



## **MICROORGANISMOS E CRESCIMENTO MICROBIANO**

---

Paula Bacelar Nicolau

fevereiro 2014



## Conteúdo

<b>1. MICRORGANISMOS.....</b>	<b>2</b>
EXTENSÃO E DIVERSIDADE DA VIDA MICROBIANA .....	2
MICRORGANISMOS E OS SEUS AMBIENTES NATURAIS.....	3
<b>2. CRESCIMENTO DE UMA POPULAÇÃO MICROBIANA.....</b>	<b>6</b>
REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO .....	8
PARÂMETROS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO.....	9
CICLO DE CRESCIMENTO MICROBIANO .....	11
<b>3. EFEITOS AMBIENTAIS NO CRESCIMENTO MICROBIANO.....</b>	<b>13</b>
ÁGUA .....	13
ACIDEZ E PH.....	16
TEMPERATURA .....	18
POTENCIAL REDOX (EH).....	20
NUTRIENTES.....	21

## 1. Microorganismos

Os microrganismos são seres vivos de pequenas dimensões, na escala dos micrómetros, e portanto apenas observáveis com o uso de microscópios. São um vasto grupo de organismos, geralmente unicelulares, que incluem bactérias, protozoários, algas e fungos (*seres celulares*) e vírus (*seres subcelulares*), entre outros.

O conhecimento e estudo destas pequenas formas de vida, devido às suas diminutas dimensões, foi tardio relativamente a outras áreas do conhecimento biológico e apenas possível com o aparecimento dos primeiros microscópios no século XVII, e com o posterior desenvolvimento da microscopia.

A sua pequena dimensão também facilmente induziu a que se pensasse que teriam uma menor importância em termos da biomassa global do planeta, assim como uma menor importância para o seu ecossistema global. Nada de mais equivocado! Os microrganismos, sabe-se atualmente, são ubíquos, encontrando-se em qualquer ambiente terrestre, incluindo ambientes aquáticos, solos, ar, e seres vivos (plantas e animais), e apresentam uma imensa versatilidade metabólica e grande facilidade de adaptação fisiológica e evolutiva. São, desta forma, extremamente importantes na forma como o planeta, e a vida nela existente, foi moldado ao longo da sua história.

### *Extensão e diversidade da vida microbiana*

Uma estimativa do número de células procariotas no nosso planeta indica que estas podem atingir  $5 \times 10^{30}$ . Isto significa que a quantidade de carbono armazenada nestas células pode equivaler àquela estimada para a biomassa vegetal do planeta. Significa também que a quantidade de fósforo e de azoto armazenada nas células procariotas pode corresponder a 10 vezes aquela que existe na mesma biomassa vegetal.

Consideremos a diversidade microbiana numa perspetiva quantitativa. Estimativas de biodiversidade microbiana baseadas em estudos genéticos, indicam que em 10 gramas de solo não poluído existirão tipicamente  $8,3 \times 10^6$  espécies diferentes de bactérias, ou seja quase 10 milhões de espécies num pequeno punhado de terra. Estudos

semelhantes de biodiversidade bacteriana em árvores, indicaram existirem centenas de espécies procariontas, diferentes, nas folhas de apenas uma árvore, e centenas de outras espécies, diferentes destas, nas folhas das árvores adjacentes. Para efeito de comparação, é estimado existirem apenas 5.500 espécies de mamíferos em toda a Terra, entre 10.000 a 20.000 espécies de aves, 390.000 espécies de plantas e entre 1 a 5 milhão de insetos em todo o planeta. Uma punhado de dez gramas de solo tem mais espécies de procariontes!

Consideremos agora a biodiversidade microbiana numa perspetiva qualitativa. Os organismos metazoários têm apenas uma forma de metabolismo: utilizam  $O_2$  como recetor de eletrões e oxidam o carbono orgânico. Em contraste, as células procariontas podem metabolizar o enxofre no  $SO_4^{2-}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{3+}$ , o azoto em  $NO_3^-$  e em  $NH_3$ , ou mesmo o carbono na matéria orgânica como recetores de eletrões. Alguns podem ainda utilizar formas oxidadas de urânio ( $U^{6+}$ ) como o recetor de eletrões. Estes vários mecanismos metabólicos representam uma muito mais diversidade entre procariontes do que entre todos os animais. Os procariontas apresentam ainda uma capacidade de utilização de fontes diversificadas de energia inorgânica (como iremos estudar posteriormente), que os animais não têm, e que as plantas apresentam de forma limitada (utilizando a energia solar através da fotossíntese. Os procariontas apresentam uma variedade de vias metabólicas quimiosintetizantes e fotossintetizantes.

Estas pequenas células – em particular os procariontas – são na realidade consideradas reservatórios-chave de nutrientes essenciais à vida e são ainda responsáveis por grande parte das transformações dos ciclos de nutrientes no ambiente.

### ***Microorganismos e os seus ambientes naturais***

Os microrganismos, como é próprio de qualquer ser vivo, são **sistemas abertos**, e assim vivem em associação, e interagindo, com outros organismos e com o meio em que estão inseridos.

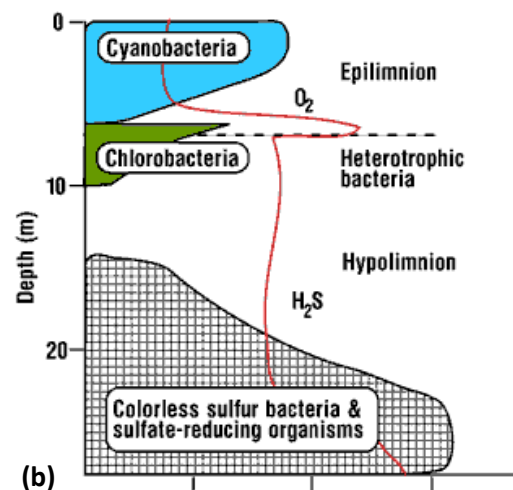
No meio ambiente, os microrganismos encontram-se formando **populações microbianas**, compostas por grupos de células da mesma espécie de microrganismo,

geralmente provenientes de uma única célula parental, através de sucessivas divisões celulares. Estas populações celulares vivem em **habitats**. Cada habitat, ou **microhabitat**, como é o caso da escala microbiológica em que nos encontramos, é caracterizado por um conjunto de condições físicas e químicas (entre os quais nutrientes) que é, por sua vez, influenciado pela presença dos organismos que aí se encontram (utilizando nutrientes e nele libertando compostos do seu metabolismo).

Em ambientes naturais, i.e. na natureza, estas populações de microrganismos geralmente coexistem com populações de outros microrganismos, com as quais interagem, formando **comunidades**.

Em ambientes artificiais, como em condições laboratoriais, as populações de microrganismos podem cultivadas em **cultura pura**, formando uma população de microrganismos, geralmente clones resultantes de divisões sucessivas de uma única célula, e portanto geneticamente semelhantes.

As comunidades microbianas podem ser comunidades sésseis (formas planctónicas), como aquelas presentes nas colunas de água de lagos ou do oceano, ou comunidades em biofilmes (aderentes a substratos sólidos) como os que se formam nas superfícies rochosas ou do sedimento em rios ou na superfície dos nossos dentes (Fig.1).



**Figura 1 – (a)** Placa nos dentes: neste biofilme, o consórcio de bactérias pode atingir a espessura de 300-500 células na superfície dentária. **(b)** Distribuição vertical de bactérias na coluna de água de um lago.

