

AULA 6

BIOMETEOROLOGIA DE MICROORGANISMOS.

6.1 Aspectos básicos da ação da temperatura sobre os microrganismos

A temperatura é um dos principais fatores que influenciam no crescimento e na multiplicação dos microrganismos. O crescimento destes seres vivos pode ser tanto de tamanhos (da própria célula) como populacional (de reprodução).

O crescimento celular e a reprodução são governados por diferentes atividades celulares, umas tanto complexas, mas pode-se estabelecer que a divisão celular ocorre quando a célula atinge um padrão fisiológico e tamanho adequado. Isto foi verificado por Hoffmann (1967) onde a divisão celular de *Escherichia coli* começa a diminuir a 7.3°C visto que com o aumento de temperatura, o crescimento celular aumenta e células grandes e filamentosas surgem.

Um tratamento teórico acerca do crescimento de organismos unicelulares foi efetuado por Bertalanffy (1957). De acordo com sua teoria tem-se que diferenciar entre os processos de crescimento nos quais são dependentes da superfície celular, dos processos de crescimento das substâncias (matéria) celulares, dependentes da massa. Em casos mais simples o aumento das substâncias das células é proporcional à massa da célula inicial. Estas condições são verdadeiras para organismos em forma de bastonetes onde a proporção entre superfície celular e o volume celular permanece constante durante o crescimento celular. Neste caso o comprimento L ao tempo t pode ser expresso pela função:

$$L = L_0 \exp(\mu - x)t \quad (6.1)$$

onde L_0 é o comprimento inicial do "bastonete" no início do crescimento, x é uma constante de processos catabólicos (desassimilação) e μ é uma constante de processos sintetizadores. A taxa de crescimento é dada pela diferença entre as duas constantes. O aumento da massa dos bastonetes, em consequência, variam com a taxa de crescimento constante:

$$\frac{dL}{dt} = L \cdot cte \quad (6.2)$$

Se a célula possui uma forma esférica, como os *cocci* e as leveduras (fungos) as taxas de crescimento são mais complicadas. Neste caso, o aumento do volume é limitado pela superfície celular, na qual governa o influxo de metabólitos para dentro da própria. Então a taxa do crescimento é dada pela equação de Schmalhausen-Bordzilowskaya :

$$\frac{dg}{dt} = \mu g^{2/3} - \chi g \quad (6.3)$$

onde dg ("crescimento do peso celular") resulta dos processos sintéticos (μ) nos quais são proporcionais à superfície celular ($\mu g^{2/3}$) e é oposto pelos processos catabólicos proporcionais ao peso celular (χg). Conseqüentemente as taxas de superfície/peso mudam com o

crescimento do organismos até o equilíbrio entre aumento e destruição de metabólicos, aonde o tamanho máximo é alcançado.

Assumindo que os coeficientes das temperaturas do influxo de metabólicos é significativamente menor do que os coeficientes de temperatura dos processos metabólicos dentro da célula, o equilíbrio entre a superfície celular e o volume celular deve depender então, da temperatura de crescimento. Portanto, o tamanho celular deve diminuir com o aumento da temperatura de crescimento.

Esta teoria está baseada na observação freqüente que o crescimento dos organismos em altas temperaturas é menor do que em baixas temperaturas, i. e., os organismos com nichos em temperaturas altas são usualmente menores do que os de baixa temperatura. Bactérias e algas termófilas (do grego *termos*= quente, calor e *filos*= amigo) possuem diâmetros de 0,3 a 0,5 μm , enquanto que os mesófilos (do grego *mesos* = no meio) têm de 2 a 3 μm . Mas a maioria das bactérias e algas termófilas são filiformes (em forma de cabelo), sendo sua morfologia uma peculiaridade genética na qual não deve ser comparada às mesófilas tão facilmente.

