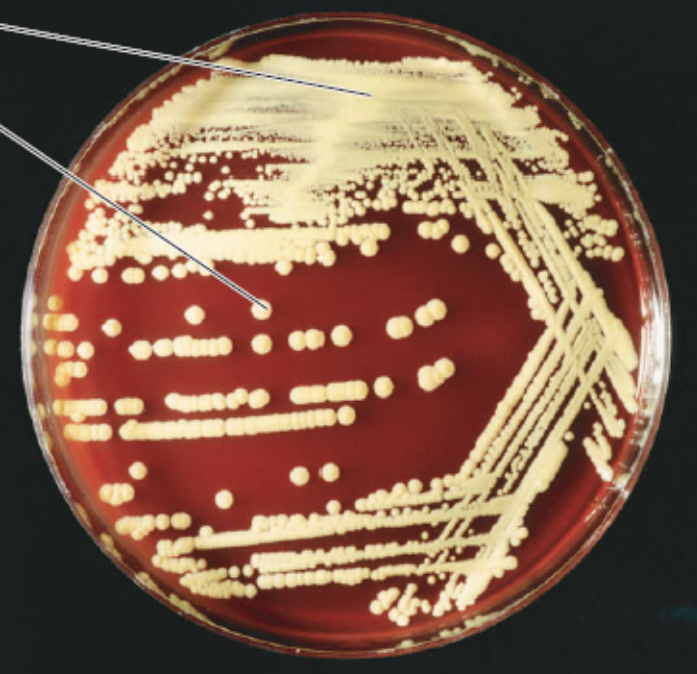




Nutrição Bacteriana - Meios de Cultura

Cristiane Guzzo

Departamento de Microbiologia - ICBII-USP

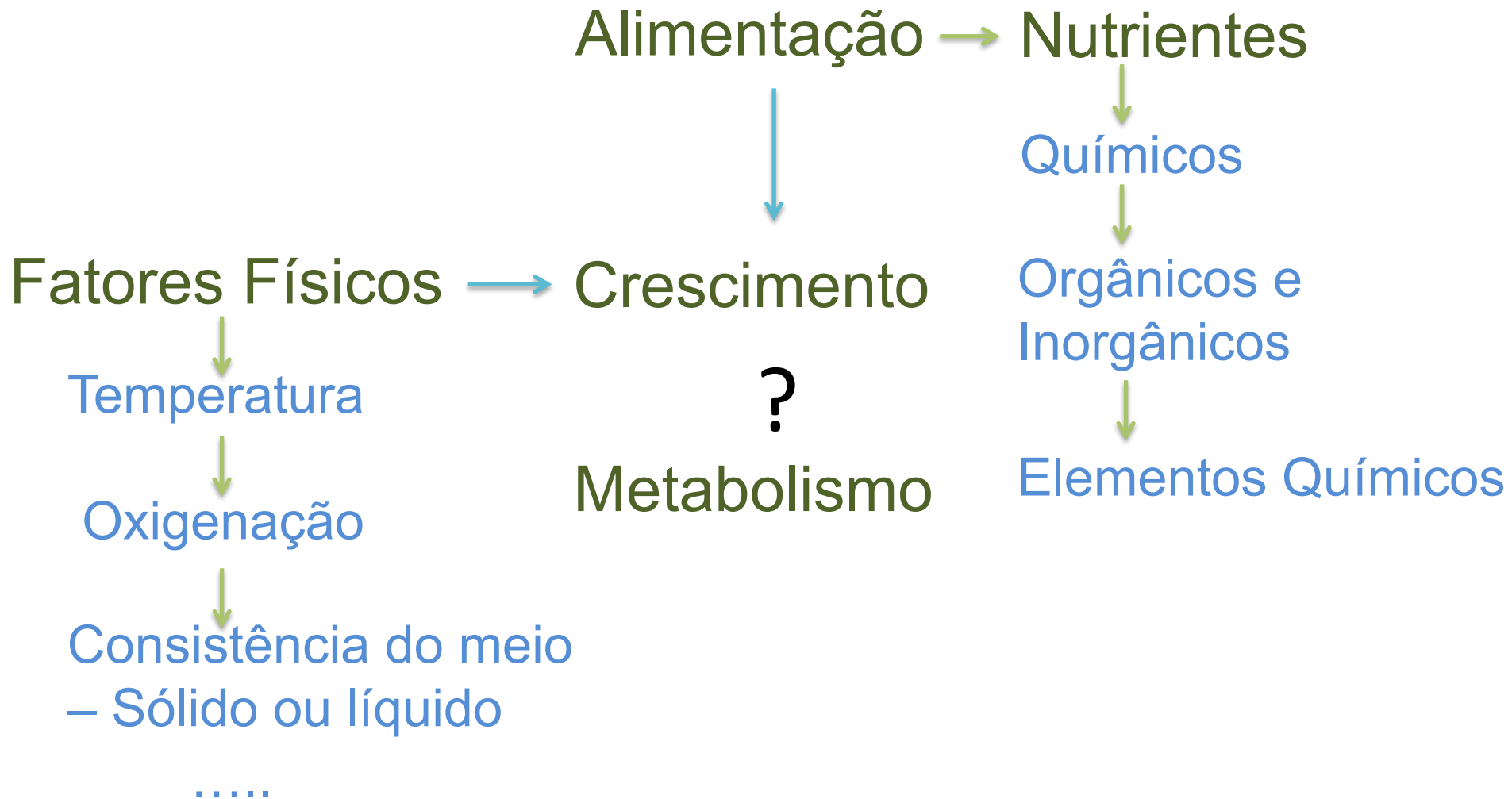
BMM0160 – Farmácia Diurno

São Paulo, 10 de Setembro de 2018

Group →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Period ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	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

Quais são os fatores que afetam o crescimento microbiano?



Macro ou Micronutrientes essenciais

Group → 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Period ↓

1	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	57 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

(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)

Exemplos de micronutrientes

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

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

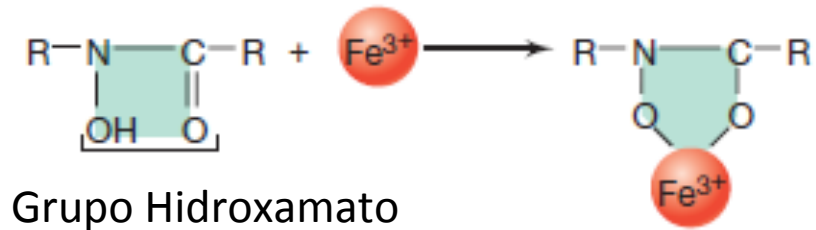
<i>Element</i>	<i>Cellular function or molecule of which a part</i>
Boron (B)	Autoinducer for quorum sensing in bacteria; also found in some polyketide antibiotics
Chromium (Cr)	Possible but not proven component for glucose metabolism (necessary in mammals)
Cobalt (Co)	Vitamin B ₁₂ ; transcobalamin (only 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.

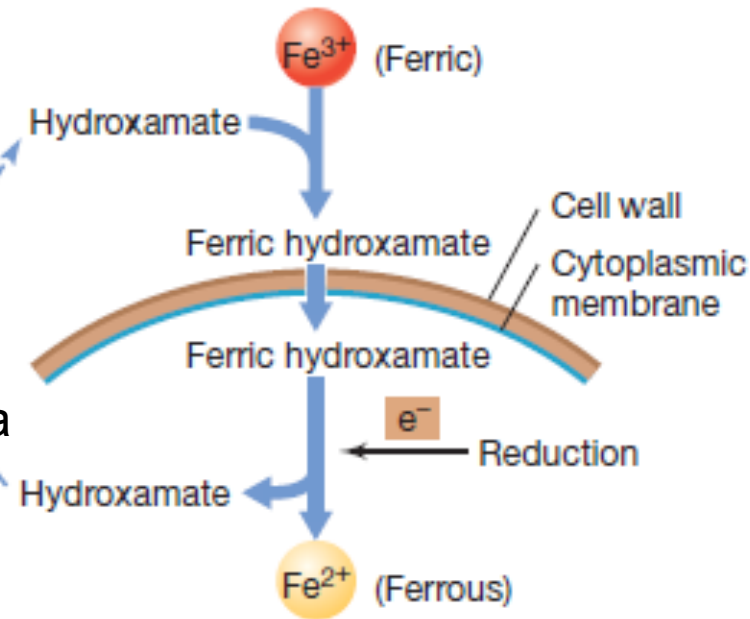
^bNeeded in greater amounts than other trace metals.

