



Nutrição Bacteriana - Meios de Cultura

Cristiane Guzzo

Departamento de Microbiologia - ICBII-USP

BMM0160 – Farmácia Diurna

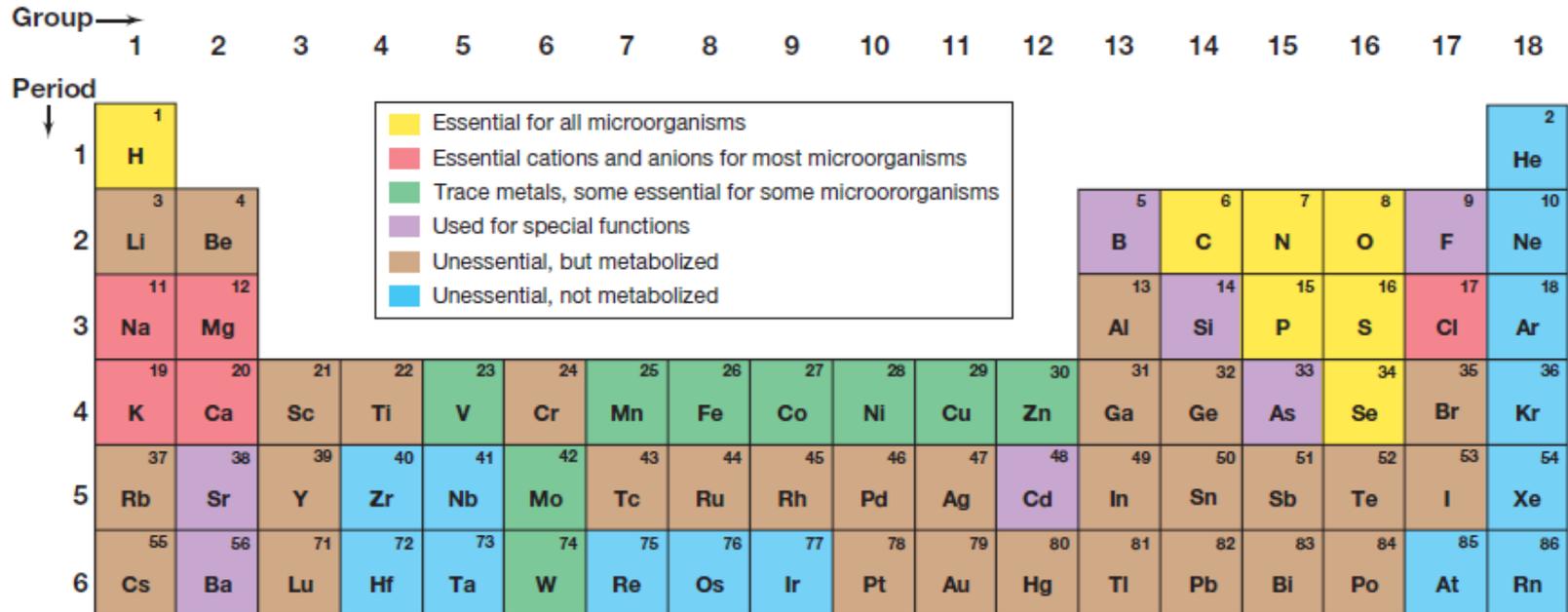
São Paulo, 31 de Agosto de 2017

Group →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Period ↓	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn

- Essential for all microorganisms
- Essential cations and anions for most microorganisms
- Trace metals, some essential for some microorganisms
- Used for special functions
- Unessential, but metabolized
- Unessential, not metabolized

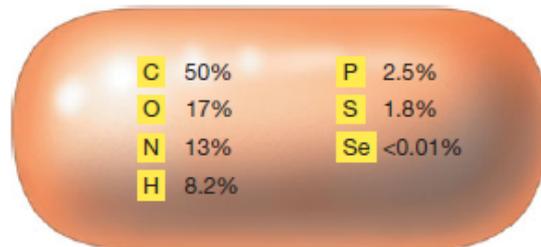
2- Quais são os elementos químicos mais importantes para as células vivas?

Macro ou Micronutrientes essenciais



(a)

Essential elements as a percent of cell dry weight



(b)

Macromolecular composition of a cell

Macromolecule	Percent of dry weight
Protein	55
Lipid	9.1
Polysaccharide	5.0
Lipopolysaccharide	3.4
DNA	3.1
RNA	20.5

(c)

Macronutrientes

Elemento	Principais fontes	Função na célula
C	→ CO ₂ e compostos orgânicos	base de todas as moléculas orgânicas
H	→ H ₂ O e compostos orgânicos	compõem proteínas, ácidos nucleicos e peptidoglicano
O	→ H ₂ O e O ₂	O ₂ : Aceptor de elétrons da cadeia de transporte e regulador do metabolismo
N	→ NH ₃ , NO ₃ e comp. org.	componente de proteínas e ácidos nucleicos, além de vitaminas e outros compostos celulares
P	→ PO ₄	importante na composição de ácidos nucleicos e fosfolipídeos
S	→ H ₂ S, SO ₄ , comp. org.	SO ₄ : aceptor final de elétrons da cadeia de transporte anaeróbia. Reduzido: incorporado a aminoácidos (cisteína e metionina) e a vitaminas (biotina e tiamina)
K	→ K ⁺	ativador de várias enzimas, tais como aquelas envolvidas na tradução
Mg	→ Mg ⁺²	estabilização de ribossomos, membranas e ácidos nucleicos e para o funcionamento de diferentes enzimas como aquelas envolvidas na transferência de fosfato
Ca	→ Ca ⁺²	tem papel na estabilização da parede celular e de termorresistência nos esporos, atividade enzimática
Na	→ Na ⁺	microrganismos marinhos e certas <i>archaea</i> halófilas . Organismos marinhos – reflexo do habitat
Fe	→ Fe ⁺³ , comp. org.	presente em proteínas envolvidas na respiração celular (essencial nos citocromos, cluster Fe-S,..).

Exemplos de micronutrientes

- Chamados de elementos traços
- Geralmente são componentes de enzimas.

Table 4.1 *Micronutrients (trace elements) needed by microorganisms^a*

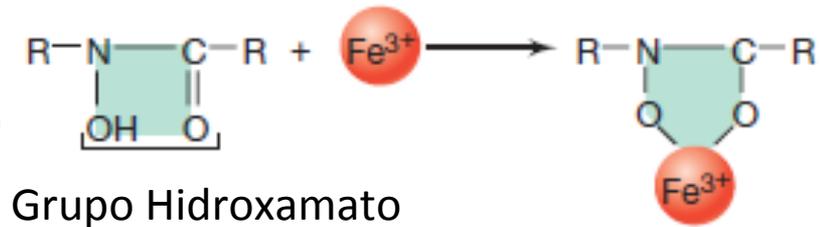
<i>Element</i>	<i>Cellular function or molecule of which a part</i>
Boron (B)	Autoinducer for quorum sensing in bacteria; also found in some polyketide antibiotics
Chromium (Cr)	Possible but not proven component for glucose metabolism (necessary in mammals)
Cobalt (Co)	Vitamin B ₁₂ ; transcarboxylase (only in propionic acid bacteria)
Copper (Cu)	In respiration, cytochrome c oxidase; in photosynthesis, plastocyanin, some superoxide dismutases
Iron (Fe) ^b	Cytochromes; catalases; peroxidases; iron-sulfur proteins; oxygenases; all nitrogenases
Manganese (Mn)	Activator of many enzymes; component of certain superoxide dismutases and of the water-splitting enzyme in oxygenic phototrophs (photosystem II)
Molybdenum (Mo)	Certain flavin-containing enzymes; some nitrogenases, nitrate reductases, sulfite oxidases, DMSO-TMAO reductases; some formate dehydrogenases
Nickel (Ni)	Most hydrogenases; coenzyme F ₄₃₀ of methanogens; carbon monoxide dehydrogenase; urease
Selenium (Se)	Formate dehydrogenase; some hydrogenases; the amino acid selenocysteine
Tungsten (W)	Some formate dehydrogenases; oxotransferases of hyperthermophiles
Vanadium (V)	Vanadium nitrogenase; bromoperoxidase
Zinc (Zn)	Carbonic anhydrase; alcohol dehydrogenase; RNA and DNA polymerases; and many DNA-binding proteins

^aNot every micronutrient listed is required by all cells; some metals listed are found in enzymes or cofactors present in only specific microorganisms.

^bNeeded in greater amounts than other trace metals.

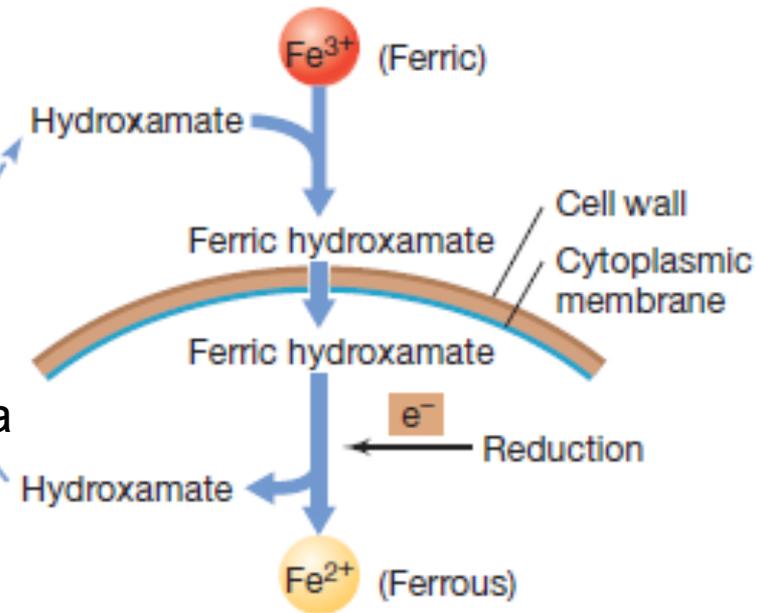
Captação do Ferro por Quelantes

- Condições anóxicas está na forma Fe^{+2}
- Condições óxicas está na forma de Fe^{+3} , insolúvel e se depositam em minerais
- Captação do Ferro – via Quelantes (Sideróforos)– internaliza o ferro extracelular
 - Compostos derivados do ácido Hidroxamato
 - Sideróforos fenólicos, chamados de enterobactina férrica
 - Aquaquelina (grupos peptídicos) – cauda hidrofóbica que auxília a internalização do ferro.
 - Alta afinidade e consegue captar ferro na concentração de 10^{-12}g/mL .
 - Encontrado em bactérias marinhas, que tem que pegar ferro do mar



Grupo Hidroxamato

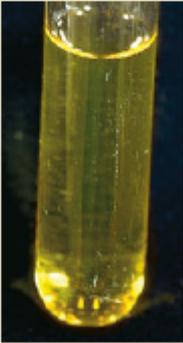
(a)



(b)

5- Classifique os meios de 1 a 4 como **defenido** ou **complexo**, e qual bactéria tem a maior capacidade biossintética?

Table 4.2 Examples of culture media for microorganisms with simple and demanding nutritional requirements^a

for <i>Escherichia coli</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>E. coli</i> or <i>L. mesenteroides</i>	<i>Thiobacillus thioparus</i>
K ₂ HPO ₄ 7 g KH ₂ PO ₄ 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.02 g Glucose 4–10 g Trace elements (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2–10 μg each Distilled water 1000 ml pH 7	K ₂ HPO ₄ 0.6 g KH ₂ PO ₄ 0.6 g NH ₄ Cl 3 g MgSO ₄ 0.1 g Glucose 25 g Sodium acetate 25 g Amino acids (alanine, arginine, asparagine, aspartate, cysteine, glutamate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine) 100–200 μg of each Purines and pyrimidines (adenine, guanine, uracil, xanthine) 10 mg of each Vitamins (biotin, folate, nicotinic acid, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxine, riboflavin, thiamine, pantothenate, <i>p</i> -aminobenzoic acid) 0.01–1 mg of each Trace elements (as in first column) 2–10 μg each Distilled water 1000 ml pH 7	Glucose 15 g Yeast extract 5 g Peptone 5 g KH ₂ PO ₄ 2 g Distilled water 1000 ml pH 7	KH ₂ PO ₄ 0.5 g NH ₄ Cl 0.5 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.05 g KCl 0.5 g Na ₂ S ₂ O ₃ 2 g Trace elements (as in first column) Distilled water 1000 ml pH 7 Carbon source: CO ₂ from air
 <p>(a)</p>		 <p>(b)</p>	

^aThe photos are tubes of (a) the defined medium described, and (b) the complex medium described. Note how the complex medium is colored from the various organic extracts and digests that it contains. Photo credits: Cheryl L. Broadie and John Vercillo, Southern Illinois University at Carbondale.