Foi observado, também, que o *Bacillus subtilis*, crescido a 63°C é 2 a 3 vezes maior que a 37°C, o mesmo ocorrendo com algumas leveduras (Fig. 6.1), invalidando parcialmente a teoria acima, podendo portanto, haver outras influências (como p.ex.: o coeficiente de temper., que afeta a entrada e saída de metabólitos, pode variar de espécie p/ espécie).

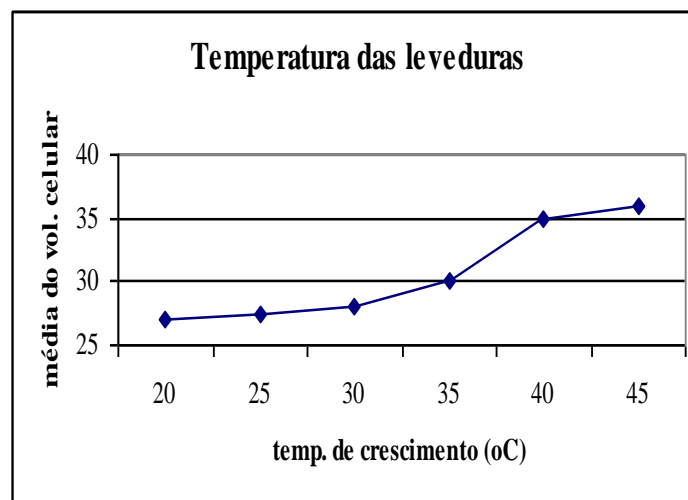


Fig.6.1 A influência da temperatura no tamanho de uma levedura.

6.2 O efeito da temperatura na reprodução.

A taxa de reprodução de microorganismos ou a taxa de crescimento de uma cultura de microorganismos em um dado volume de meio de cultura depende de vários fatores. Alguns destes fatores são inerentes à espécie em questão, enquanto que outros fatores são resultados das condições ambientais. A temperatura é somente um dos fatores, embora preponderante em relação a outros fatores meteorológicos neste caso.

Quando plotarmos o logaritmo do número de células contra o tempo nós obtemos a seguinte curva de crescimento populacional (Fig.6.2), com suas fases:

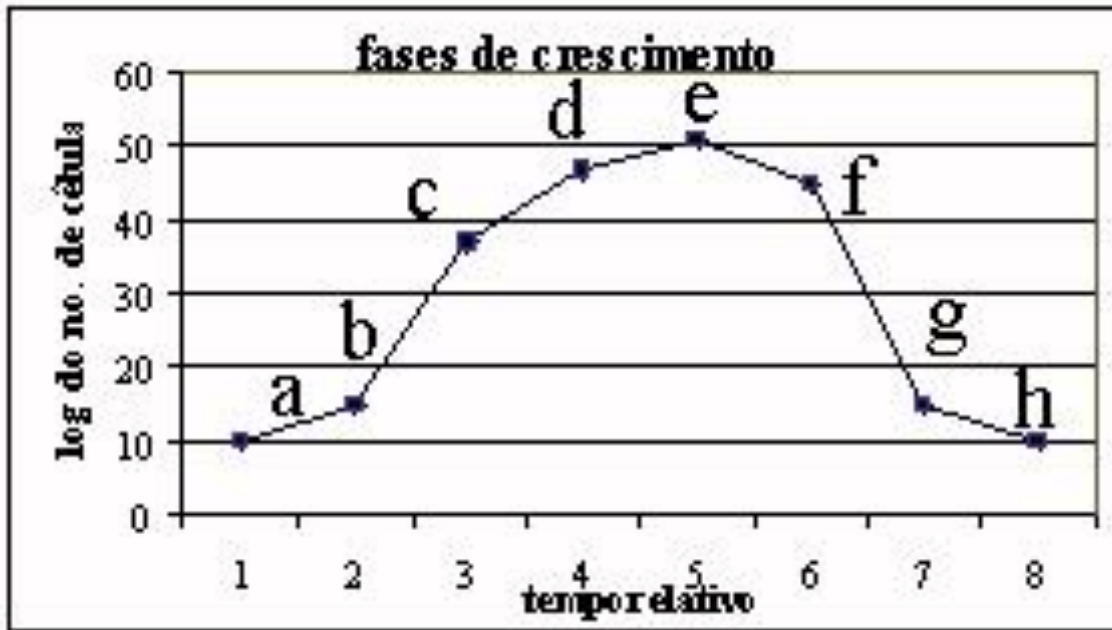


Fig.6.2 Curva de crescimento populacional.