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



(a)

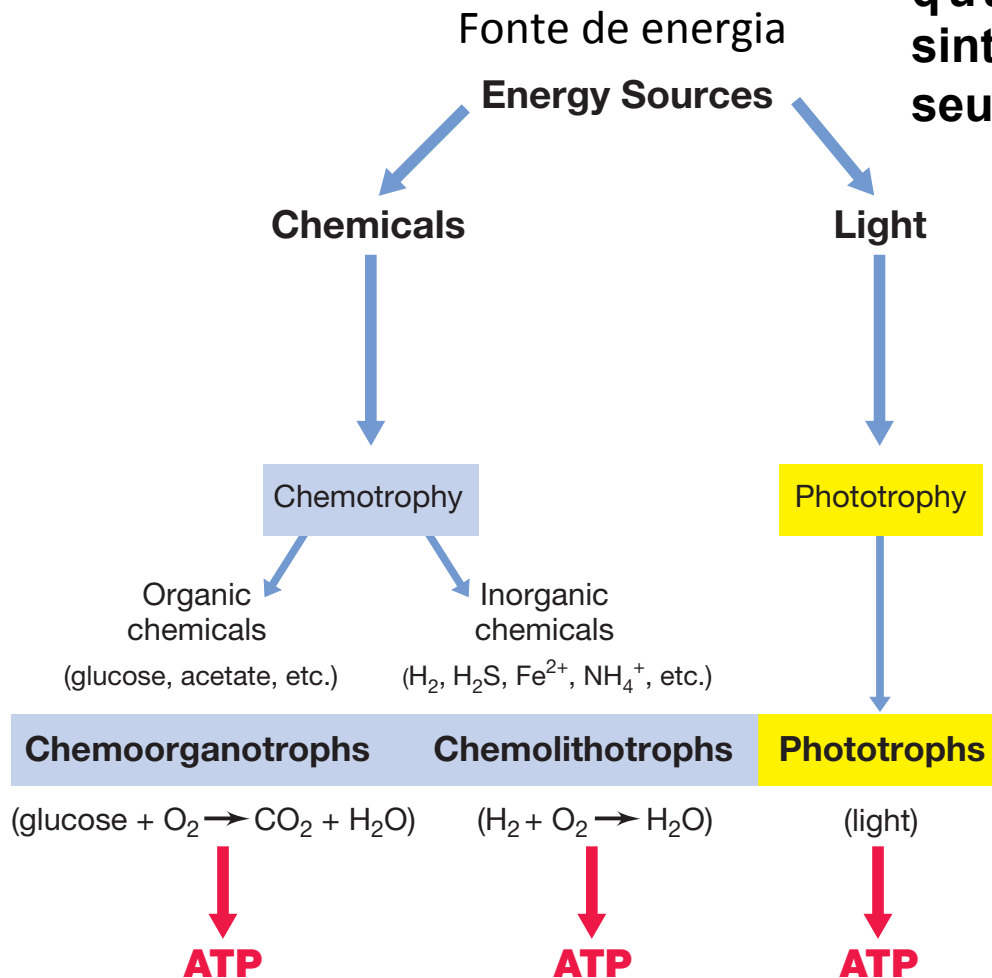


(b)

Diversidade Metabólica

Capacidade Biossintética:

quanto o organismo consegue sintetizar fatores importantes para o seu crescimento



Fonte de carbono

Autotróficos: CO₂

Heterotróficos: compostos orgânicos

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

Meio Seletivo ou Diferenciais

- **Meio Seletivo**

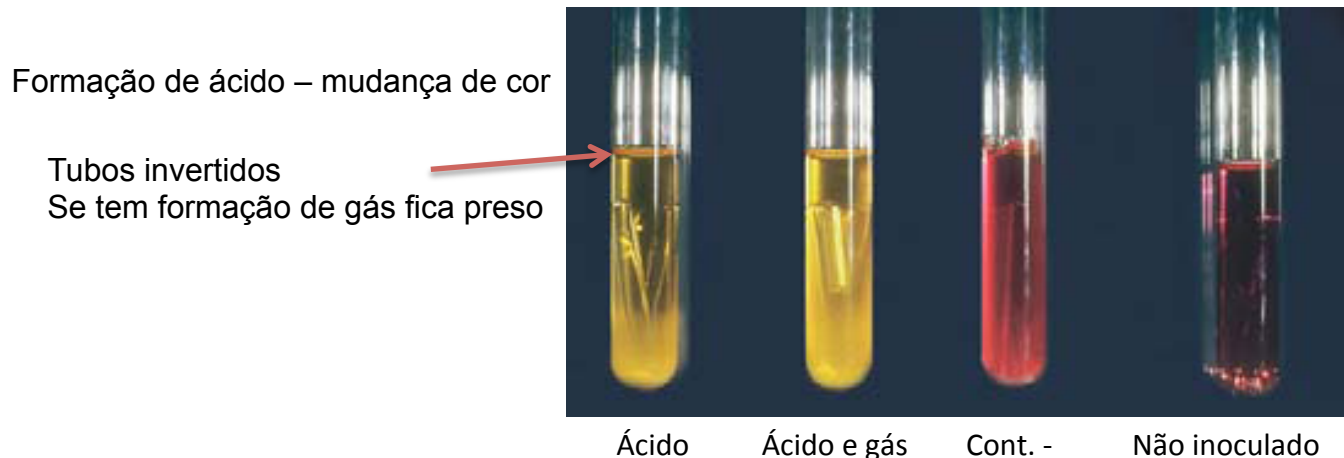
Contém compostos que inibem o crescimento de alguns microrganismos mas de outros não

- **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

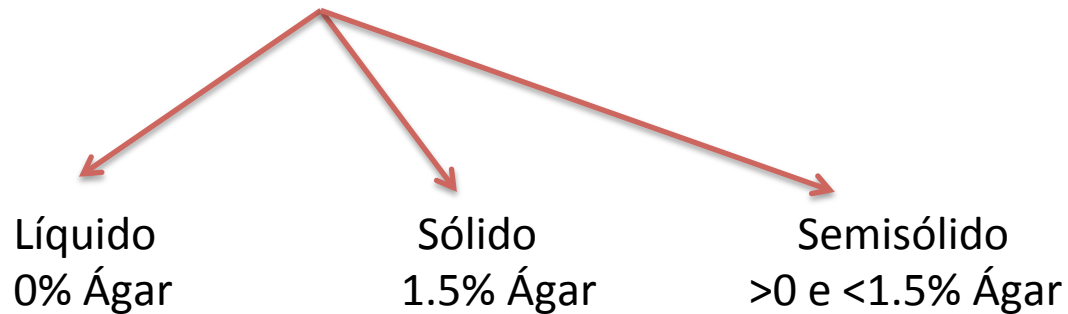


Preparar um Meio de Cultura

- 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

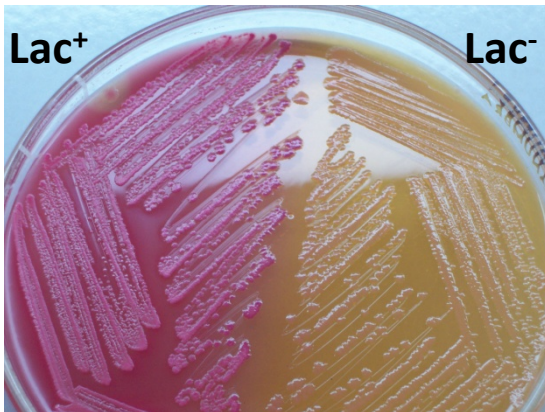
Cultivo de Microrganismos em Laboratório

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



Diferentes Meios de Cultura usado em laboratório

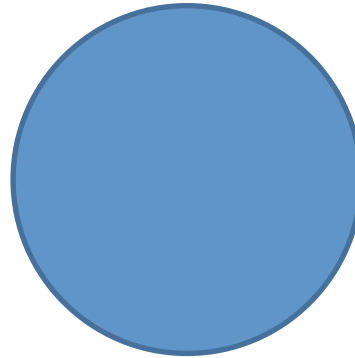
Ágar MacConkey



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

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

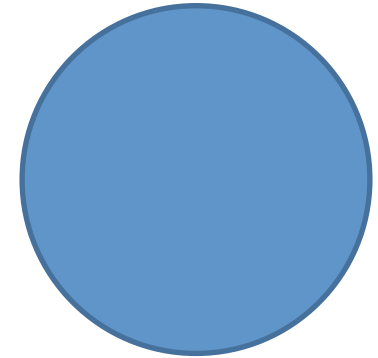
Ágar Staphylococcus 110 Stone Gelatin Ágar