Meio de Cultura

Meio de Cultura

Condições nutricionais para o crescimento de um microrganismo



Meio Definido

Adição precisa de compostos orgânicos e inorgânicos

Composição química exata

Meio Complexo

Não se sabe a composição exata do meio de cultura.

Exemplos:

- Caseína – proteína do leite
- Extrato de levedura (células de levedura)
- Extrato de carne, soja

Fontes altamente nutricionais

Real composição é desconhecida

Exemplos de meio de Cultura

Que tem maior C.B.
Quimiolitotrófico autotrófico

Table 4.2 Examples of culture media for microorganisms with simple and demanding nutritional requirements^a

Defined culture medium for <i>Escherichia coli</i>	Defined culture medium for <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Complex culture medium for either <i>E. coli</i> or <i>L. mesenteroides</i>	Defined culture medium for <i>Thiobacillus thioiparus</i>
<p>K₂HPO₄ 7 g KH₂PO₄ 2 g (NH₄)₂SO₄ 1 g MgSO₄ 0.1 g CaCl₂ 0.02 g Glucose 4–10 g Trace elements (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2–10 μg each Distilled water 1000 ml pH 7</p>	<p>K₂HPO₄ 0.6 g KH₂PO₄ 0.6 g NH₄Cl 3 g MgSO₄ 0.1 g Glucose 25 g Sodium acetate 25 g Amino acids (alanine, arginine, asparagine, aspartate, cysteine, glutamate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine) 100–200 μg of each Purines and pyrimidines (adenine, guanine, uracil, xanthine) 10 mg of each Vitamins (biotin, folate, nicotinic acid, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxine, riboflavin, thiamine, pantothenate, <i>p</i>-aminobenzoic acid) 0.01–1 mg of each Trace elements (as in first column) 2–10 μg each Distilled water 1000 ml pH 7</p>	<p>Glucose 15 g Yeast extract 5 g Peptone 5 g KH₂PO₄ 2 g Distilled water 1000 ml pH 7</p>	<p>KH₂PO₄ 0.5 g NH₄Cl 0.5 g MgSO₄ 0.1 g CaCl₂ 0.05 g KCl 0.5 g Na₂S₂O₃ 2 g Trace elements (as in first column) Distilled water 1000 ml pH 7 <u>Carbon source: CO₂ from air</u></p>

Meio Complexo

Meio Definido



(a)



(b)

E. coli tem capacidade biossintética maior que *L. mesenteroides*

Capacidade Biossintética:
quanto o organismo consegue sintetizar fatores importantes para o seu crescimento

^aThe photos are tubes of (a) the defined medium described, and (b) the complex medium described. Note how the complex medium is colored from the various organic extracts and digests that it contains. Photo credits: Cheryl L. Broadie and John Vercillo, Southern Illinois University at Carbondale.

Meio Seletivo ou Diferenciais

- **Meio Seletivo**

Contém compostos que inibem o crescimento de alguns microrganismos mas de outros não

- **Meio Diferenciado**

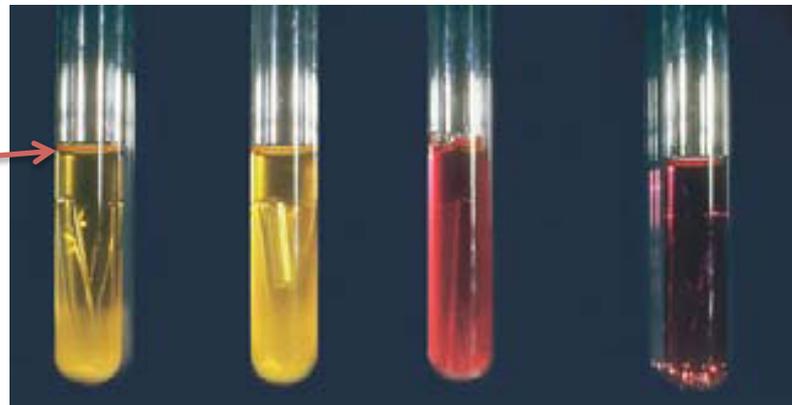
Adiciona um indicador (corante, por exemplo), diferenciar reações químicas que ocorrem durante o crescimento .

Distinção de espécies de bactérias

Meio Diferencial para verificar Fermentação de açúcares

Formação de ácido – mudança de cor

Tubos invertidos
Se tem formação de gás fica preso



Ácido

Ácido e gás

Cont. -

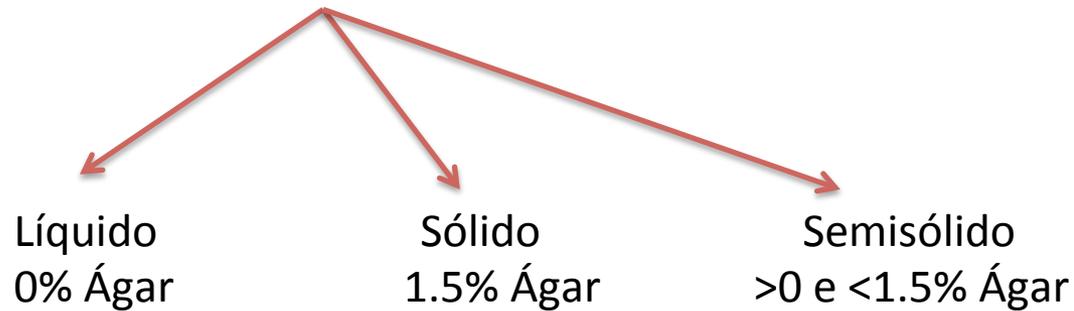
Não inoculado

Preparar um Meio de Cultura

- Para o cultivo é necessário saber suas necessidades nutricionais
- Alguns casos é necessário a adição de soro, sangue (*N. gonorrhoeae*) e etc..
- Mimetizar o meio natural de crescimento do organismo

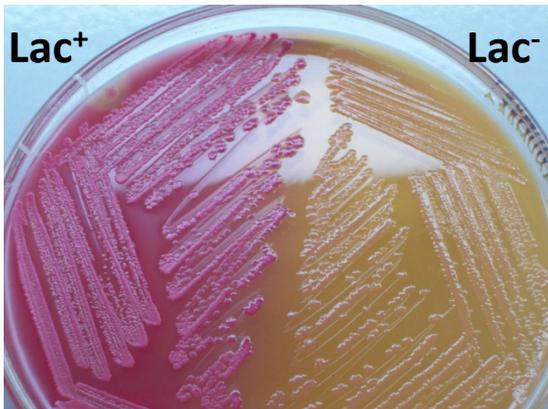
Cultivo de Microrganismos em Laboratório

- Meio devidamente preparado e estéril (autoclave, fluxo)
- Três tipos de meio de cultura



5- O meio de cultura Ágar MacConkey é Seletivo, Diferenciado, Complexo e/ou Definido?

Ágar MacConkey

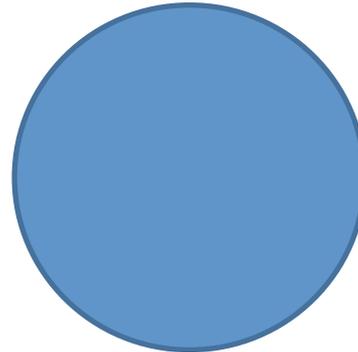


Lactose – Diferencia Lac⁺ (ácido pH cai)
Seletivo para Gram Negativo
(sais biliares inibem G⁺)

http://en.wikipedia.org/wiki/MacConkey_agar

Ágar Staphylococcus 110

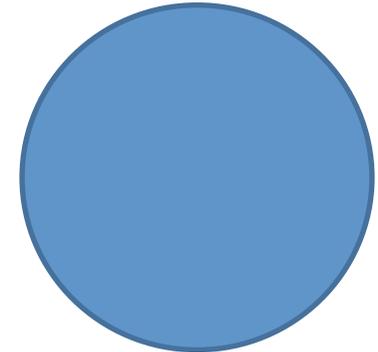
Stone Gelatin Ágar



Isolar e diferenciar *Staphy.*
Alta concentração sal - 7.5%
Manitose⁺
Formação de pigmento
Atividade Gelatinase

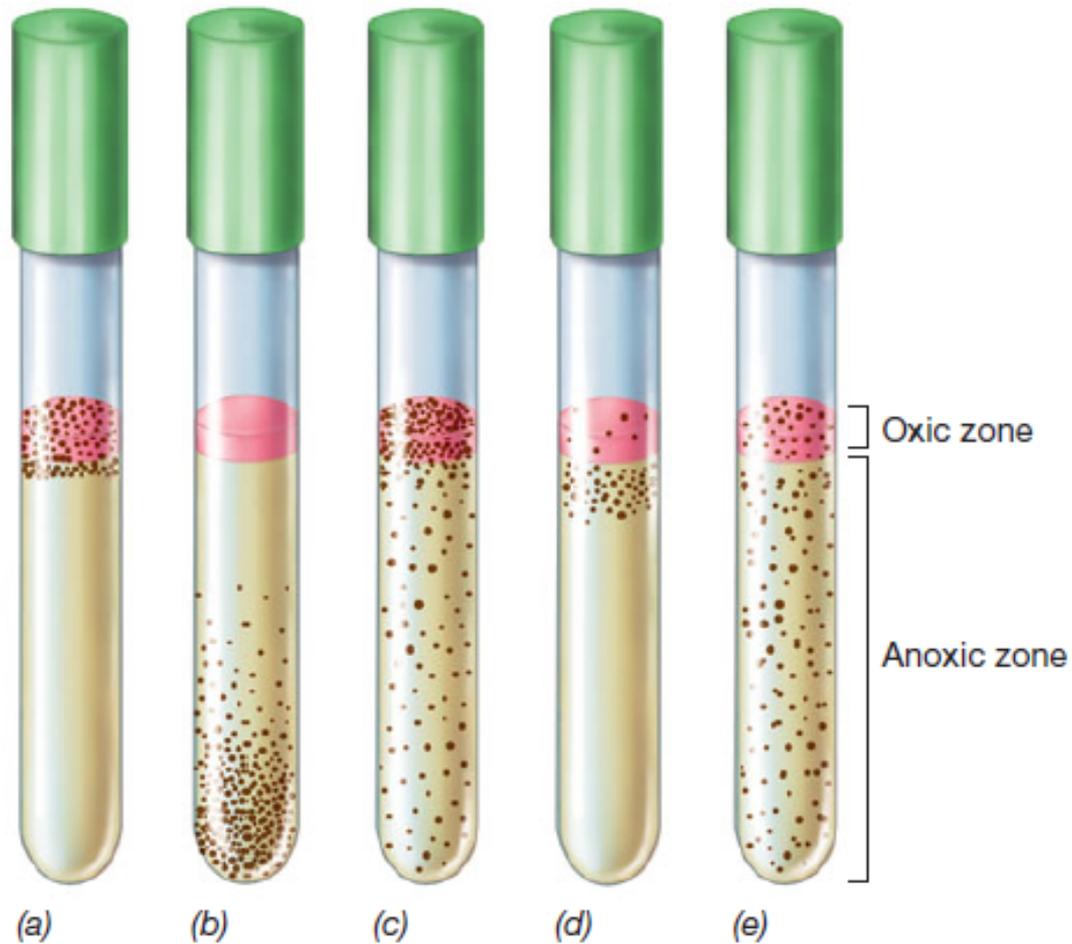
https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/229730.pdf

Ágar Triptona Soja (TSA)



Não é um meio Inibitório
Cresce mic. fastidiosos

5- Em qual tubo há microrganismos microaerófilo e Aeróbio facultativo?