- | | |
|----------------------------------|------------------------------|
| a) fase "demorada" ou inicial | e) . estacionária. |
| b) f. de crescimento acelerado | f) f. de aceleração da morte |
| c) f. de crescimento exponencial | g) f. de destruição |
| d) f. de desaceleração | h) f. estacionária |

Estas 8 fases reproduzem a ação de bactérias e fungos sobre um extrato alimentar qualquer ou sobre um meio de cultura qualquer. Elas são afetadas pela temperatura de maneiras diversas. Atuam em algumas fases diretamente (c e g) e indiretamente (sobre o pH, íons, viscosidade, solubilidade de O₂ e CO₂, etc.). Neste caso, quanto mais baixa a temperatura, maior a solubilidade do O₂, p.ex.

6.3 Curvas de crescimento

A taxa de crescimento de uma cultura crescendo exponencialmente pode ser expressa pela constante da taxa específica (k) em :

$$\frac{dN}{dt} = k.N \quad (6.4)$$

$$k = \frac{2.3(\log N_2 - \log N_1)}{t_2 - t_1} \quad (6.5)$$

onde N_2 e N_1 são números de células na cultura nos tempos t_2 e t_1 , respectivamente. Esta constante k depende consideravelmente da temperatura, mas outros fatores também influenciam.

Os microorganismos podem ser classificados em 3 categorias de acordo com sua suscetibilidade à temperatura : psicrófilos ("gostam" do frio, menos de 20°C), mesófilos (de

20°C a 50°C) e termófilos (> de 50°C). Notar que há um número significativo de organismos crescendo a 0°C e são classificados como psicrófilos, mas tem um ótimo desenvolvimento a 37°C (como os mesófilos). Observação similar ocorre nos termófilos.

Sabe-se que há muitas reações enzimáticas que funcionam em uma enorme gama de temperaturas. Algumas enzimas, entretanto, podem degenerar com a queda ou subida desta. A maioria das enzimas tem um máximo de atividade em torno do ótimo crescimento do organismo (de 30° a 50°C para os mesófilos, p.ex.). Uma questão em aberto ainda, no entanto é se as próprias enzimas são inativadas ou se há um inibidor (ou vários) que controlam o mecanismo de síntese enzimática.

Descrições matemáticas das curvas de crescimento dos microorganismos tem sido feitas por diversos autores. Hinselwood (1947) assumiu que o crescimento G resulta da síntese da matéria celular A menos a desnaturação irreversível de componentes protéicos B :

$$G = A - B \quad (6.6)$$

Eyring (1942) descreveu a teoria dos processos de desnaturação enzimática em células vivas que pode ser descrito como:

$$k = \frac{k'Kt}{h} \exp\left(\frac{S}{R}\right) \exp\left(\frac{H}{RT}\right) \quad (6.7)$$

onde k' é o coeficiente de transmissão, representando a probabilidade de que a formação de um complexo ativado levará a sua decomposição em produtos (de reação), K é a constante de Boltzmann, h é a constante de Planck. H é a mudança de entalpia da reação, S é a mudança da entropia, R é a constante dos gases e T a temperatura absoluta.

