilado do caldo de cana em cachaça (que contém em média 20% de teor alcoólico), ou em álcool puro, usado como combustível.

Outro exemplo desse tipo de produto é o ácido lático. As moléculas de glicose são metabolizadas por todos os seres vivos, eucarióticos ou procarióticos, que degradam esse carboidrato até moléculas de piruvato. Este pode ser transformado em ácido lático.

Quando esse fenômeno ocorre nas nossas células do tecido muscular, por exemplo, o efeito se faz notar pela câibra, dor muscular resultante do efeito das moléculas de ácido lático sobre os íons cálcio, responsáveis pela contração muscular. Sem cálcio, não acontece a despolarização elétrica das fibras musculares. Mais detalhes sobre este assunto você pode obter lendo a Aula 10 do Módulo 3, Volume 1, da disciplina Bioquímica II.

O gás sulfídrico ( $H_2S$ ) é um produto da degradação microbiana dos aminoácidos que contêm enxofre. Este gás pode ser produzido pela microbiota do nosso intestino, e às vezes é exalado com odor característico (*o famoso pum*). A produção do  $H_2S$  pelos micróbios do ambiente marinho serve para remover, por precipitação, metais pesados dissolvidos na água do mar que, se livres, seriam tóxicos aos seres vivos. Como exemplos, os sulfetos de chumbo ou ferro, que são removidos para a praia pelo movimento das marés. Você já esteve numa praia de areia clara e reparou que durante a maré baixa aparece uma linha de cor escura? Esta linha, formada pelos sulfetos de metais pesados que ali foram depositados, identifica o limite que a água atingiu durante a maré alta.

Alguma vez você já foi tratado com algum tipo de antibiótico? Os antibióticos constituem mais um exemplo de resíduo de metabolismo celular, produzido por micróbios. Penicilina, bacitracina, neomicina, gentamicina, eritromicina, cloranfenicol, rifamicina, estreptomicina e polimixina são alguns dos mais disponíveis comercialmente, para uso nas infecções bacterianas. O uso indiscriminado desses antibióticos tem sido responsável pela seleção de germes resistentes.



### **ATIVIDADE**

1.a. Vejamos se você já entendeu por que os micróbios são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos multicelulares. Compare a relação que existe entre a nossa convivência com os micróbios que cultivamos no intestino com a das formigas-cortadeiras com seus micróbios no formigueiro. Você encontrou alguma semelhança entre os dois processos digestórios?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

1.b. Que utilidades têm no nosso cotidiano o ácido lático e o álcool etílico produzidos pelos micróbios?

---

---

---

---

---

---

---

### **RESPOSTAS COMENTADAS**

1.a. Da mesma forma que as formigas-cortadeiras criam fungos para deles se alimentarem, também nós cultivamos nossos micróbios, que nos fornecem vitaminas e aminoácidos essenciais. A necessidade dos seres multicelulares em relação aos micróbios existe porque estes seres fornecem muitas vitaminas e aminoácidos essenciais para a nossa sobrevivência. Enquanto as formigas criam seus micróbios no ambiente externo, nós os alojamos em cavidades internas de nosso corpo. A proliferação de micróbios em nosso intestino nos garante o suprimento de muitas vitaminas do complexo B e proteínas que contêm aminoácidos essenciais à subsistência de nossas células.

1.b. Para responder a esta questão, basta observar os rótulos de alimentos, bebidas e medicamentos. Neles você encontrará o ácido lático (ou lactato) como acidificante de compotas ou geléias e, naturalmente, de produtos lácteos. Nas bebidas alcoólicas e nos medicamentos sob forma de elixir, conhecidos comercialmente como biotônicos, você encontrará o teor de álcool.

## PRODUTOS DAS CÉLULAS

Como característica de todo ser vivo, as células sintetizam diversos produtos, de acordo com as informações contidas no seu material genético e o estágio de diferenciação em que se encontram (G1, S, G2, M).

Nas Figuras 4.1 e 4.2, são apresentados, respectivamente, produtos de células eucarióticas e procarióticas. Você vê alguma semelhança?

### Produtos do metabolismo celular de eucariontes

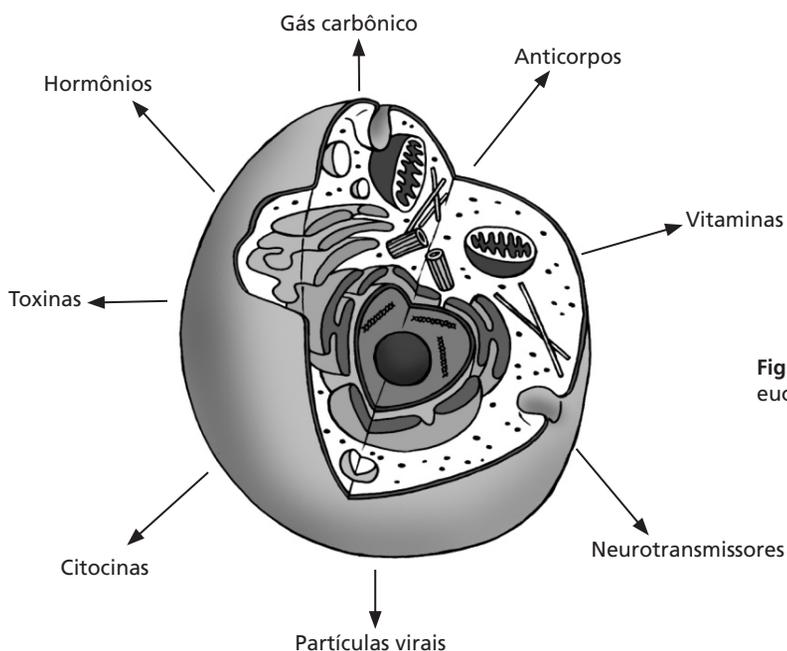


Figura 4.1: Produtos de células eucarióticas.

### Produtos do metabolismo celular de procariontes

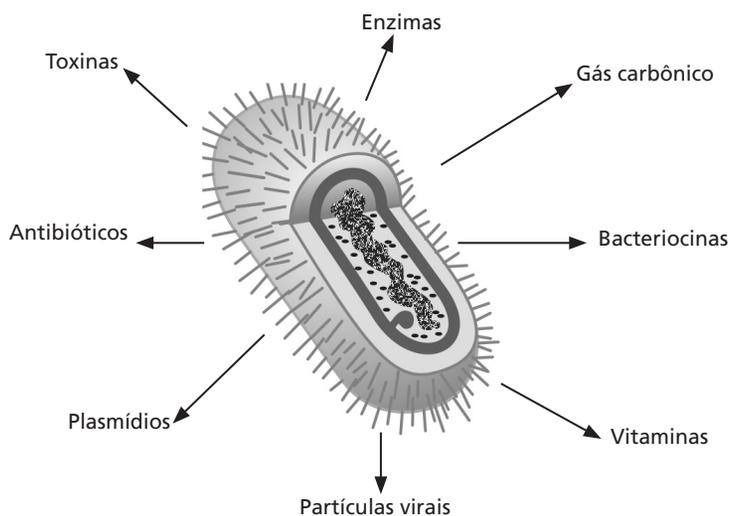


Figura 4.2: Produtos de células procarióticas.

### LAZZARO SPALLANZANI

Fisiologista italiano do século XVIII, alimentou falcões com pedaços de carne presos por um fio metálico. Após algum tempo, puxando o fio, verificou que a carne havia sido parcialmente dissolvida e conseguiu reproduzir esse fenômeno fora do estômago do falcão, aplicando o suco gástrico do animal sobre a carne.

O fenômeno de transformação dos alimentos realizado pelos micróbios guarda muita semelhança com o processo de digestão realizado pelos animais. Essa conclusão foi decorrente de uma observação gradual de fenômenos biológicos isolados. Os primeiros relatos datam do século XVIII e foram descritos por **SPALLANZANI**. No século XIX, destacaram-se os trabalhos de **PASTEUR** e dos **IRMÃOS BUCHNER**.

### IRMÃOS BUCHNER

Trituraram leveduras de cerveja em um balão de vidro de fundo chato com areia, preparando um filtrado isento de células vivas. Esse suco transformou uma solução de glicose em álcool etílico e gás carbônico (processo fermentativo). Esse tipo de substância presente no interior das leveduras, capaz de produzir fermentação, foi chamada, pelo fisiologista alemão W. F. Kühne (1837-1900) enzima (do grego *en*, dentro + *zýmē*, fermento).

### LOUIS PASTEUR

No século XIX, demonstrou que a transformação das bebidas e dos alimentos utilizados pelos seres humanos eram resultantes de processos metabólicos efetuados pelos micróbios. Os micróbios comumente envolvidos nesses processos eram conhecidos pelo nome de “fermentos”. Mas essa afirmativa contrariava Spallanzani, que atribuía os processos de decomposição a substâncias presentes no suco gástrico, conforme mostravam seus experimentos feitos com falcões. Pasteur descobriu que as fermentações ocorriam em função de substâncias contidas nas células microbianas, e isso foi confirmado em 1897 pelos irmãos Buchner.



### ATIVIDADE

2. Levando em conta que os produtos secretados pelas células eucarióticas e procarióticas podem ser de natureza enzimática ou resíduos de processos metabólicos, imagine uma situação na qual uma célula bacteriana viva fosse fagocitada por uma célula eucariótica e ambas tivessem necessidade de hidrolisar proteínas para sobreviver. Se um desses dois tipos de célula expressasse um repertório de enzimas proteolíticas mais amplo do que o outro, qual delas teria mais chance de aproveitar os aminoácidos nessa peleja?

---

---

---

---

---

### RESPOSTA COMENTADA

*Células bacterianas, por terem uma constituição rígida, necessitam fazer hidrólise de proteínas no meio exterior para depois absorver os aminoácidos e degradá-los. Em contrapartida, as células eucarióticas fazem fagocitose de produtos do meio exterior para depois degradá-los no interior do vacúolo digestivo, onde as proteínas são hidrolisadas em aminoácidos que são aproveitados pelas células.*

*Parabéns se você respondeu que tem mais chance de ganhar a briga aquela célula que dispõe de uma maior versatilidade metabólica, ou seja, quem tem um repertório de enzimas proteolíticas mais amplo tem a possibilidade de digerir as enzimas da outra célula, usar esses produtos para sua nutrição e proliferar. Esse raciocínio que você acabou de construir pode ser extrapolado para a situação que pode levar seu organismo para o estado de saúde ou doença, quando acontece uma batalha enzimática desse tipo entre o seu corpo e os micróbios com os quais você pode se deparar.*

## PRODUTOS DE CÉLULAS PROCARIÓTICAS QUE BENEFICIAM A HUMANIDADE

A grande diversidade metabólica dos micróbios sempre despertou o interesse dos seres humanos que aprenderam a tirar proveito destes seres microscópicos.

A seguir, você verá alguns exemplos de ações microbianas que contribuem para a sobrevivência dos seres animais e da espécie humana em particular:

- a) produção de vitaminas, como as do complexo B, pela microbiota do intestino;
- b) competição da microbiota com micróbios exógenos, que podem ser lesivos ao organismo;
- c) produção de alimentos, tais como chucrute, queijos, iogurtes e chocolates, por processos de fermentação;
- d) produção de álcool e bebidas, tais como vinhos e cervejas, a partir da degradação de cereais e frutas;
- e) produção de antibióticos como a penicilina;
- f) fornecimento de produtos de natureza protéica (enzimas e peptídios), obtidos a partir de culturas microbianas selecionadas para uso industrial;
- g) produção de insumos utilizados como vacinas, quer sejam constituídas pela própria célula microbiana, quer sejam constituídas por produtos gerados por células geneticamente transformadas;
- h) atuação como bioinseticidas para controle biológico de pragas de insetos na agricultura;

- i) degradação de moléculas orgânicas, presentes em águas de esgotos contaminadas com dejetos humanos, produtos industriais ou resíduos das empresas de mineração e das refinarias de petróleo;
- j) transformação de poluentes tóxicos do meio ambiente em substâncias atóxicas (biorremediação).

### **Exemplos de ações microbianas prejudiciais à humanidade**

Você já sabe que, na Natureza, a lei da sobrevivência consiste em matar ou morrer. Como já foi destacado, os micróbios existem no planeta há pelo menos 3,9 bilhões de anos, e a espécie humana existe apenas há 500 mil anos. Estes dados mostram que a evolução dos seres humanos no planeta ocorreu na presença dos micróbios, o que torna claro que nós, humanos, somos uma espécie vencedora, adaptada às ações microbianas.

Apesar disso, certos elementos da espécie humana, por alguma razão genética ou fisiológica, não conseguem resistir aos efeitos dos produtos metabólicos dos micróbios, o que resulta em dano para seus órgãos ou tecidos. Este processo é conhecido como doença. Apesar das descrições históricas acerca das pragas que assolaram a humanidade através dos tempos, a população humana continua em expansão. É a expansão dos selecionados, embora saibamos que a doença também está relacionada com o comportamento inadequado sob o ponto de vista higiênico, alimentar, sexual e psíquico. Mais detalhes sobre esse assunto você verá em aulas subsequentes desta disciplina.

Alimentos mal conservados possibilitam a proliferação dos micróbios. Se ingeridos, podem ocasionar intoxicações ou infecções no consumidor. Prejuízos causados por micróbios podem ser relacionados à deterioração de materiais, tais como tubulações de ferro, combustíveis, papéis, tecidos, cordas e paredes (quem ainda não viu aquelas manchas de mofo?).

A água pode ser contaminada por diversos tipos de micróbios, e isto pode, em algumas circunstâncias, resultar em infecções de vários graus de severidade.

## CONCLUSÃO

O metabolismo das células microbianas é um fenômeno que pode ser visto como protótipo para a compreensão dos processos fisiológicos observados no corpo dos seres multicelulares. Em ambas as situações, observa-se síntese e degradação de componentes que têm papel preponderante nas fases de anabolismo ou de catabolismo celular. A facilidade de manipulação, a velocidade de crescimento populacional e a versatilidade metabólica dos seres microbianos atraíram a atenção da humanidade que, através de gerações, procura “domá-los” para que liberem produtos que podem ser úteis aos demais seres vivos.

## ATIVIDADES FINAIS

Vamos agora verificar como está o processo de fixação do conteúdo?

1. As formigas-cortadeiras criam fungos para comer. Você conhece alguém que adora comprar micróbios vivos para bebê-los? Você pode explicar por que isso é uma boa prática?

---

---

---

---

### RESPOSTA COMENTADA

*Quem é que ainda não tomou leite fermentado? As prateleiras dos supermercados exibem uma grande variedade de marcas de produtos contendo lactobacilos vivos. Os lactobacilos, depois de fagocitados e digeridos, suprem nosso organismo de vitaminas, principalmente do complexo B, e de aminoácidos essenciais.*



**RESUMO**

Alguns processos metabólicos são comuns às células procarióticas e eucarióticas, que geram produtos que podem ser secretados por elas. Dentre esses produtos, encontram-se ácido láctico, gás carbônico, gás sulfídrico, álcool etílico, enzimas, vitaminas, partículas virais e, de forma mais específica, antibióticos, hormônios e toxinas.

A inter-relação de ações enzimáticas celulares é responsável pelo ciclo de vida no planeta, onde aqueles que perecem são degradados, fornecendo produtos que são aproveitados pelos sobreviventes, formando uma cadeia alimentar dinâmica.

**INFORMAÇÃO SOBRE A PRÓXIMA AULA**

A próxima aula será prática, e você terá a oportunidade de visualizar bactérias, depois de executar o tipo de coloração mais importante da Microbiologia: a coloração de Gram.



# Coloração de esfregaço de material biológico pelo método de Gram – Aula prática

## AULA 5

### Meta da aula

Apresentar uma forma de coloração que permita diferenciar células bacterianas de acordo com as características de suas estruturas de superfície.

## objetivos

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Explicar por que bactérias com componentes estruturais diferentes podem ser diferenciadas quando coradas pelo método de Gram.
- Descrever a seqüência dos procedimentos da coloração de Gram e os princípios físico-químicos que regem cada um desses procedimentos.
- Apresentar provas da existência de micróbios intimamente associados aos tecidos de nosso corpo.

### Pré-requisitos

Para entender esta aula, você deve ter as noções de solubilidade de solutos em líquidos imiscíveis que você aprendeu no Ensino Médio (semelhante dissolve semelhante), e ter estudado a Aula 3 desta disciplina (sobre células e suas estruturas).

## INTRODUÇÃO

Nesta aula, você vai executar uma das práticas mais interessantes da bacteriologia: visualizar, com o auxílio do microscópio, micróbios corados.

A prática que vamos realizar consiste em um método de coloração desenvolvido pelo patologista dinamarquês Hans Christian Joachim Gram, já citado na nossa terceira aula. Gram, em 1885, publicou na revista científica *Fortschritte der Medizin*, em Berlim, Alemanha, um método de coloração de bactérias que até hoje vem sendo utilizado para fins de classificação de micróbios.

A idéia da técnica surgiu enquanto o pesquisador examinava o tecido pulmonar de pacientes que haviam morrido com pneumonia. Ele percebeu que alguns dos corantes utilizados eram retidos, preferencialmente, pelas células bacterianas. A técnica foi gradativamente aperfeiçoada pela adição de outras etapas de coloração.

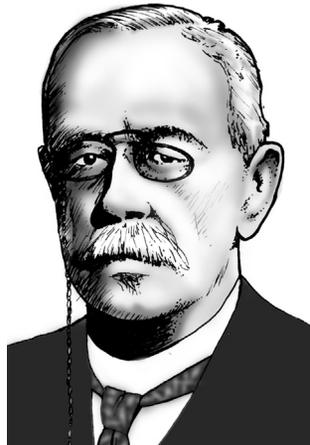


Figura 5.1: Hans Christian Joachim Gram (1853–1938).  
(<http://protocolos.tioale.pro.br/gram.php>)

## ATIVIDADE



1. Para desenvolver esta atividade, você precisará dispor dos seguintes materiais e equipamentos:

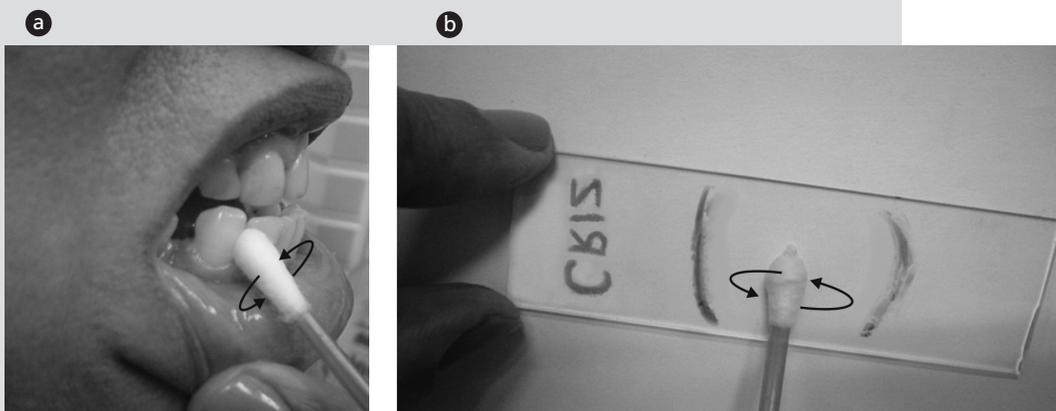
- a. hastes flexíveis com ponta de algodão hidrófilo (cotonetes);
- b. lâminas de vidro para microscopia;
- c. caneta para escrever em vidro;
- d. solução de cristal violeta constituída por 1g de cristal violeta, 10mL de álcool a 95° GL, 2g de fenol e 100mL de água destilada;
- e. solução de iodo, conhecida como solução de Lugol (J.G.A. Lugol, \*1786-†1851, médico francês que formulou a solução). É constituída por 1g de iodo metálico, 2g de iodeto de potássio e 300mL de água destilada;
- f. álcool a 95° GL;
- g. solução de fucsina constituída por 30mg de fucsina básica, 10mL de

- álcool a 95° GL, 500mg de fenol e 90mL de água destilada;
- h. pia com torneira;
- i. recipiente ou suporte descartável para recolher os resíduos de corante (lata de leite em pó ou equivalente);
- j. frasco com água;
- l. bico de Bunsen ou lamparina a álcool;
- m. papel-toalha;
- n. microscópio óptico com lente objetiva com capacidade de aumento de 100 vezes;
- o. óleo para imersão ou óleo mineral.

Dica: Os itens d, e, f e g podem ser obtidos comercialmente em lojas de materiais para laboratórios de análises clínicas, sob a denominação "kit de Gram".

### **Etapa de coleta do material para observação ao microscópio e preparo do esfregaço na lâmina de vidro**

O material biológico para ser utilizado nesta aula prática pode ser coletado de você mesmo. Uma das regiões do corpo mais povoadas por micróbios é a boca, principalmente os sulcos gengivais. Portanto, esfregue firmemente a ponta de algodão de uma haste flexível na gengiva e, com este material, faça um esfregaço no centro de uma lâmina de vidro, previamente desengordurada e marcada na face contrária àquela onde o esfregaço será feito, conforme as **Figuras 5.2.a e 5.2.b**. Deixe-a exposta ao ar, até o esfregaço secar.



**Figura 5.2:** (a) Passando a haste algodonsa na gengiva; (b) fazendo o esfregaço na lâmina, no lado contrário à marcação (o nome Cris aparece invertido, você notou?).

### **Etapa de fixação, à lâmina, do material a ser examinado**

Esta fase deve ser executada passando a lâmina pela face oposta ao esfregaço sobre uma chama, tendo o cuidado de não torrar o esfregaço. Passe a lâmina três vezes pela ponta da chama, rapidamente, para que a lâmina fique levemente aquecida. Atente para não tostar os micróbios.

### **Etapa de coloração primária do material**

Coloque a lâmina nivelada sobre um suporte que permita recolher qualquer líquido que nela seja depositado, estando o material fixado voltado para cima.

**CRISTAL VIOLETA**

Também conhecido como violeta de genciana, corante roxo do grupo das anilinas.

Goteje a solução de CRISTAL VIOLETA de maneira a cobrir todo o esfregaço. Deixe corar por um minuto. Escorra o corante para dentro do suporte e volte a lâmina para a mesma posição. Goteje sobre os esfregaços a solução de lugol e deixe reagir durante um minuto. Escorra o lugol no suporte. Com a lâmina inclinada, goteje álcool de forma a lavar o resíduo de corante, deixando-o escorrer para o suporte. Agora, você deve lavar a lâmina com água destilada. Ao final desta fase você poderá obter, como resultado do experimento, duas possibilidades: ou as células bacterianas aparecem coloridas em roxo ou descoloradas.

**Etapa de coloração secundária ou de contraste**

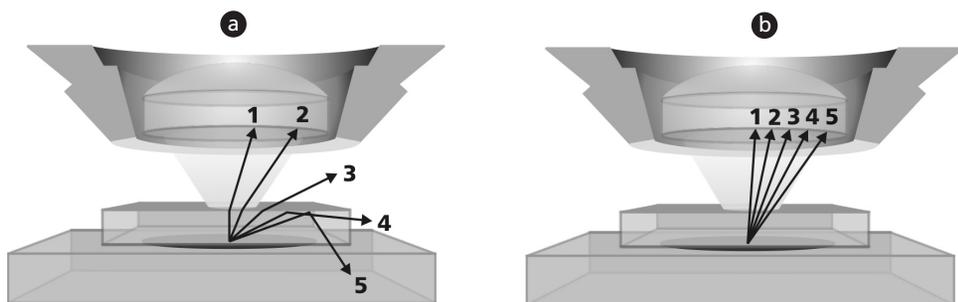
Esta etapa do processo tem por finalidade corar as células que ficaram descoloradas na fase anterior. Usa-se um corante de cor diferente para possibilitar o contraste entre as células. Dentre os mais utilizados, destaca-se a FUCSINA BÁSICA, que tem cor avermelhada. A solução contrastante deve ser gotejada sobre a lâmina nivelada e escorrida após 30 segundos. Em seguida, o esfregaço deve ser lavado com água e deixado secar ao ar. Neste momento, a lâmina está pronta para ser levada ao microscópio no qual você poderá observar as estruturas coradas.

**FUCSINA BÁSICA**

Corante vermelho do grupo das anilinas.

**Etapa de observação dos resultados da coloração**

Antes de posicionar a lâmina no microscópio, verifique se a objetiva instalada tem o sistema óptico que aumenta a imagem em 100 vezes (objetiva de 100x). Coloque uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço. A função do óleo, neste caso, consiste em anular o fenômeno de difração da luz entre meios diferentes. Quando dizemos meios diferentes, nos referimos aos existentes no vidro da lâmina e no espaço entre a lâmina e a lente da objetiva. Usa-se o óleo porque, sem ele, parte da luz, depois de atravessar o vidro da lâmina, se desviaria antes de chegar à objetiva (feixes 3, 4 e 5 da **Figura 5.3**, que ilustra o fenômeno de reflexão da luz, quando passa do vidro para o ar e do vidro para o óleo).



**Figura 5.3:** Reflexão da luz nas interfaces lâmina/ar (a) e lâmina/óleo (b). (<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/immersion.html>)

Tanto as células Gram-positivas quanto as Gram-negativas adquirem, de maneira idêntica, a coloração da etapa primária, e passam a apresentar um tom violeta resultante da formação do composto iodo-para-rosanilina, produto da reação do cristal violeta com o iodo. Este composto tem **CARÁTER HIDROFÓBICO**, portanto, é insolúvel em água. Sua melhor dissolução se faz nos lipídios da membrana plasmática.