Efeito do Oxigênio

Table 5.5 Oxygen relationships of microorganisms

Group	Relationship to O ₂	Type of metabolism	Example ^a	Habitat ^b
Aerobes				
Obligate	Required	Aerobic respiration	<i>Micrococcus luteus</i> (B)	Skin, dust
Facultative	Not required, but growth better with O ₂	Aerobic respiration, anaerobic respiration, fermentation	<i>Escherichia coli</i> (B)	Intestino grosso
Microaerófilos	Required but at levels lower than atmospheric	Aerobic respiration	<i>Spirillum volutans</i> (B)	Lake water
Anaerobes				
Aerotolerant	Not required, and growth no better when O ₂ present	Fermentation	<i>Streptococcus pyogenes</i> (B)	Trato respiratório superior
Obligate	Harmful or lethal	Fermentation or anaerobic respiration	<i>Methanobacterium formicicum</i> (A)	Sedimentos de lagos anóxicos

Capazes de respirar usando O₂

Respiração sem O₂

Encontrada em 3 grupos:

1- Procariotos

bactérias anaeróbias – *Clostridium*

Archaea

2- Fungos

3- Protozoários

Efeito do Oxigênio no crescimento no laboratório

- **Aeróbios**

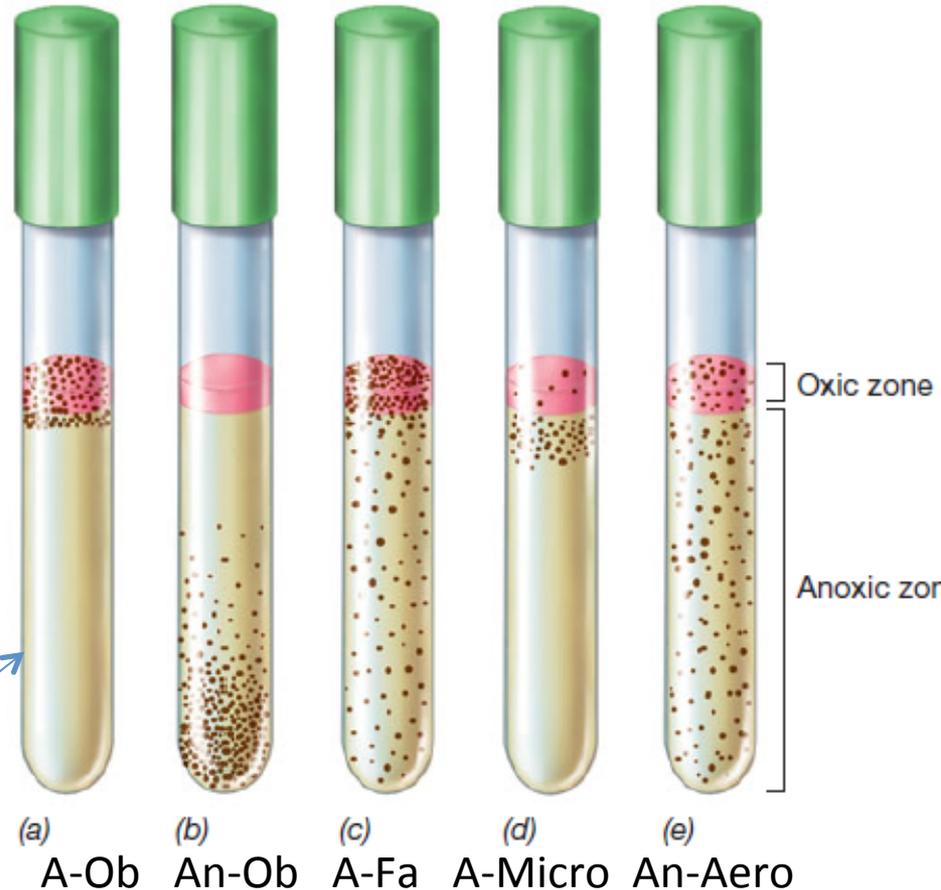
- Necessita de agitação (aeração forçada)
- Adicionar O_2

- **Anaeróbios**

- Remover o O_2 através da adição de agentes redutores como tioglicolato (reduz o O_2 a água)
- Casos de anaeróbios obrigatórios a remoção total de O_2 é complicada, crescer em ambientes específicos

O_2 consegue penetrar apenas na superfície, o resto do meio é sem O_2 por causa do tioglicolato

Teste do efeito do Oxigênio nos organismos



Pergunta

6- Como eles são classificados com base:

- a. Osmolaridade
- b. pH
- c. Temperatura



Efeito da Temperatura

- **Temperaturas Cardeais**

Características para todos os microrganismos

- **Mínima**

- Gelificação da membrana, quando a membrana para funcionar, como no transporte de nutrientes a bactéria para de crescer.
- Não tem força próton motiva

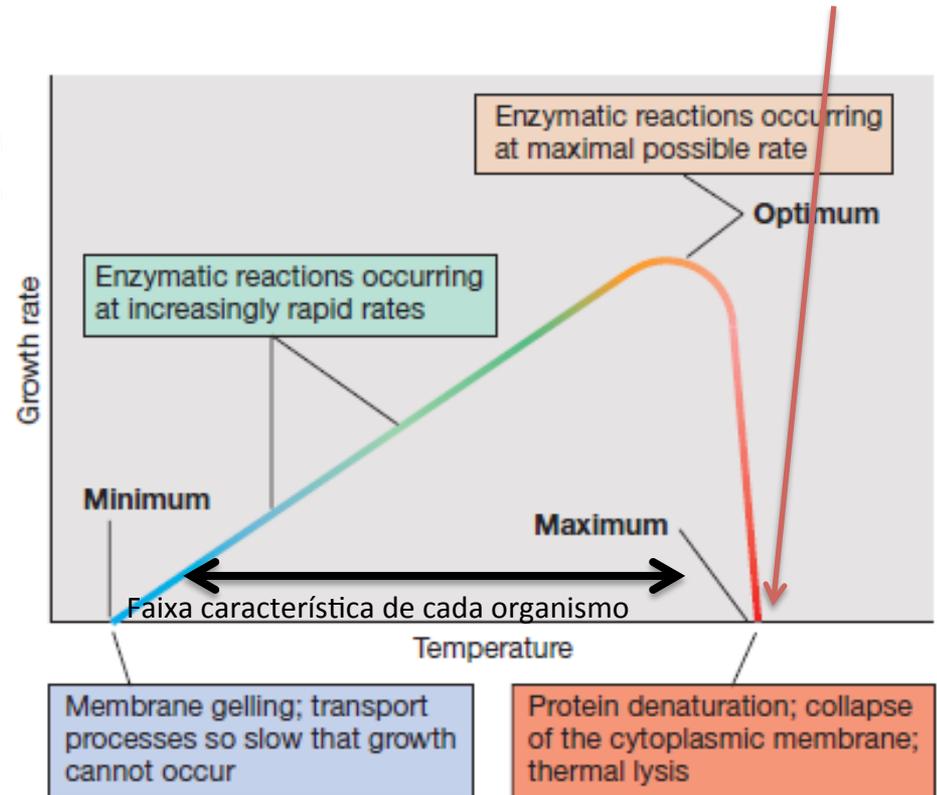
- **Ótima**

- Condição em que todos os componentes estão na sua atividade máxima

- **Máxima**

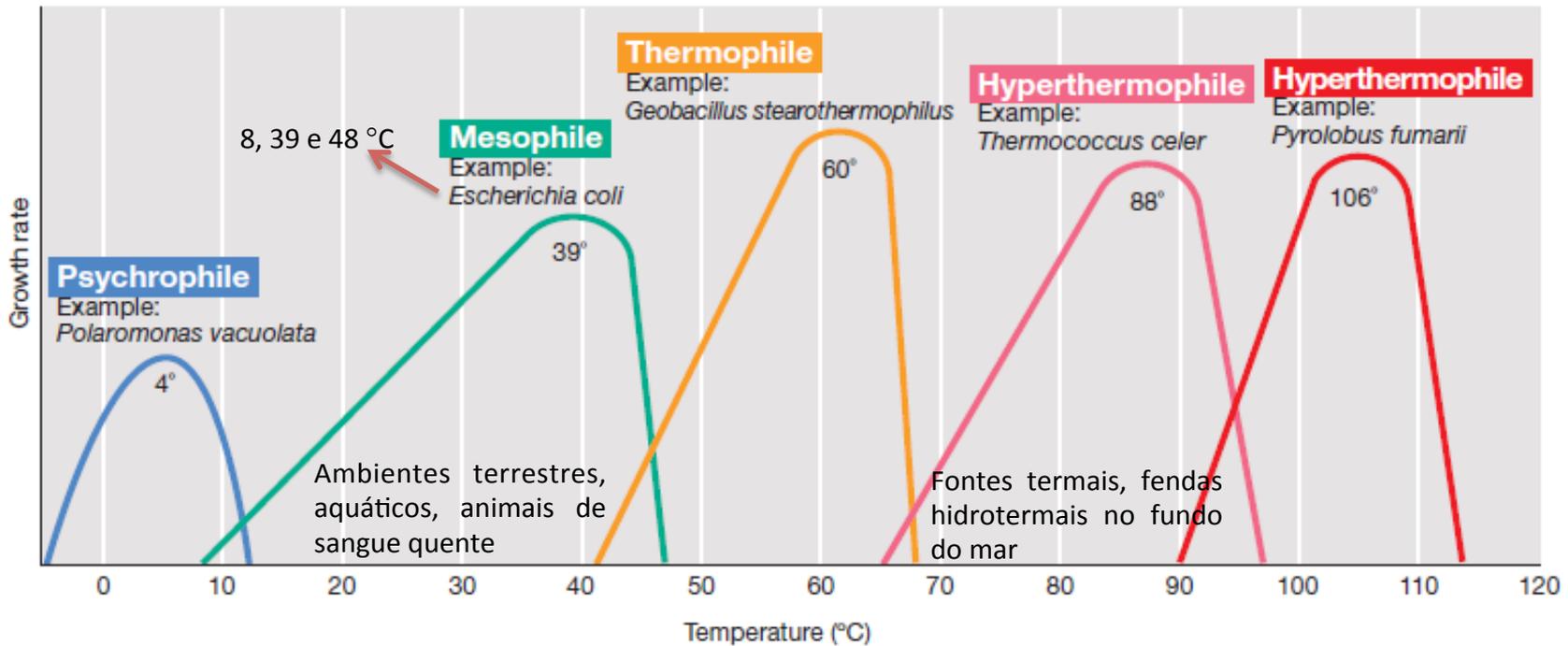
- Faixa normal de variação de temperatura é 25-40 °C
- Não conseguem crescer em todas as faixas

Processo geralmente irreversível
Exemplo febre



Efeito da Temperatura

- 4 Classes térmicas dos Microrganismos com base na temperatura ótima de crescimento



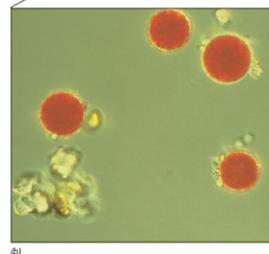
Microrganismos Psicrófilos

- **Organismos extremófilos**
 - vivem em condições extremas, muito frio ou muito quente
- São encontrados em ambientes constantemente frios - termosensíveis
- Grande parte da superfície da Terra é fria
- Encontra em sulcos de água dentro do gelo (-12°C).
- Ambientes frios na Terra
 - Ártico
 - Antártida
 - No fundo do mar (1-3 °C)

Essas algas formam massas densas no interior do gelo (sulcos de água líquida)

Alga da neve que esporula
(↑ temp.) e fica vermelha
Em geral é verde

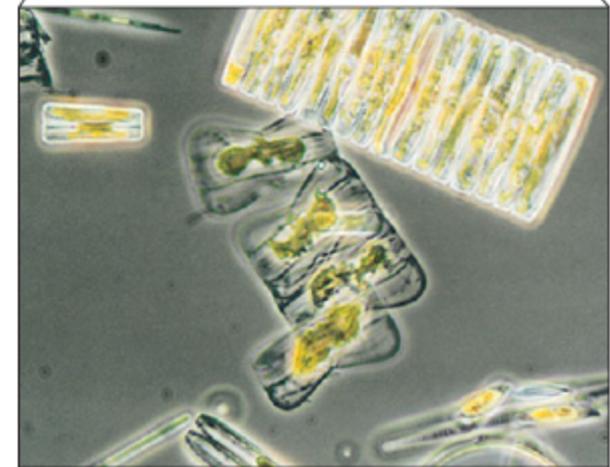
California
Algas da neve
Chlamydomonas nivalis



John Gosink and James T. Staley

(a)

Algas verdes (eucariótos fototróficos)



John Gosink and James T. Staley

(b)

Microorganismos **Psicrotolerantes**

- Organismo capazes de crescer a 0°C (lento), com temperatura ótima de 20-40°C.
- São mais abundantes que os psicrófilos, como as algas da neve.
- Várias bactérias, *Archaea* e eucariotos são psicrotolerantes.
- Encontrados solos, água de clima temperado, carne, leite, ...