Substituindo 6.7 em 6.6, obtemos a 6.8:

$$G = \left(k_1 \frac{K_1 T}{h} e^{\frac{S_1}{R}} e^{\frac{-H_1}{RT}} - \left(k_2 \frac{K_2 T}{h} e^{\frac{S_2}{R}} e^{\frac{-H_2}{RT}}\right)\right) \quad (6.8)$$

Desde que KT/h aparece em ambos os membros ele pode ser negligenciado. As constantes desconhecidas k_1' e k_2' podem assumir o valor 1, no ponto de vista prático obtemos :

$$G = \frac{e^{S_1/R}}{e^{H_1/RT}} - \frac{e^{S_2/R}}{e^{H_2/RT}} \quad (6.9)$$

Assumindo que $S_1= 24$ cal. e $H_1= 5000$ cal e ainda $S_2= 200$ cal e $H_2= 62000$ cal, as curvas de crescimento podem ser feitas na Fig.6.3.

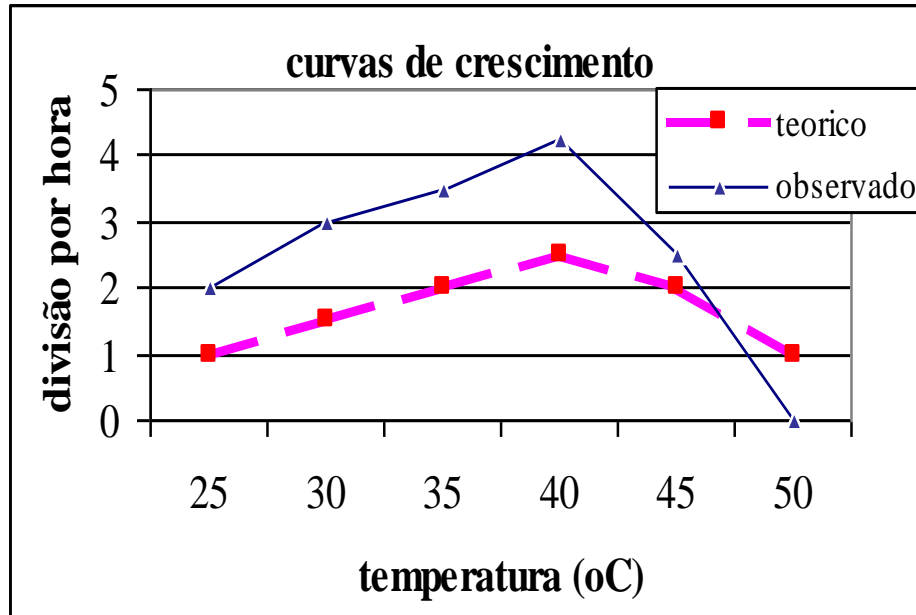


Fig.6.3. Curva teórica de (a) crescimento por temperatura (Hinshelwood) e (b) curva experimental em *A.aerogenes*.

6.4 Morte por aquecimento em microorganismos

O efeito do calor na destruição dos microorganismos para a esterilização é usada especialmente na preservação de alimentos (UHT-ultra alta temperatura, pasteurização, etc.), ainda que os próprios também sejam sensíveis ao calor.

As alterações das taxas de reações biológicas incluindo taxas de mortalidade de indivíduos com a temperatura podem ser descritos pelo coeficiente de temperatura Q_{10} . Este coeficiente não está relacionado, no entanto a mecanismos bioquímicos envolvidos na inativação por calor dos sistemas biológicos. O Q_{10} é apenas um fator no qual as taxas de mortalidade aumentam a cada 10°C de aquecimento.

$$Q_{10} = \frac{kT}{kT + 10} \quad (7.0)$$

onde k é a taxa de reação constante específica dada na 6.6. A desnaturação das enzimas e proteínas é a responsável pela morte por calor, estando Q_{10} longe de ser uma constante real (tabela 6.1). Variações consideráveis geralmente são observadas e são marcadas por um decréscimo (médio) com o aumento da temperatura.

Tabela 6.1: Mudança nos valores de Q10 para a morte por aquecimento de *Salmonella paratyphi*.

