

121

SÉRIE Tecnologia Ambiental

Introdução ao cultivo de microrganismos utilizados na biolixiviação de minérios

**Luis Gonzaga Santos Sobral
Andriela Dutra Norberto de Oliveira
Amandha Gomes Tavares de Miranda
Naiara Soares Bello**

CETEM 45
CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL



SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

**Introdução ao cultivo de microrganismos utilizados na
biolixiviação de minérios**

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Luciana Santos

Ministra de Estado

Luis Manuel Rebelo Fernandes

Secretário Executivo

Isa Assef dos Santos

Subsecretária de Unidades de Pesquisa e Organizações Sociais

CETEM – CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL

Silvia Cristina Alves França

Diretora

Maurício Moutinho da Silva

Coordenador de Administração - COADM

Andréa Camardella de Lima Rizzo

Coordenadora de Planejamento, Gestão e Inovação - COPGI

Paulo Fernando Almeida Braga

Coordenador de Processamento e Tecnologias Minerais - COPTM

Marisa Nascimento

Coordenadora de Processos Metalúrgicos e Ambientais - COPMA

Leonardo Luiz Lyrio da Silveira

Coordenador de Rochas Ornamentais - CORON

Arnaldo Alcover Neto

Coordenador de Análises Minerais - COAMI

SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

ISSN 0103-7374

STA - 121

Introdução ao cultivo de microrganismos utilizados na biolixiviação de minérios

Luis Gonzaga Santos Sobral

Engo. Químico, PhD em Hidrometalurgia/Imperial College-Londres/UK. Pesquisador Titular do CETEM/MCTI.

Andriela Dutra Norberto de Oliveira

Bióloga pela UERJ-ZO, Bolsista PCI no CETEM/MCTI

Amandha Gomes Tavares de Miranda

Aluna de Graduação na UERJ-ZO, Bolsista PIBIT no CETEM/MCT.

Naiara Soares Bello

Bióloga pela Veiga de Almeida. Bolsista por Projeto/FACC.

CETEM/MCTI

2023

SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

Editor: Luis Gonzaga Santos Sobral

Subeditor: Andréa Carmadella de Lima Rizzo

CONSELHO EDITORIAL: Saulo Rodrigues P. Filho (UNB), Jorge Rubio (UFRGS), José Ribeiro Aires (CENPES), Luis Enrique Sánchez (EPUSP), Virginia Sampaio Ciminelli (UFMG), Luís Alberto Dantas Barbosa (UFBA), Ricardo Melamed (UNB), Marcello F. Veiga (University of British Columbia-Canadá), Bruce Marshall (University of British Columbia-Canadá).

Não existe uma definição única que se enquadre na ampla diversidade que o tema “Tecnologias Ambientais” abrange. Em primeiro lugar, o campo das Tecnologias Ambientais é caracterizado por um alto grau de diversidade e heterogeneidade. Em geral, o termo é usado para incluir tecnologias e aplicações que supostamente ajudam a reduzir o impacto negativo da atividade industrial e dos serviços, de usuários privados ou públicos, no meio ambiente. O conceito se refere, normalmente, a tecnologias “no final do processo” (end-of-pipe) integradas a tecnologias limpas e de recuperação de áreas contaminadas. No entanto, também pode abranger questões de sentido mais amplo, como monitoramento, medição, mudança de produtos ou gerenciamento de sistemas ambientais. As tecnologias ambientais são, portanto, de natureza interdisciplinar e podem ser aplicadas em qualquer etapa da cadeia produção-consumo. Tendo isso em mente, a *Série de Tecnologia Ambiental* tem por objetivo congrega especialistas, tais como: pesquisadores, tecnologistas, professores etc., do CETEM em particular, para que divulguem suas pesquisas em áreas tão diversas para servirem como estímulo para os novos e futuros pesquisadores.

There is no single definition that fits the wide diversity that the theme “Environmental Technologies” covers. First, the field of Environmental Technologies is characterized by a high degree of diversity and heterogeneity. In general, the term is used to include technologies and applications that are supposed to help reduce the negative impact of industrial activities and services, by private or public users, on the environment. The concept usually refers to technologies “at the end of the process” (end-of-pipe) integrated with clean technologies and recovery of contaminated areas. However, it can also cover broader issues such as monitoring, measuring, changing products or managing environmental systems. Environmental technologies are, therefore, of an interdisciplinary nature and can be applied at any stage of the production-consumption chain. Bearing this in mind, the “Environmental Technology Series” aims at bringing together specialists, such as: researchers, technologists, professors etc., from CETEM in particular, to disseminate their research in such diverse areas to serve as a stimulus for new and future researchers.

O conteúdo desse trabalho é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Copyright © 2023 CETEM/MCTI

Todos os direitos reservados.
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação de copyright (Lei 5.988)

Valéria Cristina de Souza
Diagramação e Editoração Eletrônica

André Luiz Costa Alves
Projeto Gráfico

Informações:

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral
Av. Pedro Calmon, 900 – Cidade Universitária
21941-908 – Rio de Janeiro – RJ
Homepage: www.cetem.gov.br

CIP – Catalogação na Publicação

l61

Introdução ao cultivo de microrganismos utilizados na biolixiviação de minérios / Luis Gonzaga Santos Sobral... [et al.] – Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2023.

44 p. - (Série Tecnologia Ambiental ; 121).

ISBN 978-65-5919-039-3.

1. Cultivo. 2. Microrganismos. 3. Meios de cultivo.
I. Sobral, Luis Gonzaga Santos. II. Oliveira, Andriela Dutra Norberto de.
III. Miranda, Amanda Gomes Tavares de. IV. Bello, Naiara Soares.
V. Centro de Tecnologia Mineral. VI. Série.

CDD 669.7

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do CETEM/MCTI
Bibliotecário(a) Rosana Silva de Oliveira CRB7 – 5849

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 REQUISITOS PARA O CRESCIMENTO MICROBIANO	11
3 FONTES DE ENERGIA METABÓLICA	13
3.1 Fermentação	13
3.2 Respiração	13
3.3 Fotossíntese	14
4 NUTRIÇÃO	15
4.1 Fonte de Carbono	15
4.2 Fonte de Nitrogênio	16
4.3 Fonte de Enxofre	18
4.4 Fonte de Fósforo	18
4.5 Fontes Minerais	19
4.6 Fatores de Crescimento	19
5 FATORES AMBIENTAIS QUE AFETAM O CRESCIMENTO MICROBIANO	22
5.1 Nutrientes	22
5.2 Concentração de Íons Hidrogênio (pH)	23
5.3 Temperatura	24
5.4 Aeração	27
5.5 Força Iônica e Pressão Osmótica	29
6 MÉTODOS DE CULTIVO	31
6.1 O Meio	31
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

Organismos microbianos, como bactérias, desempenham papéis críticos em diferentes facetas da vida moderna. Eles são usados na produção de produtos médicos, remediação ambiental, pesquisa biomédica e produção de alimentos, como alguns usos diferenciados. A capacidade de manipular e selecionar diferentes cepas com características específicas tem sido fundamental para a utilização das mesmas. Da mesma forma, o desenvolvimento de novas cepas geralmente requer o monitoramento do crescimento dessas cepas sob várias condições experimentais. Nesta série, consideramos o que é cultura bacteriana, fatores que afetam as condições de cultivo de microrganismos, problemas comuns encontrados nesse processo e algumas das inúmeras aplicações das referidas culturas.

Palavras-chave

Cultivo, microrganismos, meios de cultivo.