Crescimento microbiano em altas Temperaturas

- Organismo procariotos com temp. ótima
(*termófilos*) > 45°C
(*hipertermófilos*) > 80°C
- Vulcões e Fontes termais



Fontes termais
ferventes
150-500°C

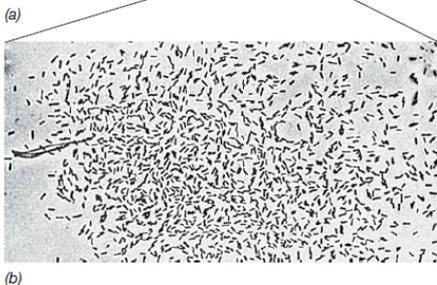


Figure 5.22 Growth of hyperthermophiles in boiling water.

Table 5.1 Presently known upper temperature limits for growth of living organisms

Group	Upper temperature limits (°C)
Macroorganisms	
<i>Animals</i>	
Fish and other aquatic vertebrates	38
Insects	45–50
Ostracods (crustaceans)	49–50
<i>Plants</i>	
Vascular plants	45 (60 for one species)
Mosses	50
Microorganisms	
<i>Eukaryotic microorganisms</i>	
Protozoa	56
Algae	55–60
Fungi	60–62
Prokaryotes	
<i>Bacteria</i>	
Cyanobacteria	73
Anoxygenic phototrophs	70–73
Chemoorganotrophs/chemolithotrophs	95
<i>Archaea</i>	
Chemoorganotrophs/chemolithotrophs	122

Crescimento microbiano em altas Temperaturas

- Acima de 65°C só *Bacteria* e *Archaea*
- *Archaea* são os mais termófilos

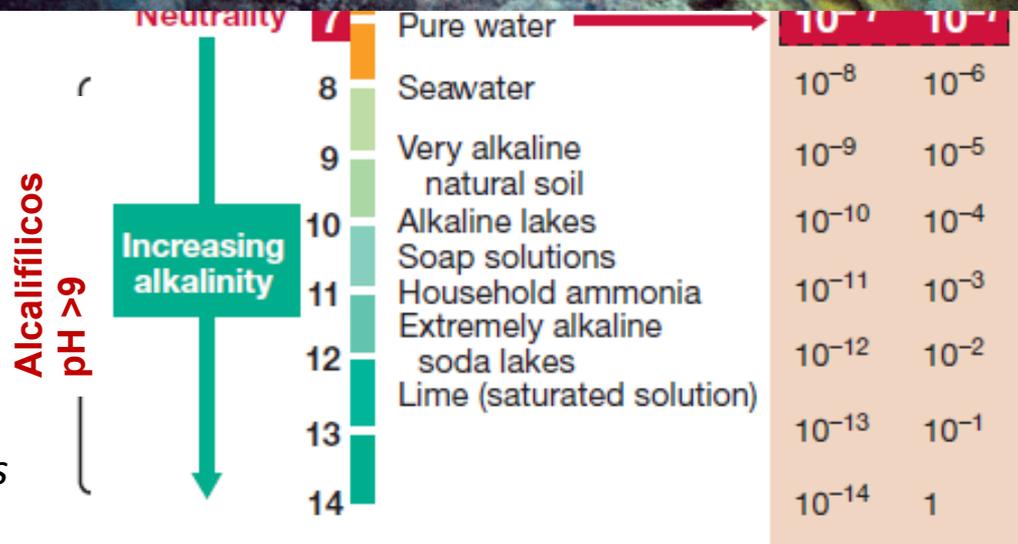
Table 5.1 Presently known upper temperature limits for growth of living organisms

Group	Upper temperature limits (°C)
Macroorganisms	
<i>Animals</i>	
Fish and other aquatic vertebrates	38
Insects	45–50
Ostracods (crustaceans)	49–50
<i>Plants</i>	
Vascular plants	45 (60 for one species)
Mosses	50
Microorganisms	
<i>Eukaryotic microorganisms</i>	
Protozoa	56
Algae	55–60
Fungi	60–62
Prokaryotes	
<i>Bacteria</i>	
Cyanobacteria	73
Anoxygenic phototrophs	70–73
Chemoorganotrophs/chemolithotrophs	95
<i>Archaea</i>	
Chemoorganotrophs/chemolithotrophs	122

E



- Faixa de pH varia de 2-3 unidades
- pH ótimo
- Maioria crescem em pH 4-9 (m dos ambientes)
- Poucos em pH <3 e >9
- Acidófilos
 - Maior quantidade de fungos (menos, como pH2)
 - Estabilidade da membrana é dependente de altas [] de H⁺
 - Obrigatórios, não crescem em pH neutro
 - *Acidithiobacillus*
 - Vários gêneros de *Archaea*
 - *Picrophilus oshimae* - pH ótimo 0.7 e em pH 4 lise celular.
 - pH intracelular 4.5
 - Habita solos quentes, ácidos com atividade vulcânica



Efeito do pH

Alcalifílicos

- pH ótimo >9
 - pH intracelular mais elevado encontrado foi de 9.5
 - DNA é instável em condições ácidas e o RNA em básicas
 - Encontrados
 - Lagos e solos ricos em carbonato de sódio
 - Exemplos
 - *Bacillus firmus* cresce na faixa de pH 7.5-11
- Crescimento em laboratório se usa tampões
- Evita que o pH mude

Table 5.2 Relationships of microorganisms to pH

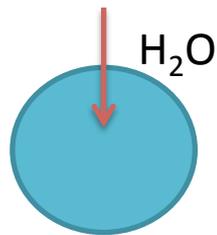
Physiological class (optima range)	Approximate pH optimum for growth	Example organism ^a
Neutrophile (pH >5.5 and <8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidophile (pH <5.5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alkaliphile (pH ≥ 8)	8	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
	9	<i>Bacillus firmus</i>
	10	<i>Natronobacterium gregoryi</i>

^a *Picrophilus* and *Natronobacterium* are Archaea; all others are Bacteria.

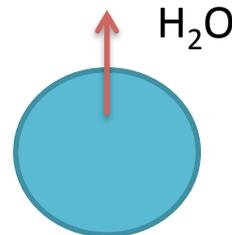
Efeito Osmótico

- Osmose- Migração de moléculas de água de um ambiente menos concentrado (hipotônico) para um ambiente mais concentrado (hipertônico)– até chegar em um equilíbrio (isotônico)

Equilíbrio aquoso +

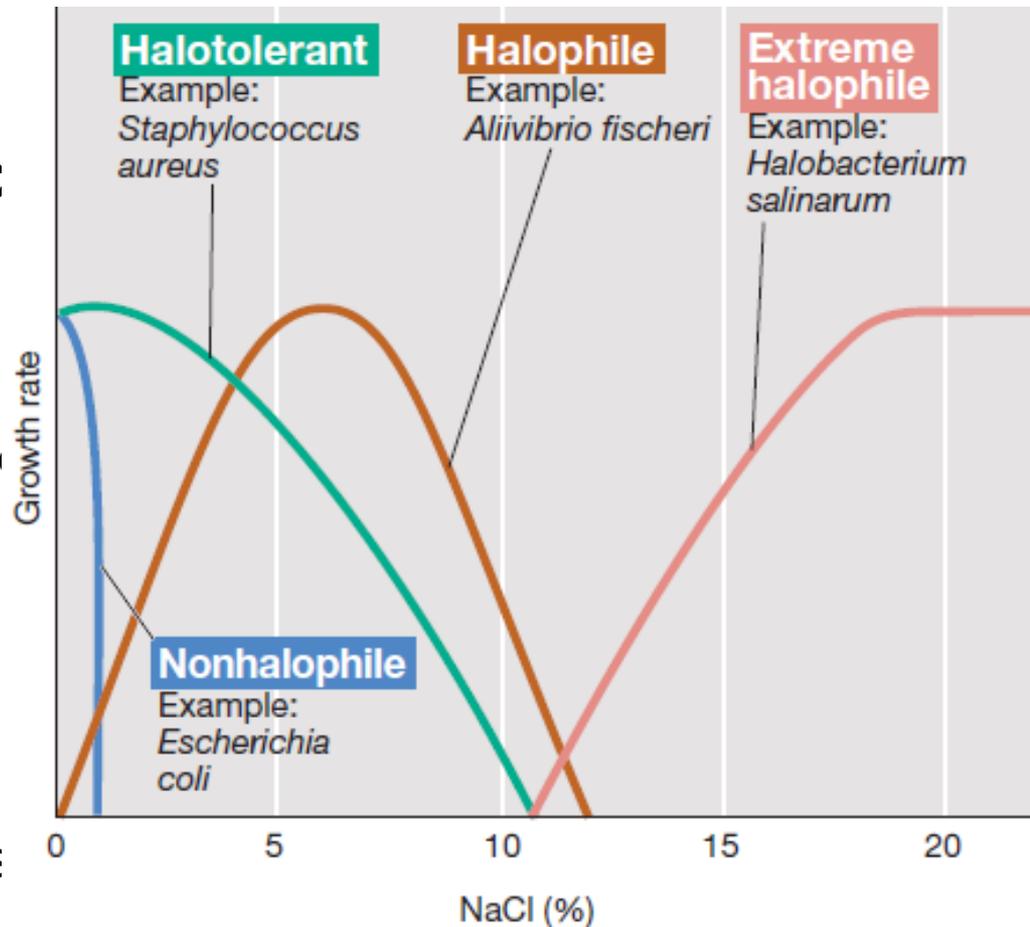


Pode causar morte celular-desidratação



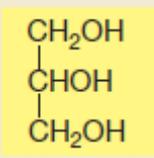
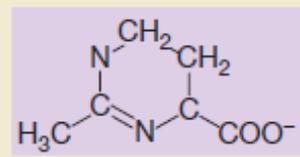
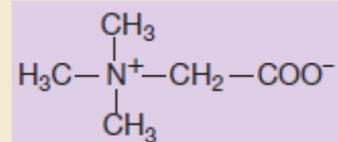
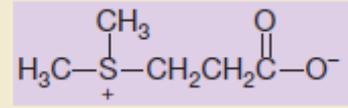
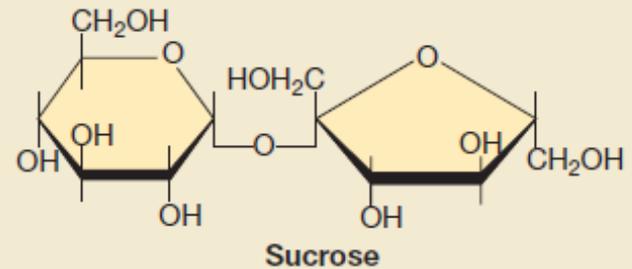
Efeito Osmótico

- **Halófilos discretos** (1-6% NaCl)
 - Mar tem 3% sal
- **Halófilos moderados** (7-15% NaCl)
- **Halófilos extremos**
 - são um problema na indústria alimentícia
 - que usa alta concentração de sais de açúres (osmófilos) como conservantes
- **Não halófilos** crescem em ambientes com pouco sal.
- **Xerófilos** – crescem em ambientes com pouca quantidade de água.
 - As células acumulam ou sintetizam solutos compatíveis para manter o equ. aquaso +



Baixa Quantidade de Água

- Capacidade genética de produzir ou acumular solutos compatíveis
- Aumenta a concentração do soluto interno
- Solute Compatível: não inibe processos químicos intracelulares