TEMPERATURA (°C)	TEMPO DE MORTALIDADE (MIN.)	Q10
55	140	1370
57	33	37
59	16	44
61	7,5	99
63	3	32

6.5 Resistência e adaptação.

Há diversos fatores que afetam a resistência e a adaptação dos microorganismos aos diferentes meios tais como: disponibilidade hídrica; presença/ausência de sais e íons, proteínas, óleos e gorduras; pH; idade; e a própria temperatura de crescimento.

Observa-se geralmente nas células em fases de crescimento exponencial (*c*, na Fig.6.2) que um rápido aumento na resistência de 3°C a 5°C ocorre quando a temperatura é elevada de 20°C para a ótima de 37°C. Isto ocorre em bactérias mesófilas, tais como *E.coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia marcescens* e em leveduras. A inativação enzimática neste grupo ocorre entre 50° e 60°C.

Os mecanismos da alta resistência das enzimas são pouco conhecidos. Em investigações recentes verifica-se que a hidratação aumenta a resistência, elevando a estabilidade protéica.

Com a elevação da temperatura a membrana plasmática e estruturas citoplasmáticas (de org. mesófilos) colapsam com a liquefação dos ácidos graxos (gorduras) celulares. Alterações na estrutura dos lipídeos (ver adiante em 6.7) são encontrados em esporos e leveduras termófilas depois de diversos processos de adaptação à elevadas temperaturas.

Podemos concluir, também, que de acordo com a teoria dos lipídeos, o baixo ponto de derretimento destes na membrana celular dos microorganismos psicrófilos são os responsáveis pela maior estabilidade destes à baixas temperaturas.

Observar que há 2 tipos de adaptação à temperaturas: a) adaptação da viabilidade do organismo exposto à extremos de frio/calor, b) adaptação da atividade metabólica medida sobre uma grande gama de temperatura. Em muitos casos, no entanto a adaptação é a mesma para os extremos, isto é chamado de adaptação paradoxal.

6.6 Resposta dos microorganismos ao frio.

Entre -4°C e -10°C a maioria dos microorganismos estão inativos e de -15°C a -30°C (freezers) a maioria morre. As leveduras, p.ex., 90% sobrevivem a -5°C, enquanto que a -40°C, só conseguem sobreviver 20%.

No entanto, há a possibilidade de estocagem de bactérias e fungos na liofilização (desidratação rápida a frio e a vácuo), expondo estes de -50° a -80°C, sem matá-los, fazendo-os "encistarem" via desidratação.

Algumas enzimas como a desidrogenase e peptidase, são ativadas pelo frio em detrimento de outras enzimas, em organismos psicrófilos.

Algumas substâncias podem "proteger" os microorganismos do frio, diminuindo o ponto de congelamento intracelular, tais como: sais, íons, proteínas, açúcares e gorduras. Nas

leveduras há eletrólitos que influenciam na resistência ao frio, chegando a 0,2 M de solução (ex.: KCL, KNO₃, NaCl, NaNO₃ - estes dois últimos em baixas concentrações-, cálcio, lítio e magnésio).

Um fator decisivo para a atividade enzimática é a água em estado líquido. Sabe-se que é possível haver água neste estado até -40°C (superresfriada). Do ponto de vista teórico as interações entre enzimas e substratos durante o congelamento de sistemas vivos são governados por 2 fatores:

a) primeiramente, eles são governados pela queda das taxas de reação dos processos enzimáticos. A dependência das taxas de reações biológicas podem ser descritas aproximadamente: uma queda a cada 10°C leva a uma diminuição da taxa de 2 a 3 vezes.

b) o segundo evento governa a interação de enzimas com os substratos durante o congelamento e a formação do gelo. O congelamento externo acarreta em uma concentração de enzimas, tanto quanto a concentração de substratos. Sobre certas circunstâncias isto favorece a taxa de reação. Realmente, já foi observado aumento na taxa de reações enzimáticas quando ocorre congelamento externo, diminuindo a quantidade de água líquida. Em adição a estes dois fatores há muitos outros fatores, p.ex., os inibidores (maior viscosidade, íons inibidores, etc.) e estimuladores (precipitação de substâncias inibidoras, ativação de certa enzimas, etc).