Ao utilizar o solvente orgânico (etanol) para lavar o esfregaço corado, este álcool dissolve a porção lipídica das membranas externas das células, que estavam impregnadas com o complexo iodo-para-rosanilina, deixando-as descoradas. A espessa parede de mureína das bactérias Gram-positivas impede que o álcool chegue até a membrana, o que a mantém corada. A lavagem com álcool é uma etapa crucial no processo de coloração, pois, se houver exposição prolongada a este solvente, mesmo nas Gram-positivas, o corante será removido, tal como acontece com as bactérias Gram-negativas. Essa é uma situação à qual você deve estar atento para evitar a obtenção de resultados inadequados, que podem mascarar a definição dos tipos microbianos presentes na sua amostra.

#### **CARÁTER HIDROFÓBICO**

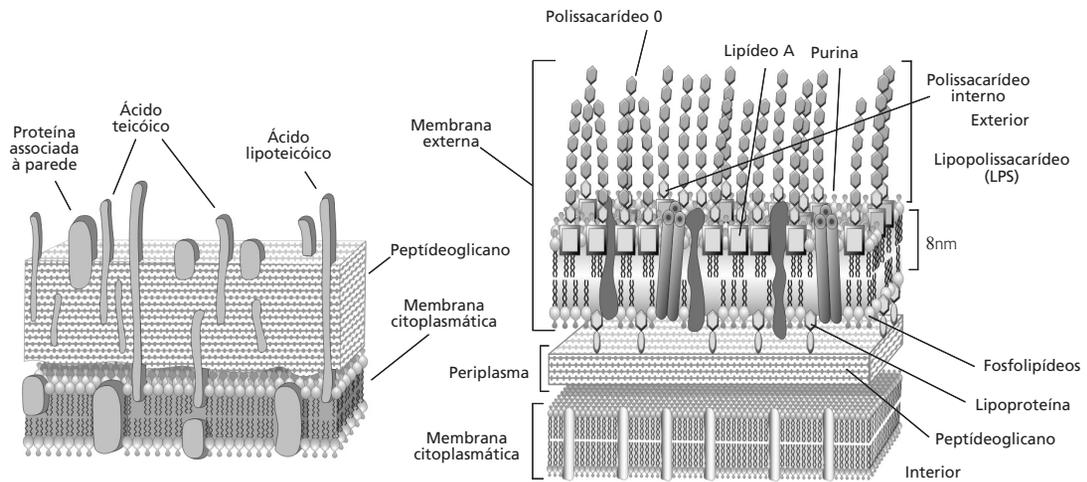
(*Hidro* = água + *fobus* = repulsa). Propriedade das moléculas orgânicas de serem insolúveis em soluções aquosas (que têm um caráter iônico ou polar). As moléculas hidrofóbicas são dissolvidas em componentes orgânicos apolares (semelhante dissolve semelhante).

#### **COMENTÁRIO**

*Olhando ao microscópio, você vai perceber que, além das células do epitélio, também existem muitos micróbios na sua cavidade bucal. Diante deste fato, você deve ter passado a entender por que é importante escovar os dentes e outros hábitos de higiene corporal, uma vez que, por meio deles, você consegue evitar a proliferação exagerada dos seus micróbios, mantendo-os sob controle.*

*Na observação das lâminas, atente para as dimensões das estruturas visualizadas. Uma célula do epitélio tem, em média, 15 μm, e as células bacterianas apresentam tamanho que pode variar de 0,5 a 2 μm. Lembre-se de que a imagem que você está observando foi ampliada 100 vezes na parte da objetiva do microscópio e mais 10 vezes pela lente da ocular, o que faz com que qualquer objeto visualizado esteja 1.000 vezes aumentado.*

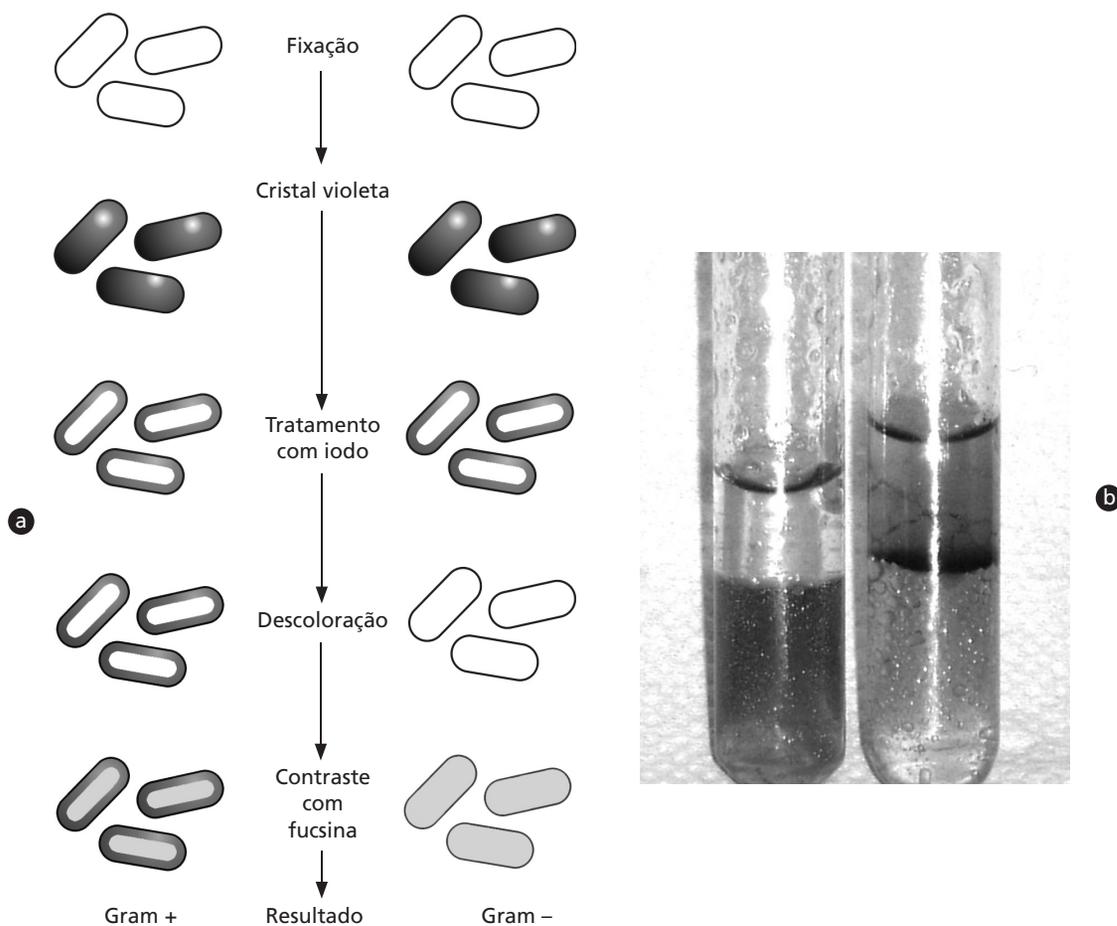
*Ao observar as lâminas, você também pode perceber que algumas células estão coradas em roxo e outras em vermelho. As primeiras são aquelas que retiveram o corante da primeira fase (iodo-para-rosanilina), mesmo após a lavagem com álcool. Estas são definidas como Gram-positivas. Aquelas que descoraram são as Gram-negativas, que, para serem visualizadas, devem sofrer coloração de contraste com a fucsina.*



**Figura 5.4:** Estruturas de superfície de bactérias Gram + e Gram-.

Observando os desenhos da **Figura 5.4**, cujos elementos já foram citados na Aula 3, você pode notar as diferenças estruturais dos envoltórios bacterianos característicos de células Gram-positivas e Gram-negativas. Nas primeiras, a camada de peptídeoglicano (mureína) cobre a membrana plasmática da célula. Nas Gram-negativas, além de a camada de mureína ser menos espessa, existe ainda uma segunda camada, que é a membrana externa.

Como você já viu na Aula 3 (células e suas estruturas), as células de origem animal, como as que fazem parte do epitélio da sua gengiva, têm a membrana plasmática exposta ao ambiente, da mesma forma como se apresenta a membrana externa das bactérias Gram-negativas. De ambas as células, as membranas são dissolvidas quando tratadas pelo álcool, fazendo com que estas células fiquem descoradas e passíveis de adquirirem a cor do corante contrastante. Na **Figura 5.5**, estão apresentadas, de forma ilustrativa, as diferenças tintoriais que as bactérias vão apresentando, à medida que a técnica de coloração de Gram vai sendo executada. Para ter uma visão em cores, você deve acessar o *site* <http://protocolos.tioale.pro.br/gram.php>.



**Figura 5.5:** (a) Fases do processo da coloração de Gram. (b) Resultado da reação de Gram em tubo (notar o caráter hidrofóbico da iodopararosanilina).



### ATIVIDADE

#### Demonstração dos mecanismos da coloração de Gram

2. Para você ter uma idéia mais concreta do que acabamos de explicar, vamos fazer agora uma prática que tem por finalidade mimetizar, dentro de um tubo de ensaio, o fenômeno que acontece com as células durante a primeira etapa da coloração de Gram.

Para executar esta atividade, você vai precisar de alguns daqueles materiais listados na Atividade 1 e mais um tubo de ensaio com tampa ou com rolha de borracha.

Agora, você deve seguir as seguintes etapas:

- no tubo de ensaio de vidro, coloque água até formar uma coluna de três centímetros;
- adicione óleo até formar uma camada de um centímetro sobre a camada de água;
- coloque duas gotas da solução de cristal violeta e observe até o corante atingir a fase aquosa;
- feche o tubo usando a tampa ou a rolha de borracha, de forma a vedar a saída dos líquidos;

**CARÁTER HIDROFÍLICO OU HIDROFÓBICO**

Hidros = água  
 Filos = atração  
 Fobus = repulsão  
 Propriedade das moléculas orgânicas de serem solúveis em solução aquosa (polares) ou insolúveis nessa solução (apolares).

- e. agite fortemente, segurando a rolha, e espere o processo de separação dos componentes água e óleo;
  - f. anote em qual das fases ficou o corante;
  - g. com vista nesses resultados, diga se as moléculas do cristal violeta têm **CARÁTER HIDROFÍLICO OU HIDROFÓBICO**;
  - h. adicione duas gotas de lugol, feche o tubo e observe essas gotas de iodo até atingirem a fase aquosa;
  - i. agite fortemente o tubo e espere o processo de separação dos componentes água e óleo;
  - j. anote em qual das fases o complexo iodo-para-rosanilina ficou dissolvido;
  - k. discuta o resultado com seus colegas e o tutor e aplique-o ao método de Gram usado para coloração de bactérias, fazendo analogia entre os fenômenos observados no tubo e na lâmina corada.
- Você pode memorizar o processo de coloração de Gram (fixando na memória o esquema da **Figura 5.5**) ou registrar, de forma mnemônica divertida, ao lembrar da frase “Vi Lulu ali a fumar”:

Vi		Violeta	1 min
Lu	lu	Lugol	1min
Al	i	Álcool	Lavar rapidamente
A		Água	Lavar exaustivamente
Fu	mar	Fucsina	0,5 min e lavar com água

**COMENTÁRIO**

*O objetivo deste experimento é que você perceba o que acontece numa célula quando um corante hidrofílico se transforma em hidrofóbico.*

**CONCLUSÃO**

A técnica de coloração de Gram permite diferenciar bactérias em função de seus envoltórios de superfície. Esta diferença pode ser utilizada como critério de classificação, pois as estruturas de superfície celulares são expressões do caráter genético de cada célula.

Se ao final desta aula prática você não ficou com o jaleco ou com os dedos coloridos, parabéns! Se não conseguiu essa proeza, que tal executá-la mais uma vez, para fazer bonito junto aos seus futuros alunos?

Para você guardar no seu arquivo, a **Tabela 5.1** contém alguns exemplos de espécies bacterianas e suas respectivas reações à coloração de Gram.

Tabela 5.1: Exemplos de bactérias

Espécie	Morfologia	Col. de Gram
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cocos agrupados em rosário	Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos agrupados em cachos	Gram +
<i>Escherichia coli</i>	Bastonetes	Gram -
<i>Neisseria meningitidis</i>	Diplococos em forma de grãos de café	Gram -
<i>Vibrio cholerae</i>	Bastonetes virguliformes	Gram -
<i>Chlostridium tetani</i>	bastonetes	Gram +
<i>Bacillus anthracis</i>	bastonetes	Gram +

## RESUMO

Nesta aula prática, foi explicado por que bactérias com componentes estruturais diferentes podem ser diferenciadas quando coradas pelo método de Gram. O método de coloração de Gram diferencia células que apresentam a parede de mureína coberta ou não por uma membrana externa. A seqüência dos procedimentos da coloração de Gram e os princípios físico-químicos que regem cada um deles podem ser memorizados pela frase: “Vi Lulu ali a fumar.”

A microscopia de esfregaço do material de gengiva mostrou de maneira cabal a existência de micróbios intimamente associados aos tecidos de nosso corpo. A propriedade dos corantes de se fixarem em estruturas hidrofílicas ou hidrofóbicas também pode ser evidenciada, de maneira direta e indireta, pela realização do método de Gram.

## INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, você vai ver como os micróbios fazem para crescer e se reproduzir. Vai ver também como ocorre o crescimento populacional quando essas células são semeadas em um meio de cultura, e os fatores que prejudicam ou favorecem a multiplicação celular. Prepare-se para mais uma fascinante viagem ao mundo destes fantásticos seres vivos!



# Crescimento populacional microbiano

AULA

# 6

## Meta da aula

Apresentar os fatores físico-químicos e biológicos que regem os processos de cultivo dos micróbios.

## objetivos

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Reconhecer termos da semântica empregada em Microbiologia.
- Enumerar as fases de transformação anatômica observadas nas bactérias durante a sua multiplicação.
- Descrever alguns dos fatores que influenciam o crescimento populacional microbiano.
- Construir uma ilustração gráfica representativa da dinâmica populacional de uma cultura microbiana clonada.
- Quantificar o tempo de geração das células de uma dada espécie de bactérias.

## Pré-requisito

Para ajudá-lo a compreender melhor o assunto desta aula, é recomendável que você releia o texto da Atividade 2, da Aula 1 (Microbiologia: estudo dos fósseis vivos do nosso planeta), a Aula 3 (Células e suas estruturas), a Aula 16, do Volume 2, da disciplina Bioquímica II. Também é conveniente recordar conceitos de matemática, referentes a critérios aritméticos de números logarítmicos.

## INTRODUÇÃO

Os micróbios, como todos os seres vivos, executam três funções básicas: comer, crescer e multiplicar. Nesta aula, você vai compreender que existem vários fatores que influenciam o crescimento populacional microbiano, e que este crescimento pode ser quantificado.

Esse tipo de quantificação pode ser verificado quando inoculamos uma suspensão de bactérias em um meio de cultura apropriado por meio de contagens efetuadas em intervalos de tempo determinados. Com este procedimento, é possível notar que o crescimento da população bacteriana ocorre conforme uma curva característica. Fazendo uma relação gráfica entre o tempo e o logaritmo do número de bactérias encontrado, podemos reconhecer quatro fases bem definidas na linha representativa da curva de crescimento, conhecidas como: fase de adaptação, fase logarítmica, fase estacionária e fase de declínio.

Para se multiplicar, uma célula bacteriana passa por modificações anatômicas que incluem aumento do volume celular, duplicação do cromossomo e formação de um septo na região central da célula que resulta na separação de duas células iguais entre si. A repetição desse processo de divisão dá origem a uma população de células clonadas, que pode ser visualizada sob a forma de uma colônia, quando o cultivo foi realizado em meio sólido.

O conhecimento sobre a maneira como os micróbios proliferam tem contribuído para melhorar as condições ambientais, quer seja no ambiente terrestre quer na estação espacial internacional. Neste ambiente fechado, a sobrevivência dos astronautas só pode ser garantida com pleno domínio da convivência com os micróbios pois são eles que promovem a reciclagem dos resíduos humanos.

## DIVISÃO CELULAR E CRESCIMENTO POPULACIONAL BACTERIANO

### FISSÃO

#### BINÁRIA

Forma de divisão bacteriana na qual uma célula se divide em duas, de tamanho aproximadamente igual.

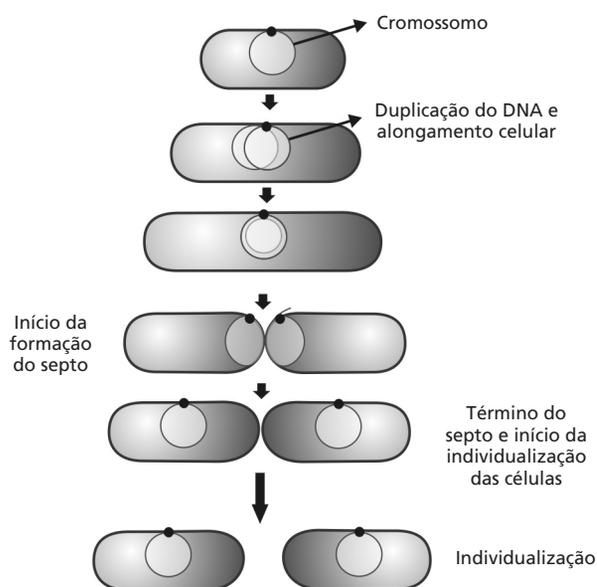
Normalmente, as células bacterianas se reproduzem por um processo de divisão chamado **FISSÃO BINÁRIA**. Para que uma bactéria consiga se reproduzir, ela precisa primeiramente crescer, ou seja, aumentar o seu volume através da biossíntese de seu conteúdo celular. Depois que ela duplica o genoma, tem início o processo de separação que origina duas novas células. Dessa forma, veremos mais adiante como podem ser identificadas as três etapas do processo de reprodução bacteriana: o alongamento celular, a replicação do DNA e a septação.

Para que uma bactéria possa alongar-se, ela precisa primeiramente aumentar a dimensão da sua parede celular. Uma das características das células bacterianas é a alta **TONICIDADE** do seu protoplasma. Mas se a célula é hipertônica em relação ao meio externo, você poderia perguntar: por que ela não estoura? A resposta é simples: é a parede celular que segura a pressão do protoplasma bacteriano, da mesma forma como um pneu protege a câmara de ar na roda de uma bicicleta. Por causa deste envoltório rígido, a célula bacteriana que vai crescer, primeiramente, tem de construir uma nova camada de parede por cima da preexistente e depois digerir, com enzimas do tipo mureinases, a primeira camada de parede.

### TONICIDADE

Refere-se à pressão osmótica, condicionada pela concentração de sais dissolvidos no interior de uma célula. Quando esta pressão interior é igual àquela do meio aquático em que a célula se encontra, diz-se que ela está numa condição isotônica. Se a pressão interna for maior, diz-se hipertônica e, quando menor, hipotônica.

Durante a etapa de alongamento, ocorre uma intensa biossíntese dos componentes celulares com conseqüente aumento do corpo bacteriano. Este crescimento acontece nas extremidades, e gradualmente a célula vai se tornando mais longa, até completar o septo de separação, conforme ilustrado na **Figura 6.1**.



**Figura 6.1:** Representação de uma geração celular.

À medida que o **SEPTO** de divisão vai sendo formado, acontece também a replicação de uma cópia completa do DNA genômico bacteriano, de forma que cada célula gerada recebe uma cópia completa do cromossomo. A formação do septo é conseqüência da invaginação da membrana plasmática e da parede celular através do conteúdo protoplasmático.

### SEPTO

Estrutura citoplasmática formada durante a divisão celular bacteriana que divide uma célula em duas.





Para cultivar bactérias heterotróficas, recomenda-se colocar glicose no meio de cultivo para servir como fonte de carbono e energia. Nos cultivos de micróbios autotróficos quimiossintéticos, a fonte de carbono é o  $\text{CO}_2$  e a energia é obtida a partir de compostos inorgânicos. Nos autotróficos fotossintéticos, a fonte de carbono é o  $\text{CO}_2$  e a fonte de energia é a luz.

Mas, nem só de carbono vive uma célula bacteriana. Ela precisa dispor de outros elementos, como nitrogênio, fosfato, sulfato, ferro e outras substâncias que são necessárias à biossíntese dos seus componentes. Alguns meios de cultura são chamados seletivos, pois eles acabam favorecendo o crescimento de um tipo específico de micróbios enquanto inibem o crescimento de outros.

### As fases do crescimento bacteriano

Algo que chama atenção quando se estuda as populações microbianas é o comportamento que adquirem quando estão nos meios de cultura. Sabe por quê? Quando pegamos uma cultura de bactérias em que os nutrientes já estão esgotados (cultura velha) e a transferimos para um novo meio, observamos um padrão de comportamento característico dessas células. Pela representação gráfica do fenômeno de crescimento da população microbiana, podem ser definidas quatro fases assim ordenadas: a fase de adaptação (*Lag phase*), a fase exponencial ou logarítmica (*Log phase*), a fase estacionária e a fase de declínio populacional. A Figura 6.3 ilustra o comportamento típico apresentado pela população microbiana, quando levado em conta o número de elementos da população em relação ao tempo.

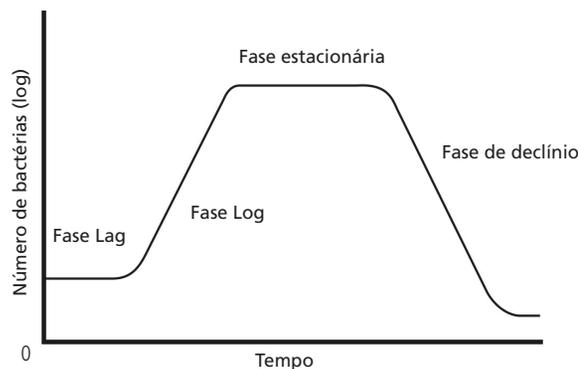


Figura 6.3: As diferentes fases do crescimento populacional bacteriano.

Como você pode perceber, a linha do gráfico inicialmente aparece horizontal, depois passa a ter uma inclinação ascendente, seguida de nova horizontalidade e uma inclinação descendente. Sabe o que isso significa?

Na primeira fase, denominada *Lag*, os micróbios provenientes do meio esgotado, quando encontram novos nutrientes, demoram algum tempo para se adaptar às novas condições nutricionais. O que acontece nesta fase é que cada célula bacteriana está retirando nutrientes do meio para crescer e se dividir.

Na fase logarítmica de crescimento populacional, as células estão se dividindo rapidamente. Nesta fase, cada célula está em plena atividade reprodutiva e cada uma dará origem a duas novas células e assim sucessivamente. Você pode observar essa dinâmica populacional no esquema apresentado na **Figura 6.4**. Nela, você verá a duplicação do número de bactérias durante a fase exponencial que dará origem a uma população de indivíduos geneticamente semelhante ao original (**CLONE**). Na fase exponencial, a biomassa da cultura aumenta linearmente em função do tempo. Sob essas condições, a velocidade de duplicação das bactérias ocorre da forma mais rápida.

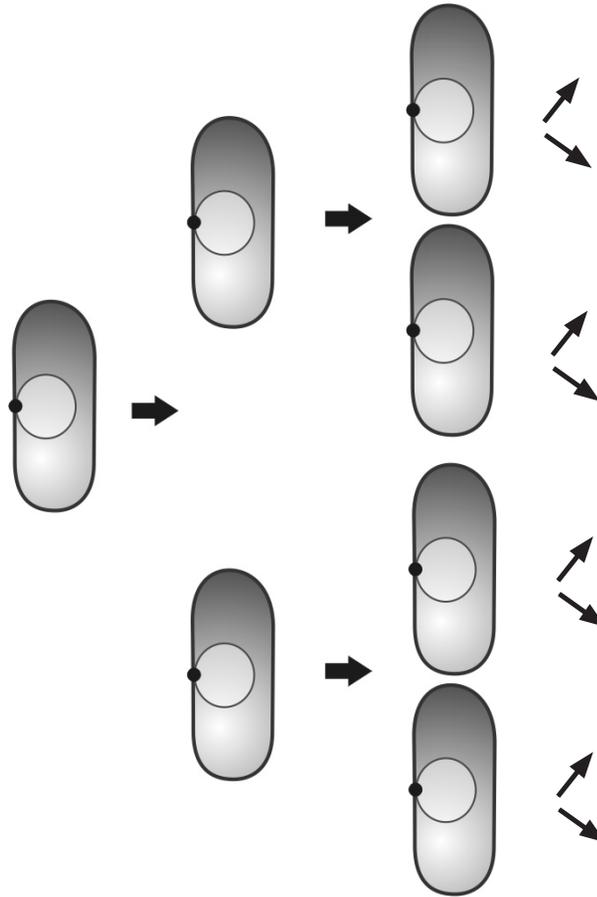
O tempo que uma célula demora a se dividir, quando a sua população está na fase *Log*, é definido como sendo o tempo de geração da espécie microbiana estudada nas condições experimentais estabelecidas.

Como você pode saber se o número das bactérias está aumentando? Uma das formas mais simples é verificar, quando em meio líquido, a turvação do meio de cultura. Quanto mais células houver, mais turva ficará a cultura. Existem outras maneiras, mas isto você verá mais adiante na nossa disciplina.

#### CLONE

Diz-se de uma população de células geneticamente iguais, que teve origem a partir de uma única célula.

Exemplos de clones são as colônias bacterianas visualizadas no meio de cultura sólido, como você pôde observar na **Figura 1.6** da Aula 1 desta disciplina, que foi semeado de maneira a permitir a obtenção de células isoladas.