ABSTRACT

Microbial organisms such as bacteria play critical roles in different facets of modern life. They are used in the production of medical products, environmental remediation, biomedical research and food production, as some differentiated uses. The ability to manipulate and select different strains with specific characteristics has been fundamental for their use. Likewise, the development of new strains often requires monitoring the growth of these strains under various experimental conditions. In this series, we consider what bacterial culture is, factors that affect microorganism culture conditions, common problems encountered in this process, and some of the numerous applications of such cultures.

Keywords

Cultivation, microorganisms, culture media.

1 | INTRODUÇÃO

O cultivo é o processo de propagação de organismos, fornecendo as condições ambientais adequadas. Microrganismos em crescimento fazem réplicas de si mesmos e requerem os elementos presentes em sua composição química. Os nutrientes devem fornecer esses elementos de forma metabolicamente acessível. Além disso, os organismos requerem energia metabólica para sintetizar macromoléculas e manter gradientes químicos essenciais através de suas membranas. Os fatores que devem ser controlados durante o crescimento incluem os nutrientes, pH, temperatura, aeração, concentração de sais e força iônica do meio.

O cultivo adequado de microrganismos é fundamental para os processos naturais de biolixiviação. As bactérias mesófilas, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans*, são frequentemente isoladas em ambientes de lixiviação e crescem, preferencialmente, em ambientes ácidos. Esses microrganismos coexistem simultaneamente devido às suas similaridades fisiológicas e ambientais, intensificando a solubilização dos metais constituintes dos sulfetos minerais. Para um cultivo com alta eficiência, é importante controlar os parâmetros que influenciam o processo de biolixiviação (ROHWERDER, 2003; LAVALLE, 2005). Com esses cuidados, é possível fornecer as condições ambientais adequadas para o crescimento e replicação dos microrganismos, garantindo um resultado satisfatório no processo de biolixiviação de minérios.

Geralmente, os microrganismos envolvidos nos processos naturais de biolixiviação possuem características bem definidas. Crescem, preferencialmente, em ambientes ácidos (acidófilos), podendo, inclusive, crescerem em pH próximo de zero (OTTOBONI &

SATO 2000). As bactérias envolvidas no processo de biolixiviação são classificadas como quimioautotróficas, visto que obtêm energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos tais como os sulfetos (ALMEIDA, 2005; SILVAS, 2010), e utilizar o CO₂ como única fonte de carbono para produção de biomassa. Elas são classificadas de acordo com a temperatura em que se desenvolvem, distinguindo-se em: mesófilas (até ~40 °C), termófilas moderadas (~40 ~55 °C) e termófilas extremas (~55 ~80 °C) (CHANG et al., 2000; NAGPAL et al., 2000).

A manutenção adequada dos parâmetros que afetam o crescimento microbiano, como pH, concentração de nutrientes etc., é crucial para garantir um cultivo bem-sucedido e eficiente. Portanto, é importante seguir os requisitos para o crescimento microbiano, a fim de alcançar, com sucesso, a propagação desses cultivos.

2 | REQUISITOS PARA O CRESCIMENTO MICROBIANO

A maior parte do peso seco dos microrganismos é matéria orgânica contendo os elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre. Além disso, íons inorgânicos como potássio, sódio, ferro, magnésio, cálcio e cloreto são necessários para facilitar a catálise enzimática e manter gradientes químicos através da membrana celular.

Na maior parte, a matéria orgânica é composta de macromoléculas formadas pela introdução de **ligações de anidrido** entre os blocos de construção. A síntese das ligações via anidridos requer energia química, que é fornecida pelas duas ligações fosfodiéster na adenosina trifosfato (ATP). A energia adicional necessária para manter uma composição citoplasmática relativamente constante durante o crescimento em uma variedade de ambientes químicos extracelulares é derivada da **força motriz prótonica**. A força motriz do próton é a energia potencial que pode ser obtida pela passagem de um próton através de uma membrana. Em eucariotos, a membrana pode fazer parte da mitocôndria ou do cloroplasto. Em procariotos, a membrana é a membrana citoplasmática da célula.

A força motriz do próton é um gradiente eletroquímico com dois componentes, uma diferença no pH (*i.e.*, concentração de íons de hidrogênio) e uma diferença na carga iônica. A carga do lado de fora da membrana bacteriana é mais positiva do que a carga do lado de dentro, e a diferença de carga contribui para a energia livre liberada quando um próton entra no citoplasma vindo de fora da membrana. A energia livre pode ser usada para mover a célula, para manter gradientes iônicos ou moleculares através da membrana, para sintetizar ligações de anidrido no ATP ou para

uma combinação desses propósitos. Alternativamente, as células que recebem uma fonte de ATP podem usar sua energia de ligação de anidrido para criar uma força motriz protônica que, por sua vez, pode ser usada para mover a célula e manter gradientes químicos.

Para crescer, um organismo necessita de todos os elementos em sua matéria orgânica e todo o complemento de íons necessários para a energia e a catálise. Além disso, deve haver uma fonte de energia para estabelecer a força motriz do próton e permitir a síntese macromolecular. Os microrganismos variam amplamente em suas demandas nutricionais e suas fontes de energia metabólica.

3 | FONTES DE ENERGIA METABÓLICA

Os três principais mecanismos de geração de energia metabólica são a fermentação, a respiração e a fotossíntese. Pelo menos um desses mecanismos deve ser usado para que um organismo cresça.

3.1 | Fermentação

A formação de ATP na fermentação não está acoplada à transferência de elétrons. A fermentação é caracterizada pela fosforilação do substrato, um processo enzimático no qual uma ligação pirofosfato é doada diretamente ao difosfato de adenosina (ADP) por um intermediário metabólico fosforilado. Os intermediários fosforilados são formados por rearranjo metabólico de um substrato fermentável, como glicose, lactose ou arginina. Como as fermentações não são acompanhadas por uma mudança no estado geral de oxidação-redução do substrato fermentável, a composição elementar dos produtos da fermentação deve ser idêntica à dos substratos. Por exemplo, a fermentação de uma molécula de glicose ($C_6H_{12}O_6$) pela via Embden-Meyerhof produz um ganho líquido de duas ligações pirofosfato no ATP e produz duas moléculas de ácido láctico ($C_3H_6O_3$).

3.2 | Respiração

A respiração é análoga ao acoplamento de um processo dependente de energia à descarga de uma bateria. A redução química de um oxidante (*i.e.*, aceptor de elétrons), através de uma série específica de transportadores de elétrons na membrana, estabelece a força motriz do próton através da membrana bacteriana. O redutor (*i.e.*, doador de elétrons) pode ser orgânico

ou inorgânico (por exemplo, o ácido láctico serve como redutor para alguns organismos e o gás hidrogênio é um redutor para outros organismos). O oxigênio gasoso (O_2) é frequentemente usado como oxidante, mas oxidantes alternativos usados por alguns organismos incluem dióxido de carbono (CO_2), sulfato (SO_4^{2-}) e nitrato (NO_3^-).

3.3 | Fotossíntese

A fotossíntese é semelhante à respiração, pois a redução de um oxidante, por meio de uma série específica de transportadores de elétrons, estabelece a força motriz do próton. A diferença entre os dois processos é que, na fotossíntese, o redutor e o oxidante são criados fotoquimicamente pela energia luminosa absorvida pelos pigmentos da membrana; assim, a fotossíntese pode continuar apenas enquanto houver uma fonte de energia luminosa. As plantas e algumas bactérias são capazes de investir uma quantidade substancial de energia luminosa para tornar a água um redutor de dióxido de carbono. O oxigênio é desprendido neste processo e a matéria orgânica é produzida. A respiração, a oxidação energeticamente favorável da matéria orgânica por um aceptor de elétrons como o oxigênio, pode fornecer energia aos organismos fotossintéticos na ausência de luz.