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

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 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

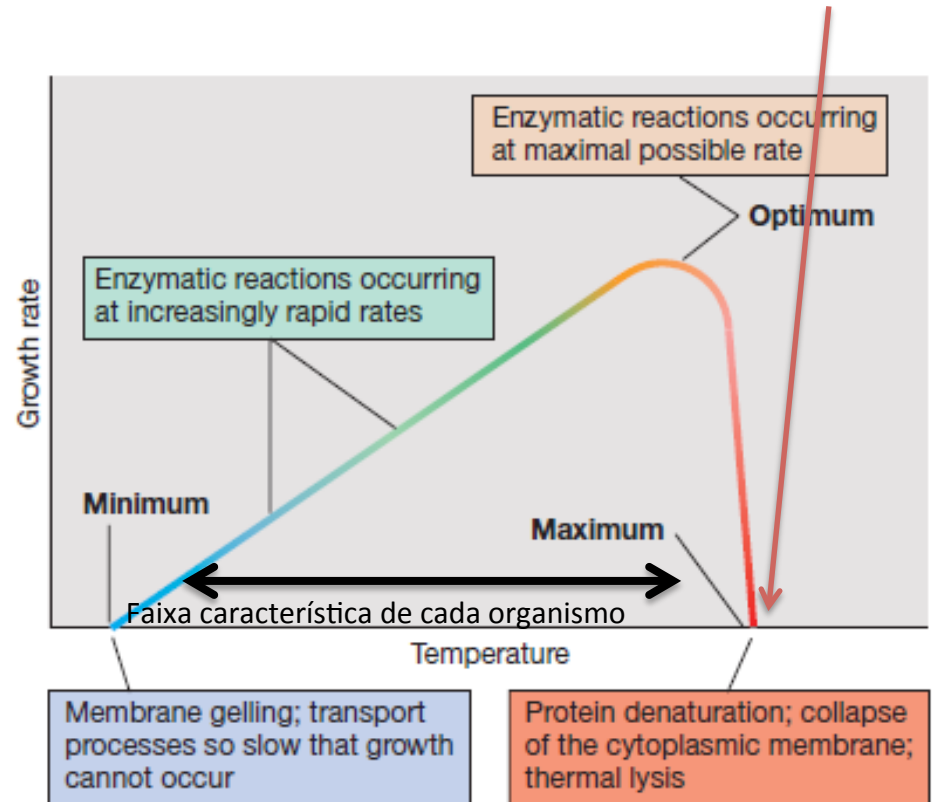
- **Ótima**

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

- **Máxima**

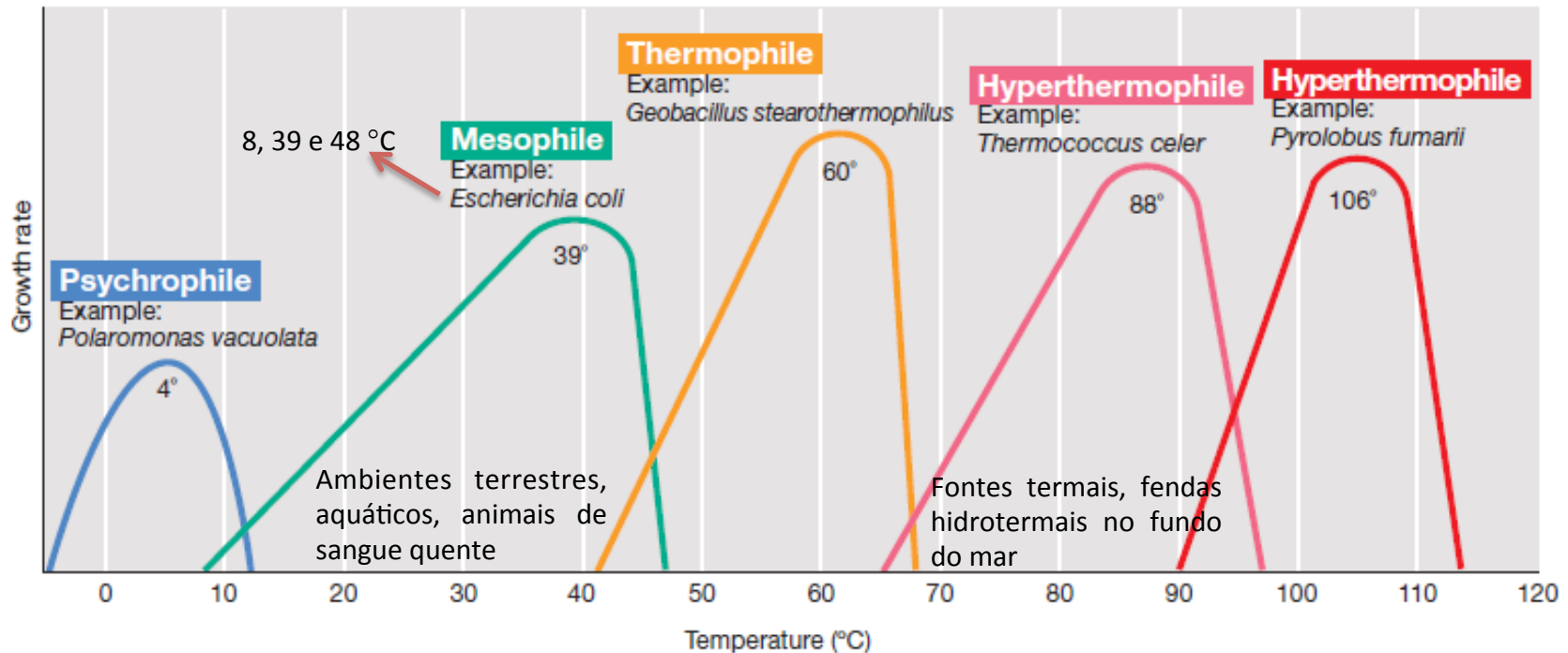
- Faixa normal de variação de temperatura é 25-40 °C
- Não conseguem crescer em todas as faixas

Processo geralmente irreversível
Exemplo febre



Efeito da Temperatura

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



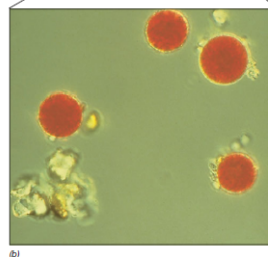
Microrganismos Psicrófilos

- **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



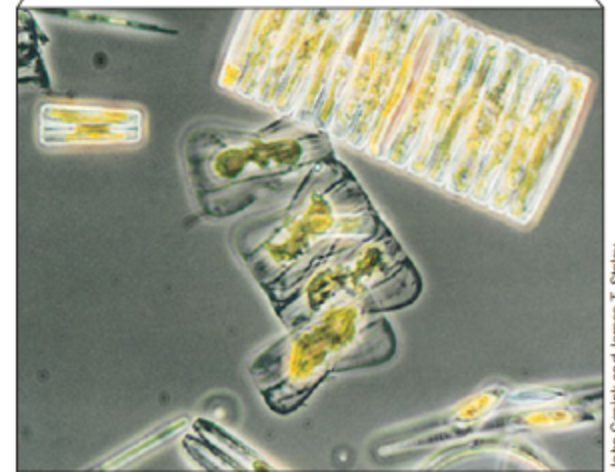
Antártida



John Gosink and James T. Staley

(a)

Algas verdes (eucariótos fototróficos)



John Gosink and James T. Staley

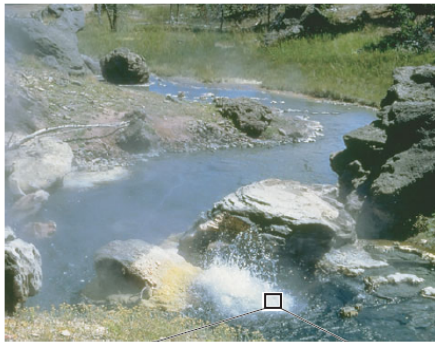
(b)

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

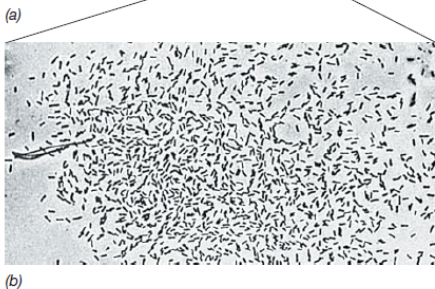


Figure 5.22 Growth of hyperthermophiles in boiling water.