Cyanobacteria	1	2	$3 \times 10^4$
Chlorobacteria	0.5	1	$1.5 \times 10^6$
Heterotrophic bacteria	0.5	1	$1.5 \times 10^6$
Sulfur bacteria & sulfate reducers	1	2	$3 \times 10^6$

Naturalmente que o estabelecimento de uma população, ou comunidade microbiana, depende das condições físicas e químicas do habitat (pois cada espécie de microrganismo apresenta requisitos específicos de nutrientes, pH, temperatura, etc.). O estabelecimento dessas comunidades microbianas, num determinado habitat, irá por sua vez, influenciar as condições físicas e químicas desse habitat, quer mantendo-as quer alterando-as, sempre como ação dos seus processos fisiológicos e metabólicos. Falamos, assim, geralmente de **ecossistemas microbianos**, referindo-nos ao conjunto interatuante – comunidade microbiana e meio ambiente.

#### Caixa: Ecossistemas microbianos

Podemos definir ecossistema microbiano como o conjunto formado pelos microrganismos e o meio ambiente em que eles habitam, incluindo os diversos tipos de interações bióticas (simbiose, mutualismo, predação, etc.) e abióticas (com o meio físico e químico desse meio ambiente).

Os principais ecossistemas microbianos considerados são:

- (i) *Ecossistemas aquáticos*: incluem os ecossistemas em oceanos, lagos e lagoas, rios e fontes termais;
- (ii) *Ecossistemas terrestres*: incluem os ecossistemas em solos, em minerais e de zonas sub-superficiais.
- (iii) *Ecossistemas em organismos superiores*: incluem os ecossistemas em vegetais e em animais

## 2. Crescimento de uma população microbiana

A análise do crescimento dos microrganismos é um aspeto importante da microbiologia, incluindo a microbiologia ambiental. No passado foi dado grande ênfase ao estudo do crescimento de populações constituídas por uma única espécie microbiana. É atualmente óbvio que na natureza a maior parte dos microrganismos existe e coexiste com outras espécies microbianas. Assim, o estudo da dinâmica de populações microbianas deverá contemplar este duplo objetivo. Nesta seção, pelo seu carácter introdutório à temática em questão, centramo-nos no estudo de populações microbianas constituídas por uma única espécie microbiana.

**Crescimento** de uma população é definido como o aumento do número de células dessa população. A **taxa de crescimento** da população microbiana corresponde à variação (aumento) do número de células por unidade de tempo. Existem diversos processos de quantificar (ou enumerar) o número de células de uma população microbiana, entre os quais se destacam (i) a contagem de número de células ao microscópio, (ii) a contagem de colónias (i.e. células viáveis) que se formam após espalhamento de uma alíquota de uma cultura de microrganismos (suspensão de células em meio líquido) numa superfície de meio sólido, e (iii) a quantificação da biomassa celular através da quantificação de componentes químicos celulares (partindo do princípio que a duplicação do número de células resulta na duplicação de todos os seus componentes químicos<sup>1</sup>). Este assunto será retomado e aprofundado posteriormente.

O crescimento de uma população microbiana e a taxa de crescimento que esta apresenta são influenciados pela genética microbiana (que “dita” as características fisiológicas e metabólicas de cada microrganismo) e pelas condições ambientais (físicas e químicas, incluindo os nutrientes). Quando em condições ambientais ótimas, o crescimento não é limitado e a taxa de crescimento será máxima. Contudo, em condições naturais, o crescimento de uma população microbiana apresenta limitações diversas mais ou menos restritas no tempo (ex. pH, temperatura, e nutrientes como o

---

<sup>1</sup> Este princípio não é matematicamente linear, pois a quantidade de determinadas biomoléculas depende de outros fatores, ex. estado fisiológico celular.

oxigénio), o que resulta em taxas de crescimento inferiores à taxa de crescimento máxima.

Relativamente ao crescimento microbiano, importa ainda definir o intervalo de tempo que medeia entre duas gerações microbianas consecutivas, designado por **tempo de geração** ou **tempo de duplicação** (uma vez que também corresponde ao tempo necessário para que uma população microbiana duplique o seu número de células). O tempo de geração é característico de cada microrganismo, embora também varie com as condições ambientais; significa isto que cada espécie (ou estirpe) de microrganismo apresenta um tempo de geração (ou de duplicação) que lhe é característico, e que varia de uma forma que também lhe é própria, em função das condições físicas e químicas do meio ambiente. A tabela 1 indica os tempos de duplicação de uma espécie bacteriana em função da temperatura.

**Table 1** Generation times of psychrotrophic *Pseudomonas* species during growth in food. Adapted from Snyder (1996).

Temperature		Generation time (h)	Food
°C	°F		
0	32	26.6	Dairy product
0	32	30.2	Fish
2.5	36.5	7.7	Dairy product
2.5	36.5	8.0	Chicken
2.5	36.5	13.8	Meat
4.5	40	11.7	Dairy product
4.5	40	6.7	Fish
4.5	40	5.0	Dairy product
10	50	5.4	Dairy product
10	50	2.6	Dairy product
10	50	2.7	Chicken
10	50	1.9	Fish

**Tabela 1.** Tempos de geração de uma espécie psicrotrófica de *Pseudomonas* durante o crescimento em alimentos. (Adaptado de Snyder, 1996).

## Representação gráfica do crescimento microbiano

O crescimento de uma população de microrganismos unicelulares, por exemplo bactérias, pode ser representado graficamente, em função do tempo (Fig. 2). Se considerarmos que o crescimento de uma célula bacteriana (i.e. o processo de fissão binária) dá origem a duas células, e que cada uma dessas células filhas originará, por sua vez, outras duas células, e por aí adiante (1), vemos que este crescimento corresponde a uma progressão geométrica que podemos expressar por uma função matemática a que designamos função exponencial, de base 2 (2).

$$1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 16 \rightarrow 32 \rightarrow 64 \rightarrow 128 \rightarrow \dots 2^n, \text{ em que } n \text{ indica o nº de gerações} \quad (1)$$

$$2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow 2^4 \rightarrow 2^5 \rightarrow \dots 2^n \quad (2)$$

Assim, podemos expressar o crescimento de uma população bacteriana por:

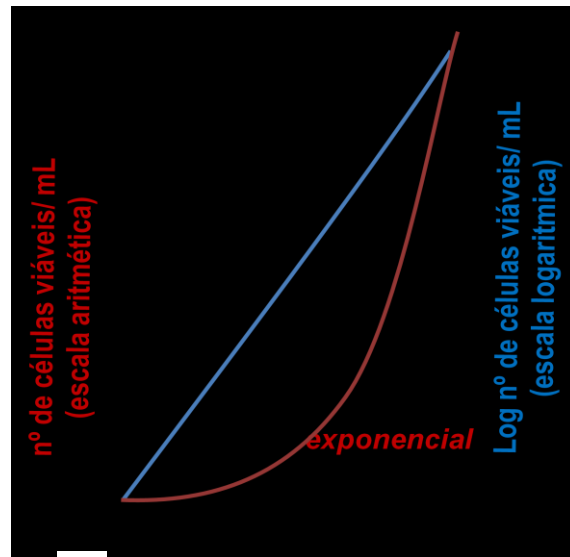
$$N_t = N_0 \cdot 2^n \quad (3)$$

onde  $N_t$  é o número de células bacterianas no momento  $t$ ,  $N_0$  é o número de células iniciais ( $t=0$ ) e  $n$  indica o número de gerações durante o período de tempo considerado.

Uma população de microrganismos com um crescimento que é modelado por uma expressão exponencial diz-se ter um **crescimento exponencial**. Se representarmos o aumento do número de células desta população, ao longo do tempo, num gráfico de coordenadas aritméticas, obtemos uma curva com inclinação crescente, semelhante àquela que se apresenta na Fig. 1. Neste tipo de gráfico é difícil obter informação que caracterize o crescimento da população. No entanto, se fizermos a representação dos dados de crescimento num gráfico *semilogarítmico* (com o número de células em escala logarítmica e tempo em escala aritmética), o gráfico resultante é uma função linear, o que possibilita de forma fácil o cálculo de parâmetros de crescimento e, assim, a caracterização do crescimento dessa população de microrganismos (Fig. 2).