4 | NUTRIÇÃO

Os nutrientes nos meios de crescimento devem conter todos os elementos necessários para a síntese biológica de novos organismos. Na discussão a seguir, os nutrientes são classificados de acordo com os elementos que fornecem.

4.1 | Fonte de Carbono

Como já mencionado, as plantas e algumas bactérias são capazes de usar a energia fotossintética para reduzir o dióxido de carbono às custas da água. Esses organismos são chamados de autotróficos, criaturas que não requerem nutrientes orgânicos para crescer. Outros microrganismos autotróficos são os quimiolitotróficos, organismos que usam um substrato inorgânico, como hidrogênio ou tiosulfato, como redutor e dióxido de carbono como fonte de carbono.

Os heterotróficos requerem carbono orgânico para crescimento, e o carbono orgânico deve estar em uma forma que possa ser assimilada. O naftaleno, por exemplo, pode fornecer todo o carbono e energia necessários para o crescimento heterotrófico respiratório, mas muito poucos organismos possuem a via metabólica necessária para a assimilação do naftaleno. A glicose, por outro lado, pode suportar o crescimento fermentativo ou respiratório de muitos organismos. É importante que os substratos de crescimento sejam fornecidos em níveis apropriados para a cepa microbiana que está sendo cultivada: Níveis que suportarão o crescimento de um organismo podem inibir o crescimento de outro organismo.

O dióxido de carbono é necessário para uma série de reações Biosintéticas. Muitos organismos em processo de respiração

produzem dióxido de carbono mais do que suficiente para atender a esse requisito, mas outros requerem uma fonte de dióxido de carbono em seu meio de crescimento.

4.2 | Fonte de Nitrogênio

O nitrogênio é o principal componente de proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos, respondendo por aproximadamente 5% do peso seco de uma célula bacteriana típica. O nitrogênio inorgânico (N_2) é muito prevalente, compreendendo 80% da atmosfera terrestre. É também um composto muito estável, principalmente por causa da alta energia de ativação necessária para quebrar a ligação tripla nitrogênio-nitrogênio. No entanto, o nitrogênio pode ser fornecido em várias formas diferentes, e os microrganismos variam em sua capacidade de assimilar o nitrogênio (Tabela 1). O produto final de todas as vias de assimilação do nitrogênio é a forma mais reduzida do elemento, a amônia (NH_3). Quando o NH_3 está disponível, ele se difunde na maioria das bactérias através de canais transmembrana como NH_3 gasoso dissolvido, em vez de íon amônio iônico (NH_4^+).

Tabela 1. Fontes de Nitrogênio na Nutrição Microbiana.

Composto	Valência do Nitrogênio
NO_3^-	5+
NO_2^-	3+
N_2	0
NH_4^+	3-
R- NH_2^a	

aR – radical orgânico.

A capacidade de assimilar N_2 de forma redutiva via NH_3 , que é chamada de **fixação de nitrogênio**, é uma propriedade exclusiva dos procariotos, e relativamente poucas bactérias são capazes de quebrar a ligação tripla nitrogênio-nitrogênio. Esse processo requer uma grande quantidade de energia metabólica e é prontamente inativado pelo oxigênio. A capacidade de fixação de nitrogênio é encontrada em bactérias amplamente divergentes que desenvolveram estratégias bioquímicas bastante diferentes para proteger suas enzimas fixadoras de nitrogênio do oxigênio.

A maioria dos microrganismos pode usar NH_3 como única fonte de nitrogênio, e muitos organismos possuem a capacidade de produzir NH_3 a partir de aminas ($R-NH_2$) ou de aminoácidos ($RCHNH_2COOH$), geralmente intracelularmente. A produção de NH_3 a partir da desaminação de aminoácidos é chamada de amonificação. A amônia é introduzida na matéria orgânica por vias bioquímicas envolvendo glutamato e glutamina.

Muitos microrganismos possuem a capacidade de assimilar nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) de forma redutiva pela conversão desses íons em NH_3 . Esses processos são denominados **redução assimilatória de nitrato e redução assimilatória de nitrito**, respectivamente. Essas vias de assimilação diferem das vias usadas para dissimilação de nitrato e nitrito. As vias dissimilatórias são usadas por organismos que usam esses íons como aceptores terminais de elétrons na respiração. Algumas bactérias autotróficas (por exemplo, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter spp.*) são capazes de converter NH_3 em N_2 gasoso sob condições anaeróbicas; este processo é conhecido como **desnitrificação**. Nossa compreensão do ciclo do nitrogênio continua a evoluir. Em meados da década de 1990, a reação anammox foi descoberta. A reação 1, em que a

amônia é oxidada por nitrito, é um processo microbiano que ocorre em águas anóxicas do oceano e é uma via importante pela qual o nitrogênio é devolvido à atmosfera.



4.3 | Fonte de Enxofre

Semelhante ao nitrogênio, o enxofre é um componente de muitas substâncias celulares orgânicas. Faz parte da estrutura de várias coenzimas e é encontrado nas cadeias laterais cisteinil e metionil das proteínas. O enxofre, em sua forma elementar, não pode ser usado por plantas ou animais. No entanto, algumas bactérias autotróficas podem oxidá-lo a sulfato (SO_4^{2-}). A maioria dos microrganismos pode usar sulfato como fonte de enxofre, reduzindo o sulfato ao nível de sulfeto de hidrogênio (H_2S). Alguns microrganismos podem assimilar H_2S diretamente do meio de crescimento, mas este composto pode ser tóxico para muitos organismos.

4.4 | Fonte de Fósforo

O fosfato (PO_4^{3-}) é necessário como componente do ATP; ácidos nucleicos e coenzimas como NAD, NADP e flavinas. Além disso, muitos metabólitos, lipídios (fosfolipídios, lipídeo A), componentes da parede celular (ácido teicóico), alguns polissacarídeos capsulares e algumas proteínas são fosforilados. O fosfato é sempre assimilado como fosfato inorgânico livre (Pi).

4.5 | Fontes Minerais

Diversos minerais são necessários para a função enzimática. O íon magnésio (Mg^{2+}) e o íon ferroso (Fe^{2+}) também são encontrados em derivados de porfirina: magnésio na molécula de clorofila e ferro como parte das coenzimas dos citocromos e peroxidases. Mg^{2+} e K^+ são essenciais para a função e integridade dos ribossomos. O Ca^{2+} é necessário como constituinte das paredes celulares gram-positivas, embora seja dispensável para bactérias gram-negativas. Muitos organismos marinhos requerem Na^+ para o crescimento. Na formulação de um meio para o cultivo da maioria dos microrganismos, é necessário fornecer fontes de potássio, magnésio, cálcio e ferro, geralmente como seus íons (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+}). Muitos outros minerais (por exemplo, Mn^{2+} , Mo^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}) são necessários; estes podem, frequentemente, ser fornecidos na água da torneira ou como contaminantes de outros ingredientes dos meios.

A absorção de ferro, que forma hidróxidos insolúveis em pH neutro, é facilitada em muitas bactérias e fungos pela produção de sideróforos - compostos que sequestram o ferro, na forma de um quelato, e promovem seu transporte como um complexo solúvel. Estes incluem hidroxamatos ($-CONH_2OH$), chamados sideraminas, e derivados de catecol (por exemplo, 2,3-dihidroxi-benzoilserina). Os sideróforos determinados por plasmídeos desempenham um papel importante na invasão de alguns patógenos bacterianos.

