

CAPÍTULO III

BACTÉRIAS

Ida Chapaval Pimentel
Jair Alves Dionísio
Diana Signor

Os organismos procariotos são agrupados em dois domínios Bacteria e Archea. As principais diferenças entre eles estão na composição química, na atividade e no ambiente em que se desenvolvem. A composição química da parede celular das bactérias é constituída por peptidoglicano, que lhes dá forma, confere força e rigidez. Já as arqueas apresentam grande diversidade e não contém peptidoglicano, além de possuir capacidade de se desenvolver em condições extremas de temperatura, salinidade e pressão.

As células bacterianas são constituídas por parede celular, membrana plasmática e algumas espécies possuem uma terceira camada externa denominada cápsula, formada por polissacarídeos com consistência de muco, o que lhes confere resistência. Flagelos e fímbrias também podem fazer parte da sua constituição (TORTORA et al., 2013).

De acordo com a composição química e a integridade da parede celular, as bactérias se dividem em: Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano e ácidos teicoicos e as Gram-negativas possuem peptidoglicano e uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídios (TORTORA et al., 2013; DUNLAP, 2010). Reproduzem-se muito rápido por divisão simples (fissão binária) que pode acontecer em aproximadamente 20 minutos, como é o caso da *Escherichia coli*. Por isso, a partir de uma única bactéria pode-se chegar a cinco bilhões delas após 12 h de cultivo.

As bactérias são os seres vivos mais antigos da terra, estão amplamente distribuídas no ar, no solo e na água e são os micro-organismos mais simples, do ponto de vista estrutural, e de menor tamanho (0,2 a 2,0 mm de diâmetro e 2,0 a 8,0 mm de comprimento). Durante o processo de divisão celular, por fissão binária, o material genético (DNA), que não está envolvido por uma membrana, é duplicado e a célula se divide em duas (TORTORA et al., 2013).

Bactérias podem ser autotróficas ou heterotróficas. No solo, a maioria é heterotrófica e necessita de uma fonte de carbono orgânico para sua nutrição. De

acordo com as exigências de oxigênio, podem ser: aeróbias obrigatórias, anaeróbias facultativas, anaeróbias obrigatórias, anaeróbias aerotolerantes e microaerófilas (TORTORA et al., 2013; DUNLAP, 2010).

Quanto à forma, podem ser: arredondadas (cocos), alongadas ou em forma de bastonetes (bacilos), em forma de espiral (espiroquetas e espirilos) e em forma de vírgula (vibriões).

De acordo com Siqueira et al. (1993), a faixa de pH para o crescimento da maioria das bactérias varia de 6,5 a 7,5, podendo algumas espécies atingir limites extremos entre 0,5 e 9,5. Em função da faixa de temperatura, dividem-se em: psicrófilas, que podem desenvolver-se a 0 °C ou em temperaturas mais baixas; mesófilas, que se desenvolvem entre 15 e 25 °C; termófilas, que crescem na faixa de 40 °C; e, termófilas extremas, que crescem com temperatura acima de 60 °C.

A população de bactérias no solo é estimada em torno de 10^8 a 10^9 organismos por grama de solo (esse número varia conforme o método de contagem). Entretanto, devido ao tamanho reduzido, contribuem com menos da metade do carbono da biomassa microbiana (CBM) do solo, mas, mesmo assim, podem atingir valores de CBM entre 100 e 4.000 kg ha⁻¹ (GRISI, 1988).

As bactérias de importância agrícola, que fixam nitrogênio atmosférico, podem ser agrupadas em três categorias:

- 1) Simbiontes (nodulam leguminosas): *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*;
- 2) Associativas (vivem endofiticamente ou na rizosfera de gramíneas): *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Gluconobacter*; e,
- 3) De vida livre: *Beijerinckia*, *Derrxia* e *Azotomonas*.

No entanto, os gêneros de maior ocorrência no solo são: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas* e *Micrococcus* (EWEIS et al., 1999).