Tempo (h)	nº células/mL
0	1
0,5	2
1	4
1,5	8
2	16
2,5	32
3	64
3,5	128
4	256
4,5	512
...	...
10	1 048 576

(a)



(b)

**Figura 2.** Representação do crescimento de uma população microbiana. **(a)** Dados tabelados de uma população que duplica a cada 30 min. **(b)** Gráficos de crescimento utilizando uma escala aritmética e em escala semilogarítmica.

### Parâmetros da cinética de crescimento microbiano

E como podemos parametrizar, em termos matemáticos, a taxa de crescimento e o tempo de duplicação de uma população em crescimento? Sabemos que o tempo de duplicação (ou tempo de geração) de uma população, que podemos designar por  $t_d$  (ou  $g$ ) é calculado, durante a fase de crescimento exponencial, como o *período de tempo decorrido* ( $t$ )/ *número de gerações* ( $n$ ) no tempo  $t$ , ou seja por  $t/n$ . Podemos, assim, calcular  $n$  pelo conhecimento do número de bactérias inicial e do número de bactérias ao tempo  $t$  (determináveis através de procedimento experimental, ex. contagem direta de células), através da expressão (3), e após a aplicação de algumas transformações matemáticas obtemos a expressão (4):

$$N_t = N_0 \times 2^n \quad (3)$$

$$\log N_t = \log N_0 + n \times \log 2$$

$$\log N_t - \log N_0 = n \times \log 2$$

$$n = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$$

$$n = (\log N_t - \log N_0) / 0,301$$

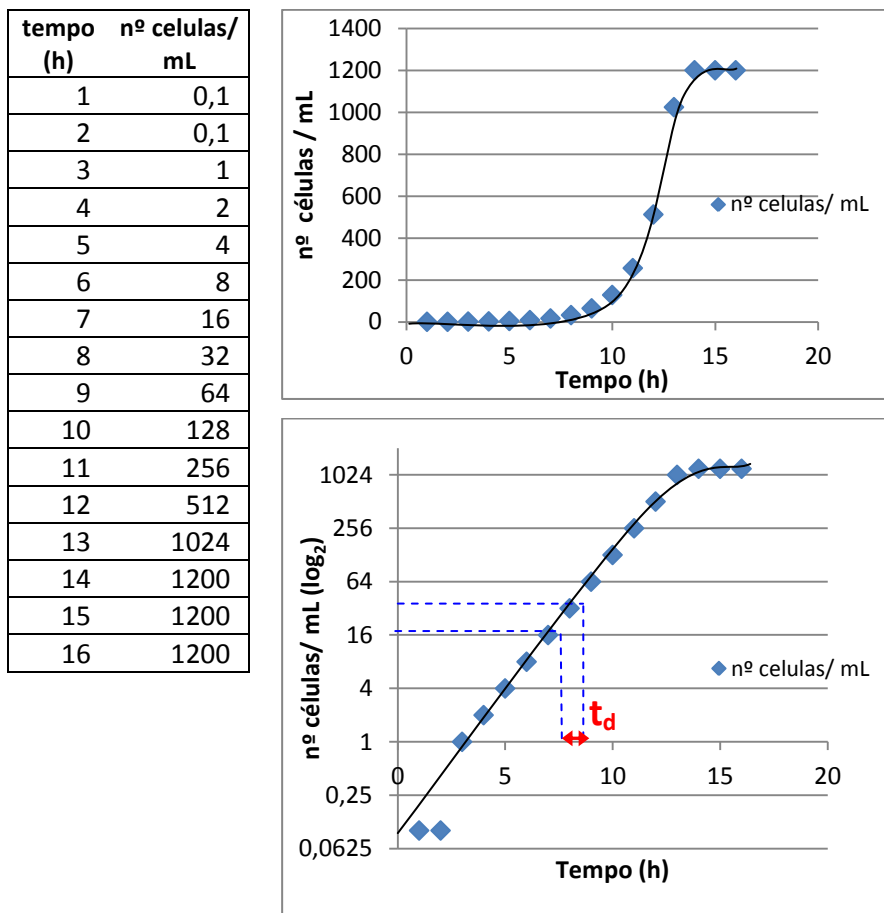
$$n = 3,3 \times (\log N_t - \log N_0) \quad (4)$$

Com esta expressão (4), e sendo  $N_t$  e  $N_0$  determinados experimentalmente, o tempo de duplicação pode ser calculado:

$$t_d = t/n$$

$$t_d = t / [3,3 \times (\log N_t - \log N_0)]$$

Uma forma alternativa de estimar o tempo de geração de uma população bacteriana, durante a sua fase de crescimento exponencial é ilustrado na Fig. 3.



**Figura 3.** Método para estimar o tempo de duplicação ( $t_d$ ) a partir de gráfico de crescimento de uma população microbiana representado em escala semilogarítmica. Na fase exponencial de crescimento, consideram-se dois pontos, no eixo dos Y, correspondentes ao número de células, em que um ponto seja o dobro do outro (acima foram escolhidos os pontos 16 e 32); os pontos são marcados no gráfico e determina-se o tempo correspondente para cada, no eixo dos X; a diferença entre os dois tempos dá-nos o tempo que demora a população a duplicar o seu nº de células. Neste caso, o tempo de duplicação ( $t_d$ ) ou tempo de geração ( $g$ ) é 1h.

Existe um outro parâmetro constante relacionado com a taxa de crescimento - **taxa específica de crescimento**, expresso pela letra grega  $\mu$  (ou por  $k$ ):

$$\mu = \ln 2 / t_d \quad (5)$$

$$\mu = 0,693 / t_d \quad (\text{dado que } \ln 2 = 0,693) \quad (6)$$

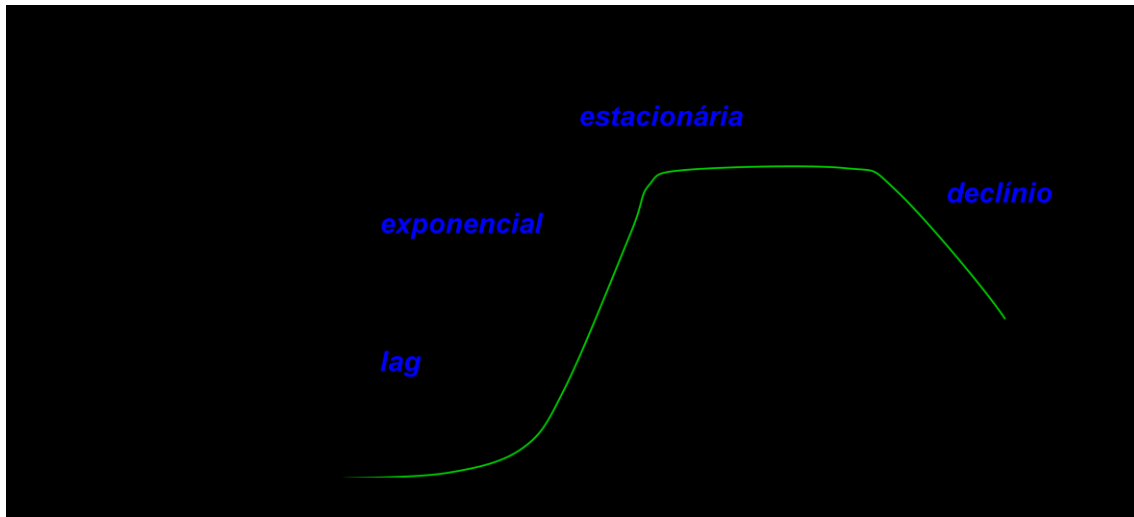
O **tempo de duplicação**,  $t_d$ , pode ser definido como o tempo necessário para uma população bacteriana duplicar o seu número de células. O  $t_d$  é expresso em unidades de tempo, ou seja em horas (h) ou minutos (min).