Fatores que afetam o Crescimento microbiano

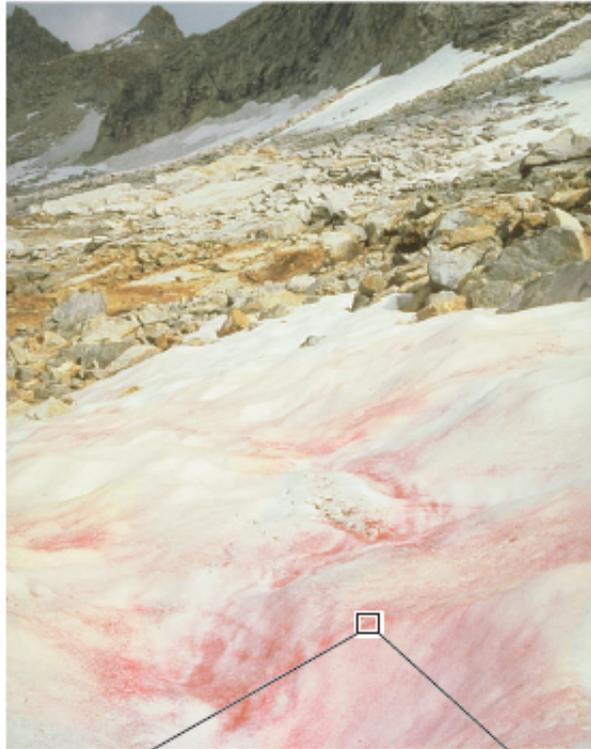
- **Estado Químico e Físico do Ambiente**
 - Temperatura
 - pH
 - Quantidade de água
 - Oxigênio
 - Outros fatores
 - Pressão
 - Radiação

Bactérias não cultiváveis e Metagenômica

- Apenas 1% das bactérias existentes no ambiente são cultiváveis
- Metagenômica
 - Identificação de microrganismos não cultiváveis
 - Genes com algum interesse específico presentes em diferentes amostras ambientais.

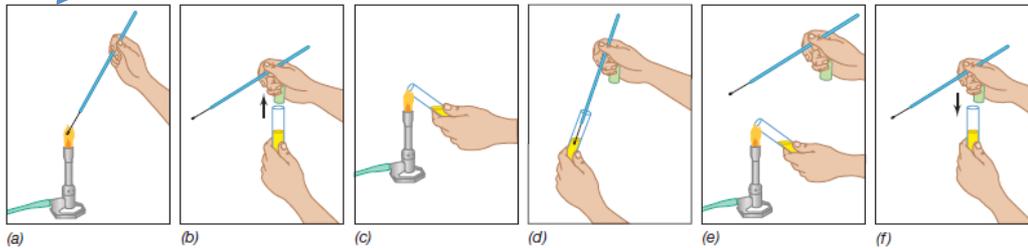
Pergunta

7- Como você isolaria estes microrganismos?

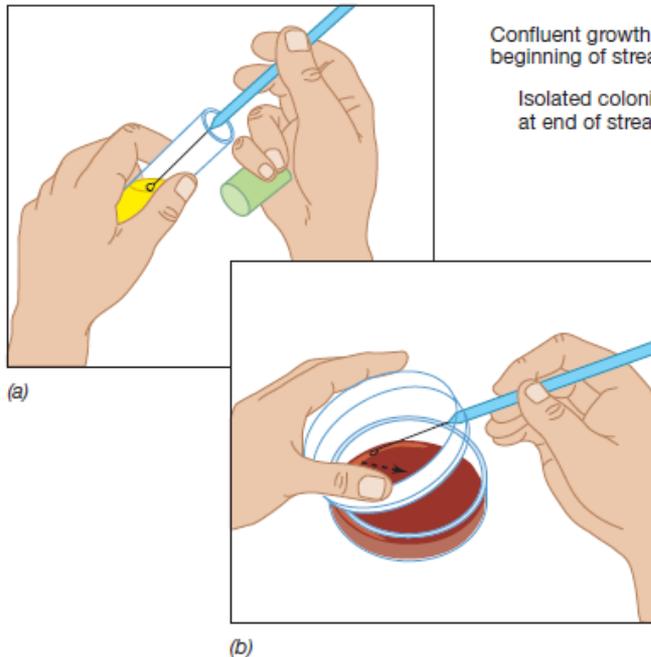


Obtenção de culturas puras por semeadura por esgotamento

- Obtenção de amostras puras (contém apenas um tipo de microrganismo).
- Verificar a pureza da amostra
- Método de assepsia (impedir contaminações)



- Avaliar a pureza da amostra
- A quantidade de diferentes microrganismos
- Obtém **colônias** Isoladas



Confluent growth at beginning of streak
Isolated colonies at end of streak

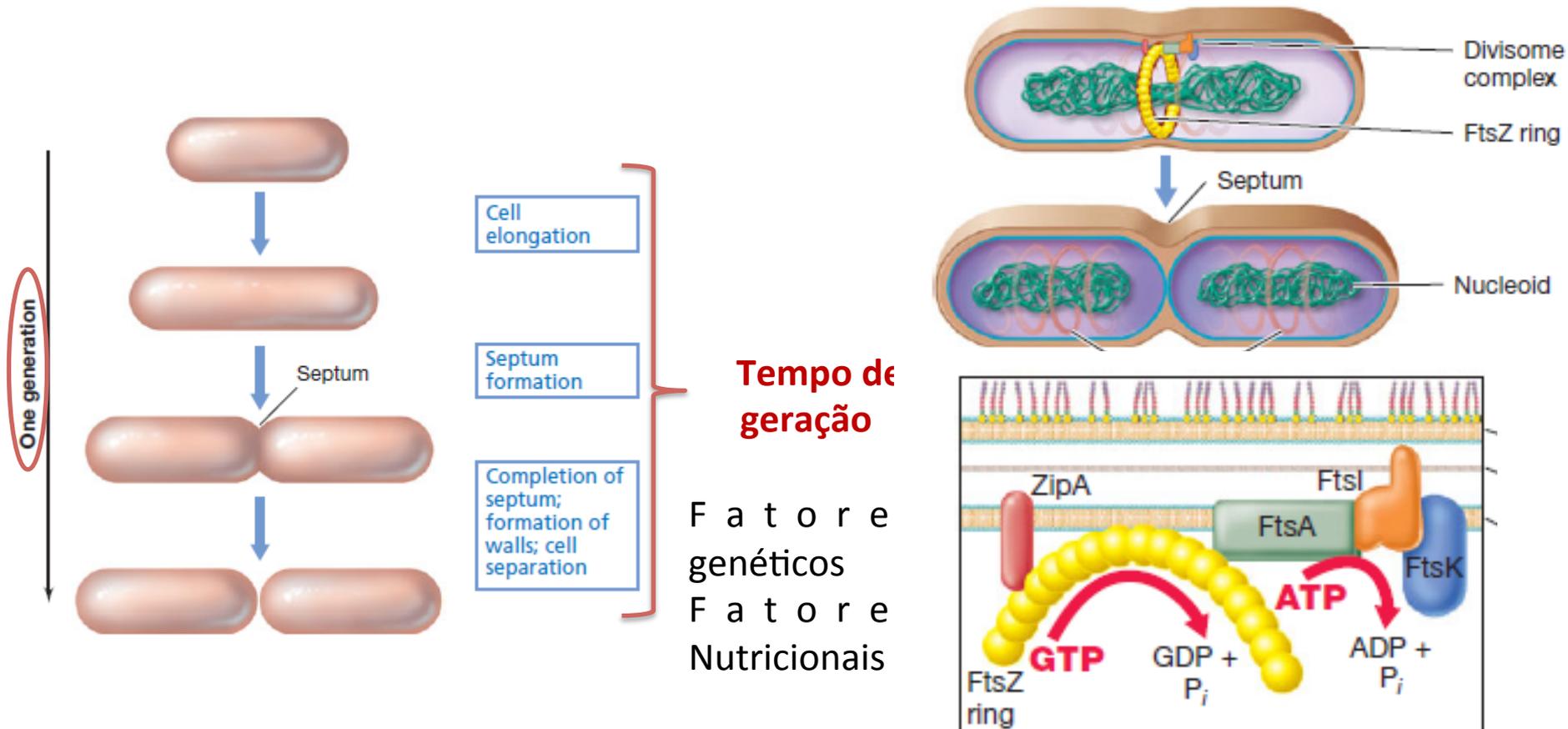


James A. Shapiro, University of Chicago

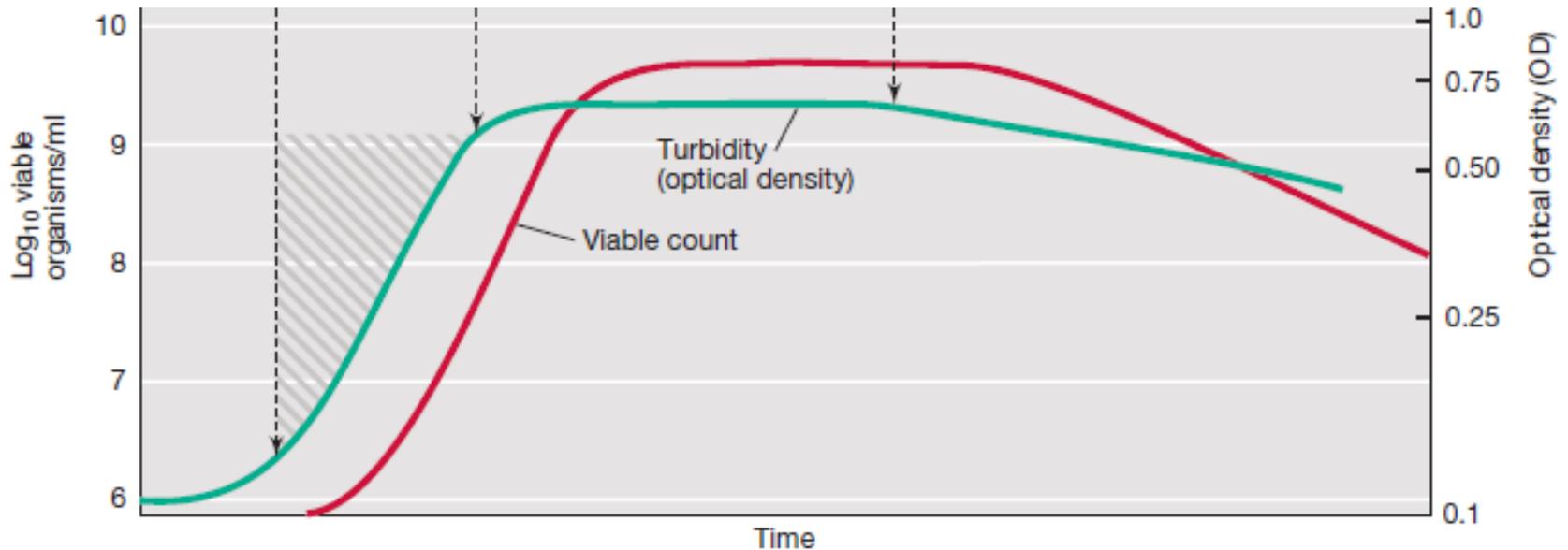
Várias células proveniente de uma única célula (bilhões de células)

Crescimento Bacteriano e Duplicação Celular

- O processo de divisão celular envolve um conjunto de proteínas conhecidas como Fts (*Filamentous temperature Sensitive*) (Todos os Procaríotos e *Archae*, organelas - mitocôndrias e cloroplastos).