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

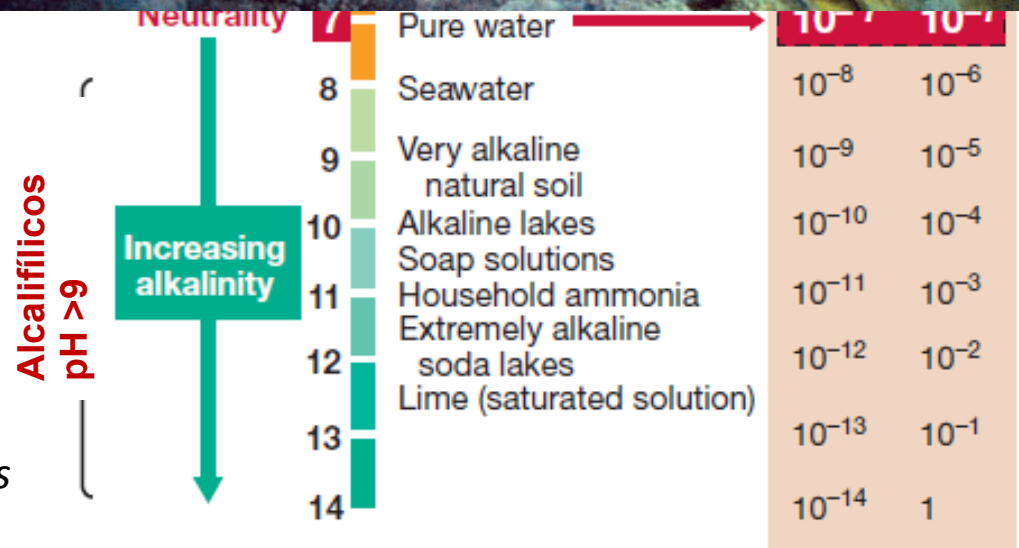
- Acima de 65°C só *Bacteria* e *Archaea*
- *Archaea* são os mais termófilos

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 $\text{pH} < 3$ e > 9
- Acidófilos
 - Maior quantidade de fungos (menos, como $\text{pH} 2$)
 - Estabilidade da membrana é dependente de altas $[\text{H}^+]$
 - 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 >8
- 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

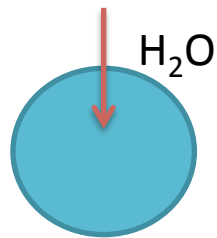
Physiological class (optima range)	Approximate pH optimum for growth	Example organism ^a
Neutrophile (pH >5.5 and <8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidophile (pH <5.5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alkaliphile (pH ≥ 8)	8	<i>Chloroflexus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

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

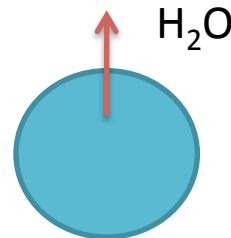
Efeito Osmótico

- 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 +

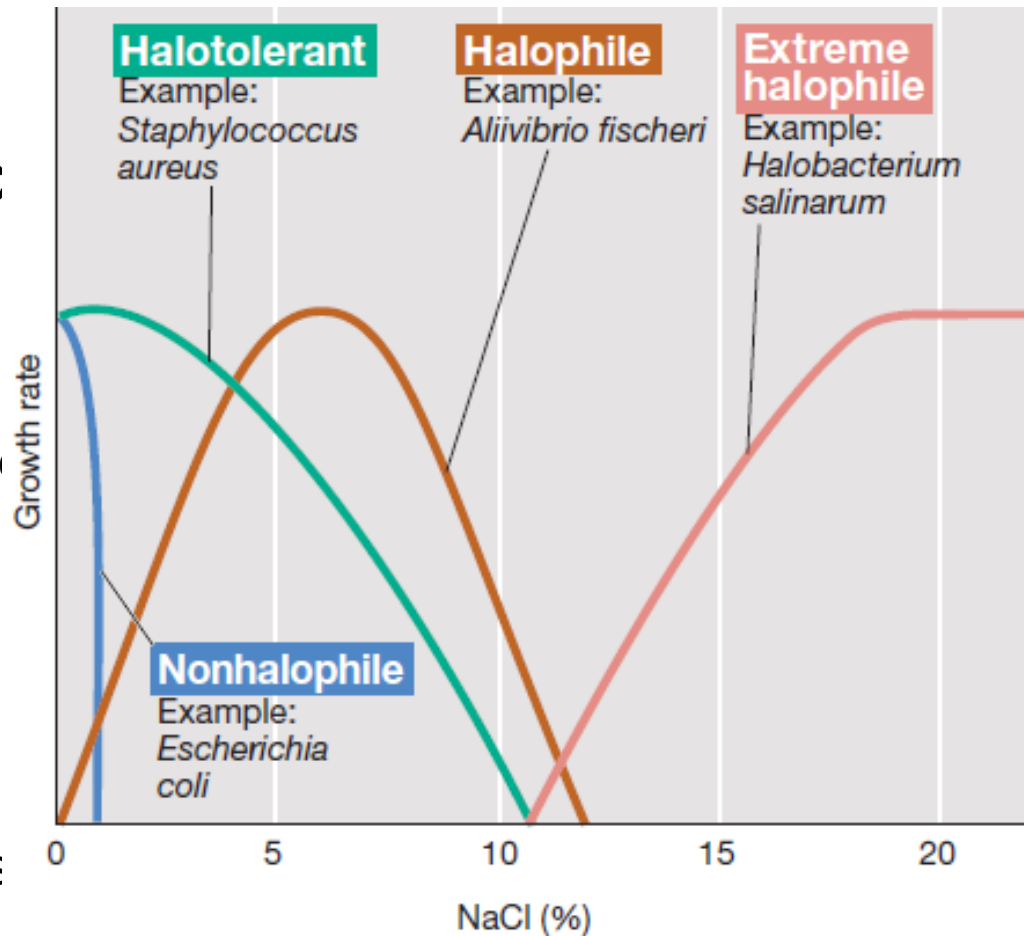


Pode causar morte celular-desidratação



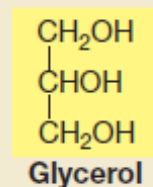
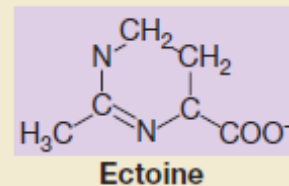
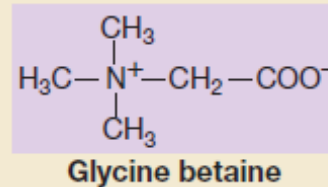
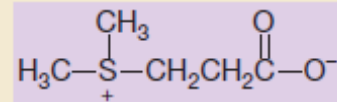
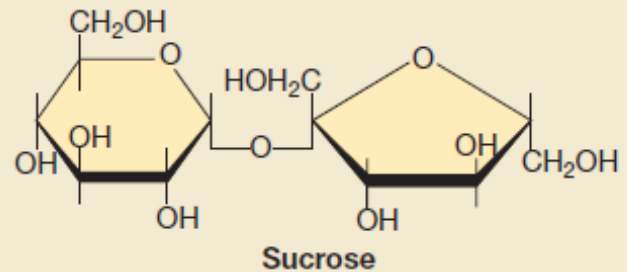
Efeito Osmótico

- **Halófilos discretos** (1-6% NaCl)
 - Mar tem 3% sal
- **Halófilos moderados** (7-15% NaC
- **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