**Figura 6.4:** Duplicação do número de bactérias durante a fase exponencial, dando origem a um clone.

Após um certo tempo, que varia de um tipo bacteriano para outro, observamos que não ocorre mais o aumento do número de células. Dizemos, então, que a cultura entrou em fase estacionária, ou seja, o número de células que se reproduzem é idêntico ao número de células que morrem.

A última fase da curva tem início quando os nutrientes do meio de cultura são completamente consumidos. A falta de nutrientes, somada à grande liberação de dejetos celulares, leva a população microbiana à fase de declínio, na qual o número de células que morrem é, progressivamente, maior que o número de células que se reproduzem.



## Influência das condições ambientais no crescimento bacteriano

Agora, você vai estudar como as condições do ambiente em que os micróbios vivem podem afetar o seu crescimento e reprodução. A principal condição é a disponibilidade de nutrientes. Quem não sabe que precisamos comer para crescer? Como já ouvimos naquela conhecida música infantil: “comer, comer, comer, comer, é o melhor para poder crescer”!

Com os micróbios, a diversidade metabólica é tamanha que existem as mais variadas maneiras deles obterem os nutrientes necessários para crescerem. A possibilidade de crescimento de um determinado micróbio está muito relacionada ao seu metabolismo. Os micróbios são classificados quanto às suas necessidades nutricionais, de acordo com a fonte de carbono, a fonte de elétrons e a fonte de energia que utilizem. O Quadro 6.1 ilustra essa classificação e acreditamos que alguns desses termos já são de seu conhecimento.

**Quadro 6.1:** Micróbios com seu tipo de metabolismo e fontes de carbono e energia

GRUPO MICROBIANO	METABOLISMO		FONTES DE	
	Tipo de Nutrição	Mecanismo de obtenção de energia	Carbono	Energia
BACTÉRIAS (procariontes)	autotrófica	Fotossíntese	CO <sub>2</sub>	luz
		Quimiossíntese	CO <sub>2</sub>	Compostos inorgânicos
	heterotrófica	Respiração Fermentação	Compostos orgânicos	Compostos orgânicos
FUNGOS E LEVEDURAS (eucariontes)	heterotrófica	Respiração Fermentação	Compostos orgânicos	Compostos orgânicos
PROTOZOÁRIOS (eucariontes)	autotrófica	Fotossíntese	CO <sub>2</sub>	luz
	heterotrófica	Respiração	Compostos orgânicos	Compostos orgânicos
ALGAS (eucariontes)	autotrófica	Fotossíntese	CO <sub>2</sub>	luz



*espécie, cujos novos elementos são individualizados a partir de um septo formado na região central da célula original resultando em duas células iguais entre si. A repetição desse processo de divisão dá origem a uma população de células clonadas que, quando em meio sólido, são visualizadas como colônias.*



Você sabe que os vegetais conseguem sua energia da luz e fabricam seus nutrientes através da assimilação de  $\text{CO}_2$ , enquanto os animais adquirem o carbono orgânico através da alimentação. No entanto, nos micróbios, essas atividades são muito mais amplas: existem bactérias que obtêm energia da luz, mas assimilam o carbono de compostos orgânicos. Essas bactérias são possuidoras de um metabolismo do tipo fotoheterotrófico. Existem ainda tipos bacterianos que conseguem extrair energia de compostos inorgânicos, como os íons sulfato ( $\text{SO}_4$ )<sup>-2</sup> e os radicais ferrosos ( $\text{FeO}_2$ )<sup>-2</sup>. Essa versatilidade metabólica das bactérias é bem diferente daquela observada nas células de origem animal. Vamos ver um exemplo bem interessante: as bactérias do gênero *Klebsiella* conseguem sintetizar o total de vitaminas e aminoácidos que precisam a partir de um único tipo de íon orgânico (o malato ou o citrato). Isto acontece, porque elas são capazes de incorporar nitrogênio inorgânico em moléculas orgânicas. A via metabólica responsável por essa façanha envolve a transformação do ácido glutâmico (um aminoácido mono-nitrogenado) em glutamina. A partir deste aminoácido bi-nitrogenado as *Klebsiella* conseguem produzir todas as moléculas necessárias à construção de uma nova célula, mesmo quando dispõem apenas de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), fosfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ), fosfato bipotássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) e citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) dissolvidos em água.

## Disponibilidade de oxigênio

Um fator essencial ao cultivo microbiano é a disponibilidade de oxigênio. A presença deste gás pode limitar ou mesmo impedir o crescimento dos micróbios. Micróbios *aeróbicos* ou *aeróbicos obrigatórios* são aqueles que só proliferam na presença de oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), ou seja, possuem o complexo enzimático da cadeia transportadora de elétrons, que você aprendeu na Aula 16, do Volume 2, da disciplina Bioquímica II. Entretanto, existem alguns tipos microbianos que só suportam ambientes com quantidades de  $\text{O}_2$  bem menores do que aquelas encontradas no ar: estes são os *microaerófilos*. Já os *facultativos* são aqueles que conseguem sobreviver na presença ou na ausência do  $\text{O}_2$ , ou seja, não são influenciados por este tipo de gás. Existem micróbios que são incapazes de sobreviver na presença do  $\text{O}_2$ , e a estes denominamos *anaeróbicos*.

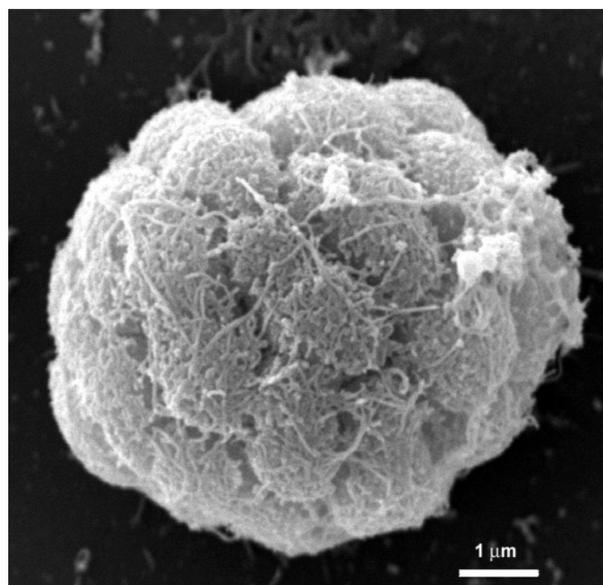
## Efeito da temperatura no crescimento microbiano

Agora, vamos falar um pouco sobre outro fator que influencia o crescimento microbiano: a temperatura. Os micróbios são capazes de crescer nas temperaturas mais diversas, o que lhes permite ocupar os mais variados locais na biosfera. Entretanto, cada tipo de micróbio necessita de uma temperatura ideal para sua reprodução. Assim, estes seres podem ser classificados de acordo com a temperatura adequada ao seu desenvolvimento, como você pode ver no **Quadro 6.2**.

**Quadro 6.2:** Classificação dos micróbios de acordo com a faixa de temperatura do ambiente onde são encontrados na Natureza.

Tipos	Temperatura (°C)
Psicrófilos	<20
Mesófilos	20 a 40
Termófilos	>40
Hipertermófilos	> 80

Há tipos microbianos adaptados aos ambientes inóspitos, como locais muito quentes ou muito frios, muito salgados ou sob muita pressão. Estes são chamados de extremófilos. Dentre eles, há hipertermófilos que se desenvolvem em ambientes com temperaturas de até 110°C. Há os halofílicos que proliferam em locais com alta salinidade, por exemplo, os micróbios presentes nas carnes salgadas encontradas nos supermercados. Na **Figura 6.5**, você observa um exemplo bem brasileiro desse tipo que consegue viver na Lagoa de Araruama, no Estado do Rio de Janeiro, onde a salinidade é aproximadamente o dobro daquela encontrada na água do mar. Você pode obter mais informações sobre esses fascinantes seres no *site*: [http://www.itqb.unl.pt/~Metalloproteins\\_Bioenergetics/extremofilos/page1.htm](http://www.itqb.unl.pt/~Metalloproteins_Bioenergetics/extremofilos/page1.htm).



**Figura 6.5:** Agregado de bactérias que vivem em águas com elevado nível de salinidade.

## CONCLUSÃO

Os micróbios são seres realmente versáteis pois, literalmente, conseguem tirar “suco de pedra”. Através das enzimas que secretam, conseguem degradar todos os produtos naturais, existentes em nosso planeta e, dessa forma, têm conseguido sobreviver por mais de 3,9 bilhões de anos. A conscientização atual da humanidade tem levado à busca permanente por produtos que possam ser biodegradáveis, ou seja, que possam ser reaproveitados a partir da degradação microbiana. A ampliação do conhecimento sobre o metabolismo dos micróbios tem sido conseguida a partir da aplicação de técnicas controladas de cultivo.

## ATIVIDADE FINAL

Vamos fazer uma atividade interdisciplinar utilizando saberes da Microbiologia e da Matemática?

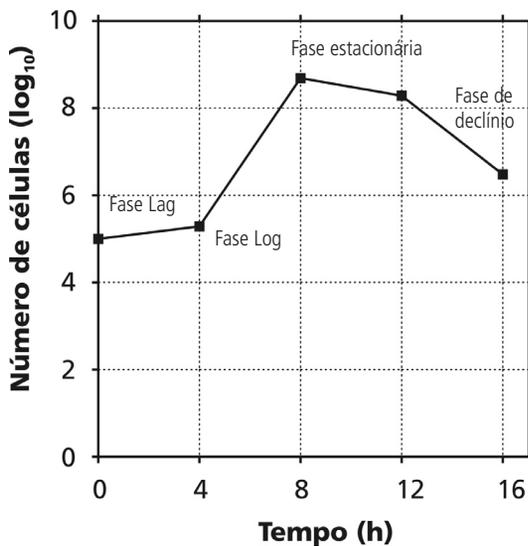
Considere-se um(a) especialista em Microbiologia que, após semear uma suspensão de bactérias de maneira que as células fiquem individualizadas sobre a superfície de um meio de cultura sólido e incubar esta cultura por 24 horas à temperatura ambiente, observa colônias (clones) isoladas típicas do espécime bacteriano desejado. Você então remove um pouco de um desses clones e acrescenta-o a 10 mL de um meio de cultura líquido. Depois de cuidadosa homogeneização, você retira uma alíquota de 1mL dessa suspensão para fazer uma contagem do número de células ali existentes. Mantendo essa suspensão à temperatura ambiente, você retira novas alíquotas de 1mL após quatro, oito, doze e dezesseis horas e as semeia tal como fez com a primeira alíquota. Ao examinar o resultado desse seu experimento, você encontrou os seguintes dados:

Tempo de incubação em horas	Log do Nº de células encontrado
Inicial (zero)	$10^{5.0}$
Quatro	$10^{5.3}$
Oito	$10^{8.7}$
Doze	$10^{8.3}$
Dezesseis	$10^{6.5}$

Com estes resultados construa um gráfico colocando a variável tempo no eixo X e o log do nº de células no eixo Y . Lembre-se de que a escala de tempo está em números aritméticos e a quantidade de bactérias/mL está expressa em valores logarítmicos. Portanto, você deve plotar os valores em papel milimetrado semi-log.

### RESPOSTA COMENTADA

Com certeza você não teve dificuldade de construir um gráfico. Atente para o ângulo de inclinação da linha que vai do tempo 0 até o tempo de 4 horas. Essa linha da cinética do crescimento populacional representa o período em que as células estão adaptando-se às novas condições nutricionais do ambiente, pois a quantidade de células passa de  $10^{5.0}$  para  $10^{5.3}$ /mL, o que sugere que a população celular demorou quatro horas para atingir o dobro de indivíduos ( $\log$  de  $10^{5.3}$  é igual a  $2 \times \log$  de  $10^{5.0}$ ). No período de 4 para 8 horas, observa-se a fase exponencial do crescimento populacional. De 8 a 12 horas verifica-se a fase estacionária, seguida da fase de declínio, após as 12 horas. Vale salientar, que o fator que regula essa dinâmica populacional é a disponibilidade dos nutrientes. Quanto mais indivíduos houver, menor será a quota nutricional para cada um. Imagine como seria o desenho da curva se depois das 8 horas fossem acrescentados mais nutrientes. Obviamente que a fase exponencial se prolongaria.



## RESUMO

Como todos os seres vivos, os micróbios comem, crescem e se multiplicam. As células bacterianas se replicam por um processo denominado fissão binária. Antes da divisão, ocorrem a duplicação do DNA, o alongamento celular e a formação do septo, que culmina com o aparecimento de duas células, a partir da primeira. No processo de cultivo bacteriano, vários fatores têm influência direta ou indireta no crescimento populacional, destacando-se a disponibilidade de nutrientes, a temperatura, o pH e a salinidade do meio.

Também são importantes as condições de aerobiose ou anaerobiose. A quantificação do número de células microbianas numa cultura, em função do tempo, pode ser representada em um gráfico, onde estão definidas as fases de adaptação (*Lag*), exponencial (*Log*), estacionária e de declínio. O tempo que uma célula demora a se dividir, quando a população está na fase *Log*, é definido como o tempo de geração da espécie estudada sob as condições estabelecidas.

## INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, você vai aprender como os microbiologistas conseguem domar os micróbios e o que fazer para controlar o crescimento populacional bacteriano, e as possíveis aplicações deste conhecimento no nosso dia-a-dia. Será uma aula interessante, pois vários dos aspectos a serem abordados têm aplicações na saúde humana e na indústria.

## Ação dos agentes físicos e químicos sobre os micróbios

### Meta da aula

Apresentar as formas como os agentes físicos e químicos podem ser empregados para controlar a presença de micróbios em um determinado ambiente.

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Entender a utilização semântica dos termos esterilização, desinfecção e assepsia, no âmbito da Microbiologia.
- Listar os principais métodos físicos e químicos que podem ser empregados para eliminar os micróbios.
- Explicar o modo de ação dos principais produtos químicos que podem ser empregados para eliminar os micróbios de um ambiente.

### Pré-requisitos

Para você compreender o conteúdo desta aula, é necessário rever os conteúdos da Aula 1 (Estudo dos micróbios: os fósseis vivos do nosso planeta), da Aula 3 (Estruturas das células), da Aula 4 (Células e seus produtos) e da Aula 6 (Crescimento populacional bacteriano), desta disciplina.

## INTRODUÇÃO

### ESTERILIZAÇÃO

É o termo que define a destruição ou eliminação de todas as formas de vida de determinado ambiente. Nesse caso, empregam-se métodos físicos tais como calor, radiações iônicas ou filtros esterilizantes. Só podemos dizer que um determinado material ou local está esterilizado ou não. Não há meio termo para este conceito.

### DESINFECÇÃO

Termo que define a destruição de formas microbianas por meio de agentes químicos em ambientes inanimados, tais como salas de cirurgia, banheiros, mesas e utensílios diversos.

### ASSEPSIA

Termo que define o conjunto de meios ou processos utilizados para impedir que micróbios presentes no ambiente cheguem a determinados locais, tais como feridas cirúrgicas ou meios de cultura. Uma palavra parecida, porém com conotação diferente, é a ANTISSEPSIA, a qual é aplicada naqueles casos onde produtos químicos são usados em tecidos vivos, mucosas ou mesmo na pele para evitar a proliferação de micróbios.

Agora que você já sabe como os micróbios interferem no nosso cotidiano, através dos seus processos metabólicos, você vai estudar, nesta aula, como é possível eliminar ou impedir a presença dos micróbios em determinado ambiente. Esse tipo de controle é um dos aspectos da civilização moderna que possibilitou grande avanço na qualidade de vida da população humana, aumentando, dessa forma, sua longevidade nas últimas décadas.

Na produção de alimentos industrializados, como é o caso de queijos, vinhos, cervejas e produtos mantidos congelados ou sob refrigeração, são adotadas medidas rígidas para o controle da proliferação microbiana.

Mesmo sem perceber, nós executamos ações que visam a controlar o crescimento populacional bacteriano em várias atividades do nosso cotidiano. Quando escovamos os dentes ou mascamos chicletes sem açúcar, por exemplo, estamos tirando de nossa boca resíduos de alimentos que poderiam servir de nutrientes para os elementos da microbiota ali residentes. Lavar frutas e verduras também é uma forma de retirar micróbios contaminantes presentes nesses vegetais, que poderiam prejudicar a saúde humana.

Atitudes como lavar as mãos, tomar banho, fazer uso somente de agulhas e seringas descartáveis e não compartilhar elementos perfurocortantes utilizados por manicures, barbeiros, dentistas, tatuadores e colocadores de *piercing*, representam zelo pelo próprio corpo e atitudes de civilidade em relação à convivência na comunidade.

Conservar alimentos na geladeira ou no congelador faz parte de um comportamento que busca uma vida saudável.

Usar desinfetantes na limpeza da casa e clorar a água da piscina são demonstrações de respeito ao seu habitat e à segurança no seu lazer.

Como você pode perceber, algumas noções de Microbiologia já estão inseridas, de maneira empírica ou consciente, no nosso cotidiano. Se você pensar um pouco poderá lembrar-se de muitas outras situações envolvendo os micróbios e os seres humanos.

## CONCEITOS FUNDAMENTAIS NO CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Antes de começarmos a estudar as diferentes formas de controle do crescimento microbiano, precisamos atentar para alguns conceitos semânticos que são fundamentais para a compreensão desses processos, tais como: **ESTERILIZAÇÃO**, **DESINFECÇÃO** e **ASSEPSIA**.

Outras terminologias utilizadas para conceituar os processos de controle do crescimento populacional microbiano se referem aos efeitos causados pelos agentes químicos ou físicos. Estes agentes podem frear a proliferação dos micróbios ou eliminá-los completamente. Os que retardam o crescimento são denominados bacteriostáticos. Os letais são chamados bactericidas. Na bacteriostase, quando o agente é removido, o crescimento populacional é retomado. Um exemplo cotidiano de agente físico bacteriostático que você conhece bem é o uso do frio. Fazemos a conservação de alimentos na geladeira, certo? Mas, se o alimento for mantido por muito tempo nesse ambiente, mesmo assim, ele terminará estragando, ou seja, os micróbios tomarão conta dele. Quem já viu uma fruta ou legume mofado na geladeira sabe do que estamos falando!

Em contrapartida, um exemplo de produto químico com efeito bacteriostático é a **SULFA**.

O efeito bactericida, assim como o bacteriostático, também pode ser exercido por agentes físicos ou químicos. No **Quadro 7.1** você vai encontrar alguns exemplos destes agentes e o modo como atuam. Mais adiante você encontrará os detalhes desse modo de ação.

**Quadro 7.1:** Quadro descritivo de alguns agentes físicos e químicos de efeito bactericida

Tipo de agentes	Exemplo	Modo de ação
Físicos	calor úmido a 120 °C	desnaturação de proteínas
	calor seco a 160 °C	dessecamento
	radiação gama	ionização
	radiação ultravioleta	dano no DNA celular
Químicos	detergentes	dissolve membranas
	soda cáustica	dissolve membranas
	formol, fenol e derivados	desnaturam proteínas
	álcool	desnatura proteínas
	halogênios (cloro, iodo)	desnaturam proteínas

#### SULFA

Produto derivado de corantes do grupo das anilinas, que tem efeito inibitório sobre a biossíntese da vitamina B6 (ácido fólico) pelos micróbios.

## MÉTODOS FÍSICOS DE ESTERILIZAÇÃO

Vamos estudar, agora, as formas de controle de crescimento com base em agentes físicos, dentre estes, destacaremos o calor, em ambiente seco ou úmido, os filtros e as radiações.

## Utilização do calor

Depois de limpo, o material pode ser esterilizado por aquecimento. Este aquecimento pode ser feito na presença ou na ausência de água, sendo chamado calor úmido e calor seco, respectivamente. A forma mais comum de calor úmido utilizada pelo homem é a fervura da água (100°C), um método eficaz e barato de destruir todas as formas vegetativas de micróbios. Porém, não elimina os micróbios sob a forma de esporos. Por essa razão, não podemos considerar a fervura como um método de esterilização.

Para que possamos esterilizar certo material utilizando calor úmido, precisamos elevar a temperatura da água para 120°C, o que é conseguido em uma autoclave (Figura 7.1). Dentro dela, a pressão é aumentada de maneira a manter a água na forma líquida, mesmo em uma temperatura acima do seu ponto de evaporação (fervura). Com isso, ocorre a desnaturação das proteínas e a conseqüente destruição tanto das formas vegetativas quanto das formas esporuladas.



Figura 7.1: Autoclave.

A autoclave é utilizada para esterilizar meios de cultura, instrumentos cirúrgicos, soluções e outros materiais que resistam às temperaturas acima de 100 °C. No interior de uma autoclave fechada, quando a temperatura da água aumenta e esta evapora, o vapor passa a exercer uma pressão sobre a própria camada de água onde está sendo gerado. Quanto maior for a temperatura, maior será a pressão do vapor sobre a água e, sob esta condição, a água não entra em ebulição. A eficiência do processo de esterilização por autoclavação vai depender do tempo de aquecimento, e da temperatura e pressão alcançadas. Na maioria dos procedimentos, os materiais a serem esterilizados por autoclavação são submetidos, durante 15 minutos, à temperatura de 121°C sob uma pressão de um kg/cm<sup>2</sup>, ou seja, uma atmosfera acima da pressão atmosférica ambiente.

Uma maneira bastante eficaz de usar o calor para remover grande parte dos micróbios presentes em produtos alimentícios, principalmente leite e seus derivados, é a pasteurização. Este método de descontaminação foi proposto pelo microbiologista francês Louis Pasteur, como você viu na Aula 1 desta disciplina.

Pasteurizar consiste em aquecer rapidamente o produto à temperatura de 72°C, por 15 segundos, e imediatamente resfriá-lo. Essa brusca mudança térmica provoca a desnaturação das proteínas e das moléculas de DNA nas células microbianas em estado vegetativo, mas não tem ação sobre aquelas em estado de endosporo. Por isso, o produto pasteurizado deve ser mantido sob refrigeração e consumido o mais rápido possível depois de aberto. Enquanto os produtos permanecem fechados, os conservantes adicionados controlam o crescimento microbiano (até o limite do prazo de validade). Na **Figura 7.2** você encontra alguns exemplos de produtos pasteurizados.



**Figura 7.2:** Exemplo de produtos pasteurizados.



### ATIVIDADE

1. Vamos ver se você entendeu a utilização do método físico calor, no processo de descontaminação microbiana:

Imagine uma situação em que você fosse contratado para coletar material para testes microbiológicos em um determinado local do Rio de Janeiro, por motivo de um inquérito de natureza epidêmica. Antes de sair de casa, ao checar o seu material de coleta, você percebeu que o invólucro que protegia as pinças esterilizadas estava rasgado. Para não ter de ir ao laboratório, escolha dentre as alternativas abaixo aquela que pode ser utilizada para esterilizar o material no próprio local e justifique a sua opção:

1. Ferver em panela comum por 5 minutos.
2. Ferver em panela comum por 15 minutos.
3. Ferver em uma panela de pressão por 1 minuto.
4. Ferver em uma panela de pressão por 15 minutos.

### RESPOSTA COMENTADA

*Apoiado nos conhecimentos até aqui apresentados, você deve ter escolhido a opção 4. Os esporos bacterianos são formas de resistência ao calor e, portanto, não são eliminados com a simples fervura à pressão atmosférica. Dentre as opções apresentadas, aquela que é capaz de promover a esterilização é a opção 4, conforme você aprendeu na Atividade 3, da Aula 1 desta disciplina.*

### FLAMBAGEM

Método de desinfecção em que a alça bacteriológica é passada pela chama até o metal adquirir a cor rubra, a fim de eliminar qualquer contaminante ali presente. Do francês *flamber* (submeter à ação do fogo).

### TERMOLÁBIL

Diz-se da substância que se decompõe quando aquecida. Como exemplos temos vitaminas, antibióticos e hormônios.

A esterilização por calor seco é efetuada em equipamentos chamados forno de Pasteur. Nestes equipamentos, pinças, espátulas e vidrarias são aquecidas a 180 °C, por uma hora. Esse método é bastante utilizado em consultórios dentários e laboratórios de pesquisa microbiológica.

Outro método de esterilização por calor seco é o uso do processo de combustão em larga escala, no qual são incinerados resíduos hospitalares. Em pequena escala, vemos este processo na **FLAMBAGEM** de alças bacteriológicas para trabalhos de transferência de micróbios.

### Utilização de filtros

A filtração é uma maneira de reter os micróbios presentes em um produto líquido. O diâmetro do poro do elemento filtrante deixa passar o líquido, porém retém os elementos particulados, que podem ser micróbios. Por isso, podemos dizer que o material filtrado e mantido em condições assépticas está esterilizado. Esse método é utilizado quando se quer esterilizar soluções contendo substâncias **TERMOLÁBEIS**. A **Figura 7.3** mostra um sistema de filtração em que são utilizadas membranas esterilizantes. Esse tipo de equipamento está disponível comercialmente para uso em laboratórios.