A taxa específica de crescimento,  $\mu$ , pode ser definida como uma medida do número de gerações formadas numa população em crescimento exponencial, por unidade de tempo. Esta constante  $\mu$  é expressa em gramas de biomassa formada, por biomassa existente, e por unidade de tempo ( $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), sendo geralmente simplificada para unidade recíprocas de tempo ( $\text{h}^{-1}$ ).

Estes dois parâmetros cinéticos do crescimento de uma população bacteriana são importantes, por exemplo, em estudos de caracterização de espécies ou estirpes de microrganismos, ou na avaliação dos efeitos de diferentes condições ambientais (*e.g.* tratamentos de controlo) sobre o crescimento dos microrganismos.

### **Ciclo de crescimento microbiano**

Nas seções anteriores estudamos o crescimento microbiano em condições ótimas de crescimento, durante a fase de crescimento exponencial. O crescimento microbiano é, no entanto, geralmente limitado por uma diversidade de condicionantes que resultam em ciclos de crescimento como o ilustrado na Fig. 4. Nesta curva de crescimento identificam-se **4 fases de crescimento**: fase *lag* (de latência ou de arranque), fase exponencial, fase estacionária, fase de declínio (ou de morte).



**Figura 4.** Curvas de crescimento de uma população bacteriana em condições laboratoriais. A curva traçada a verde foi feita tendo por base determinações de números de células viáveis (ex. contagem de colónias em meio sólido); a curva traçada a preto foi feita com base em determinações de densidade ótica.

A **fase de latência ou lag** corresponde à fase inicial de crescimento em que as células adaptam o seu metabolismo ao novo meio de cultura, sintetizando macromoléculas tais como os componentes dos ribossomas necessárias à síntese de proteínas e enzimas necessárias durante a divisão celular, aumento de volume e iniciando a divisão celular. A duração desta fase varia com a condição em que se encontra o microrganismo e com a natureza do meio.

A **fase exponencial** corresponde à fase em que as bactérias se dividem a uma taxa máxima, constante, sendo o tempo de geração também constante. A velocidade de divisão de uma dada bactéria depende das condições ótimas para cada organismo, tais como fatores nutricionais, pH, temperatura e composição do meio.

A **fase estacionária** corresponde à fase em que o crescimento populacional exponencial cessa e em que o número de células resultantes da multiplicação iguala o número de células que morre, normalmente devido à falta de um composto ou elemento necessário ao seu metabolismo. Esta fase é geralmente atingida quando a população bacteriana se aproxima de  $10^9$  células por ml. Os protozoários atingem concentrações máximas de  $10^6$  células por ml.

A **fase de morte ou de declínio** corresponde à fase em que o número total de células viáveis decresce e aumenta o número de células que morre, terminando por ocorrer lise celular.

### 3. Efeitos ambientais no crescimento microbiano

O crescimento dos microrganismos é muito influenciado por factores físicos e químicos do meio ambiente (ex. pH, temperatura, disponibilidade de água, nutrientes). Conhecimento destes e do modo como afetam o crescimento microbiano possibilita por um lado a compreensão da distribuição ecológica dos microrganismos e por lado ajuda ao seu controlo, quando necessário.

A maioria dos microrganismos ocorre em condições “moderadas”, no entanto a capacidade de alguns, em particular das bactérias, para a adaptação e crescimento em condições extremas é notável. Microrganismos que vivem a pressões superiores a 1 atm, nas profundidades dos oceanos, ou a pH de 1 e temperaturas perto da ebulição da água, nas sulfataras, dizem-se *extremófilos*.

#### Água

A água líquida é essencial para todos os processos bioquímicos. Para os microrganismos o fator crítico, mais do que o total de água de um sistema, é a quantidade de água disponível nesse sistema que pode ser reduzida, por exemplo por interação com moléculas do soluto ou por absorção às superfícies. A atividade da água é uma medida da quantidade de água disponível para um sistema.

A atividade da água ( $a_w$ ) de uma solução é definida como 1/100 da sua humidade relativa (expressa como percentagem); é equivalente à razão entre a pressão de vapor da solução ( $P_{sol}$ ) e a da água pura ( $P_{água}$ ):

$$a_w = P_{sol} / P_{água} \quad (7)$$

A atividade da água de uma solução pode ser determinada selando-a numa câmara e medindo a humidade relativa depois de o sistema estar em equilíbrio. Por definição a  $a_w$  de água destilada (ou pura) é 1. Para uma humidade relativa medida de 95%,

diríamos que o ar se encontra 95 % saturado e que a atividade da água é 0,95. A atividade da água é inversamente relacionada com a pressão osmótica.

Quando um microrganismo é colocado numa solução, e devido à permeabilidade seletiva da sua membrana plasmática, as diferenças de concentração dos diversos solutos entre o interior e exterior da célula vão implicar o estabelecimento de uma pressão no sentido de que se atinja um equilíbrio osmótico. Quando um microrganismo é colocado numa *solução hipotónica* (de concentração osmótica inferior relativamente àquela no interior do microrganismo) a água entra para diluir o meio celular *hipertónico* e estabelecer um equilíbrio osmótico (ver animação [1](#)<sup>2</sup>). Este processo leva ao *turgimento* da célula e eventualmente ao seu rebentamento. Como a maioria dos microrganismos possui paredes celulares rígidas (ex. maioria das bactérias, fungos e algas), a pressão exercida pelas paredes limita a entrada de água e as células não rebentam. Para além disso, muitas bactérias sintetizam e acumulam *solutos compatíveis* (compostos compatíveis com o metabolismo e crescimento celular mesmo em elevadas concentrações) como os aminoácidos (ex. prolina, ácido glutâmico) com a fim de estabelecer o equilíbrio osmótico com o meio envolvente. Algas e fungos acumulam sacarose e polióis (ex. arabitol, glicerol, manitol) com o mesmo fim. Os protozoários que não possuem paredes celulares rígidas usam vacúolos contrácteis para eliminar o excesso de água no interior da célula, quando habitam zonas hipotónicas.

Quando o microrganismo é colocado num habitat hipertónico, a água terá tendência a sair da célula que assim fica *plasmolisada*, e eventualmente morre. Um microrganismo para crescer num habitat de reduzida  $a_w$  gasta energia celular para manter as concentrações de solutos internas elevadas, de modo a reter água.

A maioria dos microrganismos necessita condições com  $a_w$  superior a 0,96 para manter o metabolismo ativo, e preferencialmente superior a 0,98 (valor de  $a_w$  aproximado do da água do mar). É por esta razão que secar alimentos ou adicionar grandes quantidades de açúcar ou de sal são métodos utilizados para impedir a deterioração dos alimentos, uma vez que a adição de sal e açúcar baixa a disponibilidade de água

---

<sup>2</sup> <http://people.eku.edu/ritchison/RITCHISO/osmosis3.gif>

( $a_w$ ). No entanto, alguns fungos filamentosos e líquenes são capazes de crescer em condições de  $a_w$  de 0,60; estes microrganismos são *xerotolerantes*. A capacidade de adaptação dos microrganismos a *habitats* com baixos valores de  $a_w$  é efetivamente muito variável (Tabela 2).