4.6 | Fatores de Crescimento

Um fator de crescimento é um composto orgânico que uma célula deve ter para crescer, mas que é incapaz de sintetizar. Muitos microrganismos, quando recebem os nutrientes listados acima, são

capazes de sintetizar todos os blocos de construção das macromoléculas (Figura 1), que são os aminoácidos; purinas, pirimidinas e pentoses (os precursores metabólicos dos ácidos nucleicos); carboidratos adicionais (precursores de polissacarídeos); e ácidos graxos e compostos isoprenóides. Além disso, organismos de vida livre devem ser capazes de sintetizar as vitaminas complexas que servem como precursores de coenzimas.

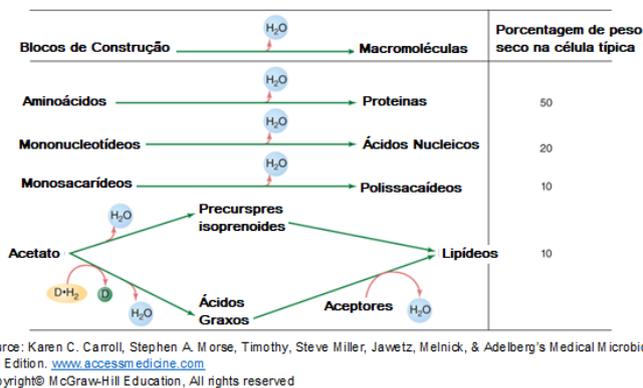


Figura 1. Síntese macromolecular. A polimerização de blocos de construção em macromoléculas é conseguida em grande parte pela introdução de ligações de anidrido. A formação de ácidos graxos a partir do acetato requer várias etapas de redução bioquímica usando doadores orgânicos de hidrogênio ($D \cdot H_2$).

Cada um desses compostos essenciais é sintetizado por uma sequência discreta de reações enzimáticas; cada enzima é produzida sob o controle de um gene específico. Quando um organismo sofre uma mutação genética, resultando na falha de uma dessas enzimas para funcionar, a cadeia é quebrada e o produto final não é mais produzido. O organismo deve, então,

obter esse composto do ambiente: O composto tornou-se um **fator de crescimento** para o organismo. Este tipo de mutação pode ser prontamente induzido em laboratório.

Diferentes espécies microbianas variam amplamente em seus requisitos de fator de crescimento. Os compostos envolvidos são encontrados e são essenciais para todos os organismos; as diferenças nos requisitos refletem diferenças nas habilidades sintéticas. Algumas espécies não requerem fatores de crescimento, mas outras - como alguns dos lactobacilos - perderam, durante a evolução, a capacidade de sintetizar de 30 a 40 compostos essenciais e, portanto, precisam deles no meio.

5 | FATORES AMBIENTAIS QUE AFETAM O CRESCIMENTO MICROBIANO

Um meio de crescimento adequado deve conter todos os nutrientes requeridos pelo organismo a ser cultivado, e fatores como pH, temperatura e aeração devem ser cuidadosamente controlados. Um meio líquido é usado; o meio pode ser gelificado para fins especiais, adicionando ágar ou gel de sílica. Agar, um extrato de polissacarídeo de uma alga marinha, é adequado exclusivamente para o cultivo microbiano porque é resistente à ação microbiana e porque se dissolve a 100°C, mas não gelifica até que seja resfriado abaixo de 45°C; as células podem ser suspensas no meio a 45°C e o meio rapidamente resfriado a um gel sem danificá-las.

5.1 | Nutrientes

Nas páginas anteriores, é descrita a função de cada tipo de nutriente, sendo apresentada uma lista de substâncias adequadas. Em geral, devem ser fornecidos: (1) doadores e receptores de hidrogênio, cerca de 2 g/L; (2) fonte de carbono, cerca de 1 g/L; (3) fonte de nitrogênio, cerca de 1 g/L; (4) minerais: enxofre e fósforo, cerca de 50 mg/L de cada, e oligoelementos, 0,1–1 mg/L de cada; (5) fatores de crescimento: aminoácidos, purinas e pirimidinas, cerca de 50 mg/L de cada, e vitaminas, 0,1–1 mg/L de cada.

Para estudos do metabolismo microbiano, geralmente é necessário preparar um meio completamente sintético no qual as características exatas e a concentração de cada ingrediente são conhecidas. Caso contrário, é muito mais barato e simples usar materiais naturais, como extrato de levedura, proteína digestiva ou substâncias semelhantes. A maioria dos micróbios de vida livre

crece bem no extrato de levedura; as formas parasitárias podem requerer substâncias especiais encontradas apenas no sangue ou em extratos de tecidos animais. No entanto, alguns micróbios parasitas (por exemplo, *Treponema pallidum*) não podem ser cultivados *in vitro* ou dentro de células eucarióticas (por exemplo, *Chlamydia trachomatis*).

Para muitos organismos, um único composto (por exemplo, um aminoácido) pode servir como fonte de energia, fonte de carbono e fonte de nitrogênio; outros requerem um composto separado para cada um. Se os materiais naturais para meios não sintéticos forem deficientes em algum nutriente específico, eles devem ser suplementados.

5.2 | Concentração de Íons Hidrogênio (pH)

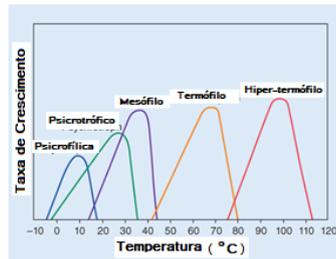
A maioria dos organismos tem uma faixa de pH ótima bastante estreita. O pH ótimo deve ser determinado empiricamente para cada espécie. A maioria dos organismos (neutrófilos) cresce melhor em um pH na faixa de 6,0 a 8,0, embora algumas formas (acidófilos) tenham um pH ótimo tão baixo quanto 3,0 e outras (alcalifílicos) tenham um pH ótimo tão alto quanto 10,5.

Os microrganismos regulam seu pH interno em uma ampla faixa de valores de pH externo bombeando prótons para dentro ou para fora de suas células. Os acidófilos mantêm um pH interno de cerca de 6,5 em uma faixa externa de 1,0 a 5,0; os neutrófilos mantêm um pH interno de cerca de 7,5 em uma faixa externa de 5,5 a 8,5 e os alcalófilos mantêm um pH interno de cerca de 9,5 em uma faixa externa de 9,0 a 11,0. O pH interno é regulado por um conjunto de sistemas de transporte de prótons na membrana citoplasmática, incluindo uma bomba de prótons primária movida

a ATP e um trocador de Na^+/H^+ . Um sistema de troca K^+/H^+ também foi proposto para contribuir para a regulação interna do pH em neutrófilos.

5.3 | Temperatura

Diferentes espécies microbianas variam amplamente em suas faixas de temperatura ideais para crescimento (Figura 2): As formas psicrófilas crescem melhor em baixas temperaturas (-5 a 15°C) e geralmente são encontradas em ambientes como as regiões ártica e antártica; os psicrotróficos têm uma temperatura ótima entre 20°C e 30°C , mas crescem bem em temperaturas mais baixas. Eles são uma importante causa de deterioração de alimentos. As formas mesófilas crescem melhor a 30 – 37°C , e a maioria das formas termofílicas cresce melhor a 50 – 60°C . Alguns organismos são hipertermofílicos e podem crescer bem acima da temperatura da água fervente, que existe sob alta pressão nas profundezas do oceano. A maioria dos organismos é mesófila; 30°C é ideal para muitas formas de vida livre, e a temperatura corporal do hospedeiro é ideal para simbioses de animais de sangue quente.