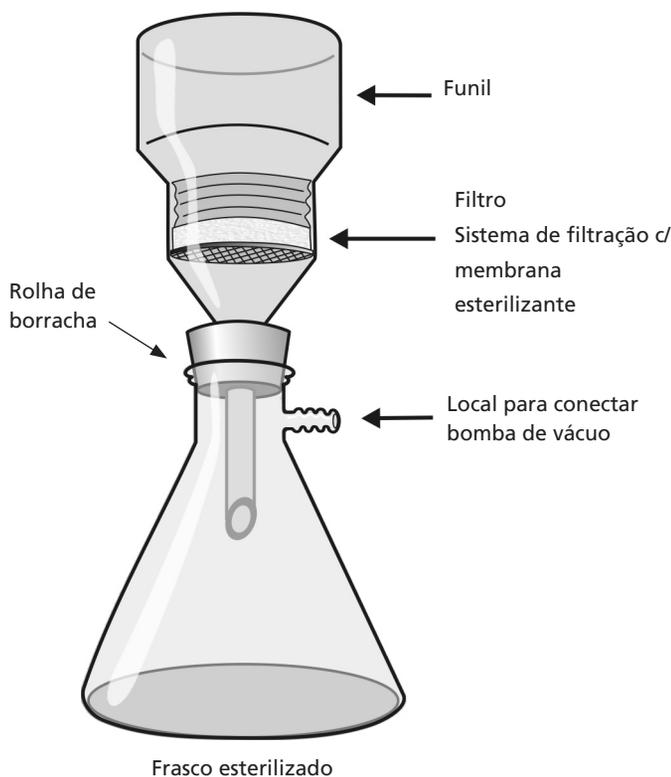


Figura 7.3: Sistema de filtração.

## Utilização de radiação gama

Utiliza-se a **RADIAÇÃO IONIZANTE** para esterilizar todo tipo de material, principalmente, produtos injetáveis, alimentos de astronautas e utensílios de plástico para uso cirúrgico ou laboratorial. Nas células vivas, os raios gama atuam ionizando a água e gerando radicais livres que desnaturam os componentes celulares.

Essa técnica tem muita aplicabilidade pois, além de substituir com grandes vantagens a filtração, pode ser utilizada também em produtos sólidos (seringas, agulhas e utensílios plásticos, dentre outros) utilizados em hospitais, consultórios dentários e em laboratórios de análises clínicas, de controle de qualidade de produtos industriais ou de pesquisas. Esse processo de esterilização mantém as características físico-químicas dos materiais. Porém (sempre tem de haver um porém...), a fonte emissora da radiação, depois que perde a energia esterilizante, continua emitindo radiações que são indutoras de câncer. Isto faz com que o descarte destas fontes deva ser efetuado em condições especializadas. Caso contrário, podem ocorrer sérios transtornos.

### RADIAÇÃO IONIZANTE

É aquela resultante da emissão de partículas ou ondas eletromagnéticas por um átomo de núcleo instável, cuja energia é suficiente para remover elétrons de outros átomos, originando íons altamente reativos, capazes de danificar a estrutura de células ou de provocar alterações nos mecanismos de divisão celular.

Você deve se lembrar (ou então pergunte aos seus parentes, se eles se lembram) do acidente com césio radiativo ocorrido na capital de Goiás, em 1987, que resultou em quatro mortes dentre as 249 pessoas contaminadas. Se você quiser conhecer mais detalhes acerca do desdobraimento deste grave acidente ocorrido em solo brasileiro, visite o site <http://www.energiatomica.hpg.ig.com.br/acidgoi.html>.

Outro tipo de radiação que também apresenta diversas aplicações laboratoriais é a ultravioleta (UV). Este tipo de radiação tem um pequeno poder de penetração, por isso é indicado para esterilização do ar em ambientes tais como câmaras assépticas e cabines de fluxo laminar.

## MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DE CRESCIMENTO

Uma forma eficiente e barata de preservar alimentos, já utilizada pela humanidade mesmo antes da descoberta dos micróbios, é a adição de grandes quantidades de sal às carnes, ou de açúcar às frutas. As carnes salgadas da feijoada são exemplos disso. Com o uso do açúcar, temos as compotas e os xaropes de frutas.

Nesses casos, a pressão osmótica exercida pelo sal ou pelo açúcar remove a água do interior das células microbianas e impede o crescimento e multiplicação das mesmas. Um exemplo de uso natural desse fenômeno, é a forma como as abelhas conservam o alimento de sua prole sob a forma de mel, cuja concentração de glicose seqüestra a água e, assim, impede que os micróbios deteriorem o mel.

Retirar a água dos alimentos é realmente a melhor forma de preservá-los. Como exemplo clássico disto temos a carne seca e as frutas secas.

Diferente das carnes salgadas que normalmente são encontradas nos supermercados existe a carne seca (jabá) que é condimentada e prensada para remoção da água. Outra forma de conservar a carne, bastante utilizada no nordeste brasileiro, é a exposição aos raios solares (carne de sol). Neste processo, a conservação se deve ao efeito esterilizante dos raios ultravioletas sobre a superfície das mantas de carne e à dessecação efetuada pelo vento. Cada um desses tipos de carne tem seu paladar característico nos cardápios – carne seca com abóbora (jabá com jerimum) e carne de sol com aipim (carne de sol com macaxeira) – dependendo da região onde você estiver degustando esses pitéus.

Obedecendo a esse mesmo princípio de retirada de água, a conservação de certos produtos biológicos e de alguns alimentos pode ser efetuada em escala industrial, por um processo de dessecação denominado **LIOFILIZAÇÃO**.

Agora que você já viu a utilização de alguns processos físicos para evitar ou diminuir a proliferação de micróbios, vamos apresentar processos onde são utilizados agentes químicos.

## Agentes químicos

Quando se utiliza um agente químico, o tempo de exposição e a concentração são os principais aspectos que devem ser levados em consideração, pois quanto maior for a quantidade de micróbios a ser atingida, maior deve ser a concentração e o tempo de exposição.

Os agentes químicos usados cotidianamente no controle microbiano têm efeito esterilizante, ou seja, matam os micróbios. A utilização desses produtos pode ser feita como desinfetante ou antisséptico. Os desinfetantes ou antissépticos, antes de mais nada, devem matar células. Usa-se desinfetantes em superfícies inanimadas e antissépticos em tecidos vivos. Você está lembrado de assepsia e antisepsia?

Uma prova da eficiência de um antisséptico é verificada quando o mesmo é aplicado sobre um ferimento. Dói? É porque suas células estão sendo mortas e os micróbios também! Para efeito comercial, as formulações com antissépticos devem ser incolores, inodoras – ou de cheiro agradável – e não deixar manchas.

Os desinfetantes que usamos no cotidiano têm geralmente em sua composição formol, derivados fenólicos ou cloro (sob a forma de hipoclorito). Os desinfetantes matam os micróbios do ambiente e, muitas vezes, também o perfumam.

Já que estamos falando de odores, não devemos achar que a eficácia de um desinfetante está associada ao odor que deixa no ambiente. Há compostos químicos altamente **GERMICIDAS** que são inodoros (sabões e detergentes) e outros com cheiro forte (formol e creosoto). Não devemos também pensar que os desinfetantes resolvem todos os problemas relacionados ao controle do crescimento microbiano, pois sua ação depende da concentração do princípio ativo e do volume do produto usado sobre a população microbiana a ser atingida. Daí a importância da prévia limpeza física.

### LIOFILIZAÇÃO

Forma de conservar produtos biológicos por muito tempo. Consiste em submetê-los a um rápido congelamento com subsequente secagem a vácuo (dessecação a frio). Depois de liofilizado, o material deve permanecer hermeticamente fechado para evitar umidade.

### GERMICIDAS

Diz-se do agente capaz de matar os germes.



### ATIVIDADE

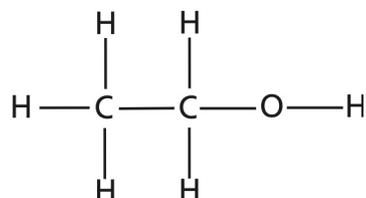
2. Imagine duas situações: na primeira, uma criança se fere ao andar de bicicleta e procura sua mãe chorando. Após ser inteirada da situação, ela diz: “Precisamos desinfetar essa ferida com álcool para não causar mais problemas. E você está de castigo menino”. Na segunda, outra criança mostra à mãe um espinho encravado no dedo e esta lhe diz: “Vou esterilizar uma agulha na chama do fogão, fazer a antissepsia do seu dedo com álcool e retirar o espinho com a agulha esterilizada”. De acordo com os conhecimentos que você adquiriu até agora, diga se as mães expressaram corretamente as ações a serem efetuadas.

### RESPOSTA COMENTADA

*Tecnicamente, só podemos falar em desinfecção quando se trata de uma superfície inanimada. A ferida expõe células vivas, portanto, o termo utilizado pela primeira mãe não se aplica. Porém, não devemos exigir essas coisas daquela mãe, que deve estar nervosa demais para se preocupar com o vernáculo e nem deve ter lido este capítulo. Já a segunda mãe deu um show nos procedimentos e na semântica. É uma autêntica microbiologista!*

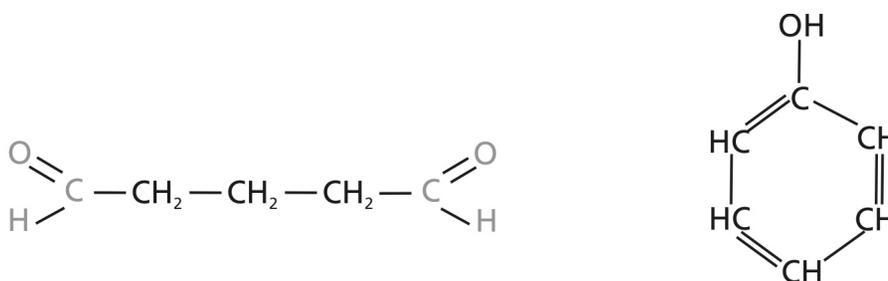
## Alguns compostos químicos usados como desinfetantes ou antissépticos

O álcool etílico (ou etanol), cuja fórmula química estrutural você pode ver na **Figura 7.4**, é um dos mais utilizados, podendo servir como desinfetante ou antisséptico. Atua desnaturando as proteínas. O álcool etílico a 70% tem maior eficiência. Além de ser um produto barato, é fácil de encontrar no comércio. Você se lembra da Aula 4, quando foi comentada a fermentação do caldo de cana gerando álcool?



**Figura 7.4:** Etanol.

Outros álcoois, como o álcool iso-propílico (ou isopropanol), são utilizados na limpeza de instrumentos como computadores, pois são menos corrosivos do que o etanol. Além dos álcoois, existem os aldeídos como o formaldeído (formol) e o glutaraldeído (Figura 7.5) que possuem muitas aplicações. Podemos constatar sua ampla utilização na desinfecção de salas cirúrgicas de hospitais, dentre outros. O glutaraldeído atua desnaturando as proteínas e é usado na prática médica. Os derivados de fenol (Figura 7.5) são de uso veterinário, conhecidos vulgarmente como creolina.



**Figura 7.5:** Fórmulas químicas estruturais do glutaraldeído (à esquerda) e do fenol (à direita).

As soluções com **HALOGÊNIOS** (cloro e iodo) também são utilizadas para controlar o crescimento microbiano. Os compostos de iodo, sob a forma de tinturas, são utilizados como antissépticos na medicina humana e na veterinária. Nas tinturas, o iodo está dissolvido em soluções alcoólicas que facilmente evaporam, deixando o iodo concentrado sobre o local aplicado. Daí sua ação ser imediata, atingindo células em estado vegetativo ou esporulado. A grande eficiência do iodo está no fato de que esse composto tem uma alta capacidade de ligar-se irreversivelmente às proteínas celulares, desnaturando-as.

O cloro é utilizado como desinfetante, pois também reage com as proteínas. Entretanto, esta reação se dá nos aminoácidos, formando os chamados cloroaminoácidos, que são compostos instáveis. Uma característica do cloro é sua instabilidade à luz; por isso, os recipientes contendo este produto devem ser opacos. Em função da grande instabilidade do cloro, para fixá-lo é necessário manter a solução em pH alcalino. Por este motivo, os desinfetantes contendo cloro estão dissolvidos em uma solução de hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio.

### HALOGÊNIOS

Diz-se dos elementos químicos flúor, cloro (gasosos), bromo (líquido), iodo e astatínio (sólidos) classificados no grupo 17 (7A) da tabela periódica dos elementos químicos.

O astatínio é radiativo e pouco comum. Todos apresentam sete elétrons no seu último nível de energia. O termo halogênio provém do grego e significa formador de sais.



Na solução de hipoclorito de sódio, comumente conhecida por água sanitária, o cloro está dissolvido em hidróxido de sódio (produto também conhecido como soda cáustica). O desinfetante utilizado na água de piscinas é o hipoclorito de cálcio associado a hidróxido de cálcio, menos cáustico que o hidróxido de sódio.

A proliferação de micróbios nos alimentos pode ser evitada se estes forem mergulhados em solução de ácido. Você já ouviu falar em uma solução de ácido acético a 0,5%? Estamos falando do vinagre. A conserva de legumes em vinagre é chamada pickles.

Usar vinagre nas verduras é uma maneira de descontaminá-las. Outro ácido usado é o ácido bórico, que pode ser adquirido nas farmácias como polvilho antisséptico ou água boricada.

Alguns produtos antissépticos, que por muito tempo foram utilizados e encontrados em farmácias, tinham na sua composição moléculas com metais pesados. Um deles era o merbromino (*Mercurcromo*), e o outro era o timerosal (*Merthiolate*), que, quando aplicado, ardia muito. Pudera!!! Este último era dissolvido numa mistura de álcool e acetona.

Em vista dessa diversidade de agentes físicos e químicos para evitar a proliferação de micróbios, qual seria o procedimento mais eficaz quando se deseja fazer a limpeza de feridas, cortes ou arranhões na superfície do nosso corpo? O recomendado nesses casos é lavar bem com água e sabão! O sabão é um detergente que atua dissolvendo os lipídios das membranas celulares. Quando essa ação é exercida, as células perdem a permeabilidade seletiva de suas membranas, função esta que foi apresentada a você na Aula 3 (Estruturas das células). A perda da permeabilidade seletiva leva a célula à morte. Quando esse efeito se dá sobre os micróbios, é dito que houve uma ação germicida.

Outros produtos muito eficientes utilizados na antisepsia das mãos por profissionais de saúde são os chamados detergentes catiônicos. Dentre estes destacam-se os compostos fenólicos clorexidina e seus derivados, que estão presentes em vários produtos para uso oral ou tópico.

## CONCLUSÃO

Vários conceitos que se aplicam a uma grande variedade de agentes químicos e físicos empregados no controle do crescimento bacteriano foram apresentados nesta aula. Alguns deles atuam provocando danos irreversíveis às células (morte). Outros, promovem danos reversíveis (retardando o desenvolvimento celular). Os primeiros são conceituados como bactericidas, e os últimos, como bacteriostáticos. A principal forma de controle de crescimento bacteriano ainda é a limpeza física, que consiste em retirar toda a sujeira. Quem já lavou louça sabe disso! Os animais ao lambem o corpo e as suas feridas, também estão exercendo a ação de remover o excedente de micróbios.

### ATIVIDADE FINAL

- a. Correlacione os tipos de agentes químicos utilizados como anti-microbianos citados na coluna da esquerda aos respectivos mecanismos de ação apresentados na coluna da direita:

1. clorexidina	( ) desinfetante halogenado
2. sabão	( ) bactericida quando usado a 70%
3. hipoclorito	( ) dissolve lipídios da membrana
4. álcool	( ) desinfetante que desnatura proteínas
5. formol	( ) detergentes catiônicos

- b. Por que o cirurgião, antes de iniciar sua atividade, escova as unhas, lava as mãos com bastante sabão, passa antisséptico nas mãos e braços, veste roupas e luvas esterilizadas, utiliza máscara cobrindo a boca e o nariz e usa gorro na cabeça?

---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---

**RESPOSTA COMENTADA**

a. Se você preencheu os parênteses da coluna da direita com a seqüência numérica 3;4;2;5;1, significa que está sintonizado com o texto. Se não acertou, releia o texto com mais atenção e tente novamente.

b. Essa você tirou de letra! Lavando as mãos e escovando as unhas o cirurgião está removendo grande parte dos próprios micróbios. O antisséptico vai agir sobre os que ainda sobraram. Como nem todos são eliminados, há necessidade de cobrir o corpo com vestimentas esterilizadas para evitar que os elementos da microbiota desse cirurgião cheguem ao campo cirúrgico, pois nesse local as incisões expõem tecidos do paciente que não estão protegidos pela pele e, se os micróbios atingirem esses tecidos, a chance de desencadear uma infecção será muito grande.

**RESUMO**

No âmbito da Microbiologia são utilizados os processos de esterilização, desinfecção, e assepsia. A utilização de vários agentes ou processos físicos, tais como calor úmido (autoclavação), calor seco (forno), radiação gama, radiação ultravioleta e filtração, permite eliminar micróbios de ambientes, equipamentos e soluções, tornando-os esterilizados. Agentes químicos letais e não letais aos micróbios – tais como álcoois (etanol e outros), aldeídos (formol e derivados), fenol (cresóis e derivados), elementos halogênicos (cloro e iodo), agentes lipolíticos (detergentes, sabões e clorexidina) –, dependendo da concentração, têm efeito letal sobre a população microbiana, e são ditos bactericidas. O efeito bacteriostático sobre populações microbianas tem sido utilizado no cotidiano pelas populações humanas para a conservação de alimentos, usando para isto os seguintes processos: refrigeração ou congelamento, salga ou dessecação de carnes, adição de açúcar a frutas (compotas e xaropes), e vinagre aos legumes (pickles). Um processo de efeito intermediário é a pasteurização de alimentos, que é uma maneira de eliminar grande parte de micróbios de um alimento líquido. Vale destacar que os princípios de higiene consistem em manter o asseio corporal, lavar as mãos, e usar roupas limpas.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA**

Na próxima aula, que será prática, você vai ver também como é possível testar a ação de agentes físicos sobre os micróbios e avaliar o efeito inibidor de agentes químicos usados como antissépticos, desinfetantes e antibióticos. Para isso você pode levar para a aula alguns desses produtos, que você usa no seu cotidiano.

# Ação do calor e de agentes químicos sobre as células microbianas – Aula prática

AULA

# 8

## Meta da aula

Demonstrar, por meio de experimentos simples, o efeito do calor e dos desinfetantes sobre os micróbios.

## objetivos

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Executar manobras assépticas adotadas no cotidiano dos laboratórios de Microbiologia.
- Demonstrar a ação do calor sobre as células microbianas em estado vegetativo ou de esporo.
- Identificar a ação de agentes químicos (desinfetantes ou anti-sépticos) sobre células microbianas.

## Pré-requisitos

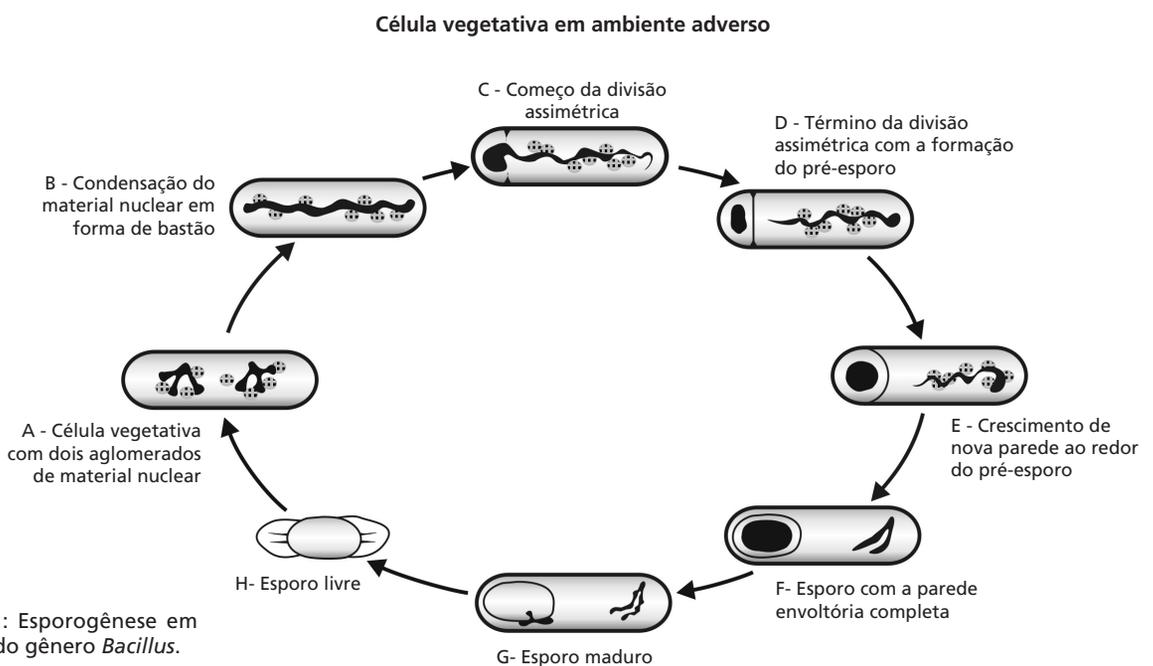
Para entender esta aula, é necessário que você reveja alguns conceitos apresentados nas Aulas 1 (micróbios como digestores de matéria orgânica), 3 (formas vegetativas e esporuladas das células), 6 (necessidades nutricionais microbianas) e 7 (noções de assepsia).

## INTRODUÇÃO

Nesta aula, você vai ter a oportunidade de executar experimentos que vão lhe permitir perceber como fazemos, no nosso cotidiano, para controlar o crescimento populacional dos micróbios. Para isto, vamos utilizar o calor da água fervente como exemplo de agente físico e soluções de desinfetantes e de anti-sépticos como exemplos de agentes químicos que podem causar dano às células microbianas. Os micróbios, como seres vivos, podem existir na forma vegetativa ou sob a forma de esporo. Na forma vegetativa, as células estão em plena atividade fisiológica (comer, crescer e dividir-se). Sob a forma de esporo, as células estão em estado inerte, pois suas atividades metabólicas estão reprimidas devido à dessecação que sofreram. A falta de água intracelular impede as ações das enzimas. As bactérias sob a forma de esporo são o calcanhar-de-aquiles dos processos de esterilização que utilizam o calor. Que tal aprender um pouco mais sobre esse estado de sobrevivência adotado pelas células microbianas?

## ESPOROS BACTERIANOS

Complementando o que foi apresentado no item sobre endosporos da Aula 3 do Módulo 1 desta disciplina, o esporo bacteriano, também denominado endosporo, é um estado fisiológico peculiar adotado por certos tipos bacterianos Gram-positivos para sobreviverem, quando o ambiente onde eles convivem torna-se adverso. Esporogênese é o processo de metamorfose pelo qual uma célula bacteriana passa do estado vegetativo (metabolicamente ativo) para o esporulado. Esse processo envolve diversas etapas (veja a Figura 8.1).



**Figura 8.1:** Esporogênese em bactérias do gênero *Bacillus*.

Esse processo envolve a prévia divisão assimétrica da célula que dá origem a uma estrutura chamada pré-esporo, da qual se desenvolverá o esporo. Essa transformação é acompanhada por um processo de desidratação que remove a quase totalidade da água intracelular, além das transformações bioquímicas e estruturais. Estruturalmente, observa-se a invaginação do pré-esporo e sua transformação em esporo, que, por sua vez, é liberado no meio. Quando as condições se tornam novamente favoráveis, os esporos germinam e dão origem a formas vegetativas.



#### BICO DE BUNSEN

Dispositivo usado em laboratório de Microbiologia para flambar objetos e criar um campo estéril em torno da chama. Foi aperfeiçoado por Robert Wilhelm Bunsen (1811-1899), a partir de um dispositivo desenhado por Michael Faraday (1791-1867). No bico de Bunsen um fluxo contínuo de gás butano (ou outro) é queimado em segurança, sem haver o risco de a chama se propagar pelo tubo até o depósito de gás que o alimenta.

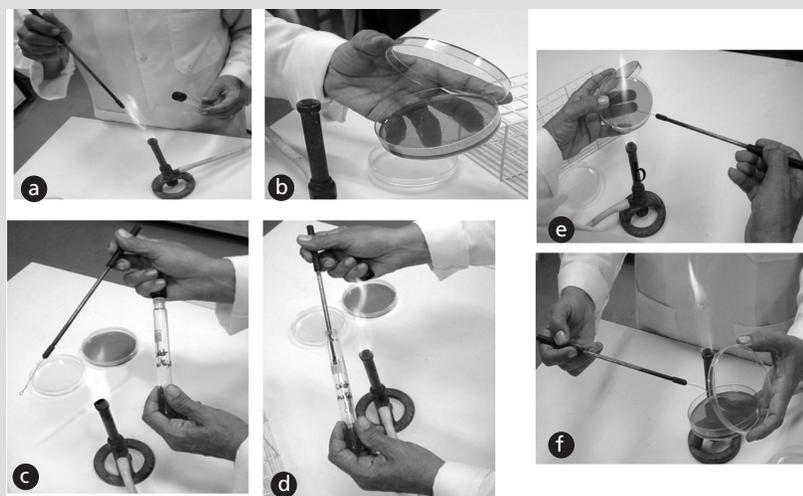
#### PLACA DE PETRI

Recipiente cilíndrico achatado, de vidro ou plástico, constituído por duas partes: uma base e uma tampa. Foi desenvolvida por J. R. Petri (1852-1921), na Alemanha, cujo modelo foi adaptado a partir de um cálice de boca larga com tampa, utilizado em trabalhos laboratoriais de Microbiologia.