**Tabela 2 .** Valores limites de  $a_w$  para crescimento microbiano

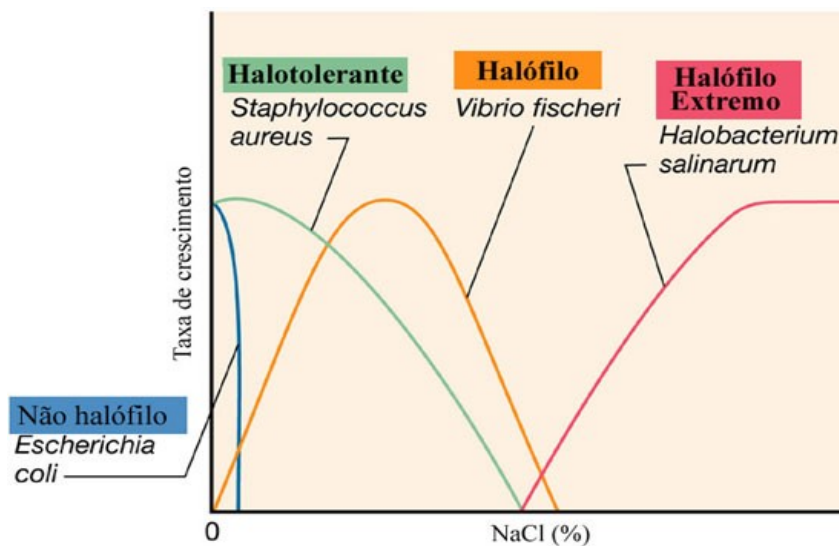
Atividade da água ( $a_w$ )	Meio	Bacteria	Fungi	Algae
1,0	Sangue Água do mar Vegs, carne, fruta	Maioria das gram-negativas não-halófilas		
0,95	Pão	Maioria dos bastonetes gram-positivos	<i>Basidiomycetes</i>	Maioria das algas
0,90	Presunto	Maioria dos coccus <i>Lactobacillus</i> <i>Bacillus</i>	<i>Fusarium</i> <i>Mucor</i>	
0,85	Salame	<i>Staphylococcus</i>	<i>Debaromyces</i>	
0,80	Conservas		<i>Penicillium</i>	
0,75	Lagos salgados Peixe em salmoura	<i>Halobacterium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Dunaliella</i>
0,60	Mel Leite desidratado		<i>Xeromyces bisporus</i>	

Relativamente ao efeito de  $a_w$ , os microrganismos podem ainda classificar-se como *xerofilicos* (organismos que crescem melhor a baixos valores de  $a_w$ , podendo não ser capazes de o fazer a valores de  $a_w$  elevados) e *osmotolerantes* (organismos que crescem numa larga amplitude de valores de  $a_w$  ou de concentrações de soluto).

Um caso particular são os microrganismos *halófilos* que apenas conseguem viver em condições salinas (*i.e.* meios com concentração elevada de NaCl). Os microrganismos apresentam diferentes tolerâncias ou necessidades de sal (Fig. 5), na forma de ião  $\text{Na}^+$ , e podem ser classificados em:

- *não halófilos*;

- *halófilos* que apenas conseguem viver em condições salinas (*i.e.* meios com concentração elevada de sal, ex. 3 % NaCl, característico de ambientes marinhos);
- *halófilos extremos*, em que a concentração ótima de NaCl exterior varia entre 15 – 30 % (podem acumular quantidades enormes de potássio (K<sup>+</sup>) para manterem as células hipertónicas relativamente ao ambiente exterior, ex. 4 a 7 M). Os seus enzimas, ribossomas, proteínas de transporte, etc. necessitam destas elevadas concentrações de potássio para a sua estabilidade e atividade;
- *halotolerantes*, toleram um certo grau de sal (*i.e.* redução de  $a_w$  ambiental) mas apresentam o crescimento ótimo na sua ausência.



**Figura 5.** Classificação de microrganismos em função da sua relação com a salinidade.

### Acidez e pH

O pH é uma medida da atividade do ião H<sup>+</sup> de uma solução e define-se como:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] = \log (1/ [\text{H}^+]) \quad (8)$$

A escala de pH estende-se entre pH 0 (1 M H<sup>+</sup>) e pH 14 (1x10<sup>-14</sup> M H<sup>+</sup>).

Cada espécie de microrganismo tem a sua amplitude e um valor ótimo de pH para o crescimento. Em função destes valores, definimos:

- *acidófilos*: microrganismo de  $\text{pH}_{\text{opt}} = 0 - 5,5$  (ex. maioria dos fungos e algas prefere habitats levemente ácidos (pH 4-6); casos extremos são encontrados

nas águas de efluentes ácidos provenientes de minas, como o género *Thiobacillus*);

- *neutrófilos*:  $pH_{opt} = 5,5 - 8,0$  (ex. maioria das bactérias e protozoários);
- *alcalófilos*:  $pH_{opt} = 8,5 - 11,5$ ;
- *alcalófilos extremos*:  $pH_{opt} > 10$ .

Os microrganismos apresentam uma grande tolerância em termos de amplitude de pH, o que se deve ao facto de serem capazes de manter o seu pH interno inalterado, perto da neutralidade. Quando o pH interno desce abaixo de um dado valor os microrganismos morrem (ex. a maioria das bactérias morre quando o seu pH interno desce abaixo de 5,0-5,5). Os efeitos de extremos de pH externo sobre os microrganismos incluem (i) a desintegração da membrana plasmática, (ii) a inibição de atividade de enzimas e de transportadores de membrana e desnaturação proteica e (iii) o efeito sobre o estado de dissociação e solubilidade de muitas moléculas, como por exemplo os nutrientes (como  $CO_2$ ) que indiretamente influenciam o metabolismo dos microrganismos.

Entre os mecanismos de manutenção do pH celular presentes em microrganismos salientam-se a existência de (i) uma membrana plasmática relativamente impermeável a prótons e de (ii) uma elevada capacidade tampão interna do citoplasma. Para além destes mecanismos, nos microrganismos neutrófilos foi descrito um sistema de antiporte com bombas iónicas (transportadores membranares de iões) que trocam potássio por prótons ( $H^+$ ), e nos microrganismos alcalófilos extremos foi descrito um sistema de troca de iões internos potássio por iões externos  $H^+$ .

Nas bactérias, pequenas variações de pH podem ser “resolvidas” pelo funcionamento de sistemas de antiporte  $Na^+/H^+$  e  $K^+/H^+$ . No entanto, grandes variações de pH implicam a necessidade de funcionamento de outros sistemas. *Salmonella typhimurium* e *E. coli* sintetizam uma série de novas proteínas quando expostas a pH externo inferior a 5,5-6,0, e possuem uma ATPase translocadora de  $H^+$  que poderá sintetizar mais ATP ou transportar  $H^+$  para o exterior da célula. A pH externo inferior ou igual a 4,5 são sintetizadas *proteínas de choque ácido* ou *proteínas de choque térmico*, cuja possível função é impedir a desnaturação de proteínas celulares e ajudar

à renaturação de proteínas desnaturadas. Os próprios microrganismos alteram frequentemente o pH do meio externo produzindo compostos (ex. ácidos gordos) ou compostos básicos (ex. amónia) como resultado do seu metabolismo.