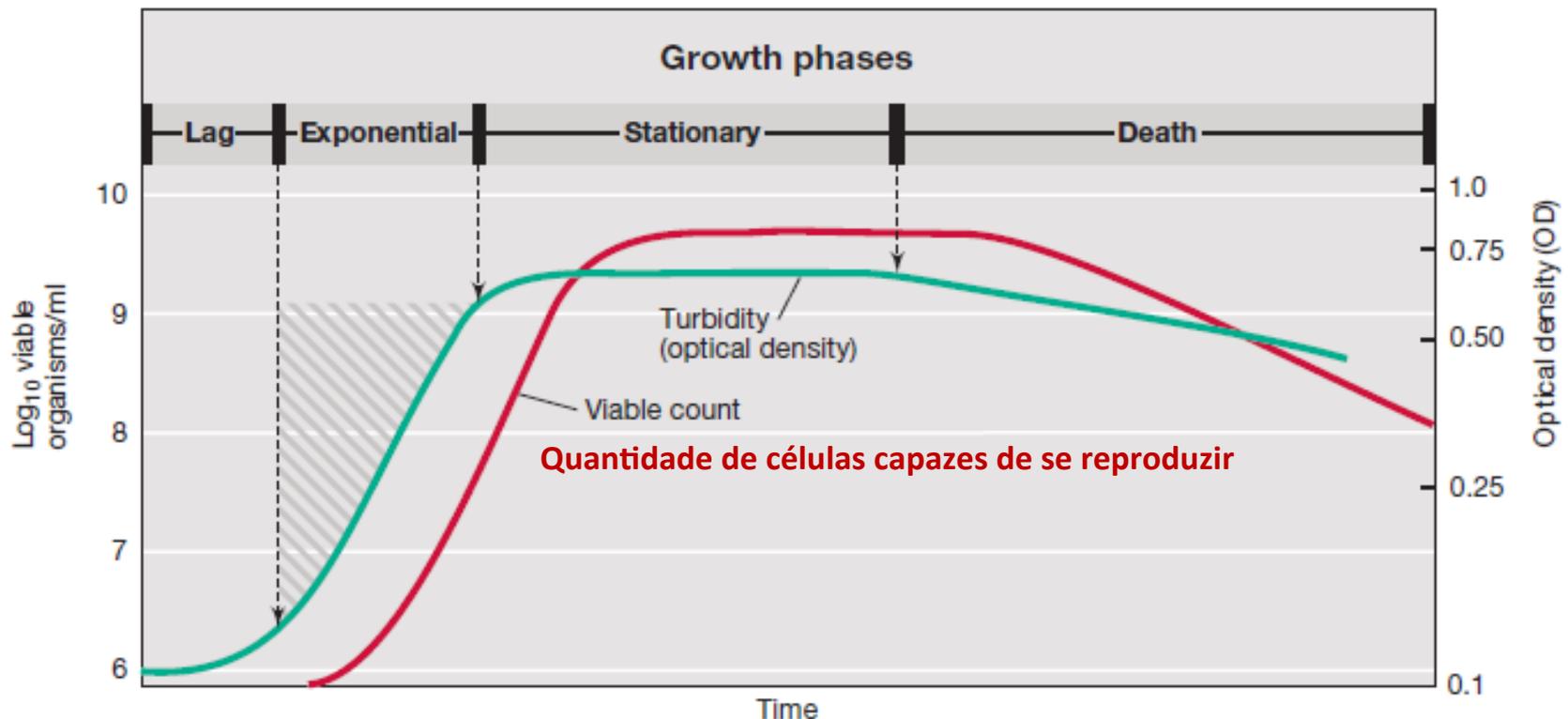


8- DESCREVA AS 4 FASES DE CRESCIMENTO BACTERIANO MOSTRADO NO GRÁFICO



Ciclo de crescimento microbiano Populacional

- Curva de crescimento de uma cultura em batelada (cultura em um sistema fechado) – estes conceitos de fase só se aplicam a populações de células e não a células individuais



Fase lag – Fase de adaptação

- Tempo pode ser curto ou longo depende:
 - Da origem do inóculo (as células tem “memória”)
 - As condições do meio de cultura atual
 - Exemplo:
 - Inóculo na fase exponencial não tem fase lag
 - Inóculo na fase estacionária tem fase lag

Fase exponencial e estacionária

- **Fase exponencial**

- Condições mais saudáveis
- Neste estágio que se faz ensaios enzimáticos, expressão gênica e etc.



- **Fase estacionária**

- Taxa de crescimento é zero
- Limitações dos nutrientes
- Acúmulo de produtos excretados pelos microrganismos – inibe o crescimento
- Pode ocorrer divisão celular quando uma célula morre - **Crescimento crítico**
- Metabolismo e processos biossintéticos podem estar ativos

- **Fase de Morte**

- Morte celular
- Lise celular
- Segue uma curva exponencial mais lenta que a de crescimento

Cálculo da taxa de Crescimento Bacteriano na Fase Exponencial

Crescimento Microbiano

- Qual o problema de comer comida no self service?
- Pq a comida mantida fora do refrigerador estraga mais rápido?

Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256 (2^8)
0.5	2	4.5	512 (2^9)
1	4	5	1,024 (2^{10})
1.5	8	5.5	2,048 (2^{11})
2	16	6	4,096 (2^{12})
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576 (2^{19})

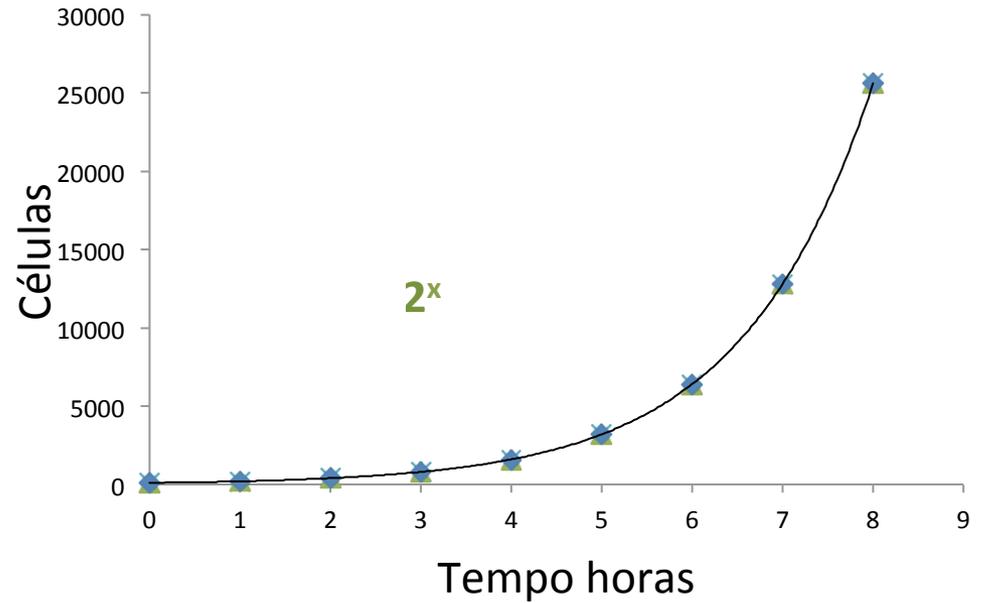
Cada 30 min. tem mais 1 célula

Cada 30 min. tem mais 2048 célula

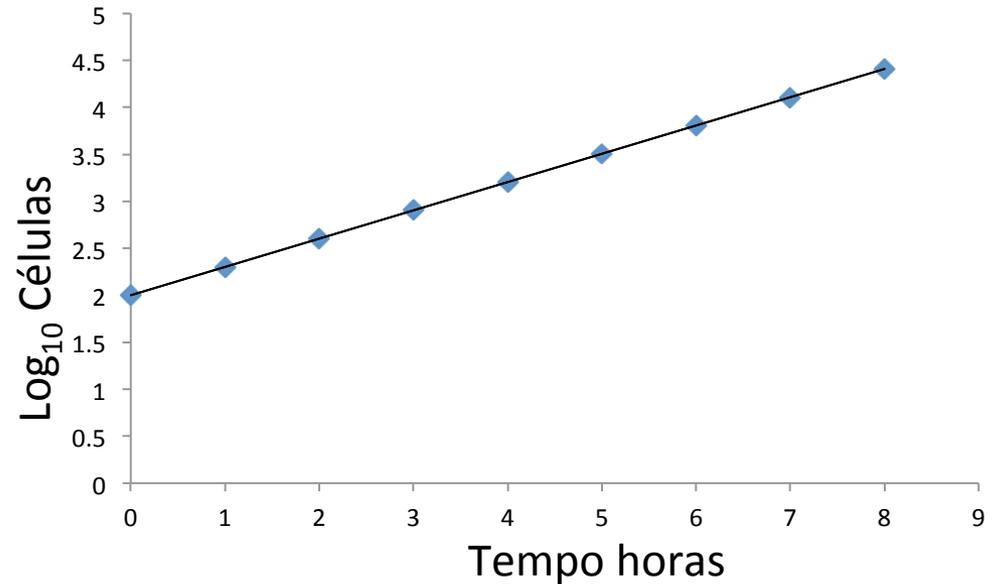
tempo	Número de Células
0	100
1	200
2	400
3	800
4	1600
5	3200
6	6400
7	12800
8	25600

$G = 1H$

$X = n$ e $T = n.g$



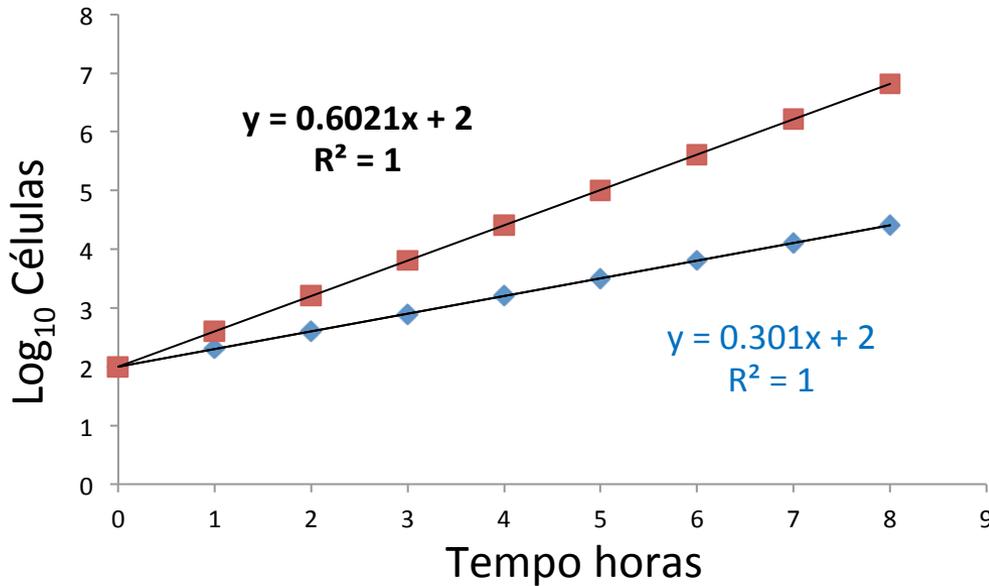
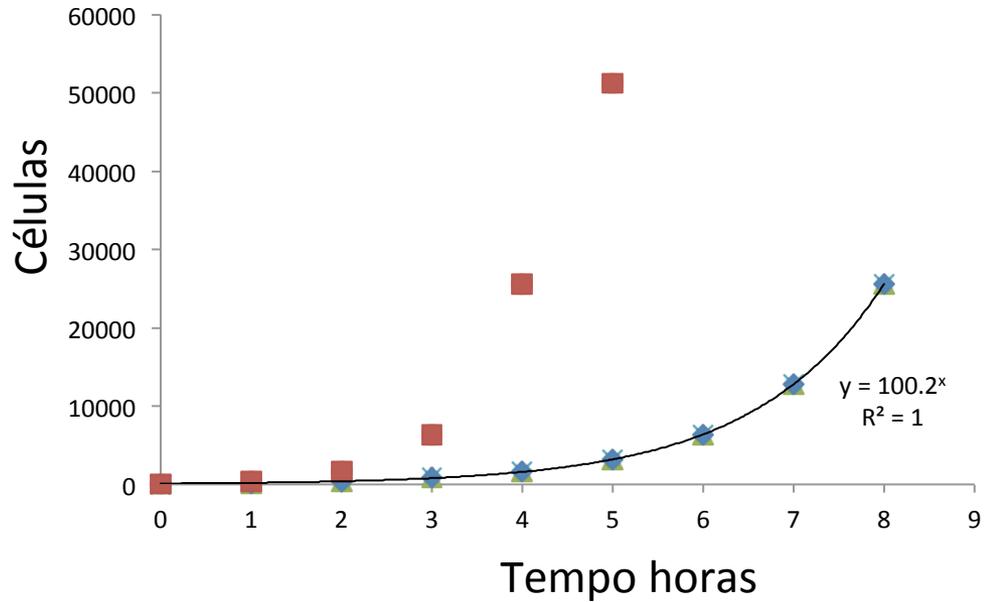
tempo	log(10)
0	2
1	2,301029996
2	2,602059991
3	2,903089987
4	3,204119983
5	3,505149978
6	3,806179974
7	4,10720997
8	4,408239965