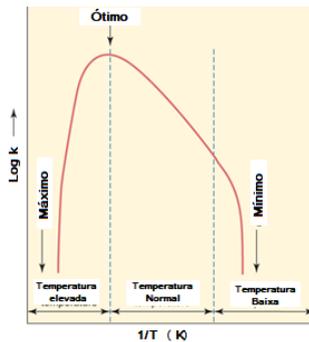
Source: Karen C. Camoll, Stephen A. Morse, Timothy, Steve Miller, Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 27th Edition. www.accessmedicine.com
Copyright© McGraw-Hill Education, All rights reserved.

Figura 2. Requisitos de temperatura para o crescimento. Os procaríotos são comumente divididos em cinco grupos com base em suas temperaturas ótimas de crescimento. Observe que a temperatura ótima, o ponto em que a taxa de crescimento é mais alta, está próxima do limite superior da faixa. (Reproduzido com permissão de Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT [editores]: *Microbiology: A Human Perspective*, 6^a ed. McGraw-Hill, 2009, p. 91. © The McGraw-Hill Companies, Inc.)

A extremidade superior da faixa de temperatura tolerada por qualquer espécie se correlaciona bem com a estabilidade térmica geral das proteínas dessa espécie, medida em extratos celulares. Os microrganismos compartilham com plantas e animais a resposta de choque térmico, uma síntese transitória de um conjunto de “proteínas de choque térmico”, quando expostos a um aumento súbito de temperatura acima do ótimo de crescimento. Essas proteínas parecem ser excepcionalmente resistentes ao calor e estabilizam as proteínas sensíveis ao calor da célula.

A relação da taxa de crescimento com a temperatura para qualquer microrganismo é vista em um gráfico típico de Arrhenius (Figura 3). Arrhenius mostrou que o logaritmo da velocidade de

qualquer reação química ($\log k$) é uma função linear do recíproco da temperatura ($1/T$); como o crescimento celular é o resultado de um conjunto de reações químicas, pode-se esperar que mostre essa relação. A Figura 3 mostra que esse é o caso na faixa normal de temperaturas para uma determinada espécie; $\log k$ diminui linearmente com $1/T$. Acima e abaixo da faixa normal, no entanto, $\log k$ cai rapidamente, de modo que os valores máximo e mínimo de temperatura são definidos.



Source: Karen C. Carroll, Stephen A. Morse, Timothy, Steve Miller, Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 27th Edition. www.accessmedicine.com
Copyright© McGraw-Hill Education, All rights reserved.

Figura 3. Forma geral de um gráfico de Arrhenius de crescimento bacteriano. (Reproduzido com permissão de Ingraham JL: Growthofpsychrophilicbacteria. J Bacteriol 1958;76(1):75-80.)

Além de seus efeitos na taxa de crescimento, os extremos de temperatura matam os microrganismos. Calor extremo é usado para esterilizar preparações; o frio extremo também mata as células microbianas, embora não possa ser usado com segurança para esterilização. As bactérias também exibem um fenômeno chamado choque frio, que é a morte de células por resfriamento rápido - em oposição ao resfriamento lento. Por exemplo, o resfriamento rápido de *Escherichia coli* de 37°C para 5°C pode

matar 90% das células. Vários compostos protegem as células do congelamento ou do choque frio; glicerol e dimetilsulfóxido são os mais comumente usados.

5.4 | Aeração

Muitos organismos são **aeróbios obrigatórios**, exigindo especificamente oxigênio como acceptor de hidrogênio; alguns são **anaeróbios facultativos**, capazes de viver de forma aeróbica ou anaeróbica; alguns são **anaeróbios obrigatórios** que requerem uma substância diferente do oxigênio como acceptor de hidrogênio e são sensíveis à inibição do oxigênio; alguns são **microaerófilos**, que requerem pequenas quantidades de oxigênio (2–10%) para a respiração aeróbica (concentrações mais altas são inibitórias); e outros são **anaeróbios aerotolerantes**, indiferentes ao oxigênio. Eles podem crescer em sua presença, mas não o utilizam como acceptor de hidrogênio (Figura 4).

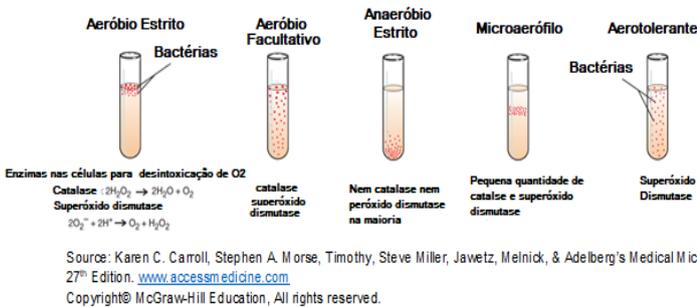
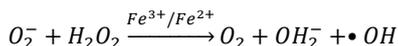
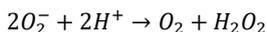


Figura 4. Exigências de oxigênio (O₂) de procaríotos. (Reproduzido com permissão de Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT: Microbiology: A Human Perspective, 6^a ed. McGraw-Hill, 2009, p. 92. © The McGraw-Hill Companies, Inc.).

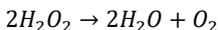
Os subprodutos naturais do metabolismo aeróbico são os compostos reativos peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-). Na presença de ferro, essas duas espécies podem gerar radicais hidroxila ($\bullet OH$), que podem danificar qualquer macromolécula biológica:



Muitos aeróbios e anaeróbios aerotolerantes são protegidos desses produtos pela presença da superóxido dismutase, uma enzima que catalisa a seguinte reação:



E pela presença da catalase, enzima que catalisa a seguinte reação:



Alguns organismos fermentativos (por exemplo, *Lactobacillus plantarum*) são aerotolerantes, mas não contêm catalase ou superóxido dismutase. O oxigênio não é reduzido e, portanto, H_2O_2 e O_2^- não são produzidos. Todos os anaeróbios estritos carecem de superóxido dismutase e catalase. Alguns organismos anaeróbicos (por exemplo, *Peptococcus anaerobius*) têm tolerância considerável ao oxigênio como resultado de sua capacidade de produzir altos níveis de uma enzima (NADH oxidase) que reduz o oxigênio a água de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio deve muito de sua toxicidade aos danos que causa ao DNA. Mutantes deficientes no reparo do DNA são excepcionalmente sensíveis ao peróxido de hidrogênio; o produto do gene *recA*, que funciona tanto na recombinação quanto no

reparo genético demonstrou ser mais importante do que a catalase ou a superóxido dismutase na proteção das células de *E coli* contra a toxicidade do peróxido de hidrogênio.

O suprimento de ar para culturas de aeróbios é um grande problema técnico. Os vasos geralmente são agitados mecanicamente para introduzir oxigênio no meio ou o ar é forçado através do meio por pressão. A difusão de oxigênio muitas vezes se torna o fator limitante no crescimento de bactérias aeróbicas; quando uma concentração celular de $4-5 \times 10^9/\text{mL}$ é atingida, a taxa de difusão de oxigênio para as células limita nitidamente a taxa de crescimento adicional.

Os anaeróbios obrigatórios, por outro lado, apresentam o problema da exclusão do oxigênio. Muitos métodos estão disponíveis para isso: agentes redutores, como tioglicolato de sódio, podem ser adicionados a culturas líquidas, tubos de ágar podem ser selados com uma camada de petrolato e parafina, o recipiente de cultura pode ser colocado em um recipiente do qual o oxigênio é removido por evacuação ou por meios químicos, ou o organismo pode ser manuseado dentro de um porta-luvas anaeróbico.