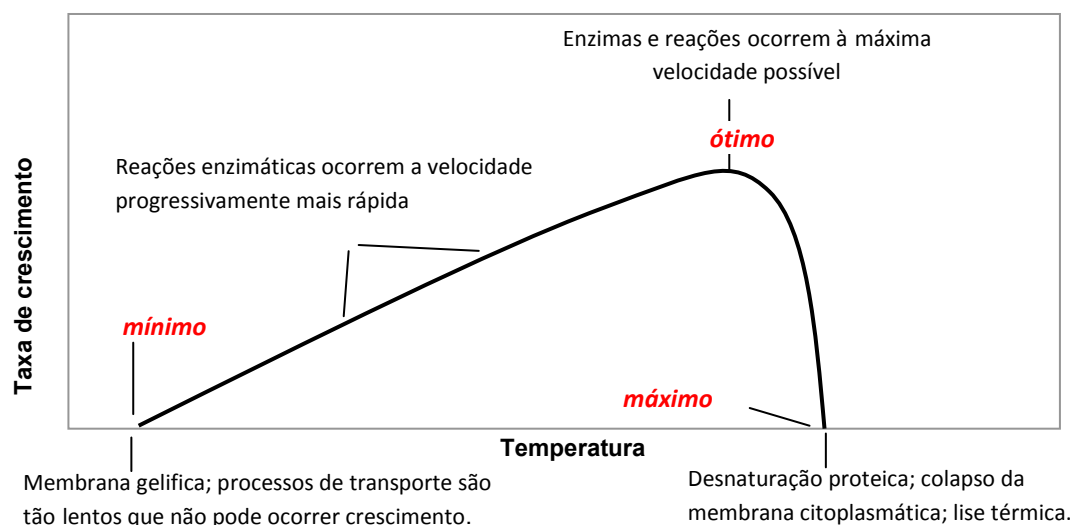
### Temperatura

A temperatura afeta profundamente os microrganismos, tal como todos os outros seres vivos. Na realidade, os microrganismos são particularmente suscetíveis a este fator dado que são geralmente unicelulares e poiquilotérmicos. Assim, a temperatura de uma célula microbiana reflete diretamente a temperatura do meio exterior.

A temperatura afeta o crescimento por (i) afetar as reações catalisadas por enzimas e (ii) afetar a funcionalidade e estrutura dos sistemas membranares. De um modo geral, a “baixas temperaturas”, um aumento de temperatura resulta num aumento da taxa de crescimento ( $\Delta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  resulta na duplicação de taxa de crescimento) devido a um aumento da atividade metabólica. A partir de dada temperatura, o crescimento desacelera e as consequências podem ser letais.

As temperaturas elevadas desnaturam proteínas como enzimas, transportadores de membrana, hormonas, proteínas estruturais, etc. e levam à desintegração das membranas lipídicas.

Para cada microrganismo definem-se temperaturas máximas, ótimas e mínimas de crescimento que no seu conjunto designamos por *temperaturas cardinais* (Fig. 6). Estas temperaturas não são fixas e variam com outros fatores ambientais como por exemplo pH e nutrientes.



**Figura 6.** Efeito da temperatura sobre o crescimento celular em microrganismos.

Em função das temperaturas cardinais, os microrganismos designam-se (Fig. 7):

- *psicrófilos* –  $T_{opt} \leq 15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{máx} \sim 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (ex. habitats Árticos e Antárticos, algas e bactérias)

Adaptações: (1) proteínas – enzimas, sistemas de transporte, mecanismo de síntese proteica - funcionam bem a baixas temperaturas; (2) membranas celulares com ácidos gordos com grau de insaturação elevado; a temperatura  $\geq 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  dá-se desintegração das membranas.

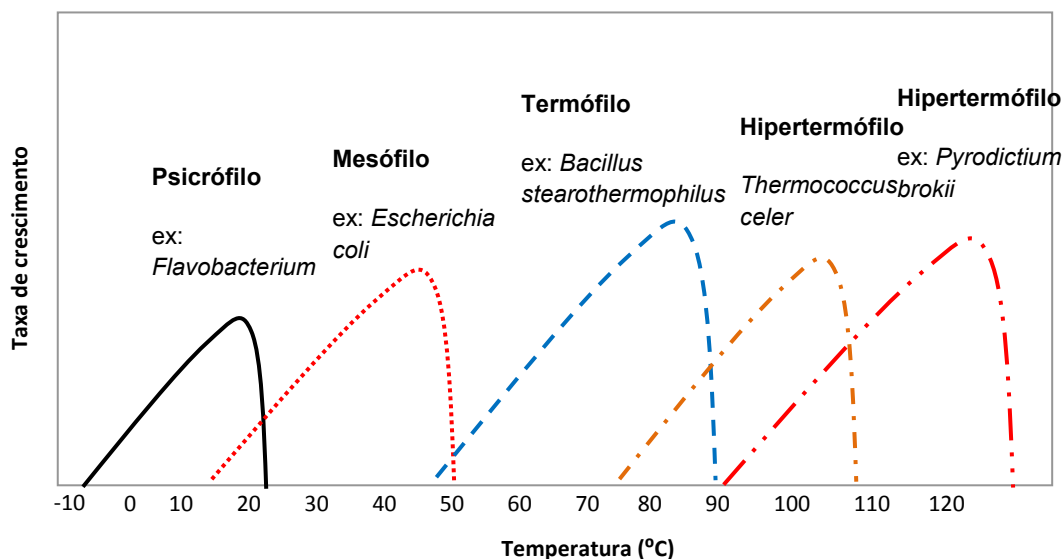
- *psicrófilos facultativos (psicrotrófos)* -  $T_{opt} \sim 20\text{-}30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{máx} \sim 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (ex. bactérias e fungos causadores de deterioração de alimentos)

- *mesófilos* -  $T_{opt} \sim 20\text{-}45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{máx} \leq 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$

- *termófilos* -  $T_{opt} \sim 55\text{-}65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{min} \geq 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (ex. geralmente bactérias, embora também alguns fungos e algas)

Adaptações: (1) proteínas – enzimas, sistemas de transporte, mecanismo de síntese proteica - termoestáveis, (2) membranas com lípidos de membrana com elevado grau de saturação e pontos de fusão mais elevados que outros microrganismos.

- *hipertermófilos* -  $T_{opt} \sim 80\text{-}113 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{min} \leq 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (ex. *Archaea* nos fundos marinhos).



**Figura 7.** Classificação de microrganismos em função da relação entre temperaturas cardinais e taxa de crescimento do microrganismo.

## **Potencial redox (Eh)**

O potencial redox (Eh) de um sistema é uma medida do potencial de redução ou de oxidação desse sistema; indica a proporção de constituintes oxidados para reduzidos do sistema. O Eh é um valor relativo, medido contra um valor zero, arbitrário, do eletrodo de H<sub>2</sub>. Qualquer sistema que receba eletrões de um eletrodo de H<sub>2</sub> define-se como tendo um valor de Eh positivo; qualquer sistema que dê eletrões para um eletrodo de H<sub>2</sub> define-se como tendo um valor negativo de Eh.

Muitas reações enzimáticas são reações de oxidação-redução (em que um composto é oxidado e outro reduzido). Consequentemente a atividade dos microrganismos depende do Eh do ambiente.

Um valor de Eh positivo indica que o sistema favorece as reações de oxidação, enquanto que um sistema de valor muito negativo de Eh indica que o sistema favorece reações de redução. Microrganismos aeróbios apenas são metabolicamente ativos em Eh positivos, enquanto que anaeróbios só são ativos em Eh negativos. Anaeróbios facultativos são metabolicamente ativos em habitats de grande amplitude de Eh, utilizando o O<sub>2</sub> como aceitador de eletrões a Eh elevados, e fermentando ou utilizando outros aceitadores eletrónicos, como o Fe(III) ou nitrato, em condições de Eh baixo. É de notar que em habitats naturais a heterogeneidade e os valores de Eh variam muito à escala do microhabitat.

O Eh afeta também a forma e a solubilidade de alguns nutrientes. Por exemplo, a Eh elevados, Fe e Mn, existem nas formas trivalente e tetravalente, respetivamente, ambas insolúveis e geralmente indisponíveis para os microrganismos. As formas bivalentes, e solúveis, destes elementos existem em condições de Eh baixo.