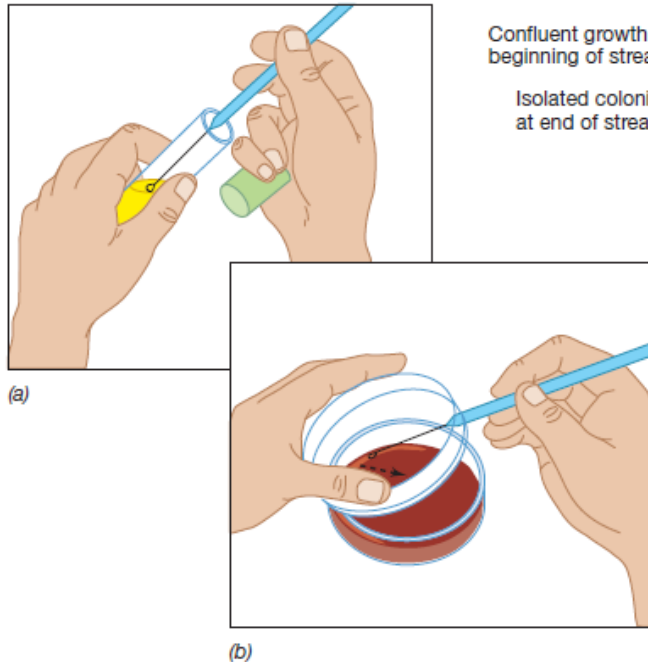
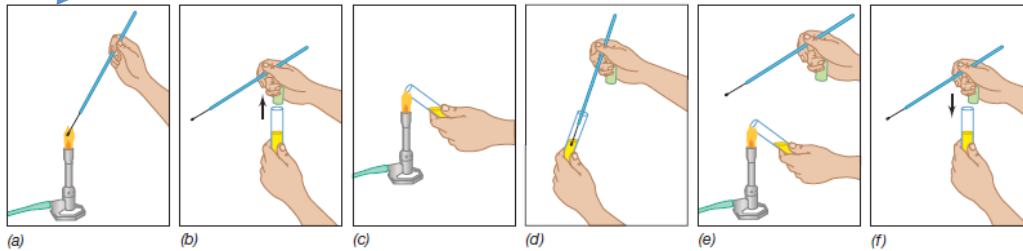
- **Estado Químico e Físico do Ambiente**
 - Temperatura
 - pH
 - Quantidade de água
 - Oxigênio
 - Outros fatores
 - Pressão
 - Radiação

Bactérias não cultiváveis e Metagenômica

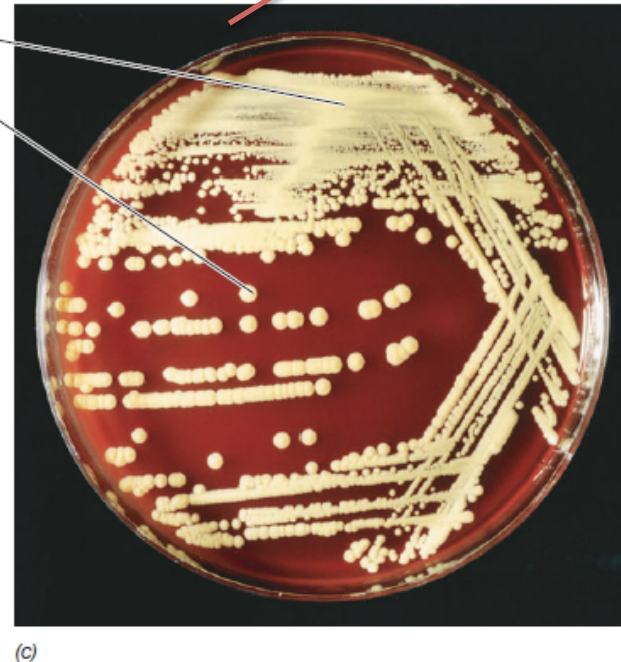
- Apenas 1% das bactérias existentes no ambiente são cultiváveis
- Metagenômica
 - Identificação de microrganismos não cultiváveis
 - Genes com algum interesse específico presentes em diferentes amostras ambientais.

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)



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

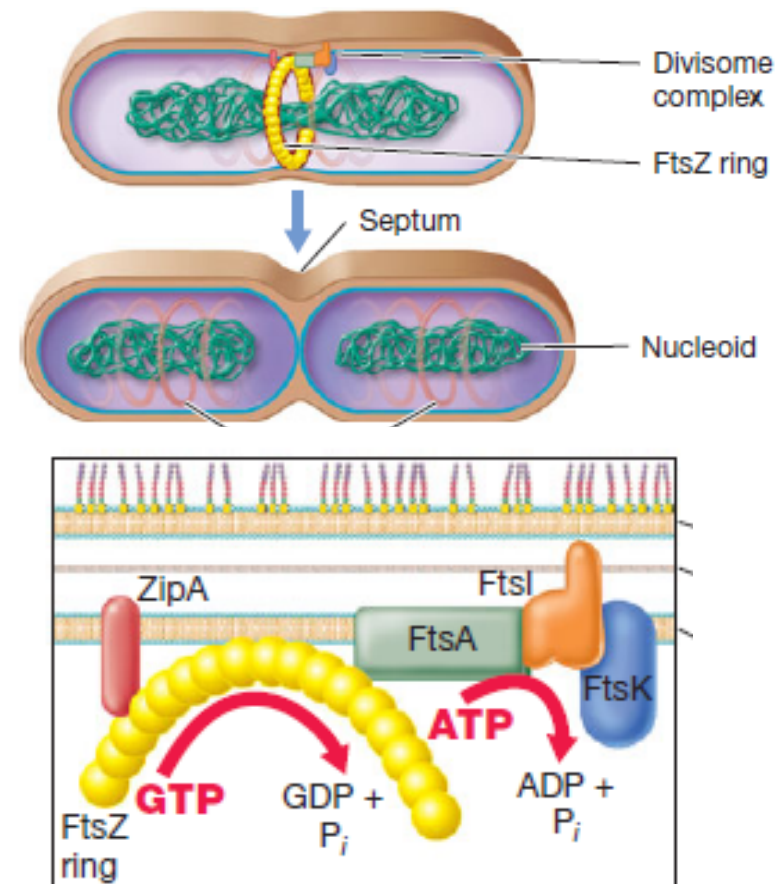
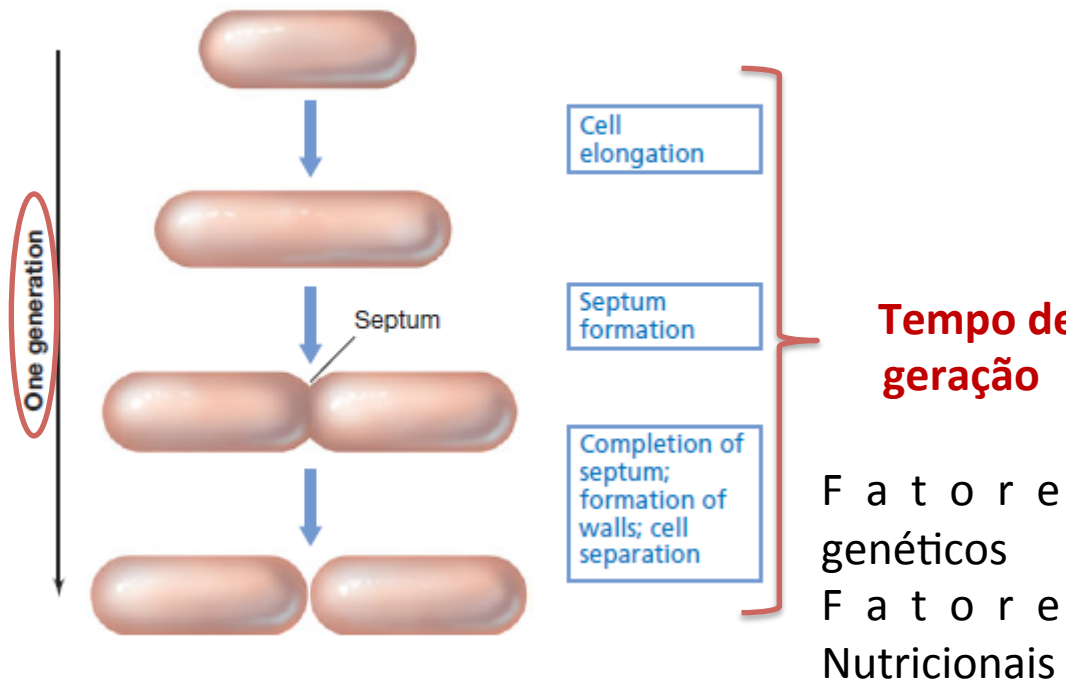


- Avaliar a pureza da amostra
- A quantidade de diferentes microrganismo
- Obtém **colônias** Isoladas