5.5 | Força Iônica e Pressão Osmótica

Em menor grau, fatores como pressão osmótica e concentração de sais podem ter que ser controlados. Para a maioria dos organismos, as propriedades dos meios comuns são satisfatórias; no entanto, para formas e organismos marinhos, adaptados ao crescimento em soluções fortes de açúcar, por exemplo, esses fatores devem ser considerados. Organismos que requerem altas concentrações de sais são chamados **halofílicos**; aqueles que requerem altas pressões osmóticas são chamados de **osmofílicos**.

A maioria das bactérias é capaz de tolerar uma ampla gama de pressões osmóticas externas e forças iônicas devido à sua capacidade de regular a osmolalidade interna e a concentração de íons. A osmolalidade é regulada pelo transporte ativo de íons K^+ para dentro da célula; a força iônica interna é mantida constante por uma excreção de compensação da putrescina de poliamina orgânica carregada positivamente. Como a putrescina carrega várias cargas positivas por molécula, uma grande queda na força iônica é afetada com apenas um pequeno custo na força osmótica.

6 | MÉTODOS DE CULTIVO

Dois problemas serão considerados: a escolha de um meio adequado e o isolamento de um organismo bacteriano em cultura pura.

6.1 | O meio

A técnica utilizada e o tipo de meio selecionado dependem da natureza da investigação. Em geral, três situações podem ser encontradas: (1) pode ser necessário cultivar uma cultura de células de uma determinada espécie disponível, (2) pode ser necessário determinar o número e os tipos de organismos presentes em um determinado material, ou (3) pode-se desejar isolar um determinado tipo de microrganismo de uma fonte natural.

Células em crescimento de uma determinada espécie

Microrganismos observados microscopicamente, crescendo em um ambiente natural, podem ser extremamente difíceis de crescer em cultura pura em meio artificial. Certas formas parasitárias nunca foram cultivadas fora do hospedeiro. Em geral, entretanto, um meio adequado pode ser criado reproduzindo cuidadosamente as condições encontradas no ambiente natural do organismo. O pH, a temperatura e a aeração são fáceis de duplicar; os nutrientes apresentam o maior problema. A contribuição do ambiente de vida é importante e difícil de analisar; um parasita pode requerer um extrato do tecido hospedeiro, e uma forma de vida livre pode requerer uma substância excretada por um microrganismo com o qual está associado na natureza. Experimentação considerável pode ser necessária para determinar

as necessidades do organismo, e o sucesso depende do fornecimento de uma fonte adequada de cada categoria de nutriente listada no início deste texto.

Exame microbiológico de materiais naturais

Um determinado material natural pode conter muitos microambientes diferentes, cada um fornecendo um nicho para uma espécie diferente. O plaqueamento de uma amostra do material sob um conjunto de condições permitirá que um grupo selecionado de formas produza colônias, mas fará com que muitos outros tipos sejam negligenciados. Por esta razão, é comum colocar amostras do material em placas usando tantos meios e condições de incubação diferentes quanto possível. Seis a oito condições de cultura diferentes não são um número irracional se a maioria das formas presentes está para ser descoberta.

Como todo tipo de organismo presente deve ter uma chance de crescer, meios sólidos são usados e a aglomeração de colônias é evitada. Caso contrário, a competição impedirá que alguns tipos formem colônias.

Isolamento de um tipo particular de microrganismo

Uma pequena amostra de solo, se manuseada adequadamente, produzirá um tipo diferente de organismo para cada microambiente presente. Para solo fértil (úmido, aerado, rico em minerais e matéria orgânica), isso significa que centenas ou até milhares de tipos podem ser isolados. Isso é feito selecionando o tipo desejado. Um grama de solo, por exemplo, é inoculado em um frasco de meio líquido preparado com a finalidade de favorecer um tipo de organismo, como os fixadores aeróbicos de nitrogênio (*Azotobacter*). Neste caso, o meio não contém nitrogênio combinado e é incubado aerobiamente. Se células de

Azotobacter estiverem presentes no solo, elas crescerão bem neste meio; as formas incapazes de fixar nitrogênio crescerão apenas na medida em que o solo introduzir nitrogênio fixado contaminante no meio. Quando a cultura estiver totalmente desenvolvida, portanto, a porcentagem de *Azotobacter* na população total terá aumentado muito; o método é, portanto, chamado de cultura de enriquecimento. A transferência de uma amostra desta cultura para meio fresco resultará em maior enriquecimento de *Azotobacter*; após várias transferências seriadas, a cultura pode ser semeada em um meio de enriquecimento solidificado e as colônias de *Azotobacter* isoladas.

O meio líquido é usado para permitir a competição e, portanto, a seleção ideal, mesmo quando o tipo desejado é representado no solo como apenas algumas células em uma população de milhões. Pode-se tirar vantagem do “enriquecimento natural”. Por exemplo, ao procurar oxidantes de querosene, o solo carregado de óleo é escolhido porque já é um ambiente de enriquecimento para tais formas.

A cultura de enriquecimento, então, é um procedimento pelo qual o meio é preparado de forma a duplicar o ambiente natural (“nicho”) do microrganismo desejado, selecionando-o (Figura 5). Um princípio importante envolvido nessa seleção é o seguinte: o organismo selecionado será do tipo cujas necessidades nutricionais mal são satisfeitas. *Azotobacter*, por exemplo, cresce melhor em meio contendo nitrogênio orgânico, mas seu requisito mínimo é a presença de N_2 ; portanto, é selecionado para um meio contendo N_2 como única fonte de nitrogênio. Se for adicionado nitrogênio orgânico ao meio, as condições não mais selecionam para *Azotobacter*, mas sim para uma forma para a qual o nitrogênio orgânico é o requisito mínimo.

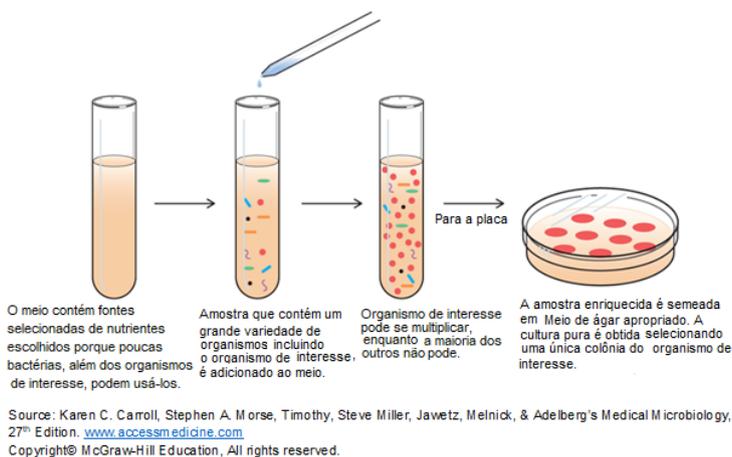


Figura 5. Cultura de enriquecimento. As condições do meio e de incubação favorecem o crescimento da espécie desejada sobre outras bactérias na mesma amostra. (Reproduzido com permissão de Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT: Microbiology: A Human Perspective, 6^a ed. McGraw-Hill, 2009, p. 99. © The McGraw-Hill Companies, Inc.).