Catellan e Vidor (1990a) compararam a densidade populacional de bactérias heterotróficas do solo, expressas em unidade formadora de colônia (UFC g⁻¹) de solo, sob diferentes sistemas de cultivo em duas profundidades. Esses autores observaram na camada 0 a 5 cm, para os sistemas de cultivo: campo nativo, aveia+ervilhaca/milho+caupi e siratro, respectivamente 88×10^5 ; $12,5 \times 10^6$ e $15,3 \times 10^6$ e na camada 5 a 15 cm, respectivamente: 45×10^5 ; 75×10^5 e $82,9 \times 10^5$. Barros et al. (2010)

observaram em área de mineração e metalurgia de chumbo as seguintes densidades populacionais de bactérias: 1,97 a 34,53 x 10⁵ e 7,6 a 103 x 10⁴ (UFC g⁻¹) de solo seco, respectivamente para os solos Neossolo Litólico sobre mata nativa sem evidência de contaminação com Pb e Neossolo Litólico Quartzarênico com cobertura de samambaias (*Pteridium aquilinum*) e capim elefante (*Penisetum purpureum*), com pilhas de rejeito na superfície do solo.

As bactérias exercem importante função na decomposição da matéria orgânica, na ciclagem de nutrientes, na fixação biológica de nitrogênio (simbiótica e assimbiótica, na agregação do solo), e no desenvolvimento de doenças, como também são indicadoras de qualidade do solo.

PROTOCOLO I

CONTAGEM DE BACTÉRIAS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- b) Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio (16 x 1,5 cm) com rosca, placas de Petri (Ø 90 mm), alça de Drigalsky e esferas de vidro (Ø 2,00 mm);
- c) Equipamentos: agitador de frasco, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina, agitador de tubos e microscópio estereoscópio (lupa);
- d) Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %), meio de cultura de Thorton (Tabela 3);
- e) Outros: funil de plástico (Ø 10,0 cm), micropipeta de volume variável (10 a 100 µL), ponteiras autoclaváveis, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção (nitrílica descartável), parafilm e gás butano; e,
- f) Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, previamente tamizado, em peneira número 10, em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de bactérias e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Com um funil, transferir o solo para Erlenmeyer de 250 mL contendo cinco esferas de vidro e 90,0 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Dispersar as unidades formadoras de colônia (UFC) em agitador de frasco (usar $\cong 3,4$ G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- d) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e dispersar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);

Tabela 3. Meio de cultura de Thorton.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
NaCl	0,1
FeCl ₃	0,002
KNO ₃	0,5
Asparagina	0,5
Manitol	1,0
Ágar	15,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0 mL

Fonte: Parkinson et al. (1971).

Obs. Adicionar ciclohexamide (40 mg L⁻¹ de meio) esterilizado por filtração, dissolvido em 10 mL de água destilada, antes de verter em placas com o meio de cultura à temperatura de 45 a 50 °C.

- e) Com uma micropipeta contendo outra ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar manualmente cinco vezes (diluição 1:1.000);
- f) Repetir o item “e” duas vezes consecutivas para atingir as diluições 1:10.000 e 1:100.000;
- g) Descartar as ponteiras utilizadas em um béquer contendo solução de hipoclorito de sódio (NaClO 2,0 %) (Anexo 1) após cada transferência;
- h) Com uma micropipeta contendo ponteira esterilizada, transferir 0,1 mL das etapas “e”, “f” e “g” para a superfície das placas de Petri, contendo o meio de cultura de Thorton;
- i) Espalhar o inóculo (0,1 mL) na superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inserindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;

- j) Identificar as placas de Petri (tratamento, repetição, meio de cultivo, data e responsável), selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, por aproximadamente uma semana;
- k) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- l) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

3. Cálculo

$$\text{UFC g}^{-1} = (\text{média das contagens} \times \text{diluição selecionada} \times 10) \text{ g}^{-1*}$$

*Obtido após a secagem do solo úmido em estufa (105 °C) até massa constante.

4. Resultados

Tabela 4. Densidade populacional de bactérias em diferentes solos.

Solo	Diluição selecionada	Unidades formadoras de colônias (UFC g ⁻¹)			Média
		Repetições			
		1	2	3	
A					
B					
C					
D					
E					