A presença ou ausência de O<sub>2</sub> afecta o Eh. Ambientes em equilíbrio com O<sub>2</sub> apresentam Eh de +800 mV, enquanto que ambientes com pouco O<sub>2</sub> apresentam valores inferiores de Eh. Por exemplo em habitats de grande atividade de microrganismos heterotróficos, e devido ao consumo de O<sub>2</sub> por parte destes, o Eh é baixo.

## Nutrientes

Os nutrientes como carboidratos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerais e água, são necessários para todos os metabolismos celulares. Os microrganismos diferem na sua capacidade de utilizar *substratos*, como fonte desses nutrientes. Essa capacidade diferencial do seu metabolismo - constituído pelos seus sistemas enzimáticos – é ditada pelo seu código genético celular.

### Compostos orgânicos

A matéria orgânica de um ecossistema é frequentemente o fator limitante de crescimento de microrganismos heterotróficos. Compostos orgânicos específicos favorecem o crescimento de populações microbianas com determinadas atividades metabólicas. Por outro lado, há microrganismos cuja fisiologia e metabolismo necessitam de elevadas concentrações de compostos orgânicos (organismos *copiotróficos*), enquanto que outros apenas se desenvolvem e crescem em concentrações diminutas de compostos orgânicos (organismos *oligotróficos*).

Para além de nutrientes, os compostos orgânicos podem também ser inibidores ou tóxicos para os microrganismos. Por exemplo os ácidos carboxílicos, álcoois e compostos fenólicos, produtos de metabolismo excretados pelos microrganismos, são potencialmente tóxicos para os mesmos.

### Compostos inorgânicos

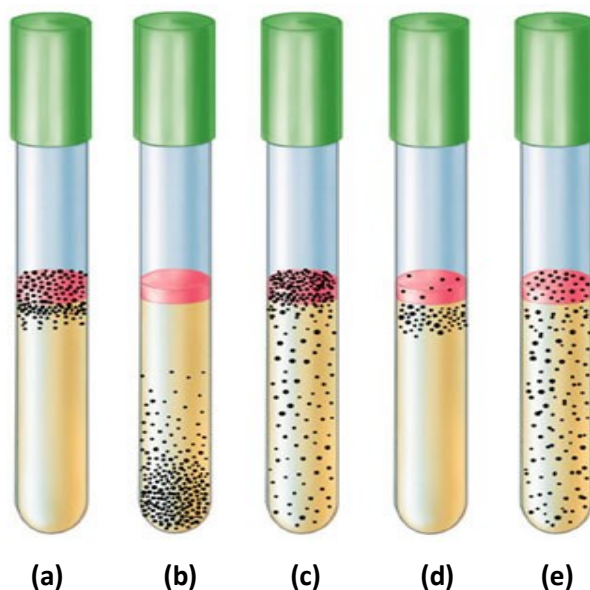
Muitos compostos inorgânicos são nutrientes essenciais para os microrganismos. Contudo muitos existem que são tóxicos. Em geral, a forma química do elemento, que pode depender das condições ambientais, dita se este funciona como nutriente ou como inibidor para o crescimento do microrganismo.

Compostos inorgânicos importantes para os microrganismos incluem: os gases oxigénio (O<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO), hidrogénio (H<sub>2</sub>), azoto (N<sub>2</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S); o enxofre elementar; os catiões NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Si, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Bo, Co, Cu<sup>2+</sup>, Mn, Mo, Vn, Ni, Zn<sup>2+</sup>, Hg, Cd e Pb; os aniões fosfato, carbonato, bicarbonato, sulfureto, sulfato, nitrito, nitrato, cloreto, clorato, brometo, fluoreto, silicato, selenito e arsenato. Os metais pesados, em

particular, são elementos essenciais em concentrações vestigiais e tornam-se tóxicos e inibitórios para o crescimento em concentrações relativamente baixas.

### *Oxigénio e suas formas reativas*

Para além da sua importância nos processos respiratórios, como aceitador final de eletrões para organismos aeróbios, o oxigénio - e como agente oxidante - apresenta também diferentes graus de toxicidade dependendo da forma química em que se apresenta ( $O_2$ , radical de oxigénio, anião superóxido) e do microrganismo em causa. O oxigénio é um composto potencialmente letal para os microrganismos pois leva à produção de peróxidos e de radicais livres de oxigénio (ex.  $O_2^-$ ) que danificam o funcionamento celular. Alguns microrganismos possuem enzimas (como a superóxido dismutase, a catálase e a peroxidase) que decompõe os compostos de oxigénio, tornando-os desta forma inócuos para o seu metabolismo. Em função do conjunto de enzimas que degradam os composto de oxigénio e da sua atividade específica (a atividade da enzima pode variar em função da espécie de microrganismo), os microrganismos são mais ou menos inibidos pela sua presença. Assim, os microrganismos podem ser caracterizados em função da sua relação com o oxigénio como aeróbios, anaeróbios, anaeróbios facultativos, microaerófilos e anaeróbios aerotolerantes (Fig. 8).



**Figura 8.** Classes de organismos, em relação à tensão de oxigénio. Tubos de meio de crescimento sólido, contendo o corante rezasurina que é adicionado como indicador redox e apresenta uma coloração rósea (quando oxidado) ou transparente (quando reduzido). O ponteados preto indica o crescimento microbiano: (a) *aeróbio*, (b) *anaeróbio*, (c) *anaeróbio facultativo*, (d) *microaerófilo* e (e) *anaeróbio*

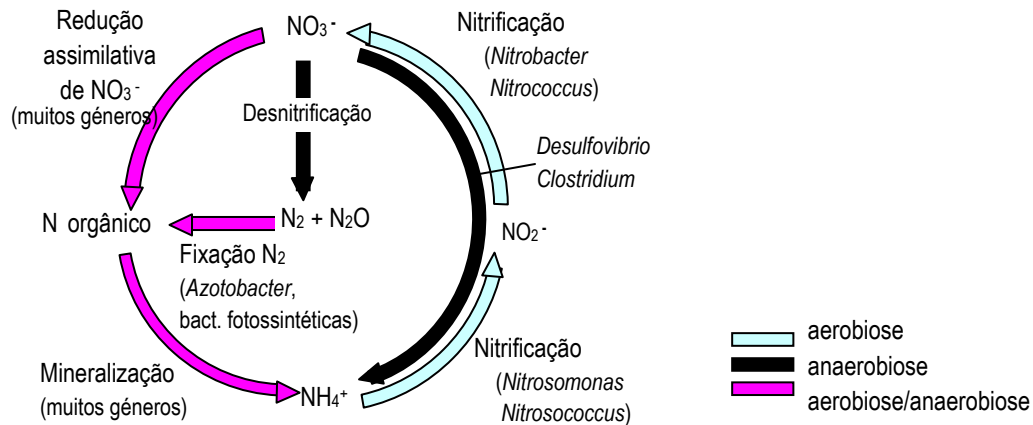
## Carbono

O carbono é um dos nutrientes essenciais, predominantes em todas as formas de vida, constituindo cerca de 50 % da biomassa seca. As suas fontes podem ser orgânicas (microrganismos com metabolismo heterotrófico) ou inorgânicas (microrganismos com metabolismos autotróficos). O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é necessário tanto para metabolismo autotrófico como heterotrófico. Pode estar disponível em solução na forma de carbonato ou bicarbonato. O monóxido de carbono (CO) é em geral um composto inibitório para o crescimento microbiano, embora um número restrito de microrganismos consiga metabolizá-lo.

## Azoto

O azoto constitui cerca de 14 % da biomassa seca. As suas fontes são diversas podendo ser compostos orgânicos, sais de amónia, nitratos ou mesmo o azoto molecular.