Na busca por um determinado tipo de organismo, que faz parte de uma população mista, são utilizados meios seletivos ou diferenciais. Meios seletivos inibem o crescimento de organismos diferentes daquele que está sendo procurado. Por exemplo, o ágar Thayer-Martin é usado para isolar *Neisseria gonorrhoeae*, a causa da gonorréia, de amostras clínicas. Os meios diferenciais contêm substâncias que certas bactérias alteram de maneira reconhecível. Por exemplo, colônias de *E coli* têm um brilho iridescente característico em ágar contendo os corantes eosina e azul de metileno (EMB ágar). O ágar EMB contendo uma alta concentração de um açúcar também fará com que os organismos que fermentam esse açúcar formem colônias avermelhadas. Meios

diferenciais são usados para fins como reconhecer a presença de bactérias entéricas na água ou no leite e a presença de certos patógenos em amostras clínicas. A Tabela 2 apresenta as características dos meios representativos usados para cultivar bactérias.

Tabela 2. Características dos meios representativos usados para cultivar bactérias.

Meio	Características
Agar sangue	Meio complexo usado rotineiramente em laboratórios clínicos. Diferencial porque as colônias de organismos hemolíticos são cercadas por zona de compensação das hemácias.
Agar chocolate	Meio complexo usado para cultura de bactérias fastidiosas, particularmente aquelas encontradas em espécimes clínicos. Não seletivo ou diferencial.
Glucose - sais	Meio quimicamente definido. Usado em experimentos de laboratório para estudar as necessidades nutricionais das bactérias. Não seletivo ou diferencial.
MacConkeyagar	Meio complexo usado para isolar bastonetes Gram-negativos que normalmente residem no intestino. Seletivo porque sais biliares e corantes inibem organismos Gram-positivos e cocos Gram-negativos. Diferencial porque o indicador de pH fica rosa-avermelhado quando o açúcar do meio, a lactose, é fermentado.
Agar nutriente	Meio complexo usado para trabalhos laboratoriais de rotina. Apoia o crescimento de uma variedade de bactérias não fastidiosas. Não seletivo ou diferencial.
Thayer-Martin	Meio complexo usado para isolar espécies de <i>Neisseria</i> , que são fastidiosas. Seletivo porque contém antibióticos que inibem a maioria dos organismos, exceto as espécies de <i>Neisseria</i> . Não diferencial.

(Reproduzido com permissão de Nester EW, Anderson DG, Robert CE, Nester MT: Microbiology: a humanperspective, 6ª ed. McGraw-Hill, 2009, p. 96. © The McGraw-Hill, Inc.).

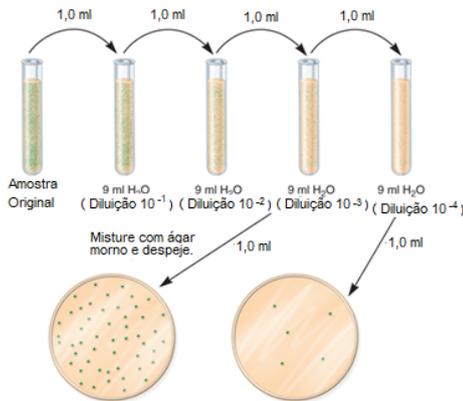
Isolamento de Microrganismos em Cultura Pura

Para estudar as propriedades de um determinado organismo, é necessário manipulá-lo em cultura pura livre de todos os outros tipos de organismos. Para fazer isso, uma única célula deve ser isolada de todas as outras células e cultivada de tal maneira que sua progênie coletiva também permaneça isolada. Vários métodos estão disponíveis:

Revestimento

Ao contrário das células em meio líquido, as células em ou sobre um meio gelificado são imobilizadas. Portanto, se poucas células suficientes forem colocadas em um meio gelificado, cada célula crescerá em uma colônia isolada. O agente gelificante ideal para a maioria dos meios microbiológicos é o ágar, um polissacarídeo ácido extraído de certas algas vermelhas. Uma suspensão de 1,5 a 2% em água se dissolve a 100°C, formando uma solução límpida que gelifica a 45°C. Assim, uma solução de ágar estéril pode ser resfriada a 50°C, bactérias ou outras células microbianas adicionadas e, em seguida, a solução rapidamente resfriada abaixo de 45°C para formar um gel. (Embora a maioria das células microbianas seja morta a 50°C, o curso do processo de morte é suficientemente lento nessa temperatura para permitir esse procedimento; veja a Figura 3.). Uma vez gelificado, o ágar não se liquefaz novamente até que seja aquecido acima 80°C, de modo que qualquer temperatura adequada para a incubação de uma cultura microbiana possa ser usada posteriormente. No método *pour-plate*, uma suspensão de células é misturada com ágar derretido a 50°C e despejada em uma placa de Petri. Quando o ágar solidifica, as células são imobilizadas no ágar e crescem em colônias. Se a suspensão de células for suficientemente diluída, as colônias serão bem separadas, de modo que cada uma tenha uma

alta probabilidade de ser derivada de uma única célula (Figura 6). Para ter certeza disso, no entanto, é necessário colher uma colônia do tipo desejado, suspendê-la em água e replaqueá-la. A repetição desse procedimento várias vezes garante a obtenção de uma cultura pura.



Source: Karen C. Carroll, Stephen A. Morse, Timothy, Steve Miller, Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 27th Edition. www.accessmedicine.com
Copyright© McGraw-Hill Education, All rights reserved.

Figura 6. A técnica do *pour-plate*. A amostra original é diluída várias vezes para diluir suficientemente a população. As amostras mais diluídas são, então, misturadas com ágar morno e despejadas em placas de Petri. As células isoladas crescem em colônias e são usadas para estabelecer culturas puras. As colônias da superfície são circulares; as colônias da subsuperfície são lenticulares (em forma de lente). (Reproduzido com permissão de Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ: Prescott, Harley, & Klein's Microbiology, 7^a ed. McGraw-Hill, 2008. © The McGraw-Hill Companies, Inc.)

Alternativamente, a suspensão original pode ser espalhada em uma placa de ágar com uma alça de arame (**técnica de placa de listras**). À medida que o estriamento continua, cada vez menos

células são deixadas na alça e, finalmente, a alça pode depositar células isoladas no ágar (Figura 7). A placa é incubada e qualquer colônia bem isolada é então removida, ressuspensa em água e novamente semeada em ágar. Se uma suspensão (e não apenas um pouco de crescimento de uma colônia ou inclinação) for estriada, este método é tão confiável quanto e muito mais rápido do que o método *pour-plate*.

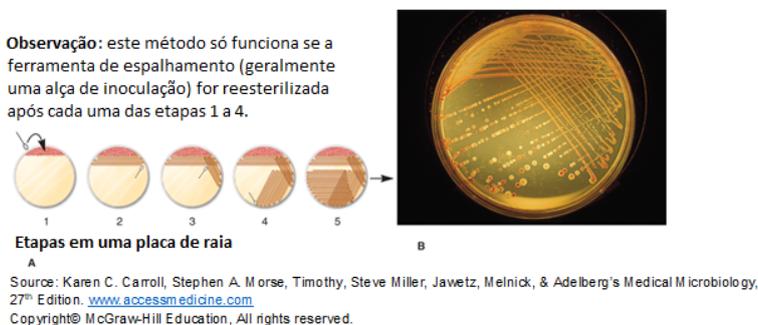


Figura 7. Técnica de estrias. **A:** Um padrão típico de estrias. (Reproduzido com permissão de Willey JM, Sherwood CJ, Woolverton CJ: Prescott, Harley, & Klein's Microbiology, 7^a ed. McGraw-Hill, 2008. © The McGraw-Hill Companies, Inc.) **B:** Um exemplo de placa de riscos. (Reproduzido com permissão de Kathy Park Talaro).