### ATIVIDADES

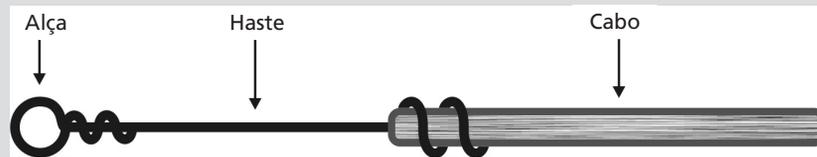
#### 1. Técnicas assépticas ou manobras assépticas

A prática que você vai realizar constitui um treinamento das técnicas utilizadas rotineiramente nos laboratórios de Microbiologia para a manutenção e passagem das culturas de bactérias. Qualquer micróbio que não aquele que está sendo mantido em cultura é indesejável, e, portanto, existem técnicas especiais, denominadas manobras assépticas, para impedir que ocorra essa invasão por outras células microbianas. Essas manobras (**Figura 8.2**) visam impedir que os micróbios em suspensão no ar, ou depositados sobre as várias superfícies, venham, como poeira, contaminar materiais esterilizados para uso no laboratório, tais como os meios de cultura, ou as próprias amostras de micróbios que estão sendo cultivadas.



**Figura 8.2:** Execução das manobras assépticas. Inoculações feitas em um campo asséptico criado pela chama do BICO DE BUNSEN: (a) flambagem da alça metálica para inoculação bacteriana; (b) manipulação da PLACA DE PETRI; (c) destampando o tubo com a alça esterilizada mantida na área estéril em volta da chama; (d) inoculação em tubo; (e)/(f) inoculação nas placas de Petri.

Observando a **Figura 8.2**, você vai perceber que o microbiologista se caracteriza por ter “três mãos”: com uma segura a alça bacteriológica (**Figura 8.3**), com a outra pega o tubo e com a terceira (o dedo mínimo da mão que segura a alça) destampa o tubo e mantém a tampa presa ao dedo. Quando a tampa é de rosca, segurando a tampa você desenrosca o tubo.



**Figura 8.3:** Modelo esquemático de uma alça metálica utilizada para trabalhos em bacteriologia.

Seguindo as orientações demonstradas pelo seu tutor, execute as manobras assépticas adotadas para transferir micróbios de um tubo de ensaio para uma placa de Petri e vice-versa. Manipular assepticamente as placas de Petri é um verdadeiro desafio. Agora que você ganhou domínio, vamos executar a prática diretamente.

### **Breves comentários**

Com certeza você demonstrou habilidade para realizar esta atividade. Quantas vezes ensaiou? Agora que você está dominando a execução de manobras assépticas, já pode prosseguir com as demais atividades desta aula prática.

### **2. Verificação do efeito do calor sobre as populações microbianas, em estado vegetativo ou esporulado**

Primeiramente, recorde o conceito de assepsia, que você já viu na Aula 7 desta disciplina. Utilizando as manobras assépticas que você treinou na Atividade 1, é possível realizar trabalhos com micróbios que podem se desenvolver nos meios de cultura disponíveis nos laboratórios de Microbiologia.

Agora, você deve estar se perguntando: como é possível perceber que os micróbios, que são seres invisíveis, estão em uma determinada área? É justamente isso que você vai fazer nesta parte da aula. Vai conseguir enxergar o invisível!

### **Material necessário**

- bico de Bunsen conectado a um botijão de gás ou lamparina a álcool;
- alça metálica;

- fósforos;
- dois tubos de ensaio com tampa de rosca;
- placas de Petri com meio de agar-leite para cultivo dos micróbios (duas placas por aluno e por tutor);
- meio copo de água mineral sem gás;
- estufa calibrada para 37°C ou caixa com lâmpada de 40w;
- terra adubada (de jardim ou de horta);
- panela para ferver água;
- fogão ou tripé para colocar a panela na chama do bico de Bunsen;
- suporte para tubo (lata estreita);
- colher de sopa;
- caneta para retroprojektor.

### Execução

- 1) colete uma colher de sopa de terra e despeje-a em meio copo d'água;
- 2) agite bem e espere decantar;
- 3) transfira o sobrenadante para um tubo e, a partir deste, distribua uma pequena quantidade (aproximadamente 5mL) no outro tubo;
- 4) coloque este segundo tubo na água fervente por 5 minutos;
- 5) de acordo com as manobras assépticas que você aprendeu a executar, disponha, próximo ao bico de Bunsen aceso, as duas placas com meio de cultura e os tubos com os sucos de terra (fervido e não fervido);
- 6) flambe a alça metálica (**Figura 8.2.a**) e mantenha-a próxima à área da chama, na altura da zona amarela da chama, a uma distância de aproximadamente sete centímetros;
- 7) como microbiologista, pegue com a outra mão o tubo com suco de terra fervida, destampe-o (**Figura 8.2.c**), passe-o para o outro lado da chama e insira a alça no tubo para recolher uma alçada do caldo de terra (**Figura 8.2.d**);
- 8) mantendo a alça na posição inicial, volte com o tubo para fechá-lo, devolvendo-o para o suporte;
- 9) demonstre sua destreza para abrir uma das placas de Petri, da forma que você aprendeu (**Figura 8.2.b**);
- 10) espalhe o conteúdo da alça por toda a superfície do meio de cultura da placa de Petri. Isto deve ser feito deslizando-a suavemente, em ziguezague, sobre o meio de cultura;
- 11) feche a placa, deposite-a sobre a bancada e flambe a alça;

12) faça a identificação da placa anotando seu nome, a data e o tipo de suco inoculado (fervido). Essas anotações devem ser feitas na parte inferior da placa, nunca na tampa;

13) leve a placa para a estufa, incubando-a com a tampa para baixo, durante 24 horas. Após esse período, providencie para que a placa seja retirada da estufa e vedada, passando-lhe uma fita adesiva em volta da borda de modo que fique hermeticamente fechada. A leitura pode ser feita nesse mesmo dia ou a placa pode ser mantida na geladeira por um período de até dez dias;

14) repita os procedimentos dos itens 6 a 13, usando o caldo de terra *in natura*;

15) após a leitura, coloque desinfetante nas placas deixando-as em contato por 24h. Após isso, as placas podem ser descartadas com segurança.

**O meio de cultura definido como ágar-leite utilizado nesta prática tem a seguinte formulação e modo de preparo:**

Leite em pó desnatado	20,0 g
Cloreto de sódio	7,5 g
Agar-agar (pó)	17,0 g
Solução de TRIS 1M	0,1 mL
Água destilada	1000 mL

**Modo de preparo do ágar-leite:** O leite é dissolvido, inicialmente, em aproximadamente meio copo de água, sendo adicionados, gradativamente, os outros ingredientes. Ao final, adicionar o restante da água. O frasco contendo a preparação é fechado com bucha de ALGODÃO CARDADO e, por cima desta, uma cobertura (capuz) de papel bem amarrada ao frasco. Esse capuz, junto com a bucha de algodão, tem a finalidade de proteger o material depois de esterilizado. Para isso, o frasco deve ser levado à autoclave e submetido a 110°C por dez minutos para alcançar a esterilização. Depois disso, um volume de 20mL do meio de cultura é distribuído, assepticamente, em cada placa de Petri. Após solidificação do meio, as placas são embrulhadas com filme plástico e mantidas em geladeira.

#### ALGODÃO CARDADO

É o algodão de cujas fibras não foi removida a cera; por isso, durante a autoclavação, a cera funde, e quando esfria e solidifica, a bucha mantém a forma da boca do frasco. O algodão hidrófilo não contém cera, portanto, não se presta a essa finalidade.

**Funções dos diversos elementos que fazem parte da formulação do meio ágar-leite:**

**LEITE EM PÓ** – quando dissolvido, constitui um alimento complexo que atende às exigências nutricionais de muitos tipos celulares, inclusive os micróbios do solo. Estes exímios digestores secretam proteases que degradam a molécula de caseína (proteína que dá a cor branca ao leite).

**AGAR-AGAR**- é um polímero do carboidrato galactose, produzido por certos tipos de algas marinhas (agarófitas), que apresenta a propriedade de gelificar as preparações líquidas em que é acrescentado. O Agar-agar é uma substância com propriedade termodinâmica muito peculiar. Sua temperatura de fusão é diferente da temperatura de solidificação. O ponto de fusão é 100°C e a temperatura de solidificação é 45°C. Você conhece outra substância que tenha característica semelhante?

TRIS (hidroximetilaminometano) – alcaliniza a solução, tendo por finalidade evitar que a caseína do leite coagule quando aquecida a 110°C, em presença do agar-agar, pois este é um polímero sulfatado que, quando aquecido, tende a acidificar a solução. Se isso acontecer, a caseína coagula, deixando o leite coalhado. O leite coalha quando seu pH está ácido (já experimentou adicionar um pouco de suco de limão a um copo de leite? O que foi que aconteceu? O leite coalhou!).

CLORETO DE SÓDIO – sal que tem a finalidade de manter a tonicidade do meio de cultura e supre o fluxo de sódio celular.



Não se esqueça: quando for usar placas com meio de cultura, antes de desembulhá-las você deve colocá-las na estufa ou deixá-las em temperatura ambiente, pois se forem abertas enquanto estiverem frias o fenômeno de condensação da umidade do ar, observado na superfície da placa, também ocorre em cima do meio de cultura. Diante dessa situação, você pode prever que esse simples procedimento evita a contaminação do meio, na placa, por micróbios presentes no ar. Atente para esse fato sempre que for utilizar materiais esterilizados mantidos na geladeira.



Se a placa for incubada com a tampa para cima, o calor da estufa faz com que a água do meio de cultura evapore e se condense na parte interna da tampa. À medida que a quantidade de água condensada aumenta, as gotas formadas tendem a cair sobre a área onde as bactérias estão proliferando. O volume d'água que cai desorganiza a cultura bacteriana. Por isso, o verdadeiro microbiologista nunca se esquece de incubar a placa com a tampa para baixo.

### Breves comentários

Fazendo a leitura e interpretação dos resultados, você deve observar as colônias microbianas formadas na superfície do meio de cultura, atentando para a quantidade que aparece em cada uma das placas. Você deve notar, também, a formação de halos claros em torno de algumas colônias, a forma, o tamanho e a coloração das mesmas.

Supondo que você tenha feito um bom espalhamento das células microbianas quando fez a inoculação, que o volume de caldo de terra inoculado foi o mesmo nas duas placas e, ainda, que uma colônia pode ter sido originada de uma única célula microbiana, como explicar a diferença na quantidade de colônias em cada placa?

Considerando que uma das amostras do suco de terra foi submetida à fervura por dez minutos, você esperava que houvesse ainda micróbios vivos naquela suspensão? Com certeza, sim, pois você está craque em esporulação microbiana. Sob a forma de esporos, as células resistem ao calor. A germinação do esporo dá origem a uma célula vegetativa que, para se alimentar, secreta enzimas com a finalidade

de hidrolisar substratos presentes no meio de cultura, que possam ser aproveitados como nutrientes. Em razão dessas enzimas secretadas pelas células vegetativas é que aparecem os halos em ambas as placas. A hidrólise enzimática da caseína do leite desfaz o aspecto leitoso do meio de cultura. A cor, a dimensão e o aspecto morfológico das colônias denotam a existência de diferentes tipos microbianos na amostra de terra inoculada.

De acordo com essas premissas, você pode concluir que a fervura da água não pode ser considerada um processo de esterilização, pois você pode perceber que os esporos bacterianos resistem à fervura. Se a placa for incubada por mais tempo, você verá que o diâmetro dos halos aumentará gradualmente, em função da quantidade de enzimas liberada pelas células da colônia.

Esse resultado mostra que a digestão bacteriana é extracelular. Essa característica permite que os micróbios exerçam sua ação, digerindo resíduos existentes no nosso planeta. Você se lembra da Aula 1, na qual os micróbios foram chamados de digestores da matéria orgânica?

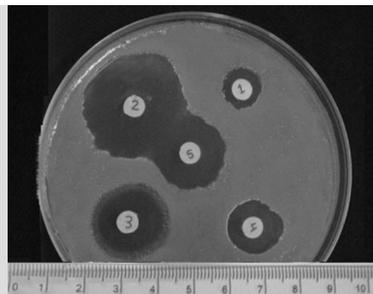
### **3. Avaliação do efeito de desinfetantes e anti-sépticos sobre bactérias**

Os desinfetantes de uso doméstico prestam-se para higienizar os ambientes, contribuindo, assim, para garantir a saúde e o bem-estar das populações humanas. Já os anti-sépticos são utilizados com a finalidade de impedir a instalação de micróbios, que podem desencadear infecções em áreas lesadas do nosso corpo.

Como os micróbios do solo podem ser cultivados em meios de cultura contendo açúcar e hidrolisado de proteínas, vamos utilizá-los como ferramentas para avaliar a ação desinfetante e/ou anti-séptica de alguns produtos químicos. O teste que você vai executar, fundamenta-se no princípio de difusão do produto químico na camada do meio de cultura.

O resultado da interação do agente químico com as células microbianas pode resultar em duas situações: ou mata as células ou as impede de proliferar. Quando essas ações se fazem sobre bactérias, dizemos que o agente químico é, respectivamente, bactericida ou bacteriostático. Em ambas as situações, verifica-se ausência de crescimento populacional microbiano ao redor do local onde o agente foi depositado. Quanto mais eficiente for o produto, maior será o halo de inibição observado, como você pode notar na **Figura 8.4**:

**Figura 8.4:** Placa mostrando halos de inibição do crescimento microbiano, em volta dos discos de papel que foram impregnados com alguns tipos de desinfetantes e anti-sépticos.



Para avaliar o efeito de alguns agentes químicos sobre os micróbios, você vai precisar dispor dos seguintes materiais:

- caldo de terra decantado;
- duas placas de ágar nutritivo;
- **SWAB**;
- pinça;
- 10 discos de papel de filtro ou de papel coador de café (cortados com o auxílio de um furador de papel);
- quatro desinfetantes para uso doméstico, de marcas diferentes;
- quatro anti-sépticos diferentes;
- algodão hidrófilo;
- álcool;
- estufa calibrada para 37°C;
- lápis dermatográfico.

### **SWAB**

Fina haste de madeira ou plástico com uma das extremidades recoberta de algodão (parecido com a ponta do cotonete). Se você estivesse em Portugal, usaria o termo *zaragatoa*, em vez de *swab*.

O meio de cultura definido como agar nutritivo, utilizado nesta prática teve a seguinte formulação e modo de preparo:

Extrato de carne (pó)	3,0 g
Peptona de carne (pó)	5,0 g
Cloreto de sódio	6,5 g
Agar-agar (pó)	17,0 g
Solução de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M	1,0 mL
Água destilada	1000 mL

**Modo de preparo:** Os ingredientes, obtidos comercialmente, são misturados em um frasco que, depois de fechado com bucha de algodão cardado protegido com um capuz de papel bem amarrado ao frasco, será levado à autoclave para ser esterilizado a 115°C por 15 minutos e depois distribuído, assepticamente, num volume de 20mL em cada placa de Petri. Após solidificação do meio, as placas são embrulhadas com filme plástico e mantidas em geladeira.

**Funções dos diversos elementos que fazem parte das formulações do meio agar nutritivo:**

AGAR-AGAR – ver boxe do ágar-leite.

EXTRATO DE CARNE e PEPTONA DE CARNE – são produtos comerciais obtidos a partir da dessecação do extrato de carne e do produto da hidrólise ácida deste extrato, respectivamente. Têm por função fornecer aminoácidos ao meio de cultura.

CLORETO DE SÓDIO – ver boxe do ágar-leite.

FOSFATO DI-SÓDICO ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) – sal que, quando dissolvido em água, faz com que a solução adquira pH alcalino. A adição deste sal neutraliza o caráter ácido da preparação da peptona e do agar-agar quando aquecido, deixando o meio de cultura com pH neutro.

**Execução**

Executando manobras assépticas, você deve impregnar um *swab* com o caldo de terra decantada não fervido para semear, por toda a superfície, as duas placas de ágar nutritivo. Para ter certeza de que a semeadura vai ficar perfeitamente confluenta, repita o procedimento, pelo menos, duas vezes.

Imediatamente após a semeadura das placas, você vai precisar utilizar a pinça, para segurar os discos de papel. Identifique cada disco com um número, escrito com grafite, e anote o tipo do agente antimicrobiano que ele carregará. Proceda da seguinte forma: a) desinfete a ponta da pinça, usando um algodão com álcool; b) segure um disco de papel de filtro com a pinça e depois o coloque, com o número para cima, no centro das duas placas inoculadas; c) mergulhe outro disco em um dos desinfetantes, deixe escorrer o excesso, pressionando-o levemente para aderi-lo sobre uma das placas com a cultura microbiana; d) repita o procedimento c com os outros desinfetantes, fixando os discos em posições equidistantes na placa; e) repita os itens a, c, e d utilizando os anti-sépticos, na outra placa; f) incube as placas, por 24 horas, a 37° C, com a tampa para baixo; g) caso sua programação de aulas não coincida com o tempo da leitura dos resultados, após o tempo de incubação, a borda das placas deve ser vedada com fita crepe e as mesmas colocadas na geladeira, conforme o item 13 da Atividade 1 desta aula, para posteriormente serem analisadas com o seu tutor.

**Breves comentários**

O dano causado pelos desinfetantes ou anti-sépticos aos micróbios está diretamente relacionado com o diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano, formado em torno do disco de papel.

A substância antimicrobiana, impregnada no disco, se difunde radialmente no meio de cultura onde os micróbios foram inoculados. Os micróbios que forem sensíveis só crescerão onde a droga não chega ou, se chega, não alcança uma concentração capaz de inibir o crescimento. Por isso, forma-se o halo de ausência de crescimento ao redor do disco.

Nesse tipo de teste, o aparecimento do halo de inibição depende do tipo e da concentração populacional dos micróbios inoculados, da natureza e da concentração das substâncias empregadas, e da temperatura de incubação.

Os micróbios resistentes crescem normalmente, e não se observa o halo de inibição ao redor do disco, demonstrando que a concentração do antimicrobiano testado não prejudica o metabolismo dos micróbios que foram inoculados na placa.

Terminada a fase de leitura e análise dos resultados, discuta com seus colegas e o tutor sobre a dinâmica das populações microbianas na natureza e as perspectivas de se criar futuros ambientes aquáticos habitados unicamente por micróbios resistentes, em decorrência do uso indiscriminado de desinfetantes nos aglomerados urbanos.

Isso porque, à medida que a população humana aumenta e se formam megalópoles, tem aumentado cada vez mais a fabricação dos agentes antimicrobianos, substâncias estas que, depois de utilizadas, geralmente são desprezadas no esgoto, sendo gradativamente acumuladas nas estações de tratamento de águas ou vão prejudicar a vida nos rios e mares.

## CONCLUSÃO

A escolha do agente físico ou químico para o controle de crescimento populacional bacteriano deve levar em consideração as características do agente. No caso do calor, a temperatura depende do estado fisiológico dos micróbios. Aqueles que podem formar esporos suportam uma fervura da água por, pelo menos, cinco minutos. No caso dos agentes químicos, a ação desinfetante ou anti-séptica está diretamente relacionada com a concentração do princípio ativo presente no produto utilizado, porém devemos estar atentos, pois formas resistentes de micróbios podem ser selecionadas.

## RESUMO

Nesta aula prática estão apresentadas as manobras assépticas utilizadas para evitar que uma determinada cultura de células bacterianas seja contaminada por micróbios presentes no meio ambiente. A versatilidade metabólica das células microbianas é avaliada quando as mesmas são submetidas aos agentes antimicrobianos de natureza física ou química. Como agente físico, foi utilizado o calor sob a forma de água fervente e os agentes químicos empregados foram aqueles que fazem parte do seu cotidiano para limpeza do ambiente doméstico ou para tratamento de pequenas lesões corporais. O uso descontrolado de desinfetantes pode contribuir para a seleção de germes resistentes à ação desses agentes químicos.

## INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, você verá como os micróbios são classificados e identificados. Estudará as diferentes formas de classificação que envolvem técnicas convencionais e técnicas moleculares.

# Caracterização e identificação de bactérias

AULA

# 9

## Meta da aula

Explicar os critérios utilizados para classificar os micróbios conhecidos.

## objetivos

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Identificar um tipo bacteriano, comparando suas características fenotípicas com os dados de uma tabela de classificação.
- Relacionar a seqüência de etapas a seguir para a classificação de uma espécie microbiana.
- Classificar bactérias de acordo com suas características fisiológicas.

## Pré-requisitos

Para o bom acompanhamento desta aula, você deve rever conceitos das Aulas 3 (estruturas celulares), 5 (componentes dos envoltórios microbianos) e 6 (condições para o crescimento populacional microbiano) desta disciplina e, ainda, precisa estar familiarizado com os conceitos de filogenia (Aula 3) e taxonomia (Aula 4) da disciplina Diversidade dos Seres Vivos e também da Aula 16 do Módulo 4 do Volume 2 da disciplina Bioquímica II.

## INTRODUÇÃO

**TAXONOMIA OU SISTEMÁTICA**

Campo da Biologia que estuda, descreve, classifica e agrupa todos os seres vivos.

Desde muito tempo o homem sente necessidade de catalogar e organizar os objetos que o cercam. O mesmo ocorre em relação aos organismos vivos, incluindo os micróbios. A área do conhecimento chamada **TAXONOMIA** ou **SISTEMÁTICA** lida com essas questões. Você já viu na disciplina Diversidade de Seres Vivos como fazemos para classificá-los. Viu também que a unidade taxonômica é a espécie. Nesta aula, você vai ser apresentado a alguns dos critérios adotados para a classificação e a identificação das bactérias.

**CRITÉRIOS UTILIZADOS NA TAXONOMIA BACTERIANA**

Uma forma prática para compreender a diferença entre os termos classificação e identificação pode ser entendida quando você classifica o seu colega no grupo dos *Homo sapiens* e o identifica como Fulano de Tal.

Seguindo esses parâmetros, você verá alguns dos critérios e das técnicas usualmente utilizados no laboratório de Microbiologia para classificar bactérias.

Os critérios adotados para classificar a diversidade de tipos microbianos existentes na Natureza incluem a análise de características relacionadas à forma, a elementos estruturais e a aspectos nutricionais, bioquímicos, fisiológicos, genéticos e ecológicos. Na **Tabela 9.1** estão descritos exemplos dessas características, que correspondem a alguns dos tópicos já apresentados nas Aulas 3, 5 e 6 desta disciplina.

**Tabela 9.1:** Exemplos de características fenotípicas utilizadas na classificação das bactérias

Características das células	Exemplo
Morfológicas	Forma da célula (coco, bacilo, espirilo) e agrupamentos pós-divisionais (em cachos, em cadeia, aos pares).
Estruturais	Componentes do envoltório, relacionados à coloração de Gram e estruturas de movimento (cílios e flagelos) e de função genética (pili sexual).
Nutricionais	Autotróficos (fotossintéticos e quimiossintéticos), heterotróficos (fazendo respiração ou fermentação).
Bioquímicas	Composição dos lipídios. Vias metabólicas.
Fisiológicas	Temperatura de crescimento (psicrófilos, mesófilos e termófilos), pH (acidófilos), sensibilidade ou resistência à ação dos antibióticos, formação de endosporos.
Genéticas	Seqüências nucleotídicas dos ácidos nucléicos genômicos e ribossomiais.
Ecológicas	Tipo de <i>habitat</i> e relações consorciais adotadas.

Você conseguiu relacionar essas características com os assuntos apresentados nas aulas anteriores?

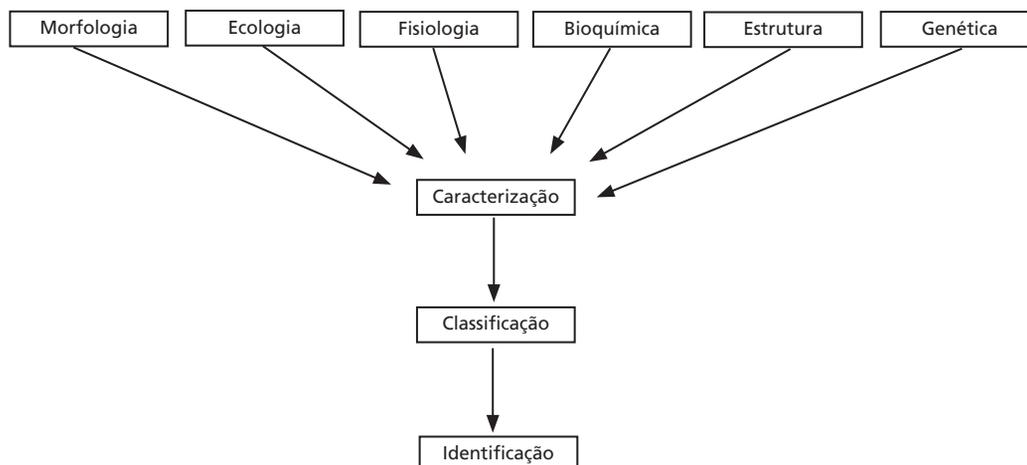
Os processos de taxonomia bacteriana abordam três aspectos: a nomenclatura, a classificação e a identificação. A nomenclatura dá nomes aos diferentes micróbios. Para isso, os microbiologistas adotam as regras do sistema binominal utilizado nas demais áreas da Biologia. Nesse sistema, o nome de uma espécie é dado pela combinação, em latim, do nome do gênero seguido do nome que denota a espécie. As normas para a criação dos nomes das espécies bacterianas são regidas pelo Código Internacional para Nomenclatura de Procariontes. Um exemplo desses nomes, para você se familiarizar, é o da *ESCHERICHIA COLI* (binominal em itálico).

A classificação tem por finalidade organizar os micróbios em coleções, de acordo com suas semelhanças. Por isso, é necessário reconhecer ou definir a maior quantidade possível das características dos integrantes de um clone microbiano, entendendo-se como clone aquela cultura originada a partir de uma única célula. Em outras palavras, a classificação tem a finalidade de descrever, detalhadamente, um determinado tipo de micróbio.