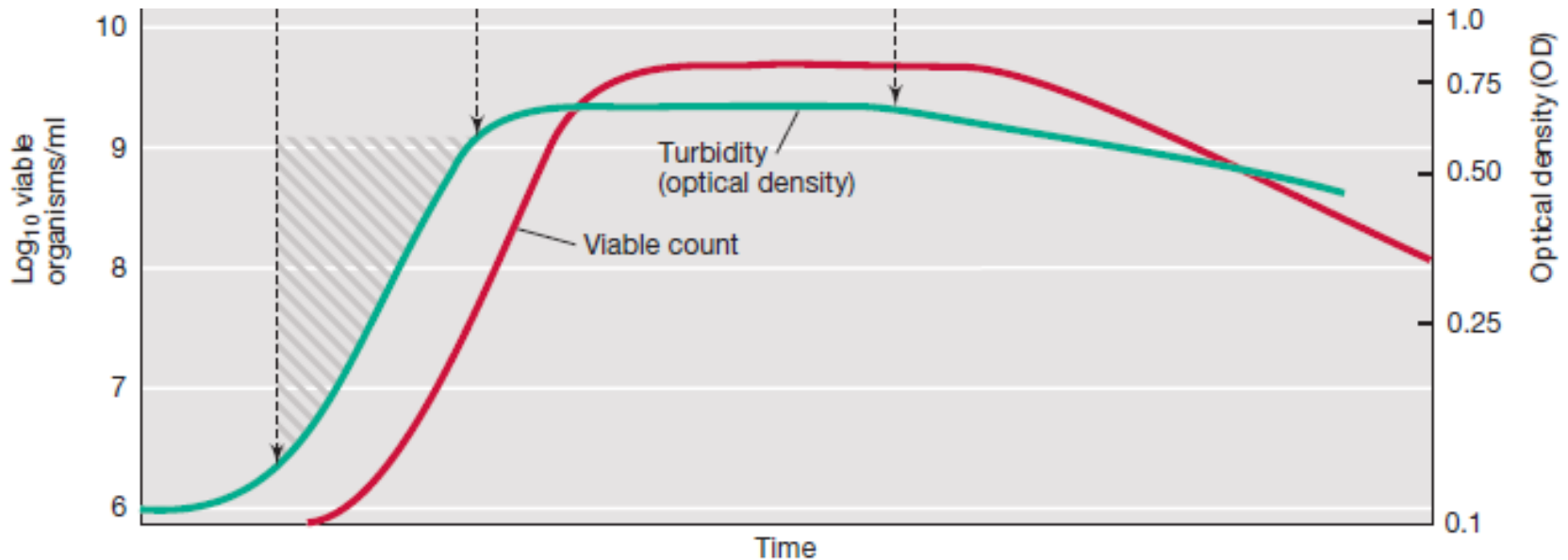
Várias células proveniente de uma única célula (bilhões de células)

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).



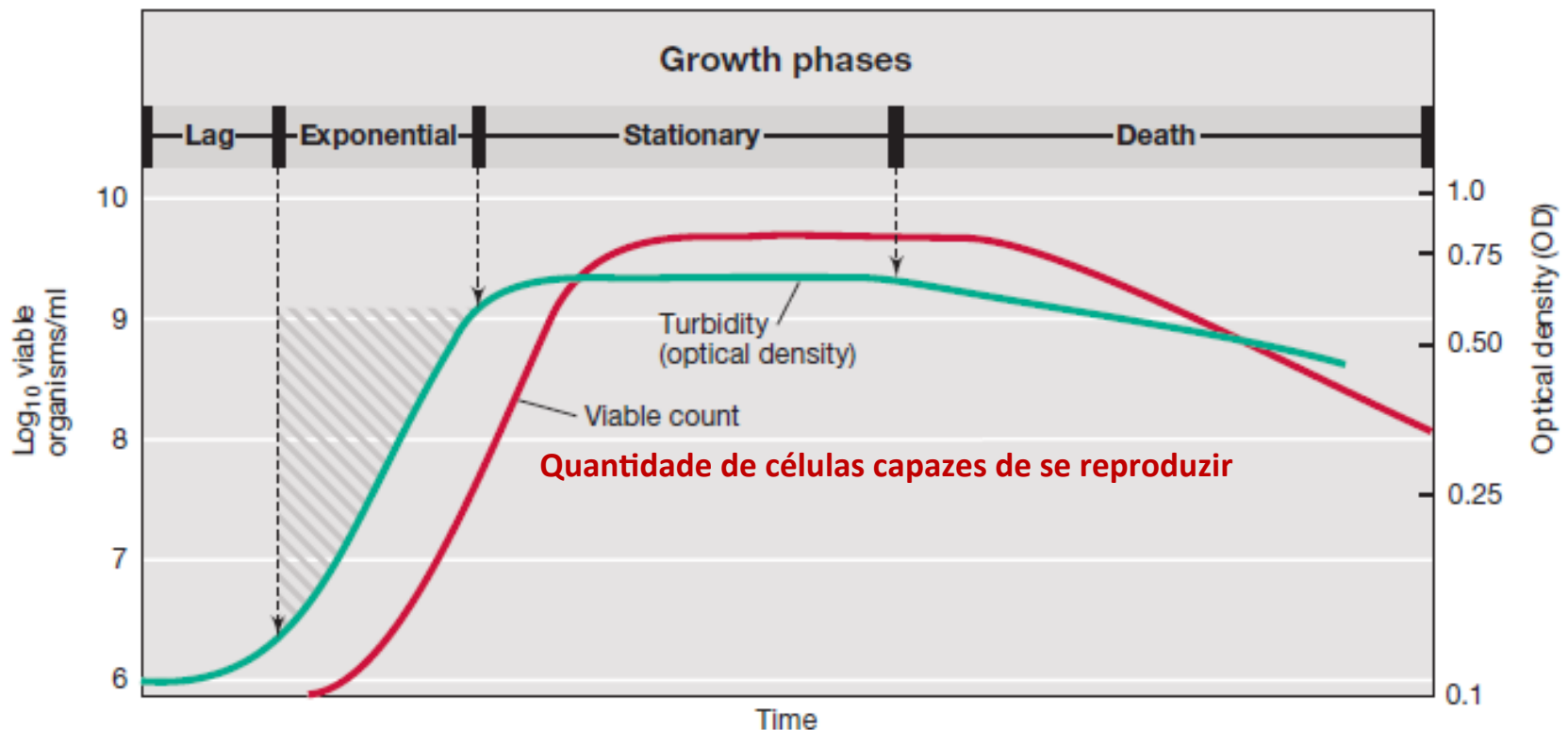
8- DESCREVA AS 4 FASES DE CRESCIMENTO BACTERIANO MOSTRADO NO GRÁFICO



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
- Acumulo de produtos excretados pelos microrganismos – inibe o crescimento
- Pode ocorrer divisão celular quando uma célula morre - **Crescimento críptico**
- 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?

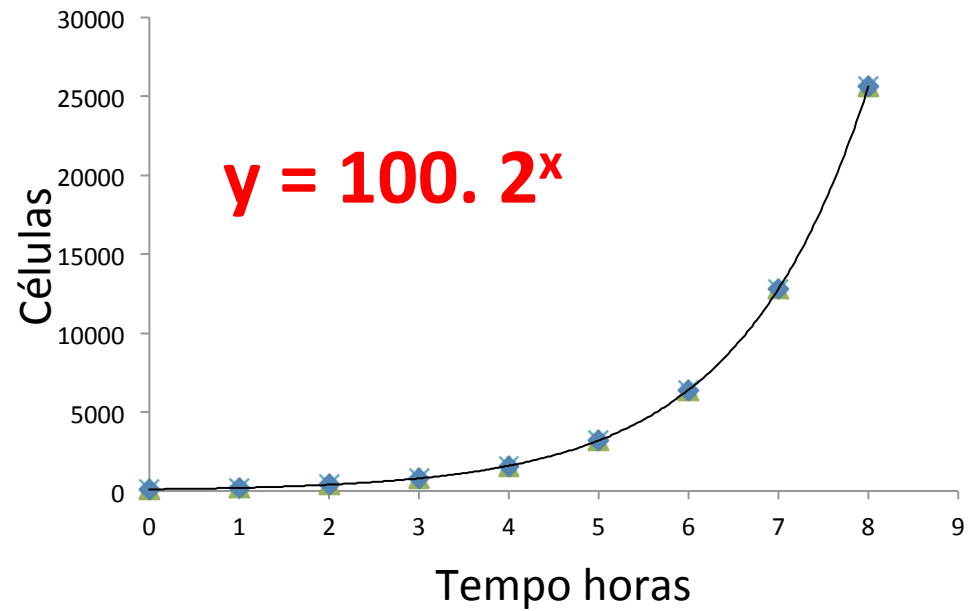
Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256 (2^8)
0.5	2	4.5	512 (2^9)
1	4	5	1,024 (2^{10})
1.5	8	5.5	2,048 (2^{11})
2	16	6	4,096 (2^{12})
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576 (2^{19})