Na técnica da placa de propagação, um pequeno volume de suspensão microbiana diluída contendo cerca de 30 a 300 células é transferido para o centro de uma placa de ágar e espalhado uniformemente sobre a superfície com um bastão de vidro curvo estéril. As células dispersas desenvolvem-se em colônias isoladas. Como o número de colônias deve ser igual ao número de organismos viáveis em uma amostra, placas espalhadas podem ser usadas para contar a população microbiana.

Diluição

Um método muito menos confiável é o da diluição da extinção. A suspensão é diluída em série e as amostras de cada diluição são semeadas. Se apenas algumas amostras de uma diluição particular exibirem crescimento, presume-se que algumas das colônias começaram a partir de células únicas. Este método não é usado a menos que o revestimento seja, por algum motivo, impossível. Uma característica indesejável deste método é que ele só pode ser usado para isolar o tipo de organismo predominante em uma população mista.

7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das considerações teóricas e praticas expostas anteriormente, podemos resumir que:

- Um organismo requer todos os elementos em sua matéria orgânica e todo o complemento de íons necessários para a energia para crescer. Os nutrientes são classificados de acordo com os elementos que fornecem, incluindo fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fonte de enxofre, fonte de fósforo e fontes minerais.
- Fatores de crescimento são compostos orgânicos que uma célula precisa ter para crescer, mas que é incapaz de sintetizar.
- Deve haver uma fonte de energia presente para estabelecer uma força protônica motriz e permitir a síntese macromolecular. Os três principais mecanismos de geração de energia metabólica são a fermentação, a respiração e a fotossíntese.
- Fatores ambientais como pH, temperatura e aeração são importantes para o crescimento dos microrganismos. A maioria dos patógenos humanos são neutrofílicos (*i.e.*, crescem melhor em pH de 6,0 a 8,0) e mesófilos (*i.e.*, crescem melhor numa faixa de temperatura de 30 a 37°C).
- Os organismos variam amplamente em sua capacidade de usar oxigênio como acceptor de hidrogênio e em sua capacidade de inativar subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbico. Eles podem ser agrupados como aeróbios obrigatórios, anaeróbios facultativos, anaeróbios obrigatórios, microaerófilos e anaeróbios aerotolerantes.
- Os meios microbiológicos podem ser formulados para permitir o crescimento de um determinado tipo de microrganismo presente em baixa densidade populacional (cultura de enriquecimento), identificar tipos específicos de microrganismos (meio diferencial) ou isolar um organismo específico de uma população mista (meio seletivo).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.K.. Detecção de bactérias redutoras de sulfato em efluente e sedimento de mina de urânio. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2005.

ADAMS, M.W: Enzymes and proteins from organisms that grow near or above 100°C. *Annu Rev Med* 1993; 47:627.

CHANG, I.S.; SHIN, P.K.; KIM, B.H. Biological treatment of acid mine drainage undersulphate-reducing conditions with solid waste materials as substrate. Water Research, Seoul.

KOCH, A.L. Microbial physiology and ecology of slow growth. *Microbiol MolecBiol Rev.* 1997; 61:305.

MAIER, R.M; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. Environmental Microbiology. Academic Press, 1992.

MARZLUT, G.A. Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentary fungi. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 42:89.

NAGPAL, S. et al. Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and Modeling study. *Biotechnology and Bioengineering*, London, v. 70, n. 5, p. 533-543, Dez. 2000. PMID: 11042550.

OTTOBONI, L.M.M.; SATO, M.I.Z. Bactérias de Interesse Ambiental e Agroindustrial. Sub Projeto 1: Diversidade Molecular de *Thiobacillus* em Ambientes Antrópicos. Disponível em <<http://www.bdt.fat.org/bacteria/subprojeto1>>. Acesso em: 10 de maio de 2023.

PELCZAR, M.J. Jr; CHAN, E.C.S; KRIEG, N.R. Microbiology: Concepts and Applications. McGraw-Hill, 1993.

ROHWERDER, T.; GEHRKE, T.; KINZLER, K.; SAND, W. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: Fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. Applied Microbiology and Biotechnology, 63:239-48, 2003.

ROHWERDER, T.; SAND, W. Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation. In: Donati, E.R., Sand, W. (Eds.), Microbial Processing of Metal Sulfides. Springer, New York, pp. 35-58, 2007.

SCHLOSS, P.D; HANDELSMAN, J. Status of the microbial census. MicrobiolMolecBiol, Rev. 2004; 68:686.

WOOD, J.M. Bacterial osmoregulation: A paradigm for the study of cellular homeostasis. Annu Rev Microbiol 2011;65:215. [[PubMed: 21663439](#)].

SÉRIES CETEM

As Séries Monográficas do CETEM são o principal material de divulgação da produção científica realizada no Centro. Até o final do ano de 2023, já foram publicados, eletronicamente e/ou impressos em papel, mais de 380 títulos, distribuídos entre as seis séries atualmente em circulação: Rochas e Minerais Industriais (SRMI), Tecnologia Mineral (STM), Tecnologia Ambiental (STA), Estudos e Documentos (SED), Gestão e Planejamento Ambiental (SGPA) e Inovação e Qualidade (SIQ). A Série Iniciação Científica consiste numa publicação eletrônica anual.

A lista das publicações poderá ser consultada em nossa homepage. As obras estão disponíveis em texto completo para download. Visite-nos em <https://www.gov.br/cetem/pt-br/assuntos/repositorio-mineralis-e-biblioteca>.

Últimos números da Série Tecnologia Ambiental

STA-120 – Estudo da degradação das cúpulas do Museu Nacional de Belas Artes – RJ e otimização do processo de limpeza por emplastro. Roberto Carlos da Conceição Ribeiro, Caroline Martins de Souza, Elson Rian Rodrigues de Albuquerque, Marceli do Nascimento da Conceição, 2023.

STA-119 – Biodeterioração dos painéis de azulejos de Cândido Portinari do Palácio Gustavo Capanema. Roberto Carlos da Conceição Ribeiro, Giovana Oliveira dos Santos Consoli, Claudia Regina Nunes, 2022.

STA-118 – Processos de fabricação de cerâmica vermelha. Mariane Costalonga de Aguiar, Monica Castoldi Borlini Gadioli, Maria Angélica Kramer Sant’Anna, Ana Júlia Nali Giori, 2022.

INFORMAÇÕES GERAIS

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral
Avenida Pedro Calmon, 900 – Cidade Universitária
21941-908 – Rio de Janeiro – RJ
Geral: (21) 3865-7222
Biblioteca: (21) 3865-7218
E-mail: biblioteca@cetem.gov.br
Homepage: <http://www.cetem.gov.br>

NOVAS PUBLICAÇÕES

Se você se interessar por um número maior de exemplares ou outro título de uma das nossas publicações, entre em contato com a nossa biblioteca no endereço acima.

Solicita-se permuta.

We ask for interchange.



Missão Institucional

Desenvolver tecnologias inovadoras e sustentáveis, e mobilizar competências visando superar desafios nacionais do setor mineral.

O CETEM

O Centro de Tecnologia Mineral - CETEM é um instituto de pesquisas, vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, dedicado ao desenvolvimento, à adaptação e à difusão de tecnologias nas áreas minerometalúrgica, de materiais e de meio ambiente.

Criado em 1978, o Centro está localizado no campus da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, na cidade Universitário, no Rio de Janeiro e ocupa 20.000m² de área construída, que inclui 25 laboratórios, 4 plantas-piloto, biblioteca especializada e outras facilidades.

Durante seus 45 anos de atividade, o CETEM desenvolveu mais de 800 projetos tecnológicos e prestou centenas de serviços para empresas atuantes nos setores minerometalúrgico, químico e de materiais.