A identificação tem como objetivo determinar se uma cultura tem algumas características semelhantes a outra já classificada. Caso contrário, será necessário classificar o novo tipo microbiano. A **Figura 9.1** ilustra esse processo.

### ***ESCHERICHIA COLI***

Bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Habitante natural do intestino dos seres humanos e de outros animais de sangue quente, sendo abundante nas fezes. É encontrada em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente.



**Figura 9.1:** Esquema ilustrando as relações existentes na caracterização de um tipo de bactéria.

Nos trabalhos de Bacteriologia desenvolvidos por Pasteur eram utilizados somente meios de cultura líquidos e usada a técnica de diluição sucessiva para separar os micróbios predominantes nas amostras. Alíquotas de cada uma das diluições eram examinadas por microscopia, sendo possível observar que nas diluições iniciais era evidenciada uma mistura de tipos microbianos. À medida que ele observava a população das diluições mais altas, percebia a nítida tendência do predomínio de um dos tipos sobre os demais, até alcançar diluições onde só era detectado um tipo morfológico de células bacterianas, ou seja, as células do tipo predominante. Quando este tipo de preparação era inoculado em meio de cultura dava origem a uma cultura pura. Essa definição não deve ser confundida com cultura clonada que é aquela originada a partir de uma única célula, cultivada em meio sólido. As técnicas microbianas utilizando meios sólidos foram desenvolvidas no laboratório de Robert Koch (1843-1910), médico bacteriologista alemão contemporâneo de Louis Pasteur, descobridor do bacilo da tuberculose.

É consenso que as culturas clonadas representam populações de células de uma única espécie. Uma vez que um novo tipo microbiano seja definido como sendo de uma nova espécie, essa cultura é enviada para as instituições internacionais responsáveis por manter, sob a forma de uma coleção, amostras de todas as culturas microbianas caracterizadas. As novas culturas passam a ser denominadas como cultura tipo ou protótipo.

A cultura tipo, ou protótipo, de uma espécie bacteriana serve de referência para caracterização de outras amostras bacterianas que, quando semelhantes à cultura tipo, passam, a ser consideradas da mesma espécie. Os protótipos das amostras microbianas são depositados em coleções mantidas por instituições internacionais. Estas amostras são disponibilizadas para pesquisadores por meio de solicitação às entidades que mantêm as coleções em seus países.

As características utilizadas como critérios de classificação seguem uma ordem hierárquica decrescente:

- superdomínio: biota;
- domínio: bactéria, arquea, eucariota;
- reino: animal e vegetal;
- filo (para os animais) ou divisão (para os vegetais);
- classe;
- ordem;
- família;
- gênero;
- espécie.

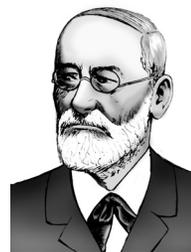
A classificação de bactérias inclui quatro filos que, por sua vez, se dividem em sete classes, de acordo com as diferenças na estrutura de parede. As classes são divididas em um total de trinta e três ordens que, por sua vez, são divididas em famílias, estas em gêneros e estes em espécies.

## SISTEMÁTICA DE PROCARIONTES

No século XIX, o uso de microscópio na pesquisa biológica foi amplamente disseminado, o que permitiu o reconhecimento de bactérias, fungos, algas microscópicas e protozoários. Foram os estudos do cientista **FERDINAND COHN** que levaram ao desenvolvimento do primeiro sistema de classificação de bactérias. Naquela época, cada microscopista que via um tipo de bactéria dava-lhe um nome sem se preocupar com o que havia sido descrito antes. Cohn percebeu que, tomando por base apenas a forma apresentada pelas bactérias, seria possível classificá-las.

Durante vários anos, Cohn estudou a variação dos aspectos morfológicos das bactérias, suas estruturas, pigmentação e atividades metabólicas, chegando à conclusão de que essas células poderiam ser divididas em espécies distintas ou agrupadas de acordo com suas semelhanças características. Cohn acreditava que as bactérias eram próximas das algas e, portanto, pertencentes ao reino das plantas. Em seu primeiro sistema de classificação ele dividiu as bactérias em quatro grupos, de acordo com a forma do corpo bacteriano: (I) Sphaerobacteria (bactérias esféricas), (II) Microbacteria (bastonetes), (III) Desmobacteria (filamentosas) e (IV) Spirobacteria (espirilos).

Com o avanço científico, a classificação dos micróbios passou a ser efetuada com base em características que são tanto de caráter fenotípico quanto molecular.



**FERDINAND COHN**  
(1828-1898)

Cientista nascido na Prússia (antiga região do norte da Alemanha), considerado um dos fundadores da bacteriologia. Descreveu vários processos fisiológicos em bactérias e lançou as bases do primeiro sistema de classificação microbiana.



### ATIVIDADE

1. Imagine duas amostras bacterianas *A* e *B*, cada uma delas inoculada em dois tubos de ensaio contendo, além dos ingredientes comuns, glicose e um indicador de pH. Após a inoculação, um dos tubos de cada cultura é adicionado de uma camada de óleo mineral esterilizado. Vinte e quatro horas após, você observa que as células da amostra *A* desenvolveram-se apenas no tubo sem óleo, enquanto as células da amostra *B* desenvolveram-se nos dois tubos. Na cultura da amostra *A*, após o crescimento, o pH do meio não ficou alterado, enquanto para a amostra *B* o pH ficou acidificado em ambos os tubos. Pode-se notar, ainda, que o crescimento populacional da amostra *A* em relação à amostra *B*, no tubo sem óleo, foi muito mais acentuado. Diante dessas informações, interprete o metabolismo das amostras *A* e *B* quanto ao processo de respiração e fermentação e ao rendimento energético do processo, em função do crescimento populacional e das amostras microbianas examinadas.

---

---

---

**RESPOSTA COMENTADA**

*A amostra A só cresce na presença de oxigênio, logo é um tipo bacteriano aeróbico estrito. A amostra B cresce nos dois tubos acidificando o meio. Isso mostra tratar-se de um micróbio fermentativo, facultativo quanto à presença de oxigênio. O crescimento mais acentuado na amostra que faz respiração deve-se ao rendimento energético na respiração (fosforilação oxidativa) ser maior do que na fermentação, como você aprendeu na Aula 16 sobre metabolismo de carboidratos II, da disciplina Bioquímica II.*

**Observação microscópica**

A primeira coisa que se faz quando se pretende identificar um tipo microbiano, que foi isolado de um determinado ambiente e cultivado no laboratório, é identificá-lo por meio de uma técnica de coloração, como por exemplo o método de Gram. Neste você já está craque, pois foi o tema da nossa Aula 5. Nesta primeira etapa, é possível descrever a morfologia e os arranjos pós-divisionais das bactérias. Para saber se o micróbio tem cílios ou flagelos, que são estruturas de locomoção, observa-se a preparação a fresco ao microscópio óptico, verificando se as células microbianas são móveis ou imóveis. Maiores detalhes sobre estas estruturas podem ser evidenciados por meio da microscopia eletrônica.

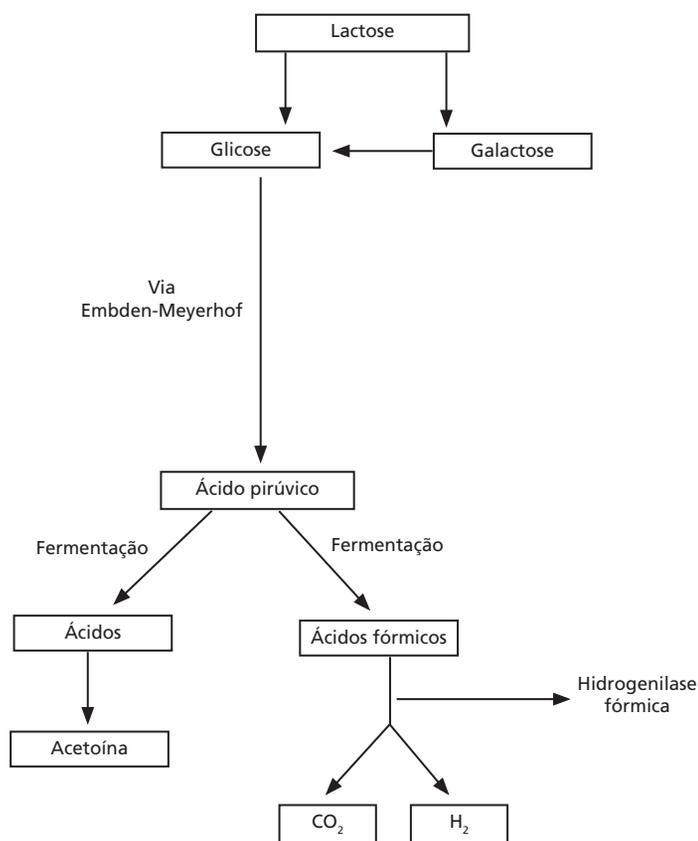
Essa etapa do processo de classificação permite reunir as bactérias de acordo com os seguintes caracteres fenotípicos:

Morfologia celular	Coloração pelo Gram	Mobilidade
Bacilo, Coco ou espirilo	+ ou -	+ ou -

**Características bioquímicas**

Existe uma grande quantidade de provas bioquímicas que podem ser feitas para caracterizar uma cultura de bactérias. A identificação de um tipo de bactéria é feita com uma cultura clonada. Esta é submetida a uma série de testes que visam a definir as características metabólicas e fisiológicas das bactérias analisadas. O metabolismo bacteriano

é pesquisado por meio de provas bioquímicas que determinam se a população celular obtém a energia vital fazendo metabolismo fermentativo ou respiratório. Provas bioquímicas especiais são utilizadas para verificar a expressão de um determinado tipo ou grupo de enzima, por parte das células da cultura. Na **Figura 9.2** está representado o mecanismo adotado pelas bactérias na fermentação da lactose.

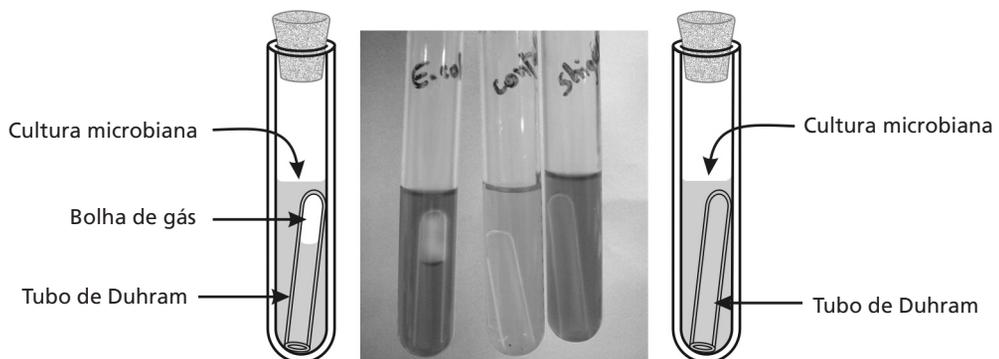


**Figura 9.2:** Resumo das vias metabólicas da fermentação da lactose por bactérias.

Se o tipo de bactéria que estamos testando for capaz de fermentar a glicose, converterá esta molécula em duas de ácido pirúvico. Esse processo fermentativo continuará até que estas duas moléculas sejam transformadas gerando outros ácidos que poderão ser o lático, o acético ou o fórmico, com liberação de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . Alguns tipos bacterianos que fermentam, com produção de ácido, podem ainda utilizar as moléculas desses ácidos como fonte energética, com produção de acetoina (acetil-metil-carbinol), que é um álcool usado com muita frequência na produção de perfumes finos (aqueles

que são vendidos em frascos minúsculos, mas com preços maiúsculos). A vantagem deste álcool é que ele evapora muito lentamente, o que mantém o aroma por um tempo muito maior do que aqueles perfumes preparados com álcool comum. O meio de cultura onde a fermentação de glicose é testada deve conter hidrolisado de proteína, água, um indicador de pH e, obviamente, glicose. À medida que a concentração de glicose diminui e a de ácido aumenta, a acidez do meio altera a cor do indicador de pH em relação ao tubo controle não inoculado. A partir desta observação, você pode concluir se o tipo microbiano testado é capaz ou não de produzir ácido pela fermentação da glicose.

Como é possível verificar se houve ou não a liberação de gases durante a fermentação da glicose? Muito simples! Dê uma olhadela na **Figura 9.3**. É para essa finalidade que se coloca o pequeno tubo emborcado dentro do tubo com o meio de cultura. Se ocorrer a produção de gás, este ficará preso sob a forma de bolhas no tubo pequeno. Tecnicamente, este é conhecido como tubo de Durham.

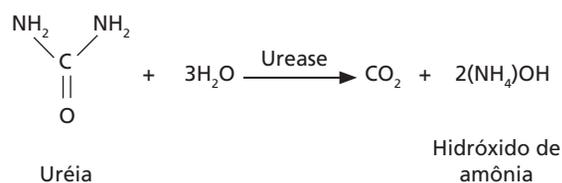


**Figura 9.3:** Fotografia e modelo esquemático de um teste de fermentação da glicose por bactérias semeadas em tubos com meio de cultura onde foi previamente colocado um tubo de Durham. Este pequeno tubo tem a finalidade de capturar o gás resultante da fermentação promovida pelas bactérias que crescem no líquido contido no seu interior. Foram inoculadas bactérias capazes de fermentar glicose com produção de gás (à esquerda) e sem produção de gás (à direita). Entre os dois está o tubo controle (não inoculado). A diferença de cor entre o tubo controle e os tubos semeados é resultante da produção de ácidos pelas bactérias em seu processo fermentativo.

## Representação dos resultados do teste

Característica fenotípica	Fermentação da lactose	Fermentação da glicose com produção de ácido	Produção de gás a partir da glicose	Produção de acetoina
	positiva	positiva	positiva	positiva
	negativa	negativa	negativa	negativa

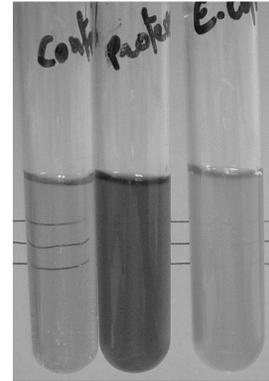
No metabolismo de compostos nitrogenados, a degradação da molécula de uréia é um processo bioquímico que exige a participação da enzima urease. Você já se imaginou conversando com bactérias e perguntando: Você tem o gene que codifica para urease? A **Figura 9.4** ilustra o esquema da reação química com a qual as bactérias responderão à sua pergunta:



**Figura 9.4:** Via metabólica resumida da degradação da uréia por bactérias.

Se a urease fizer parte do repertório enzimático do micróbico, ele produzirá, a partir da uréia, amônia e/ou carbonato de amônia, que são produtos básicos que tornam o meio alcalino. O meio de cultura para este teste deve conter hidrolisado de proteína, água, uréia e um indicador de pH. A desaminação da uréia, pela urease, ocorre com auxílio de uma molécula de água. Cada uma das moléculas de  $\text{NH}_3$  liberadas reage com uma molécula de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ), formando o hidróxido de amônia  $[(\text{NH}_4)\text{OH}]$  e  $\text{CO}_2$ , gás este que escapa para a atmosfera, favorecendo o predomínio dos íons  $\text{OH}^-$ , que tornam o meio alcalino. Essa mudança de pH é acompanhada pela mudança de coloração mediada pelo indicador de pH. Quando se usa o vermelho de fenol com essa finalidade, o meio de cultura, que tem pH neutro, apresenta-se na cor amarelo-alaranjada. Quando alcalinizado torna-se rosa-arroxeadado. A **Figura 9.5** ilustra esta prova.

**Figura 9.5:** Prova bioquímica para demonstrar a expressão de urease por uma população microbiana. O tubo da esquerda é o tubo controle (não inoculado). Perceba que neste o meio está transparente, permitindo a visualização das linhas desenhadas atrás do tubo. O tubo ao centro mostra um resultado positivo (pH alcalino resultando na coloração diferente) e no da direita a prova é negativa. Perceba que nestes dois tubos o crescimento bacteriano é observado pela turvação que impede a visualização das linhas.



### Representação dos resultados do teste

Produção de urease por bactérias	Positivo – torna o meio alcalino
	Negativo – o meio permanece neutro

### Classificação baseada em métodos moleculares

Com os métodos moleculares é possível refinar ainda mais o processo de classificação bacteriana pois, dentro da população de uma espécie bacteriana, classificada pelas suas características fenotípicas é possível, pelo exame do material genético dessa população celular, distinguir diferenças, que caracterizam as subespécies.

Os métodos moleculares envolvem tecnologia de ácidos nucleicos. De acordo com esses métodos, os micróbios podem ser classificados quanto ao percentual de pares de bases guanina-citosina (G-C), existente no seu cromossomo ou, ainda, pelo seqüenciamento do seu RNA ribossomial.

Os procedimentos disponíveis para estudo de ácidos nucleicos envolvem técnicas de centrifugação de moléculas de DNA ou RNA que avaliam a velocidade com que estas moléculas sedimentam. No caso de DNA de dupla fita, um dos fatores que contribuem para aumentar a densidade da molécula é seu conteúdo G-C. Quanto maior for o conteúdo de G-C na molécula, maior será sua densidade.

O percentual de G-C nas moléculas de DNA também pode ser diferenciado utilizando-se o calor, pois o aquecimento promove a dissociação da fita dupla com conseqüente aparecimento de DNA de fita simples. Esta dissociação ocorre em temperatura tanto mais alta

quanto maior for o percentual de G-C presente na molécula. Diferentes linhagens de uma mesma espécie não diferem mais do que 3% no conteúdo G-C.

Pela análise da seqüência de nucleotídios do RNA 16S da subunidade menor dos ribossomos das células procarióticas, é possível distingui-las em dois grandes grupos: o das arqueias e o das bactérias. Estudaremos mais sobre as arqueas na Aula 14.

A **Figura 9.6** mostra, por meio de representação gráfica, a segregação dos seres vivos protistas, com base nas suas características genéticas. Esse modelo de representação está baseado em princípios de taxonomia numérica, segundo os quais as figuras são apresentadas sob a forma de **DENDROGRAMAS**.

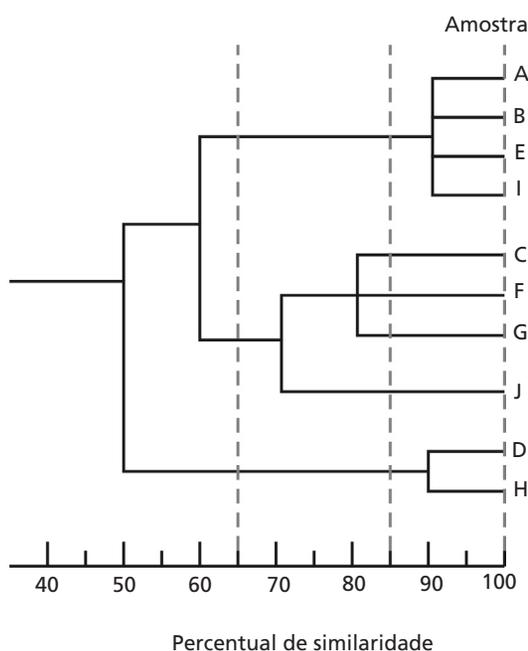
**DENDROGRAMA**

Modelo esquemático de representação comparativa entre dois ou mais elementos, de acordo com suas peculiaridades fenotípicas.

Taxonomia numérica é o tipo de classificação criada por Michel Adanson (1727-1806), contemporâneo de Linnaeus, que busca agrupar a maior quantidade possível de características de um determinado ser ou objeto para classificá-lo. Embora difícil de ser posta em prática na época de sua criação, em virtude dos longos cálculos matemáticos que se faziam necessários, com o advento da informática foi possível desenvolver *softwares* que possibilitam ao computador comparar grande número de caracteres, oferecendo resultados em breve espaço de tempo, após análise binária de cada um dos caracteres. Estes resultados são expressos como coeficiente ou percentual de similaridade entre as amostras examinadas e são representados sob a forma de um dendrograma. Com o avanço das tecnologias de ácidos nucléicos, a taxonomia numérica passou a ter grande importância na interpretação dos fenômenos biológicos. Ela tem duas importantes aplicações no campo da Biologia computacional e da Bioinformática. Estas aplicações envolvem tanto ensaios de transcriptoma (parte da Biologia molecular que trata da expressão gênica), com suas coleções de genes ou de proteínas enzimáticas a eles relacionados (seqüenciamento de fragmentos gênicos), quanto na interpretação de seqüências de DNA, ambos para a construção de mapas filogenéticos.

Na **Figura 9.6**, você pode observar uma ilustração de um modelo de dendrograma. Note que estão relacionadas 10 amostras (A a H), que apresentam coeficiente de similaridade em proporção percentual. A representatividade nos eixos vertical (Y) e horizontal (X) é fruto dos cálculos matemáticos.

**Figura 9.6:** Representação de um dendrograma.



O avanço das técnicas de Biologia molecular tem permitido o conhecimento da seqüência total de nucleotídios do genoma de vários tipos de micróbios. Nesse campo científico, o Brasil conseguiu se destacar, através do Projeto ONSA com o seqüenciamento do genoma da *Xylella fastidiosa* que é um tipo de bactéria associada a doença em laranjeiras. Se você quiser mais informações, acesse o site: <http://inventabrasilnet.t5.com.br/xilela.htm>.

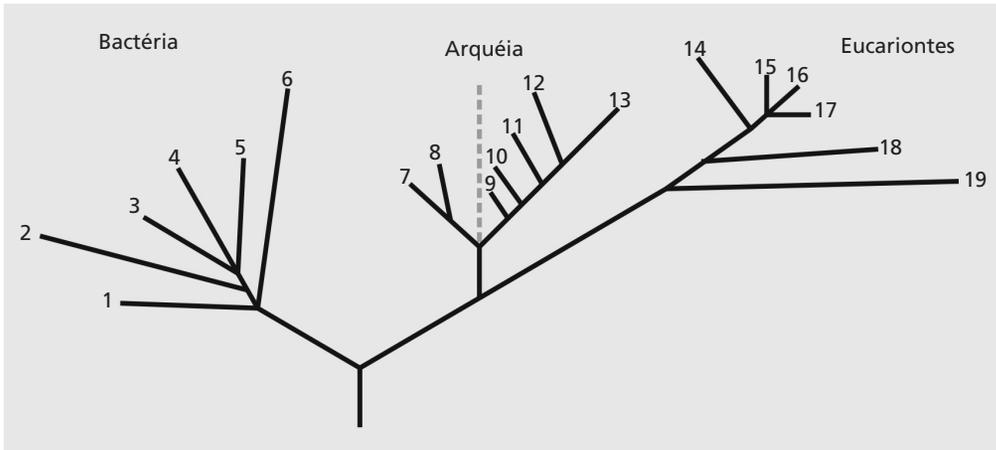


Figura 9.7: Representação dos grupos de protistas diferenciados de acordo com a seqüência do RNA ribossomial. Essa figura já é familiar a você. Ela foi retirada do Volume 1 da disciplina Diversidade dos Seres Vivos.



### ATIVIDADE

2. Vamos ver se você já é capaz de enumerar, de forma esquemática e seqüenciada, as etapas de um processo laboratorial adotado para a descoberta de um novo tipo microbiano, que pode estar presente em um determinado microambiente. Considere que você tem disponíveis recursos para coleta, transporte e conservação, e equipamentos e reagentes para executar testes bioquímicos e ou moleculares com a amostra.

---

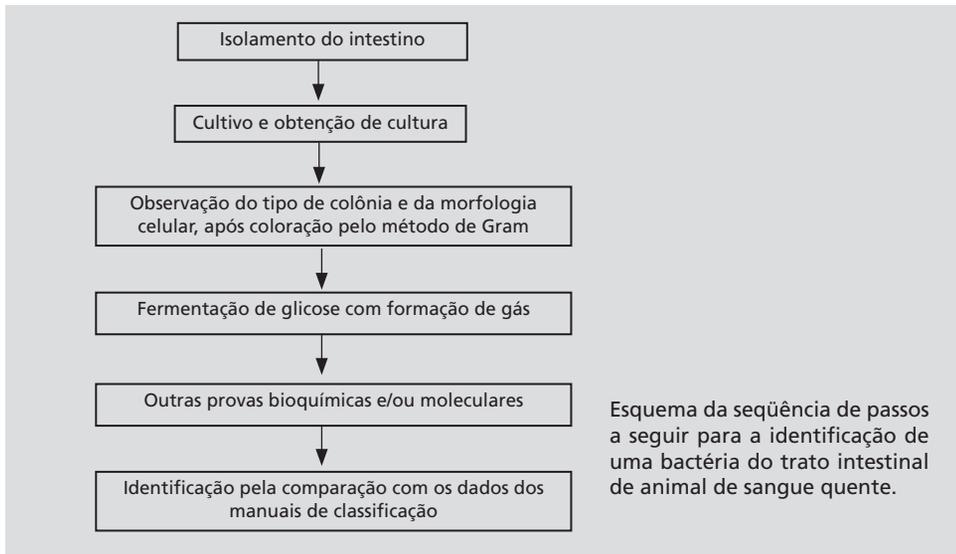
---

---

---

### RESPOSTA COMENTADA

Com base nos conhecimentos que você adquiriu, a primeira coisa a fazer é obter cultura pura e os dados morfológicos do micróbico desconhecido. Posteriormente, várias provas bioquímicas devem ser feitas. O esquema a seguir ilustra esse processo.