O azoto é essencial para todas as formas de vida, sejam elas micro ou macro, como parte integrante dos aminoácidos, ácidos nucleicos e em vários coenzimas. Para a maior parte dos microrganismos o azoto é um gás inerte ( $\text{N}_2$ ). O único grupo de organismos que é capaz de fixar  $\text{N}_2$  e convertê-lo em formas combinadas de azoto ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) é precisamente um grupo de microrganismos - *bactérias fixadoras de azoto*. Para além da sua importância na síntese de proteínas, o ião amónio ou nitrito são oxidados por alguns grupos de microrganismo quimiolitotróficos para a produção de energia. O nitrato é também utilizado como aceitador terminal de eletrões por alguns microrganismos (num processo de respiração anaeróbia), o que resulta na libertação de  $\text{N}_2$  para a atmosfera. Note-se assim a importância dos microrganismos no ciclo do azoto, incorporando, disponibilizando e reciclando um elemento essencial para todos os organismos vivos (Fig. 9).



**Figura 9.** Ciclo biogeoquímico do azoto ilustrando a participação essencial de alguns procariontas nas suas diversas reações.

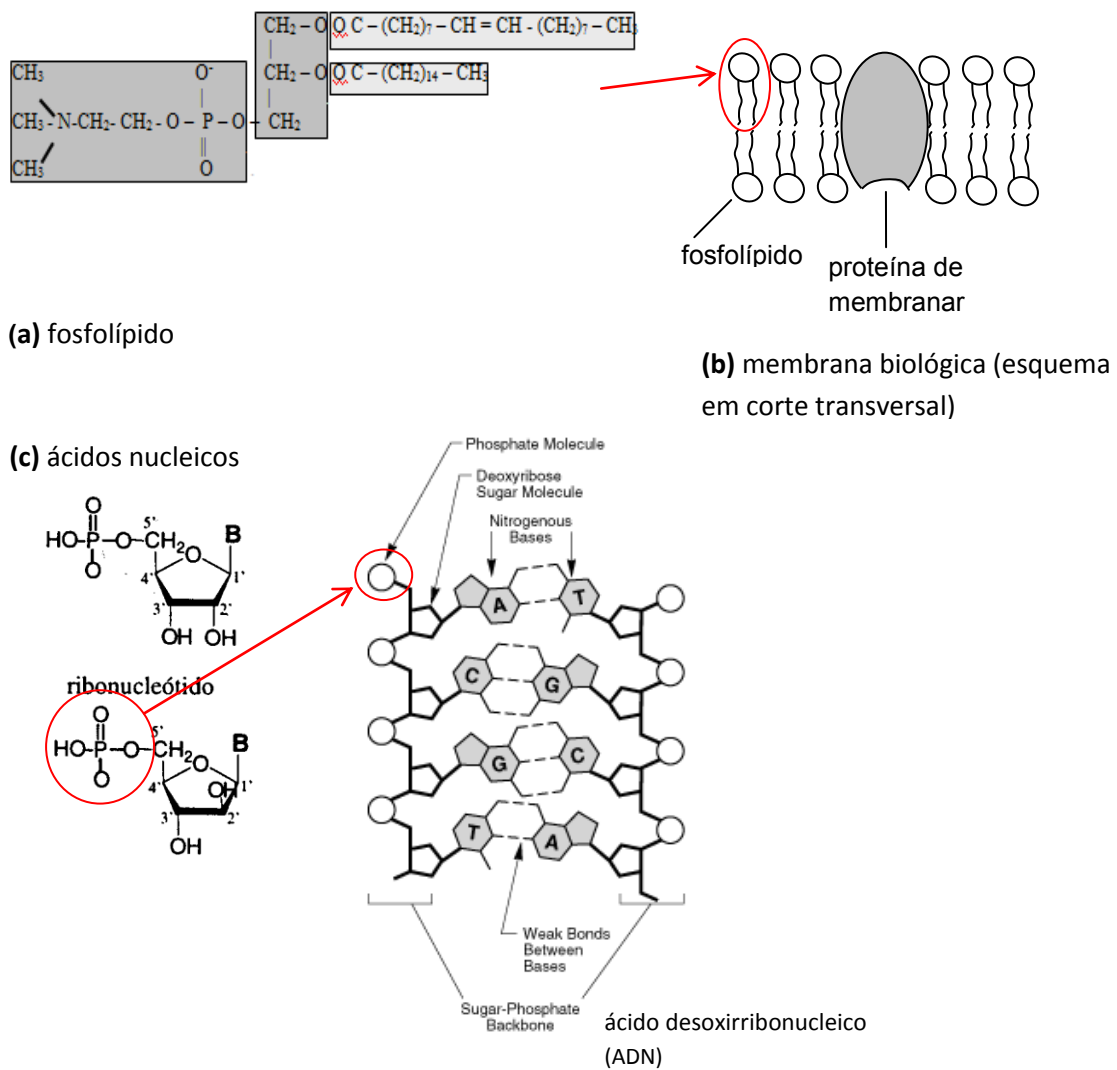
### Fósforo

O fósforo é um nutriente essencial, componente dos nucleótidos, que servem quer para armazenamento de energia celular (ATP, ADP, AMP) quer para a síntese de ácidos nucleicos constituintes do ADN e do ARN. O fósforo é ainda essencial para a síntese dos fosfolípidos de membrana (Fig. 10). Elevadas concentrações podem, no entanto, inibir o crescimento microbiano.

### Enxofre

Os microrganismos necessitam de enxofre inorgânico para a síntese de proteínas (como constituinte dos aminoácidos metionina e cisteína) e como constituinte de vários coenzimas. O enxofre, na forma de sulfureto de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), é utilizado por bactérias fotoautotróficas como dador de eletrões.  $\text{H}_2\text{S}$  é também libertado por numerosos microrganismos como produto do metabolismo proteico.

Algumas formas oxidadas de enxofre, como dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) são tóxicas para os microrganismos, sendo por vezes utilizadas como agentes desinfetantes.



**Figura 10.** Importância do nutriente fósforo nas estruturas biológicas.

### Outros elementos

O ferro (Fe) é um componente do centro ativo de numerosas proteínas, como os citocromos. A disponibilidade do ferro para utilização pelos microrganismos varia com o seu estado de oxidação ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ ) o qual depende do pH e do Eh do meio.

O cloro (Cl) é necessário para a manutenção da função membranal. O cloreto e o hipoclorito são, no entanto, tóxicos para os microrganismos, sendo o hipoclorito frequentemente usado como desinfetante na água potável.

A sílica (Si) é um componente das paredes celulares de microrganismos como as diatomáceas, os silicoflagelados e os radiolários.

## **BIBLIOGRAFIA**

Atlas, R. M. & Bartha, R. (1993) *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications*, 3<sup>a</sup> Ed, The Benjamin / Cummings Pub Co, Inc.

Chapman, A. D. (2009). *Numbers of Living Species in Australia and the World* (2nd ed.). Canberra: Australian Biological Resources Study. pp. 1–80. ISBN 9780642568618(<http://www.environment.gov.au/node/13875>).

Gans, J., et al. (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil, *Science*, v. 309, p. 1387-1390.

Lambais, M.R. et al. (2006) Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest, *Science*, v. 312, p. 1917.

Madigan, M.T., Martinko; J.M. & Parker, J. (2010) *Microbiologia de Brock*, 10<sup>a</sup> Ed, Perason/Prentice Hall.

Prescott, L., Harley, J. P. & Klein, D.A. (1999) *Microbiology* 4th Ed, WCB/ McGraw-Hill Co.

Snyder, O.P. (1996) Use of time and temperature specifications for holding and storing food in retail food operations, *Dairy Food Environ. Sanita.*, 16: 374–388.