6.7 Organismos termófilos

6.7.1 Introdução

A habilidade de organismos em crescer a temperaturas acima do máximo usual foi reconhecida inicialmente por Miquel (1888), isolando uma bactéria aquática crescendo a 73°C. Surpreendentemente, esta habilidade está basicamente restrita a organismos mais simples tais como bactérias, fungos e algas. A maioria deste organismos termófilos cresce entre 50°C e 70°C, embora haja algas azuis (cianofíceas) a 93°C (no Parque Yellowstone) e as bactérias sulfídricas (a base de H₂S), liberados pelas fossas vulcânicas marinhas de 300°C a 400°C.

6.7.2 Mecanismos celulares de crescimento em temperatura elevadas

Há diferentes teorias para explicar o fenômeno. Por um lado, acredita-se que os organismos termófilos sejam entidades arquetípicas da qual viviam em condições de maior calor no Paleozóico. Por outro lado, há resultados experimentais com 2 teorias apresentadas. A 1ª teoria e a mais óbvia, é a seguinte: os componentes celulares destes organismos são mais estáveis à elevadas condições de temperatura do que os mesófilos. A 2ª teoria: nas células dos termófilos, a produção dos componentes celulares tomam lugar mais rapidamente do que a inativação térmica.

As primeiras observações da compreensão do funcionamento desta estabilidade está correlacionada ao ponto de derretimento (liquefação) dos lipídeos. Gaughran (1949) assumiu que os processos celulares podem ser mantidos com lipídeos em estado líquido, contudo abaixo do ponto de solidificação, a célula não cresce. O fato de que o grau de saturação, o comprimento da cadeia lipídica e o ponto de derretimento destes aumentam com o aumento da temperatura, está de acordo com ambas interpretações acima.

Observa-se que os lipídeos destes organismos são mais sólidos (resistentes) que os dos mesófilos, encontrados em plantas e larvas de insetos, entretanto estudos com *E.coli* mostram que pode haver diversos tipos de lipídeos em uma mesma célula.

Os *Bacillus* termófilos apresentam ácidos graxos com 16 a 17 carbonos na cadeia, sendo mais ramificados e saturados do que os ácidos graxos dos mesófilos. Os mesófilos apresentam ácidos graxos com 17 a 19 carbonos na cadeia, que é menos ramificada e também é insaturada.

Nos fungos são geralmente encontrados ácidos graxos insaturados a baixa temperatura, no entanto em *Mucor oblongisporus*, há mais ácidos graxos insaturados a 25°C do que a 10°C. Parece que a ordem Mucorales é uma exceção a esta regra. Notar também, que o grau de saturação é determinado pela concentração de O₂ no ambiente aquático (mais frio => maior concentração de O₂ => maior grau de insaturação). As cadeias maiores também estão relacionadas ao grau de concentração de O₂.

As proteínas dos termófilos são mais resistentes à coagulação do que as dos mesófilos. Exemplos de enzimas resistentes ao calor de 60°C (desidrogenase, alfa-amilase, protease e proteínas dos flagelos). Sua estabilidade depende das estruturas 2^{arias} e 3^{arias}, da cadeia de peptídeos, o mesmo crescendo com RNA e ribossomas (vide Tabela 6.2.)

Tabela 6.2 Temperatura de máximo crescimento, ponto de derretimento dos ribossomas, destruição protéica (a 60°C) e a espécie em questão.

Organismos	Máx. crescimento (°C)	Ribossomas (°C)	Proteínas desnaturadas
<i>V.marinus</i> (MESO)	18	69	100%
<i>E.coli</i> (")	45	72	55%
<i>Bacillus subtilis</i> (")	50	74	57%
<i>B.steano-thermophilus</i> (TER)	73	79	3%

Fonte: <http://www.fungiphoto.com/CTLG/SYS1/B.wNw.html>