Temponumero de Células rápido

0	100	100
1	200	400
2	400	1600
3	800	6400
4	1600	25600
5	3200	51200

G2 = 30min G2 = G1/2

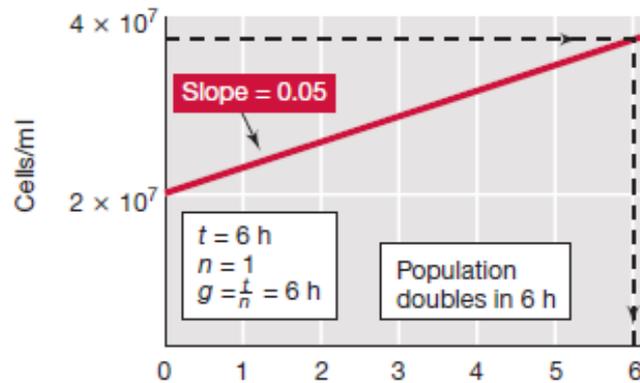


alfa = tangente do ângulo de inclinação = 0,301/g

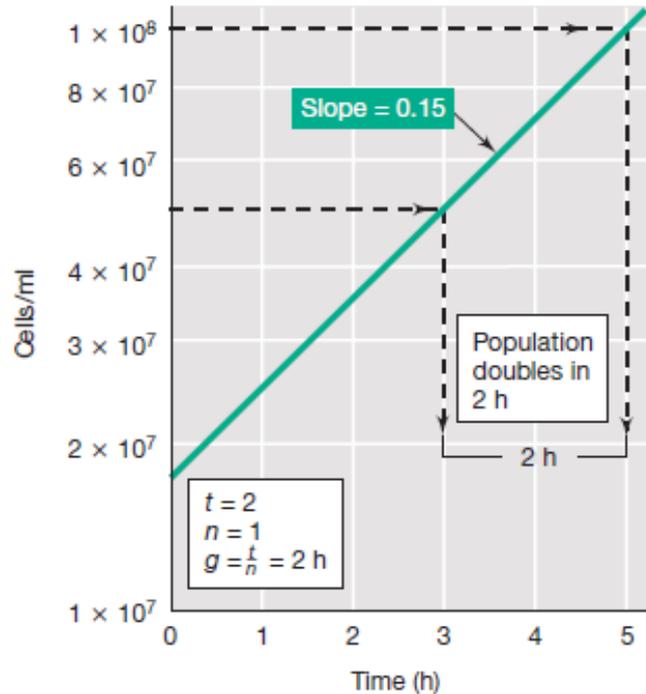
Taxa específica de crescimento (k) 0,301/g

Menor o g maior k

Paramêtros Matemáticos



(a)



- n número de gerações formadas no intervalo de tempo T

- g tempo de geração

- $T = n * g$

- Em uma escala logarítmica a inclinação da curva está diretamente relacionada ao g

- Quanto maior a inclinação menor o g

- $k = \text{inclinação da curva} = \frac{0.301}{g}$

Se há duas culturas com 100 e 50 células, depois de 10 gerações quantas células terão e quanto tempo levará?

- $Y = 100 * 2^n = 100 * 1024$
- Tempo $10 * 30\text{min} = 5 \text{ horas}$

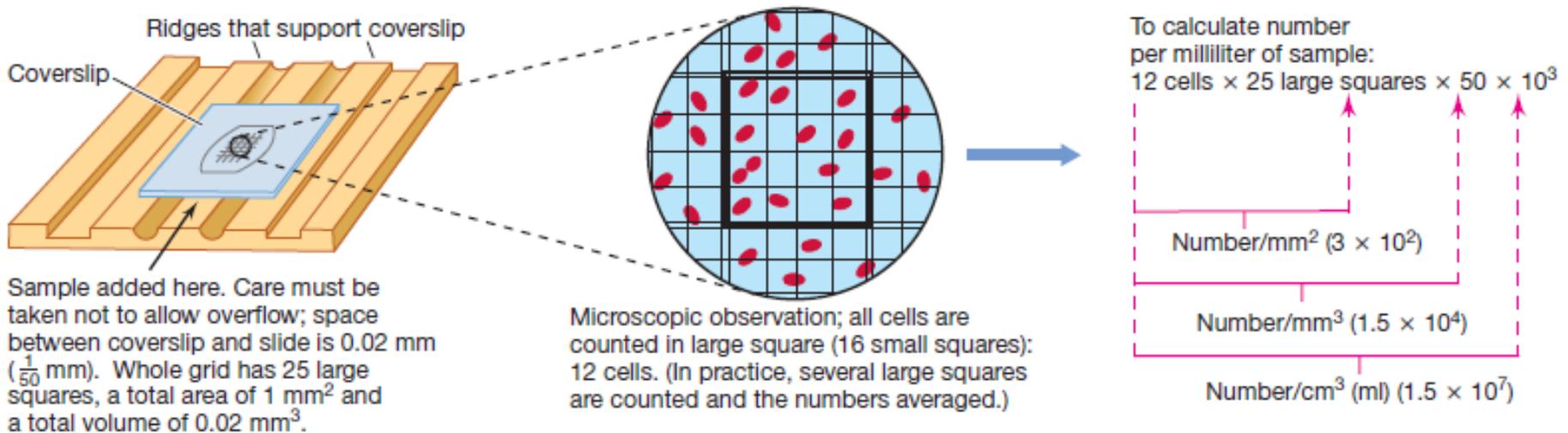
Conteúdo complementar

Formas de medir o crescimento microbiano

- **Contagem de Células**
 - Microscópicas, utilizando câmara de petroff-Hausser
 - Células Viáveis
- **Turbidez – D.O.**

Câmara de Contagem de Petroff-Hausser

- Contagem usando células secas coradas em lâminas
- Contagem de células em meio líquido utilizando câmara de contagem de Petroff-Hausser e microscópio
 - Não consegue distinguir células vivas das mortas
 - Células pequenas são difíceis de ver no microscópio
 - Usar amostras concentradas
 - Impurezas podem ser confundidos como células
 - Pouco precisa



$$1\text{mm}^3 = 10^3 \text{ cm}^3$$

Métodos de contagem de células viáveis/ ou Contagem em Placa

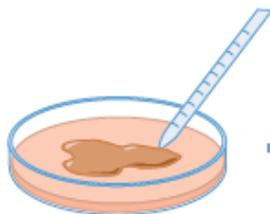
- Contagem de células viáveis (contagem em placa) conta o número de células capazes de se dividir.

1 - Semeadura por espalhamento – colônias

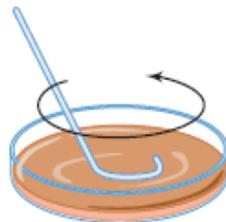
2 - Semeadura em profundidade – colônias na superfície e subsuperfície. Pode usar maior quantidade de células

- Número de colônias α n. células. Cada colônia veio de uma única célula - UFC.

Spread-plate method

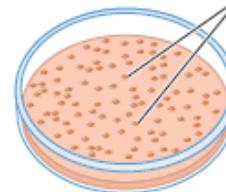


Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)



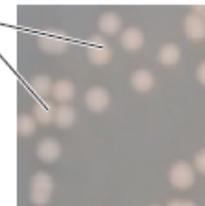
Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader

Incubation



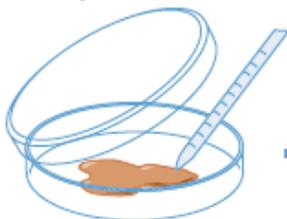
Typical spread-plate results

Surface colonies

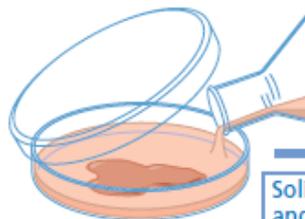


Deborah C. Jung

Pour-plate method

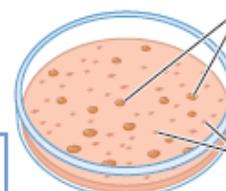


Sample is pipetted into sterile plate



Sterile medium is added and mixed well with inoculum

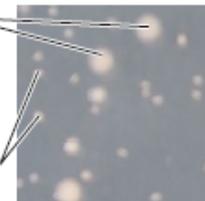
Solidification and incubation



Typical pour-plate results

Surface colonies

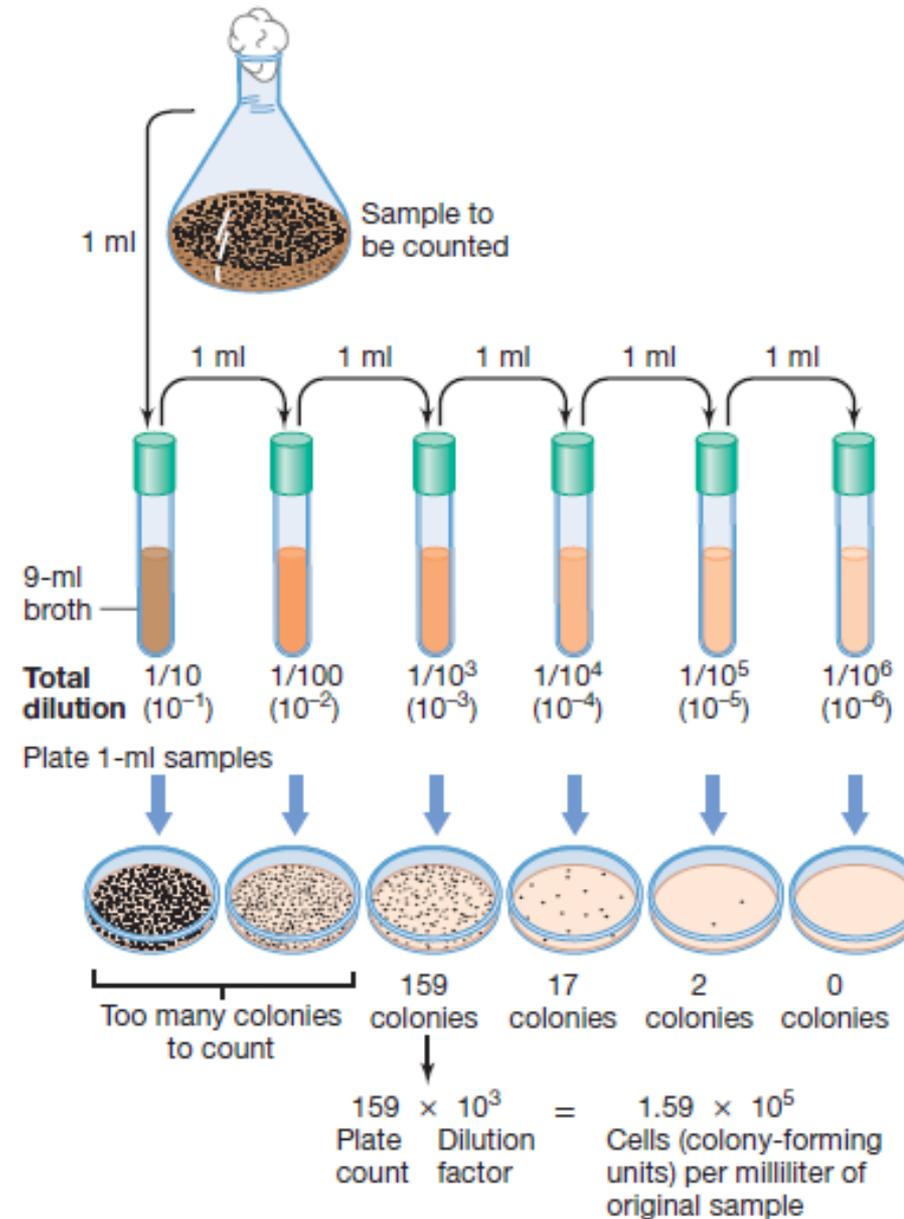
Subsurface colonies



Deborah C. Jung

Diluição antes do Plaqueamento

- Placas confiáveis tem entre 30-300 colônias
- Se tem muitas colônias, algumas não crescem, pode ter sobreposição de colônias
- Poucas colônias, não é confiável estatisticamente
- Importante fazer replicas para diminuir erros nas medidas
- **Contagem é feita “unidade formadora de colônia - UFC”**
- Método bastante usado
 - Analisar contaminações
 - Sensível
 - Medir a quantidade de células de um organismo específico proveniente de uma amostra mista – selecionando o meio de cultura na placa de petri



Diluição antes do Plaqueamento

Mais empregada por poder contar quantidade de células viáveis

A contagem de células totais em uma amostra natural

- Solo
- Mar
- ...