Cada 30 min. tem mais 1 célula

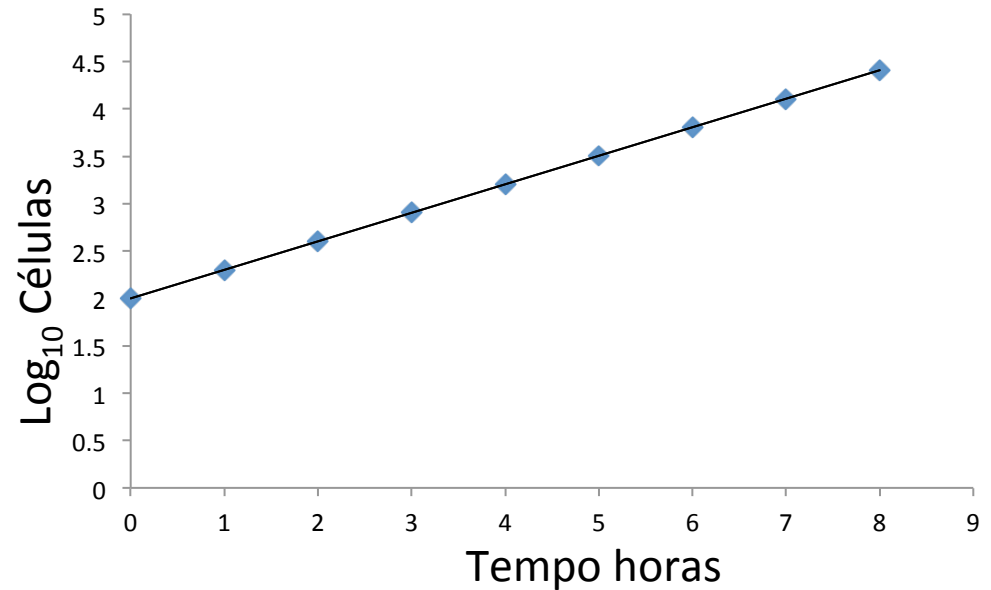
Cada 30 min. tem mais 2048 célula

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

$G = 1H$



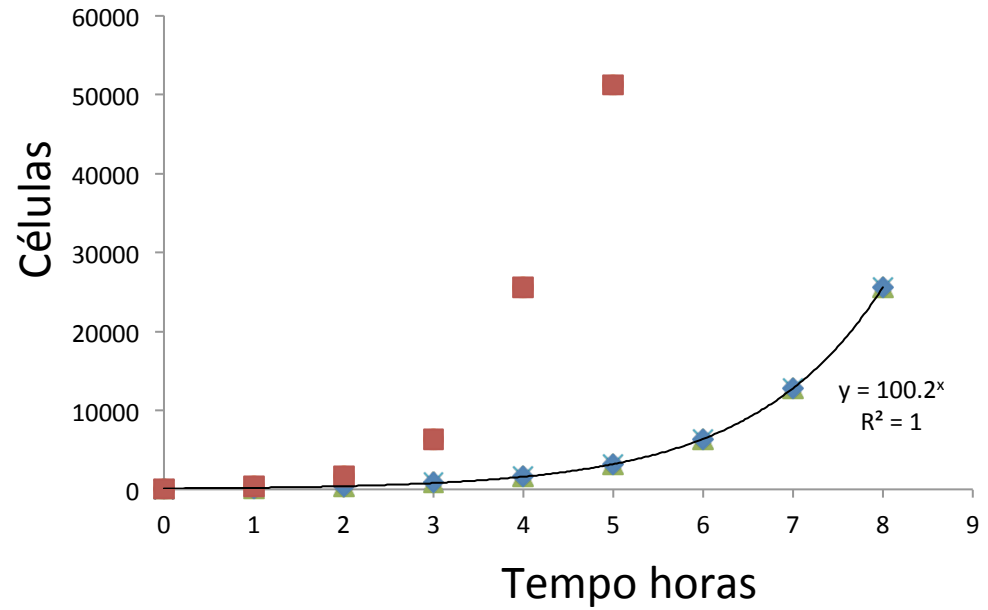
tempo	$\log_{10}$
0	2
1	2,301029996
2	2,602059991
3	2,903089987
4	3,204119983
5	3,505149978
6	3,806179974
7	4,10720997
8	4,408239965



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 = $G1/2$

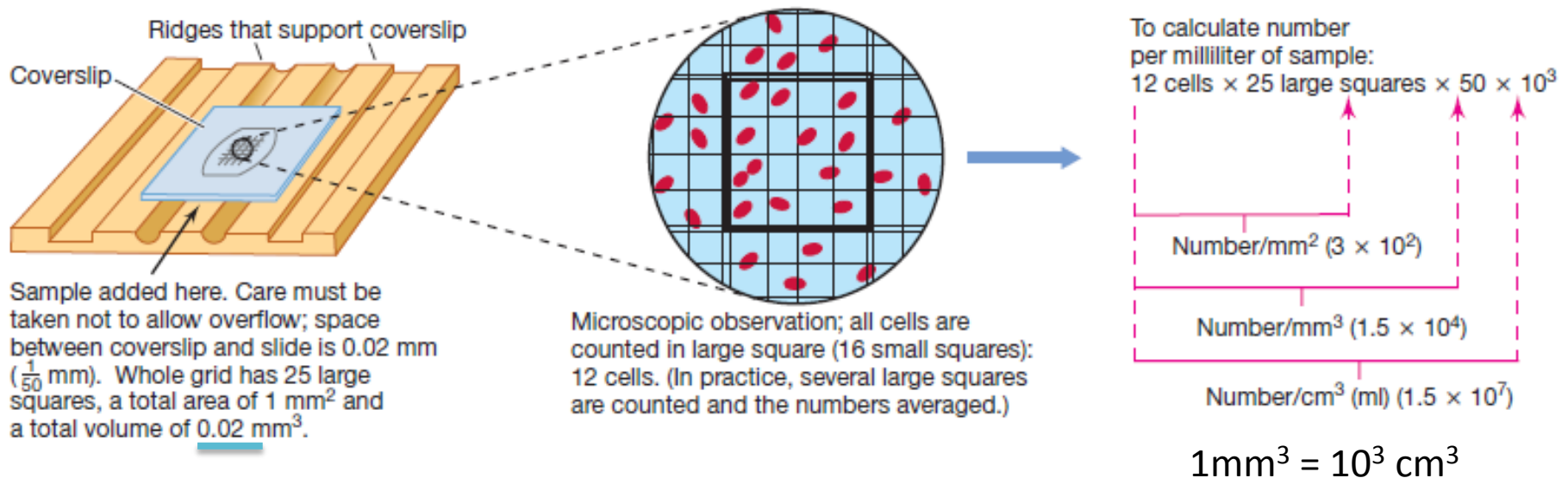


Formas de medir o crescimento microbiano

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

Câmara de Contagem de Petroff-Hausser

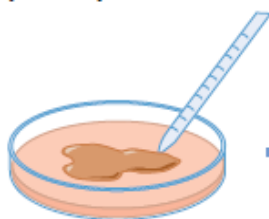
- Contagem usando células secas coradas em lâminas
- Contagem de células em meio líquido utilizando câmara de contagem de Petroff-Hausser e microscópio
 - Não consegue distinguir células vivas das mortas
 - Células pequenas são difíceis de ver no microscópio
 - Usar amostras concentradas
 - Impurezas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



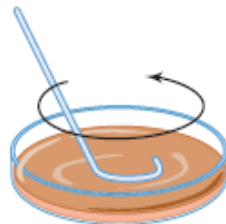
Métodos de contagem de células viáveis/ ou Contagem em Placa

- 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 $\propto$ n. células. Cada colônia veio de uma única célula - UFC.