## Conceito de espécie em Microbiologia

Em Microbiologia, a definição de espécie fundamenta-se nas características fenotípicas que os micróbios apresentam. Dessa forma, considera-se uma espécie os indivíduos de uma cultura clonada, por serem semelhantes. Outra maneira de definir espécie é aquela que utiliza o grau de homologia dos DNAs genômicos de duas amostras, partindo-se do pressuposto que, para serem da mesma espécie, devem ter seus genomas semelhantes em, pelo menos, 95% em relação ao seu conteúdo de G-C (guanina-citosina) e devem apresentar uma homologia de, no mínimo, 70% na seqüência dos nucleotídeos de seus DNAs genômicos.

As ações relacionadas aos critérios de classificação, no âmbito da Microbiologia, estão centralizadas num comitê internacional que usualmente divulga as atualizações da classificação através do livro intitulado *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

## CONCLUSÃO

Esperamos que você tenha percebido como se procede para classificar e identificar bactérias. É fundamental que você perceba a importância dos critérios utilizados na sistemática bacteriana. Em virtude da constante evolução das tecnologias disponíveis para estudo das características das células microbianas, a classificação destas, freqüentemente, é alterada por novos conceitos, pois a Microbiologia, como toda ciência, está sujeita a um processo dinâmico de compreensão regido pelo tipo de referencial utilizado.

### ATIVIDADE FINAL

No laboratório de Microbiologia, onde você está desenvolvendo a sua monografia de final de curso, foi entregue uma suspensão bacteriana obtida a partir do material fecal de um carneiro que, quando foram feitos os testes para identificação, mostrou as seguintes características: forma de bacilo; Gram-negativo; mobilidade positiva; fermentadora da lactose; produtora de gás a partir da fermentação da glicose; urease negativa, produtora de indol. Diante destes resultados, em que gênero microbiano da **Tabela 9.2** você poderia classificar a sua amostra? Em face dessa classificação que você acabou de fazer, que outras características sua amostra provavelmente apresentará?

---



---



---



---



---

**Tabela 9.2:** Algumas características das enterobactérias, bacilos Gram-negativos

Caracteres	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>
Mobilidade	+	-	+	-	+	+	+
Fermentação da glicose com gás	+	-	+	+	+	V	+
Lactase	+	-	-	+	+	-	-
Fermentação do manitol	+	V	+	+	+	+	-
Produção de H <sub>2</sub> S	-	-	+	-	-	-	+
Urease	-	-	-	-	-	-	+
Produção de acetoina	-	-	-	+	+	+	-
Utilização de citrato	-	-	+	+	+	+	-
Fenilalanina desaminase (FAD)	-	-	-	-	-	-	+
Produção de indol	+	V	-	-	-	-	-

Os sinais + e - representam as características observadas de forma predominante dentre os vários tipos microbianos listados. V indica a existência de variabilidade genética que impede a definição de uma característica predominante entre os membros daquele gênero.

Fonte: Adaptada de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

#### RESPOSTA COMENTADA

*Sem dúvida, você classificou sua amostra como pertencente ao gênero Escherichia e listou as características referentes a esse gênero, constantes na tabela. Parabéns! Mais detalhes sobre a legenda da tabela podem ser encontrados na bibliografia especializada em Microbiologia, sugerida ao final desta aula (Leituras recomendadas); afinal, você já está no sétimo período, ou seja, pertinho da formatura. Já precisa ganhar auto-suficiência.*

**RESUMO**

Os sistemas de classificação microbiana são fundamentados em características morfológicas e fisiológicas dos micróbios, associadas com descrições das relações filogenéticas entre os elementos comparados para poder organizá-los em função das características evolutivas existentes entre eles. Verifica-se ainda que várias das espécies bacterianas que foram, inicialmente, definidas apenas por características fenotípicas podem agora ser diferenciadas em subespécies, quando são examinadas mais acuradamente, quanto ao material genético dos seus diversos clones estocados nas várias instituições internacionais de coleções de culturas.

Os métodos moleculares envolvem tecnologia de ácidos nucléicos. De acordo com esses métodos, os micróbios podem ser classificados quanto ao percentual de pares de bases guanina-citosina (G-C) que possuem no cromossomo ou, ainda, pelo seqüenciamento completo do DNA genômico e/ou do RNA ribossomial.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA**

Na próxima aula, você vai estudar as diferentes relações que os micróbios possuem com o meio ambiente e como a presença deles influencia na nossa biosfera e, em particular, na distribuição de diferentes elementos químicos reciclados na natureza.

**LEITURA RECOMENDADA**

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1-4.

**SITES RECOMENDADOS**

<http://www.microbiologia.vet.br/>

[http://www.icb.ufmg.br/~franc/cool/evolucao/archaea\\_filogenia.htm](http://www.icb.ufmg.br/~franc/cool/evolucao/archaea_filogenia.htm)



# AULA 10

## Micróbios no meio ambiente

### Meta da aula

Evidenciar a influência dos micróbios na manutenção da vida no planeta.

# objetivos

Esperamos que, após o estudo do conteúdo desta aula, você seja capaz de:

- Interpretar fenômenos de dinâmica populacional microbiana.
- Descrever a participação dos micróbios nas diversas formas de reciclagem de elementos orgânicos e inorgânicos no planeta.

### Pré-requisitos

Para ter um melhor entendimento desta aula, você vai precisar rever algumas aulas da disciplina Elementos de Ecologia e Conservação, lembrando os conceitos de Fatores abióticos (Aula 4); Transferência de energia e biomassa I e II (Aulas 9 e 10) e Ciclos Biogeoquímicos (Aulas 11 e 12). Sugerimos também que você releia as Aulas 6 e 7 da nossa disciplina (Crescimento populacional microbiano e Ação dos agentes físicos e químicos sobre os micróbios).

## INTRODUÇÃO

Você já está familiarizado com a presença de micróbios no meio ambiente? Na primeira aula prática desta disciplina (Aula 2), você criou um microcosmo onde foi possível perceber a influência exercida por diferentes tipos de micróbios nas condições ambientais do solo e dos sedimentos. Essa influência varia de acordo com as condições ambientais e com as associações microbianas existentes no ecossistema. Nesta aula, abordaremos como as populações microbianas participam na reciclagem de alguns elementos químicos na Natureza.

## A UBIQUIDADE DOS MICRÓBIOS

Você já sabe que os micróbios ocupam todos os ecossistemas existentes na biosfera do nosso planeta. Alguns desses ecossistemas são inhóspitos para outros seres vivos. Como exemplos desses ambientes temos os lagos de águas ácidas, nas regiões onde existem minas de enxofre, ou as regiões de águas hipersalinas, como aquelas onde se faz a extração de sal a partir da água do mar.

Embora existam micróbios acidófilos, a maioria dos micróbios não tolera esse ambiente e, por isso, a humanidade tem usado o artifício de acidificar os alimentos para melhor conservá-los ou, em outras palavras, para evitar que estraguem (como você viu na nossa Aula 7). Veja no rótulo dos produtos, como compotas ou geléias com pouco teor de açúcar, e comprove a nossa afirmação anterior.

Compreender a influência exercida pelos micróbios no micro-ambiente onde eles convivem é o principal enfoque abordado pela

### ECOLOGIA MICROBIANA.

As técnicas adotadas para se compreender a Ecologia microbiana incluem a contagem das células para se calcular quanto representam em **BIOMASSA**, e a avaliação das potencialidades metabólicas dos micróbios. A **Tabela 10.1** resume os principais tipos de abordagens adotados em Ecologia microbiana.

### ECOLOGIA MICROBIANA

Área da ciência que estuda os micróbios e suas relações com os componentes abióticos e bióticos em um determinado ecossistema.

### BIOMASSA

Quantidade de matéria orgânica, constituída pelos seres vivos, presente em um *nível trófico* de qualquer ecossistema. O cálculo da biomassa pode ser feito com base no peso seco ou no peso úmido de uma determinada amostra. Leveduras para fazer pão (fermento) são vendidas como preparações úmidas ou dessecadas. Nas dessecadas, você encontra maior concentração de células, portanto, mais biomassa.

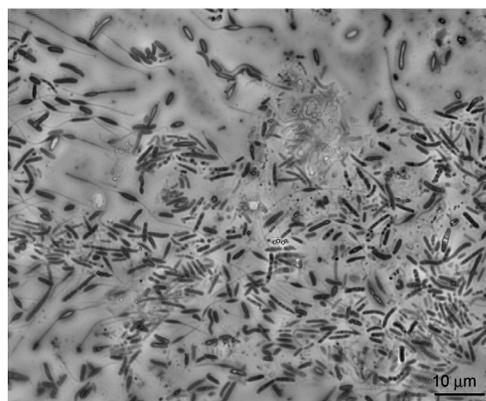
**Tabela 10.1:** Tipos de abordagens para os estudos em Ecologia microbiana

Técnica	Procedimentos
Contagem dos micróbios totais ao microscópio	As células são previamente fixadas para observação. Os resultados desses ensaios permitem estimar a quantidade de biomassa.
Determinação do percentual de células viáveis	Amostras são coletadas assepticamente e inoculadas em meios de cultura que procuram mimetizar as condições do ambiente de onde os micróbios foram coletados. Usam-se compostos fluorescentes que são capturados somente pelas células viáveis.
Avaliação da atividade metabólica pela população microbiana	Utilizam-se bases nitrogenadas (geralmente timidina) marcadas com isótopos radiativos para monitorar o grau de incorporação desses compostos às células da população que estão se multiplicando.
Análise de produtos químicos produzidos pelos micróbios	Utilizam-se métodos químicos para detectar e quantificar produtos do metabolismo microbiano excretados no ambiente.

Para que um tipo de micróbio seja considerado responsável por um determinado processo físico-químico observado no ambiente, deve-se constatar as seguintes evidências:

1. A espécie microbiana responsável pelo tipo de transformação ambiental observada deve estar presente em todas as situações em que a referida transformação seja evidenciada.
2. A espécie deve ser isolada do ambiente onde a transformação ocorre e cultivada em laboratório.
3. A cultura clonada deve promover o mesmo tipo de transformação físico-química nas condições laboratoriais.
4. Essa espécie microbiana deve ser capaz de realizar a mesma transformação no meio ambiente.

No meio ambiente, as massas microbianas são constituídas por uma mistura de comunidades que são, genericamente, chamadas consórcios. Tendo em vista que o modelo de estudo adotado em Microbiologia utiliza preferencialmente culturas clonadas, ou seja, população de seres geneticamente semelhantes, os fenômenos físico-químicos decorrentes da simbiose nos consórcios não podem ser mimetizados nas condições laboratoriais. A **Figura 10.1** é uma fotomicrografia de um consórcio de micróbios que vivem na água de uma lagoa.



**Figura 10.1:** Micrografia de um consórcio de micróbios presentes na água de uma lagoa. Observe a diversidade de micróbios em relação a formas, cores e tamanhos.

### OLIGOTRÓFICO

Diz-se do ambiente com escassez de nutrientes.

Ainda em relação aos micróbios no ambiente, observa-se que eles não estão sempre em divisão, até mesmo porque a disponibilidade de nutrientes é escassa. Portanto, boa parte dos ambientes onde os micróbios vivem é dita **OLIGOTRÓFICA**. Ou seja, essa situação é idêntica à fase estacionária da curva de crescimento que você viu na Aula 6 (Crescimento populacional microbiano).

## MICRÓBIOS COMO ELEMENTOS FUNDAMENTAIS NA CADEIA ALIMENTAR

### CADEIA TRÓFICA OU CADEIA ALIMENTAR

Relação que ocorre entre os seres vivos que compõem um ecossistema onde, mediante uma seqüência, a energia de um organismo é transferida para outro, sob a forma de alimento. A base de uma cadeia alimentar começa por organismos produtores que obtêm a energia necessária às suas atividades vitais a partir da radiação solar (fotossíntese) ou de reações entre compostos minerais (quimiossíntese). A seguir, esses autotróficos servem de base alimentar para o segundo elo da cadeia formado por consumidores heterotróficos que, por sua vez, são predados por novo grupo de animais, e assim sucessivamente.

Você geralmente encontra descrições relacionando, de maneira simplificada, os elementos que compõem uma cadeia alimentar, tendo por base os seguintes parâmetros: um peixe bem grande, papou o peixe menor, que engoliu o peixinho, que comeu o zooplâncton, que se alimentou do fitoplâncton, que absorveu a energia solar; ou podemos comer um bife da carne de um bovino que comeu o capim, que absorveu a energia solar; ou podemos usar uma cadeia muito mais curta, comendo o cereal, que é resultante da energia solar absorvida pela planta (Aula 10, da disciplina Elementos de Ecologia e Conservação). Entretanto, a influência exercida na base das cadeias alimentares é decorrente das ações microbianas no nosso planeta. Os micróbios participam como formadores da matéria orgânica através de processos energéticos que envolvem fotossíntese ou quimiossíntese. Os fotossintéticos desempenham de maneira mais intensa essa atividade na superfície do mar e constituem o chamado fitoplâncton. Como todos os seres vivos, em qualquer ambiente onde existe disponibilidade de água, os micróbios constituem parte de **CADEIAS TRÓFICAS**.

Você sabia que a população do fitoplâncton é responsável por, pelo menos, 30% da fixação do gás carbônico da atmosfera?



**FORAMINÍFEROS**

Seres unicelulares marinhos do reino dos protistas, que apresentam como envoltório carapaças calcáreas.

Na alça microbiana, a escala de tamanho dos micróbios é um fator primordial para a sobrevivência desses seres. Os micróbios autotróficos produzem matéria orgânica que fica dissolvida no meio ambiente. Essa matéria é utilizada pelas bactérias heterotróficas e pelas cianobactérias que juntas são consumidas pelos protozoários flagelados ou ciliados. Estes seres, por sua vez, são predados por ciliados de maior porte que servirão de alimento para os grandes protozoários, conhecidos como **FORAMINÍFEROS**. Por isso, a composição de um ambiente aquático natural é representada tanto pelo material dissolvido quanto pelos elementos particulados, como mostra a **Tabela 10.2**.

**Tabela 10.2:** Composição de uma amostra de água natural

Constituinte	Descrição
1. Material dissolvido	Matéria orgânica ou inorgânica contida no líquido obtido após centrifugação ou filtração, para remoção dos elementos particulados.
Componentes orgânicos	Carbono e nitrogênio associados à matéria orgânica.
Componentes inorgânicos	Sais minerais e gás carbônico.
2. Material particulado	Resíduo constituído pelo sedimento da centrifugação ou pelo material retido no processo de filtração.
Material vivo	Material celular denominado biomassa.
Material não-vivo	
Orgânico	Matéria orgânica morta, também chamada de detrito.
Inorgânico	Elementos metálicos essenciais à matéria viva.

**ATIVIDADE**



1. Vamos agora testar sua compreensão sobre cultura microbiana clonada, consórcio microbiano e suas implicações no meio ambiente. Imagine uma bela área litorânea de areias bem limpas que, por acidente, recebe todo o óleo que vazou de um petroleiro. Nessa área impactada foi pulverizada uma suspensão de uma cultura microbiana com capacidade de hidrolisar hidrocarbonetos derivados do petróleo. Porém, esse tipo microbiano somente expressa essa atividade metabólica quando dispõe do aminoácido tirosina no meio de cultura. Com essas informações, como você poderia prever o êxito do processo de despoluição efetuado e que procedimentos você sugeriria, com base nas potencialidades metabólicas dos micróbios, para reduzir o impacto

poluente de maneira mais eficaz até restituir as condições vigentes entre os consórcios microbianos antes do acidente. Como você comprovaria que a recuperação ambiental aconteceu? Elabore um gráfico mostrando a concentração dos elementos citados nesta atividade em função do fator tempo.

---



---



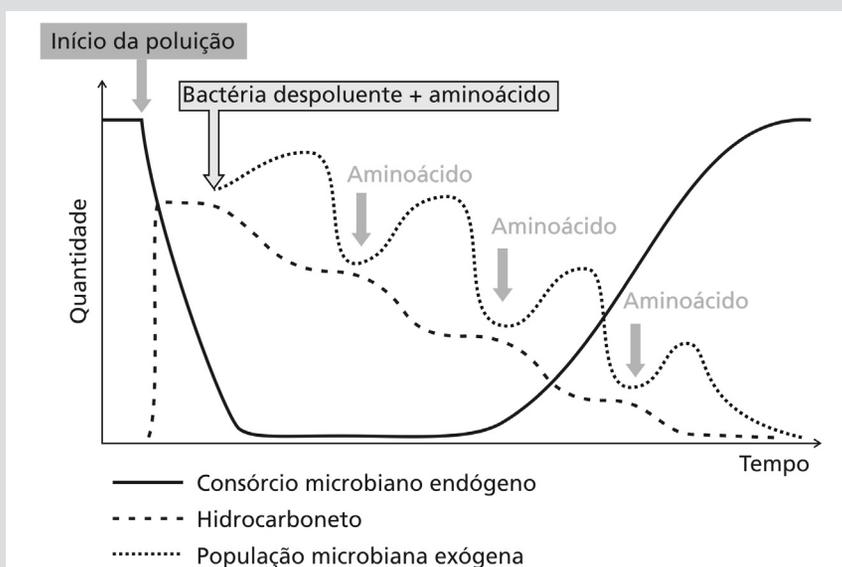
---



---

**RESPOSTA COMENTADA**

*Esta é uma atividade multifatorial que exigiu que você fizesse interligação de vários saberes. A eficiência de degradação de hidrocarbonetos vai ser baixa em virtude da característica oligotrófica do ambiente em relação ao aminoácido tirosina (nada sobra na Natureza). Para aumentar a eficiência de degradação, você deve ter recomendado pulverizar, repetidamente, uma solução de tirosina para garantir o aumento populacional do tipo microbiano despoluente, já que este aminoácido é essencial para os processos metabólicos desses micróbios. Para comprovar a recuperação ambiental, sua sugestão deve ter sido para que se quantificasse, periodicamente, o nível de hidrocarbonetos no ambiente. Quando estes atingirem uma concentração aceitável, deve-se cessar a pulverização de tirosina, e a população dos micróbios despoluentes decairá progressivamente em função da falta do hidrocarboneto e da tirosina, dando oportunidade para que outras populações microbianas do consórcio ambiental proliferem. Você percebeu como a dinâmica populacional microbiana é dependente das condições ambientais? De acordo com a disponibilidade de nutrientes no ambiente, há o predomínio daquelas populações capazes de utilizá-los.*



No seu gráfico, o consórcio nativo deve diminuir bruscamente em função da chegada do agente poluente (nível de hidrocarbonetos), que tende a decair pela ação dos micróbios que o degradam, sendo esta degradação mais acentuada de acordo com o teor de tirosina presente. À medida que o elemento poluente vai decaindo e o aporte de tirosina acaba, a população que degrada hidrocarbonetos vai desaparecendo e os elementos do consórcio original vão se reestabelecendo.

#### ELEMENTOS TRAÇO

Metais encontrados nas células em concentrações muito baixas (menos de 0,1%), embora sejam essenciais como co-fatores enzimáticos. Alguns exemplos desses elementos são o alumínio, cobre, flúor, manganês, molibdênio, selênio e zinco.

### METABOLISMO MICROBIANO E MEIO AMBIENTE

Uma das principais características dos sistemas vivos é a sua capacidade de modificar, por meio de seus processos metabólicos, diferentes compostos químicos.

A Tabela 10.3 mostra os principais elementos em uma célula procariótica, sem levar em consideração os **ELEMENTOS TRAÇO**.

**Tabela 10.3:** Principais elementos, suas fontes e funções em uma célula procariótica típica (modelo *Bacillus sp.*).

Elemento	% de peso seco	Fonte	Função na célula
Carbono	50	Compostos orgânicos ou CO <sub>2</sub>	Participa na formação das moléculas orgânicas das células.
Oxigênio	20	H <sub>2</sub> O, compostos orgânicos, CO <sub>2</sub> e O <sub>2</sub> atmosféricos.	Constituinte de moléculas orgânicas e da água; acceptor de elétrons da respiração aeróbica.
Nitrogênio	14	NH <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> , compostos orgânicos nitrogenados.	Constituintes de aminoácidos, ácidos nucleicos e vitaminas.
Hidrogênio	8	H <sub>2</sub> O, compostos orgânicos.	Componente de compostos orgânicos e da água.
Fósforo	4,8	Fosfatos inorgânicos ou associados à matéria orgânica.	Componente de ácidos nucleicos, nucleotídeos, fosfolípidios, ácidos teicóicos.
Enxofre	1	SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> S, S, compostos orgânicos de enxofre.	Componentes orgânicos tioderivados, como os aminoácidos cistina, cisteína e metionina.
Potássio	1	Sais de potássio.	Cátion inorgânico que participa do balanço osmótico intracelular e atua como co-fator de enzimas.

Magnésio	0.5	Sais de magnésio.	Cátion inorgânico que atua como estabilizador de arranjos protéicos e como co-fator de enzimas.
Cálcio	0.5	Sais de cálcio.	Cátion inorgânico que atua como estabilizador de arranjos protéicos e co-fator de enzimas; presente em endosporos.
Ferro	0.2	Sais de ferro.	Componente de citocromos, co-fatores para reações enzimáticas.

Como você pode observar, vários elementos químicos participam da composição das células, sendo a maior quantidade composta por carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. O importante agora é você perceber que tanto a estrutura quanto o metabolismo de um micróbio são capazes de se adaptar às condições do ambiente. Os vários tipos de micróbios estão adaptados aos seus nichos ecológicos, de acordo com as suas propriedades metabólicas que, em geral, estão associadas à presença de um ou mais elementos químicos disponíveis como nutrientes.

Durante o longo tempo de evolução da vida na Terra houve oportunidade para surgir a diversidade metabólica observada nas células microbianas. Tanto as bactérias quanto as arqueas estão envolvidas em praticamente todos os ciclos biogeoquímicos dos elementos essenciais. Portanto, desempenham atividades fundamentais para a manutenção da vida dos outros seres.

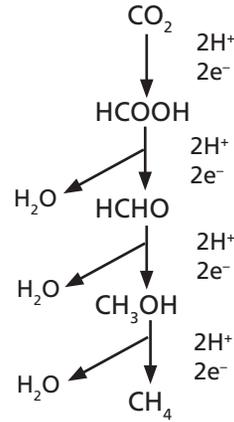
Vários tipos de micróbios heterotróficos se desenvolvem no solo, na água e em associações com outros seres vivos. A heterotrofia, no caso, significa que as bactérias sobrevivem de restos mortos de outros organismos, utilizando essa matéria orgânica tanto como fonte de carbono quanto de energia, que pode ser obtida pelos processos de respiração (aeróbica ou anaeróbica) ou fermentação. Diante desse quadro, fica fácil você concluir por que os micróbios são importantes na reciclagem dos elementos químicos que compõem a matéria orgânica, ao fazerem a decomposição ou degradação da matéria morta.

Outros exemplos de metabolismos exclusivos de procariontes são a metanogênese e a fixação de nitrogênio (assunto que foi apresentado na Aula 11, da disciplina Elementos de Ecologia e Conservação). A metanogênese é a conversão do  $\text{CO}_2$  em metano ( $\text{CH}_4$ ) por uma série de reações enzimáticas realizadas por um grupo de arqueas. Um esquema simplificado do processo de produção de metano, pode ser representado pela reação  $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ , que gera a energia que garante

a característica autotrófica dos micróbios que o realizam. Na **Figura 10.3** você pode observar a reação de forma esquemática, em função dos elétrons e dos íons  $H^+$  que participam do processo.

<http://www.ens-lyon.fr/Planet-Terre/Infosciences/Climats/Rayonnement/Effetserre/methanogenese.html>

**Figura 10.3:** Etapas da formação de metano por arqueas.



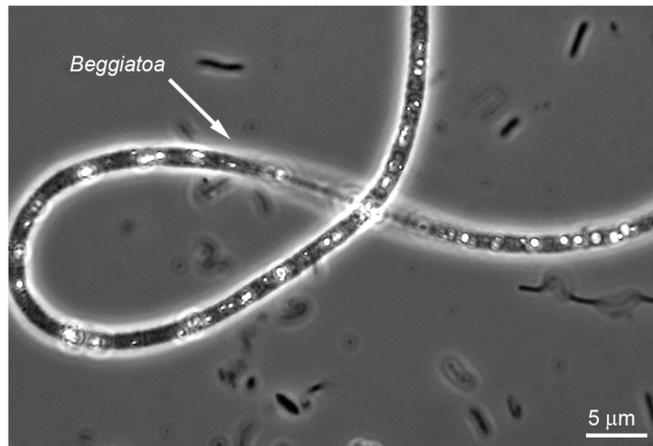
Outros exemplos de processos metabólicos exclusivos de procariontes são dados por bactérias que utilizam íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou íons sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória, em lugar do oxigênio. Essas bactérias são anaeróbicas mas obtêm energia através do processo de respiração, no qual os elétrons são transferidos para os elementos nitrogênio ou enxofre.

Há ainda as bactérias litotróficas que utilizam como fonte de energia amônia, sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) ou hidrogênio ( $\text{H}_2$ ). As bactérias litotróficas (**Figura 10.4**) foram descobertas pelo cientista russo **SERGEY WINOGRADSKY**.



**SERGEY WINOGRADSKY (1856-1953)**

Microbiologista russo que descobriu os micróbios litotróficos estudando microcosmos. Suas descobertas sobre os processos fisiológicos de nitrificação e fixação do nitrogênio por bactérias do solo ajudaram a posicionar a Bacteriologia como um importante ramo das Ciências Agrárias.