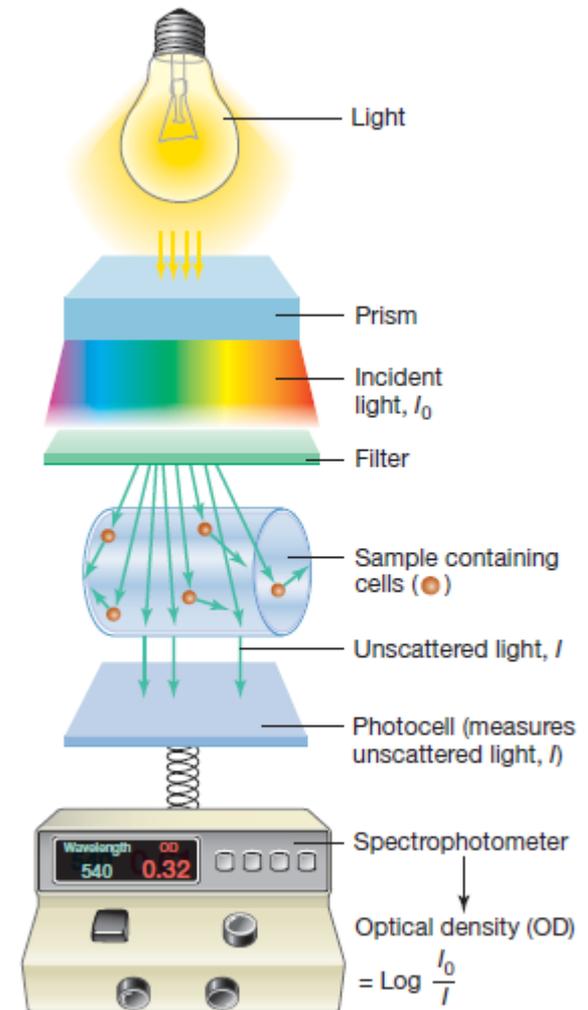
Grande anomalia da contagem de placa.

- Limita a técnica

Como vc mimetiza o meio natural?

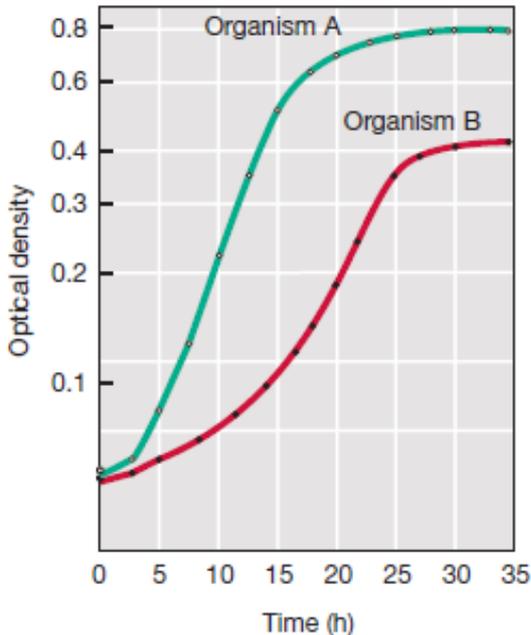
D.O – medida de turbidez

- Tomar cuidado com:
 - Caminho ótico
 - Comprimento de onda
 - 480nm
 - 540nm
 - 600nm - OD_{600} of 1.0 = 8×10^8 cells/
mL
 - 660nm



(a)

Medida da quantidade de células por D.O

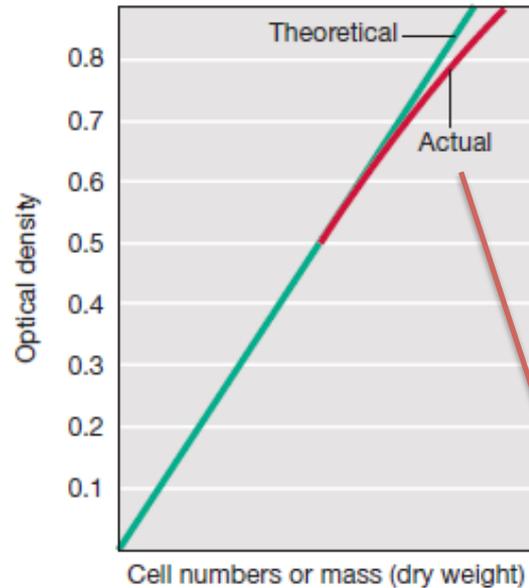


(b)

Time (h)



Exemplo da curva de crescimento de dois organismo



(c)

Cell numbers or mass (dry weight)

- Problema:
 - Agregados celulares
 - BiofilmeEvitar problemas: amostras devem crescer sob agitação



D.O é subestimada em quantidade de células elevadas

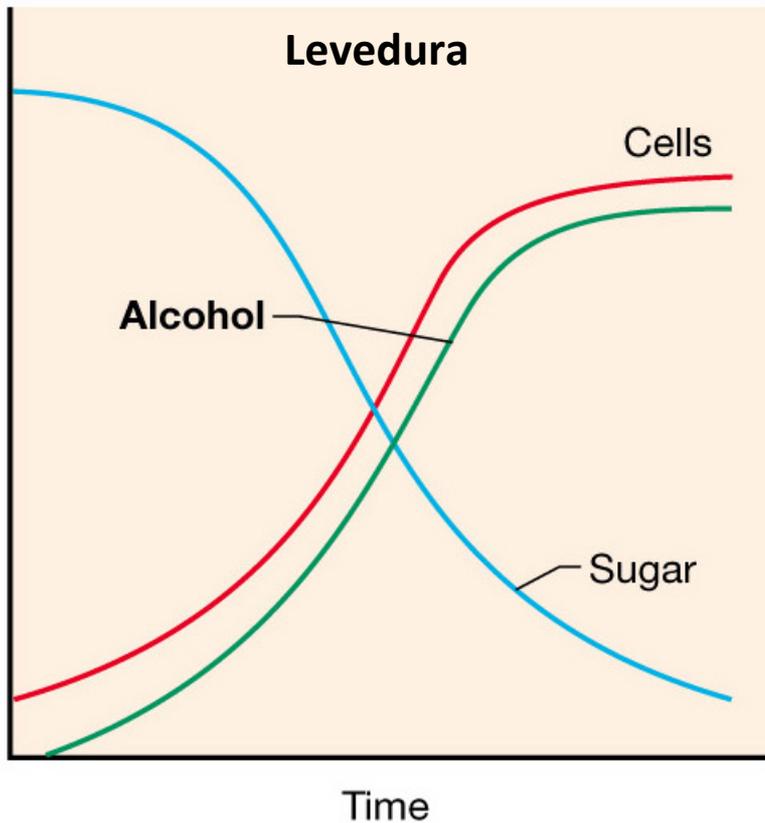
Muitas células – a luz dispersa por uma célula pode ser dispersada por outra, dando a impressão de que não teve dispersão

10 - Metabólitos secundários produzidos por bactérias podem ser úteis para os seres humanos? Dê um exemplo.

Metabólitos Primário e Secundário

Crescimento Primário

Metabólico constantemente sintetizado

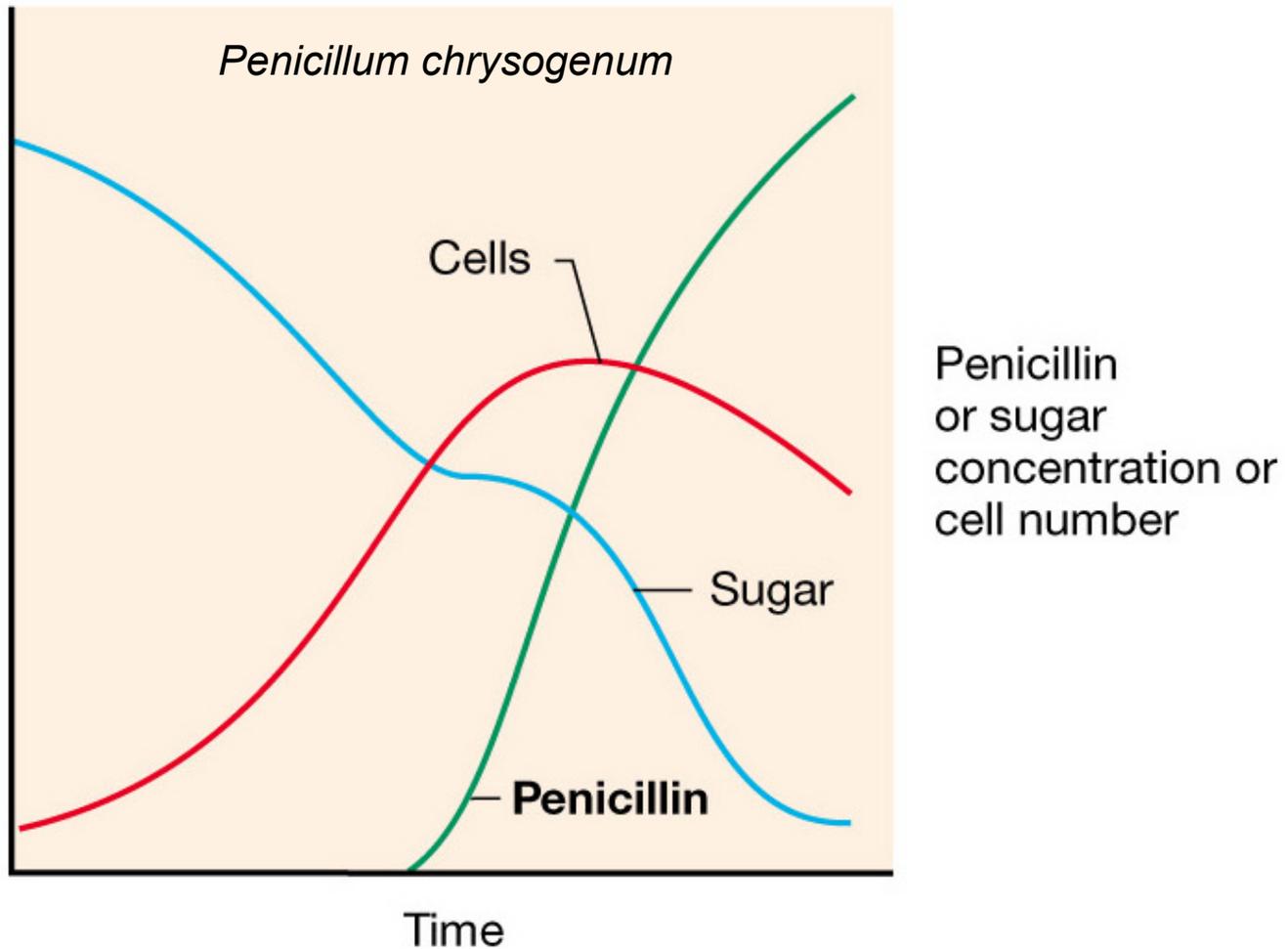


- Geralmente não são produzidos em grandes quantidades
- Faz parte do metabolismo

Alcohol or sugar
concentration or
cell number

Metabólito Secundário

Crescimento Secundário
Metabólico sintetizado próximo ao final
da fase exponencial-fase estacionária



Pergunta

- Tenho uma cultura com D.O de 0.2, quanto tempo vai demorar para ela chegar a uma D.O de 1.6 se o $g=20$ minutos?
- Podemos crescer em laboratório qualquer microrganismo, justifique sua resposta.
- Um ambiente com baixa concentração de oxigênio, pH ácido, altas temperaturas, 3% de sal são classificados de que forma, e qual domínio você acha que ele pertence?