

## CAPÍTULO IV

### BACTÉRIAS ESPORULADAS

**Ida Chapaval Pimentel**  
**Jair Alves Dionísio**  
**Diana Signor**

Algumas bactérias, quando em condições ambientais adversas, iniciam um processo em que a célula se desidrata e forma-se uma parede espessa, dentro da membrana celular, ao redor de seu citoplasma e cromossomo, formando uma estrutura conhecida como endósporo (esporo bacteriano). As bactérias que formam esses endósporos são conhecidas como bactérias esporuladas (BROCK, 2012).

Os endósporos bacterianos são capazes de permanecer em estado latente, desidratados, por longos períodos de tempo e sobreviver em condições de escassez de umidade, temperatura elevada, presença de ácidos e álcalis e falta de nutrientes. Quanto à necessidade de oxigênio, as bactérias esporuladas podem ser aeróbias estritas, anaeróbias facultativas, anaeróbias obrigatórias ou microaerófilas (TORTORA et al., 2013). Os principais gêneros que formam endósporos são *Bacillus* e *Clostridium*.

Cada endósporo contém uma cópia completa do cromossomo bacteriano, concentrações mínimas restritas de proteínas, alta concentração de cálcio e é circundado por uma parede de peptidoglicano, córtex (pseudopeptidoglicano), capa (queratina) e membrana lipoproteica. Este revestimento é responsável pela resistência a muitas substâncias agressivas (TORTORA et al., 2013).

O endósporo é uma estrutura que não apresenta metabolismo, podendo ser reativada quando as condições ambientais voltam a ser favoráveis. Por exemplo, esporos com 7.500 anos de *Thermoactinomyces vulgaris*, isolados do lodo congelado, germinaram quando reaquecidos e colocados em um meio nutriente (TORTORA et al., 2013).

A germinação do esporo bacteriano pode ser comparada à germinação de uma semente. Entretanto, nas bactérias o esporo está relacionado à sobrevivência e não à reprodução. O endósporo não se divide e a célula-mãe origina, normalmente, apenas um esporo (TORTORA et al., 2013).

Após a coloração da célula e a observação em microscópio, o endósporo poderá ser classificado como terminal (em uma das extremidades), subterminal (próximo de uma das extremidades) ou central. Além da posição, a possibilidade de causar intumescimento na célula são características utilizadas para identificar a bactéria (BURTON; ENGELKIRK, 2005).

As bactérias esporuladas são bem conhecidas quando associadas a doenças, como é o caso do *Bacillus anthracis*, que causa “Antraz ou Antrax”, uma doença do gado, ovelhas e cavalos que pode ser transmitida ao ser humano. Outra bactéria de destaque é o *Bacillus thuringiensis*, patógeno microbiano de insetos, que quando esporula internamente forma cristais intracelulares de glicoproteínas tóxicas (toxinas), causando a paralisia do intestino do inseto e fazendo com que este pare de se alimentar (TORTORA et al., 2013). Porém, as espécies de *Clostridium*, que são anaeróbias, estão associadas às seguintes doenças: tétano, botulismo e gangrena gasosa, respectivamente, causadas por: *C. tetani*; *C. botulinum* e *C. perfringens*.

Ao avaliar a população microbiana do solo em diversos sistemas de cultura e em duas profundidades, Catellan e Vidor (1990) observaram maior proporção de endósporos em solos descobertos e justificaram esse fato como reflexo das condições adversas desse sistema para o desenvolvimento microbiano. Já no solo com a leguminosa siratro (*Macroptilium atropurpureum*), apesar do maior número de bactérias, ocorreu a menor proporção de endósporos entre os tratamentos analisados. A estabilidade desse sistema, associada à boa conservação da umidade, é responsável pela baixa porcentagem de endósporos. Os mesmos autores constataram que as condições se tornam mais adversas aos micro-organismos conforme aumenta a profundidade, aumentando o número de endósporos, conseqüentemente.

Dionísio (1996), trabalhando com a população microbiana em áreas de *Eucalyptus grandis*, encontrou uma variação de 14,1 a 39,9 % na proporção de esporos nas densidades populacionais bacterianas, sendo que os tratamentos com adubação mineral apresentaram maiores proporções do que aqueles que receberam composto orgânico e calagem. Além disso, a quantidade de endósporos atingiu valores máximos em períodos de estiagem, demonstrando que em condições adversas as bactérias esporuladas entram em repouso no solo, permanecendo inativas.

Devido à sua resistência a condições ambientais adversas, as bactérias esporuladas do solo apresentam grande potencial, juntamente com os demais parâmetros microbiológicos, para avaliar os impactos resultantes de ações antrópicas das mais diversas naturezas, desde uma simples adubação ou perda do horizonte do solo até o derramamento de produtos químicos.

## PROTOCOLO II

### CONTAGEM DE BACTÉRIAS ESPORULADAS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE (CLARK, 1965)

#### 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, esferas de vidro (Ø 2,00 mm);
- c) Equipamentos: agitador de frasco, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, banho-maria, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina, agitador de tubos e microscópio estereoscópio (lupa);
- d) Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %) e 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 esporuladas e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo, com um funil, para um 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 colônias (UFC) em agitador de frasco (usar  $\cong$  3,4 G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- d) Aquecer o Erlenmeyer, em banho-maria a 80 °C, por, no mínimo, 15 minutos, para que as formas vegetativas das bactérias sejam eliminadas;

- e) 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 agitar cinco vezes (diluição 1:100);
- f) Descartar as ponteiras utilizadas em um béquer contendo solução de detergente (Anexo 1) após cada transferência;
- g) Transferir, com outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar 5 vezes (diluição 1:1.000);
- h) Repetir o item “g” novamente para atingir a diluição 1:10.000;
- i) Com outra ponteira esterilizada, pipetar 0,1 mL das etapas “e”, “g” e “h”, e transferir para a superfície das placas de Petri contendo meio de cultura Thorton (Tabela 3). Para cada diluição utilizar três repetições. Logo, serão feitas nove placas de Petri para análise posterior;
- j) Espalhar o inóculo 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;
- k) Identificar corretamente as placas de Petri, selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, durante 7 dias;
- l) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- m) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

### 3. Cálculo

Realizar o cálculo conforme Capítulo III (p. 22).

### 4. Resultados

Preencher os dados conforme Tabela 4 (p. 22).