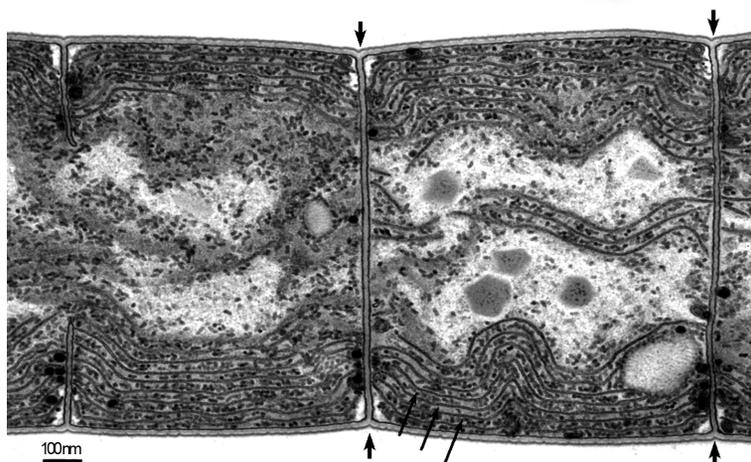
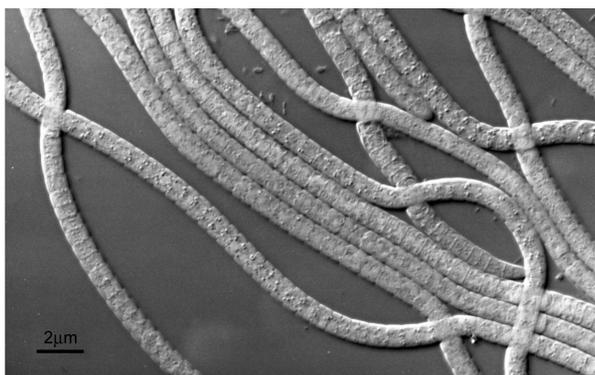


**Figura 10.4:** Micrografia mostrando bactérias litotróficas do gênero *Beggiatoa*.

As algas são micróbios eucarióticos que têm grande influência no ciclo do carbono, porque são elas que fazem a maior parte da fotossíntese que ocorre nos ambientes aquáticos. Por serem organismos fotossintetizantes e autotróficos, elas utilizam o  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono para a biossíntese de seus componentes orgânicos. Além de participarem na reciclagem dos átomos de carbono, essas algas também influenciam na reciclagem dos átomos de oxigênio ( $\text{O}_2$ ), uma vez que este elemento é um dos produtos da fotossíntese. Além das algas, há outro grupo de bactérias que participa na produção do  $\text{O}_2$  na biosfera: são as cianobactérias. Estas bactérias fazem fotossíntese por meio de um complexo aparato fotossintético, constituído de membranas intracelulares que se assemelham às lamelas dos cloroplastos (Figura 10.5). Tanto as algas como as cianobactérias podem ser encontradas em quase todos os ambientes onde haja luz e umidade. Esses dois tipos de micróbios são predominantes nos oceanos e formam a base alimentar da cadeia trófica.



Além da fotossíntese mediada pelas cianobactérias, existe aquela executada por micróbios classificados como fotossintéticos anoxigênicos (sulfobactérias púrpuras ou verdes), que absorvem a energia luminosa sem, contudo, liberar oxigênio, pois nesse processo oxidativo o doador de elétrons da cadeia respiratória são os íons enxofre.



**Figura 10.5:** Na parte de cima observa-se uma micrografia, feita ao microscópio óptico, do filamento formado por múltiplas células de algas clorofiladas do gênero *Oscillatoria*. Na parte de baixo a microscopia eletrônica de transmissão, mostra as múltiplas camadas de membranas internas (setas finas) dessas cianobactérias, onde ocorre a fotossíntese. As setas grossas indicam os limites entre duas células.

Em razão da crescente necessidade de energia pela humanidade, alguns microbiologistas passaram a estudar como alguns tipos de micróbios conseguem transformar monóxido de carbono (CO) e água (H<sub>2</sub>O) em gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e oxigênio (O<sub>2</sub>). O alvo desses estudos é descobrir uma maneira de domar os micróbios das espécies *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Methanosarcina barkeri* e *Citrobacter sp.*, que são espécimes que podem fornecer hidrogênio para servir como combustível para atender à demanda da expansão populacional humana.

Atualmente, as leveduras em cativeiro fornecem, pelo seu metabolismo fermentativo, o álcool combustível. Assim, a partir da cana-de-açúcar, tomada como matéria-prima, tornou-se possível atender à frota de veículos brasileiros. Servindo de referência para o mundo, por constituir uma fonte de energia renovável, o pro-álcool é exemplo de um projeto bem-sucedido, iniciado em 14 de novembro de 1975, e desenvolvido com tecnologia genuinamente brasileira.

Outro tipo de população microbiana que também influencia grandemente na biosfera são os fungos (bolores e leveduras). Eles são decompositores da matéria orgânica, utilizando-a como fonte de energia e de nutrientes para o crescimento. Esses micróbios são fundamentais nos processos de decomposição do lixo orgânico depositado em aterros sanitários.

Os fungos são os principais atores da biodegradação, por isso dizemos que são os melhores ajudantes da humanidade, pois executam o trabalho de despoluição, degradando celulose, plásticos ou mesmo combustíveis derivados do petróleo.

Porém, nesse processo colaborativo, se nos ativermos apenas ao lado antropocêntrico, muitas vezes os fungos podem ser considerados, no mínimo, inconvenientes, pois não distinguem resíduos poluentes de objetos úteis e, muitas vezes, de elevado preço. Exemplo disso é quando eles crescem sobre lentes de instrumentos ópticos como microscópios, reduzindo o tempo de utilização desse tipo de equipamento ou, ainda, quando deterioram alimentos, resultando em substanciais perdas econômicas quando não são devidamente controlados.

Você já teve oportunidade de entrar num ambiente fechado e úmido? Se já o fez, deve ter sentido o cheiro de mofo e pode até ter desenvolvido um quadro alérgico. Da próxima vez que isso acontecer, reclame bem alto da sujeira e avise a turma: "Olha o fungo aí, gente!"

As leveduras também desempenham um papel importante na reciclagem dos átomos de carbono, a partir da decomposição dos compostos orgânicos no ambiente.

Como organismos unicelulares, as leveduras são os eucariontes que possuem maior versatilidade metabólica em relação à captação de energia, pois dispõem de mitocôndrias, organelas responsáveis pelo processo de respiração oxidativa que lhes dão condições de obter energia pelo processo de respiração (cujo rendimento em ATP você já é capaz de calcular, certo?). Porém, se as leveduras estiverem em ambiente anaeróbico, suas mitocôndrias entram em disfunção, deixando-as apenas com metabolismo fermentativo dos açúcares.

É justamente em função dessas peculiaridades que os microbiologistas industriais ou engenheiros químicos, escravizam as leveduras, cultivando-as sob condições de aerobiose para que elas se desenvolvam e aumentem rapidamente a população. Uma vez alcançada a densidade celular desejada, as leveduras são transferidas para depósitos fechados, contendo um caldo nutritivo rico em açúcar. Nesse novo ambiente, só lhes resta executarem o processo de fermentação. E elas fazem isso com muita competência.

Vamos ver se você lembra da seguinte reação:

$C_6H_{12}O_6$  (glicose)  $\rightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2$ . Lembrou?  $C_2H_6O$  ou  $H_3C-CH_2-OH$  são as fórmulas molecular e estrutural do álcool etílico, aquele que, quando ingerido, leva as pessoas ao encontro de Baco, deus romano do vinho ou Dionísio, como era chamado pelos gregos. Se você é devoto de Baco, lembre-se: consuma com moderação e se beber não dirija! Bebida fermentada vicia.

Voltando aos micróbios, temos ainda os protozoários que são eucariontes heterotróficos que se nutrem capturando o alimento. A maioria dos protozoários alimenta-se de bactérias e, por isso, são considerados predadores naturais desses procariontes, e responsáveis pela regulação das populações de bactérias nos mais diversos ambientes. Estudaremos mais sobre eles na Aula 12.

A lista de exemplos onde os micróbios participam dos ciclos biogeoquímicos é enorme. Provavelmente, todos os tipos de micróbios no planeta estão de alguma forma envolvidos na reciclagem de elementos químicos.



### ATIVIDADE

2. Vamos ver como está sua compreensão sobre a influência dos diferentes tipos de micróbios nas várias etapas do ciclo biogeoquímico dos átomos de carbono na Natureza? Então vamos lá! Descreva como o metabolismo energético das bactérias cianofíceas e dos fungos contribuem na reciclagem do carbono terrestre.

---

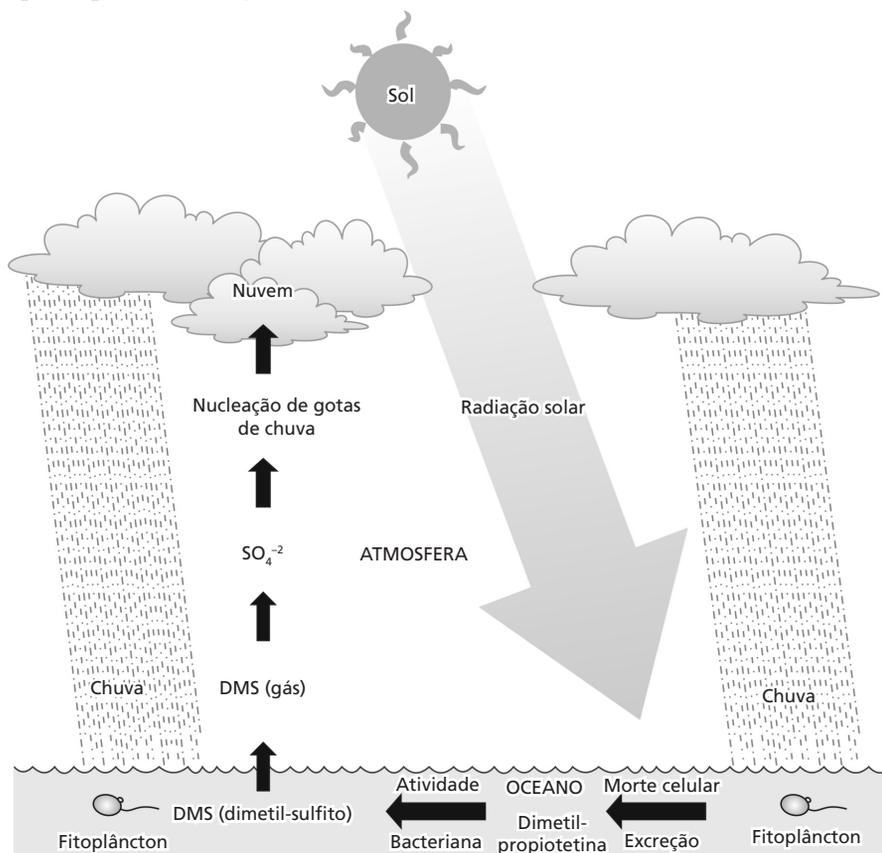
---

---

### RESPOSTA COMENTADA

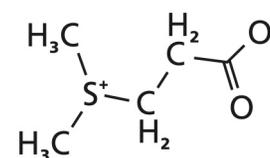
Acertou quando se referiu às cianofíceas como agentes fixadores do carbono inorgânico da Natureza, por meio dos processos de fotossíntese e autotrofia que culminam na liberação de  $O_2$ . Provavelmente, você não se esqueceu de mencionar os micróbios fotossintéticos anoxigênicos. Os fungos, as leveduras e os micróbios heterotróficos são aqueles que tratam da decomposição da matéria orgânica, ou seja, são os responsáveis pela despoluição do planeta. Enquanto os fotossintéticos agregam átomos de carbono para sintetizar carboidratos, os heterotróficos agem como desagregadores dos compostos orgânicos, restituindo o carbono para o estado inorgânico. Você pode também discutir com seus colegas outras situações envolvendo os átomos de carbono, procurando mencionar os nomes das espécies microbianas implicadas nesse ciclo biogeoquímico e, com isso, fixar o entendimento sobre a dinâmica populacional microbiana e a participação dos micróbios na reciclagem dos elementos orgânicos e inorgânicos na Natureza.

Você agora vai ver um exemplo da influência que os micróbios podem exercer nos ecossistemas e, em alguns casos, até determinarem as condições climáticas de um local. A **Figura 10.6** ilustra o mecanismo proposto para a formação de nuvens em ambientes marinhos.



**Figura 10.6:** Mecanismo de formação de nuvens nos oceanos.

O controle ambiental do processo de fotossíntese do ambiente marinho é atribuído à própria população do fitoplâncton, pois existem algumas espécies de algas que produzem um composto chamado de dimetil-propionetina ou dimetil-sulfoniopropionato (**Figura 10.7**) que ajuda a célula a manter seu equilíbrio osmótico. Quando as células morrem, esse composto é liberado no oceano onde é hidrolisado por bactérias havendo a formação de dimetil-sulfito. O dimetil-sulfito é volátil e acaba alcançando a atmosfera onde reage com os componentes do ar para formar sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). O sulfato formado age como um nucleador da formação de nuvens a partir das gotículas de água na atmosfera. Esse mecanismo é regulado naturalmente. Quanto mais nuvens presentes, menor a radiação solar na água que, por sua vez, limita o crescimento das algas que precisam de luz para o seu metabolismo fototrófico. Portanto, o plâncton se refresca com suas próprias nuvens.



**Figura 10.7:** Estrutura da molécula de dimetil-sulfoniopropionato.

## CONCLUSÃO

Os micróbios desempenham um papel fundamental na dinâmica populacional da biosfera no nosso planeta. A versatilidade metabólica, adquirida por mutantes selecionados ao longo dos bilhões de anos de permanência na Terra, lhes dá a possibilidade de colonizar basicamente todos os ambientes. Eles estão diretamente envolvidos em todos os ciclos biogeoquímicos dos elementos e atuam, em escala planetária, na transformação de matéria em energia e vice-versa, que ajuda a viabilizar a existência dos demais seres vivos.

## ATIVIDADE FINAL

Reescreva com suas palavras a situação descrita:

Vamos ver se você está atento e descobre um nome para a situação corriqueira à população humana que vive nas grandes metrópoles: um grupo de amigos, muitos deles de uma mesma família, reunidos em função de um sentimento de pesar. Pouco antes do final deste encontro, um religioso expressa palavras de conforto e esperança à vida. Finalmente, o corpo do falecido é enterrado e os micróbios do solo, junto com os elementos da microbiota daquele corpo passam a liberar as moléculas e os átomos que constituíam o corpo enterrado, restituindo à Natureza átomos que entrarão na composição de novos corpos. E assim a vida continua. Graças aos micróbios!

---

---

---

---

---

**COMENTÁRIO**

*Culto aos micróbios. Você deve refletir que se espera que os micróbios degradem aquele ser para que os átomos dele sejam devolvidos à Natureza, passando a fazer parte de outros componentes tais como frutas, por exemplo, que serão alimento para outros seres que compõem a biosfera. Se você abrir uma Bíblia, e ler o versículo 19 do capítulo 3 do livro do Gênesis, encontrará “lembra-te que és pó e ao pó tornarás”. Esta frase pode ser entendida como uma referência à participação dos micróbios na reciclagem dos elementos orgânicos e inorgânicos na Natureza. Cada um participa da vida no planeta, tanto em vida quanto após a morte e, dessa forma, “nada se cria, nada se perde e tudo se transforma”.*

**RESUMO**

A Ecologia microbiana é a ciência que estuda a influência dos micróbios sobre o meio ambiente. As técnicas empregadas no estudo da Ecologia microbiana devem ser adaptadas ao tamanho dos micróbios que, embora sejam minúsculos, se aglomeram em alta densidade populacional nos níveis tróficos de uma alça microbiana. Devido à grande versatilidade metabólica que os micróbios apresentam, eles são capazes de ocupar os mais variados nichos ecológicos e participam de todos os ciclos biogeoquímicos dos elementos essenciais. O ambiente em que vivemos é diretamente dependente da forma como os micróbios vivem. Sem eles, não seria possível a vida em nosso planeta.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA**

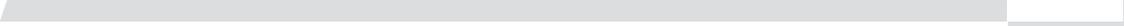
Agora que você já viu a influência dos micróbios no ambiente, na próxima aula que será prática, você comprovará a presença deles em nichos restritos como os seus dedos e o corpo de peixes marinhos. É necessário que seja trazido para o laboratório um peixe marinho fresco, de qualquer tamanho, para que a aula fique mais próxima do seu cotidiano. Apenas um peixe será necessário e você deve combinar com seus colegas qual de vocês terá mais condição de trazer o peixe dentro das especificações necessárias.

### LEITURAS RECOMENDADAS

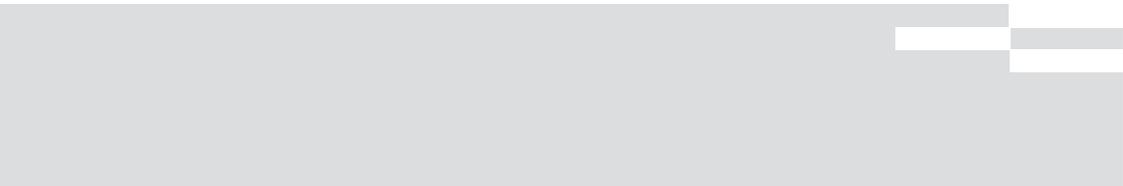
ALBUQUERQUE, Alexandre Serpa. Álcool-motor: combustível inesgotável, quase não polui e é 100% brasileiro. Disponível em: <<http://www.brasilengenharia.com.br/artenergia540.htm>>. Acesso em: 6 out. 2005.

BRONOWSKI , Jacob. Ciência e valores humanos. Tradução de Alceu Letal. Belo Horizonte: Itatiaia, 1979. (Coleção O homem e a ciência, v. 6)

**Microbiologia**



Referências



## Aula 1

---

ALMEIDA, Glória. *Louis Pasteur*. Disponível em: <<http://www.ajc.pt/ciencia/n21/estorias.php>>. Acesso em: 13 maio 2005.

AS MUITAS luzes do céu. Disponível em: <<http://leobenez.tripod.com/muitas-luzes.html>>. Acesso em: 13 maio 2005.

ÁVILA, Marcos A. *Cianobactérias (Algas azuis)*. Disponível em: <[http://www.aquahobby.com/articles/b\\_ciano.php](http://www.aquahobby.com/articles/b_ciano.php)>. Acesso em: 14 mar. 2005.

MADIGAN, M. P. *Microbiologia de Brock*. 10. ed. Rio de Janeiro: Pearson Education do Brasil, 2004. 642 p.

PELCZAR JUNIOR, Michael; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1 e 2.

## Aula 2

---

NATIONAL ASSOCIATION OF BIOLOGY TEACHERS. *Meet Microbes*. Microbe World Activities, 1999.

RODRIGUES, A. R. T. S. *Uma proposta para a montagem de um laboratório criativo para aulas práticas de Microbiologia*. 2002. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Ensino de Ciências e Biologia, Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

## Aula 3

---

INSTITUTO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/~lbcd/grupo6/rib4.gif>>. Acesso em: 11 abr. 2005.

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY. *Protonic NanoMachine Project*. Disponível em: <[www.npn.jst.go.jp/movie1.html](http://www.npn.jst.go.jp/movie1.html)>. Acesso em: 11 abr. 2005.

KYAW, Cynthia Maria. *Morfologia e ultraestrutura bacterianas*. Part. 3. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia3/morfologia3.html>>. Acesso em: 11 abr. 2005.

MADIGAN, Michel T. *Microbiologia de Brock*. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

PRESCOTT, Lansing M.; HARLEY, Jonh P.; KLEIN, Donald A. *Microbiology*. 5. ed. WCB –Wm. C, Brown Publishers, 2002.

STRUCTURE of a bacterial flagellum. Disponível em: <[http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.htm?File\\_name=Bact009b&File\\_type=gif](http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.htm?File_name=Bact009b&File_type=gif)>. Acesso em: 8 jul. 2005.

#### Aula 4

---

BIER, Otto. *Bacteriologia e Imunologia em suas aplicações à medicina e higiene*. 16. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975. 1056 p.

LOCKE, D. M. *Enzimas: os agentes da vida*. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1969. 304p.

MADIGAN, Matinko Parker. *Microbiologia de brock*. 10. ed. Rio de Janeiro: Pearson Education do Brasil, 2004. 642 p.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 556p. v. 1 e 2.

#### Aula 5

---

BIER, Otto. *Bacteriologia e Imunologia em suas aplicações à medicina e higiene*. 16.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975.

DAVIDSON, Michael W.; ABRAMOWITZ, Mortimer. *Molecular Expressions Microscopy Primer: anatomy of the microscope*. Disponível em: <<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/immersion.html>>. Acesso em: 8 jul. 2005.

EARL, Judy Y. *Microbiology and Immunology*. Disponível em: <<http://www.faculty.mc3.edu/jearl/webpage.htm>>. Acesso em: 8 jul. 2005.

MOLECULAR Expression microscopy Primer: anatomy of the microscope. Disponível em: <<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/immersion.html>>. Acesso em: 19 jul. 2005.

TIO ALÊ. Protocolos experimentais. Disponível em: <<http://protocolos.tioale.pro.br/gram.php>>. Acesso em: 1 abr. 2005.

## Aula 6

---

CURSO de Extensão à Distância. *Ecologia e Gestão Ambiental*. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <[http://ecologia.icb.ufmg.br/Sala\\_de\\_aula/modulo3/md3\\_a6.htm](http://ecologia.icb.ufmg.br/Sala_de_aula/modulo3/md3_a6.htm)>. Acesso em: 19 jul. 2005.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA QUÍMICA E BIOLÓGICA. Universidade Nova de Lisboa. Disponível em: <[http://www.itqb.unl.pt/~Metalloproteins\\_Bioenergetics/extremofilos/page1.htm](http://www.itqb.unl.pt/~Metalloproteins_Bioenergetics/extremofilos/page1.htm)>. Acesso em: 19 jul. 2005.

MADIGAN, Michel T. *Microbiologia de Brock*. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

TORTORA, Gerard J. *Microbiology : an introduction*. 6.ed. Londres: Addison Wesley Longman, 1997. 832 p.

## Aula 7

---

ACIDENTE radioativo de Goiânia: o fato. Disponível em: <<http://www.energiatomic a.hpg.ig.com.br/acidgoi.html>>. Acesso em: 18 jul. 2005.

MURRAY, P. R. et al. *Manual of clinical microbiology*. 6.ed. Washington, DC: ASM Press, 1995.

TRABULSI, Luiz R.; ALTERTHUM, Flávio. *Microbiologia*. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

## Aula 8

---

STANIER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E. A. *Mundo dos Micróbios*. São Paulo: USP, 1969. 741p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

TRABULSI, Luiz R.; ALTERTHUM, Flávio. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

LABOR & LABOR Biochin. Disponível em: <<http://www.laborhospitalar.com.br/biobras.htm>>. Acesso em: 8 set. 2005.

BIER, Otto. *Bacteriologia e Imunologia: em suas aplicações à medicina e à higiene*. 16. ed. São Paulo: USP, 1975. 1056 p.

KRIEG, N. R. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore. Williams & Wilkins, 1984. 4 v.

PERRY, Jerome J.; STALEY, James T. *Microbiology: dynamics and diversity*. Florida: Saunders College Publishing, 1997. 911 p.

SNEATH, P. H. A. Computer Taxonomy. In: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D. (Ed.). *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press, 1972. v. 7, n. 2.

STANIER, Roger Y.; DOUDOROFF, Michel; ADELBERG, E. A. *Mundo dos Micróbios*. São Paulo: Edgard Blücher, 1969. 741p.

TRABULSI, Luiz R.; ALTERTHUM, Flávio. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

A FAUNA Marítima. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/antartica/411.html>>. Acesso em: 13 set. 2005.

LA PRODUCTION biologique du methane. Disponível em: <http://www.ens-lyon.fr/Planet-Terre/Infosciences/Climats/Rayonnement/Effetserre/methanogenese.html>>. Acesso em : 20 set. 2005.

MADIGAN, M. T. *Microbiologia de Brock*. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MARTÍNEZ-ALONSO, Maira et al. Distribution of phototrophic populations and primary production in a microbial mat from the Ebo Delta, Spain. *International Microbiology*, v. 7, n. 1, p. 19-25, 2004. Disponível em: <<http://www.im.microbios.org/25march04/04%20MtnnezAlonso.pdf>>. Acesso em: 6 out. 2005.

PERRY, J. J.; STANLEY, J. T. *Microbiology: dynamics and diversity*. Florida: Saunders College Publishing, 1997. 911p.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

Serviço gráfico realizado em parceria com a Fundação Santa Cabrini por intermédio do gerenciamento laborativo e educacional da mão-de-obra de apenados do sistema prisional do Estado do Rio de Janeiro.



Maiores informações: [www.santacabrini.rj.gov.br](http://www.santacabrini.rj.gov.br)



ISBN 85-7648-183-9



9 788576 448183 6



**UENF**  
Universidade Estadual  
do Norte Fluminense



Universidade Federal Fluminense

**uff**



**UNIRIO**



**FUNDAÇÃO  
SANTA CABRINI**  
Provedora de acesso à Cidadania



**FAPERJ**  
Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo  
à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro



**GOVERNO DO  
Rio de Janeiro**

SECRETARIA DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA



**UNIVERSIDADE  
ABERTA DO BRASIL**

Ministério  
da Educação

**BRASIL**  
UM PAÍS DE TODOS  
GOVERNO FEDERAL