Spread-plate method

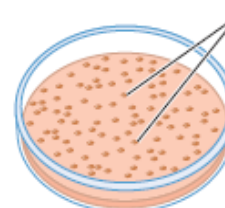


Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)



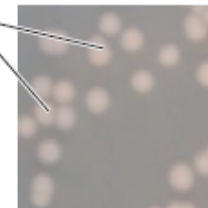
Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader

Incubation



Typical spread-plate results

Surface colonies

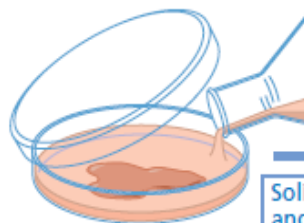


Deborah O. Jung

Pour-plate method

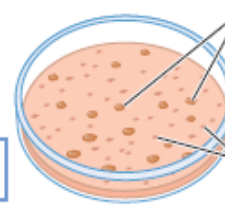


Sample is pipetted into sterile plate



Sterile medium is added and mixed well with inoculum

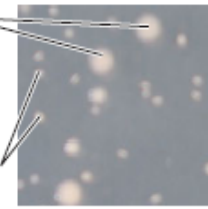
Solidification and incubation



Typical pour-plate results

Surface colonies

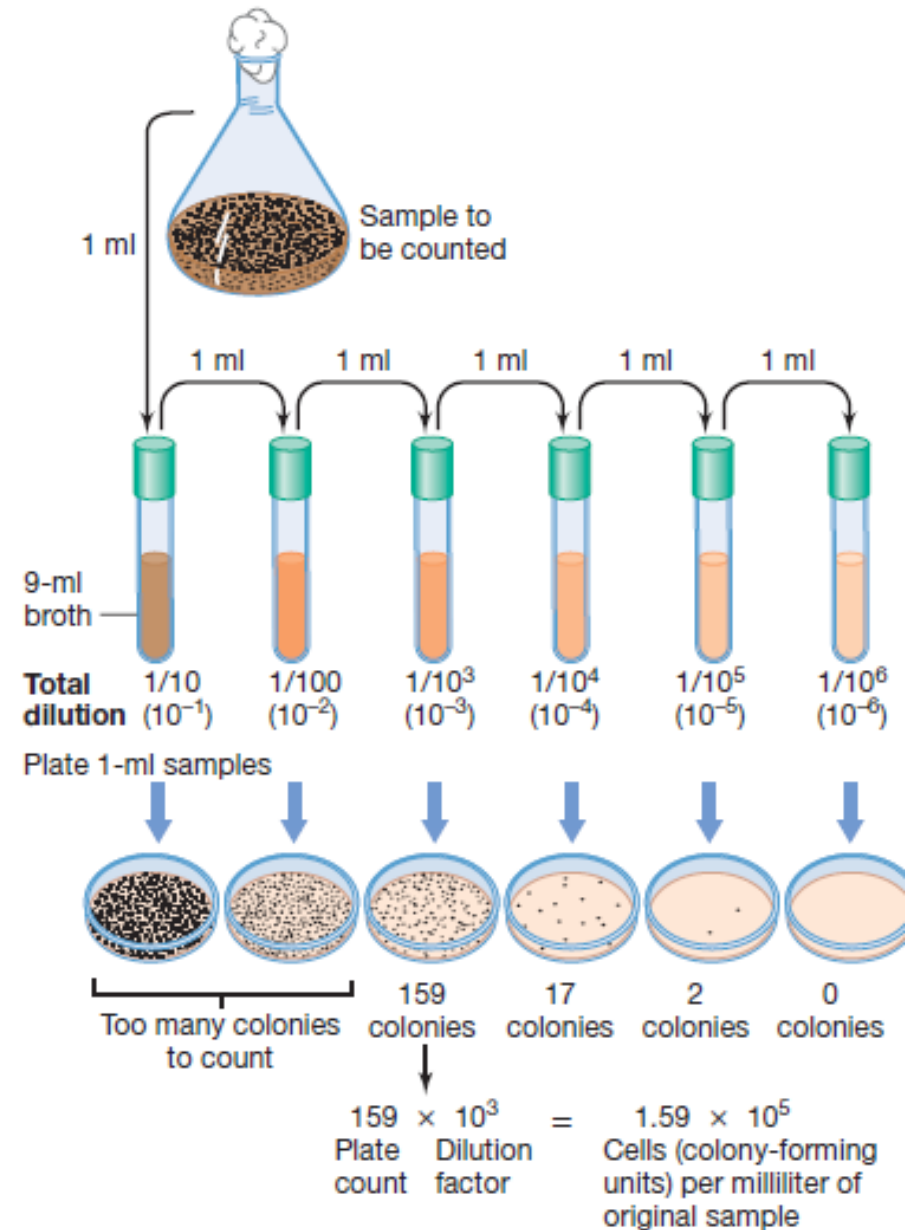
Subsurface colonies



Deborah O. 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



D.O – medida de turbidez

- Tomar cuidado com:

- Caminho ótico

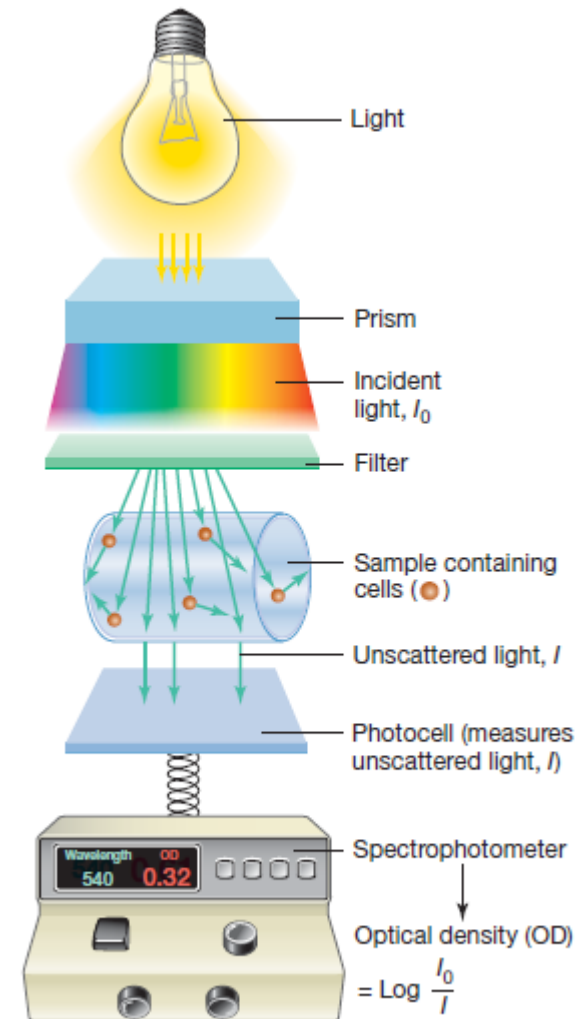
- Comprimento de onda

- 480nm

- 540nm

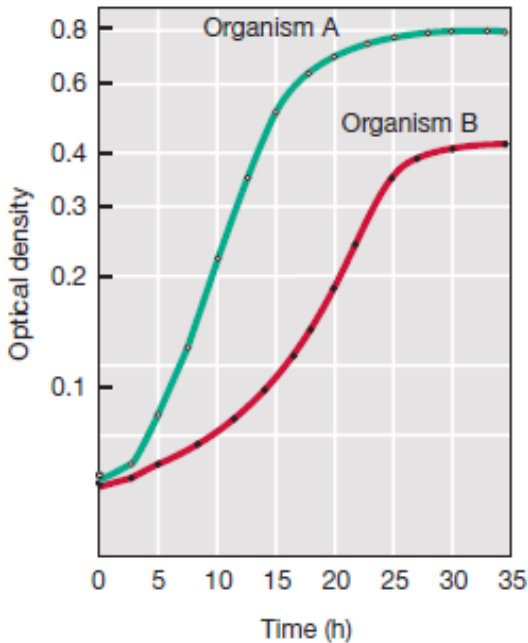
- 600nm - OD_{600} of 1.0 = 8×10^8 cells/
mL

- 660nm



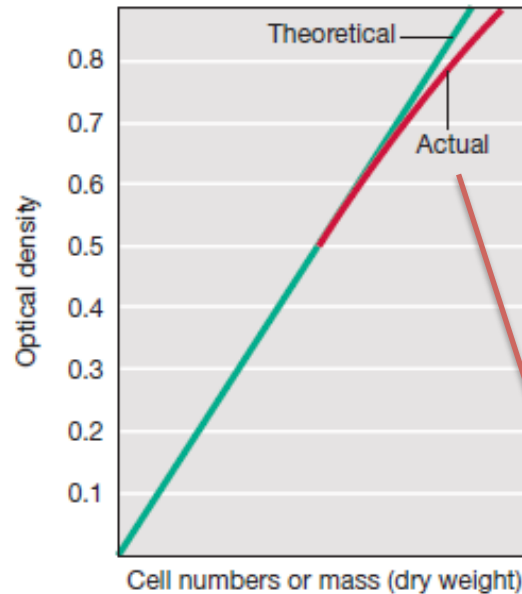
(a)

Medida da quantidade de células por D.O



(b)

Exemplo da curva de crescimento de dois organismo



(c)

- Problema:
 - Agregados celulares
 - Biofilme
- Evitar problemas: amostras devem crescer sob agitação

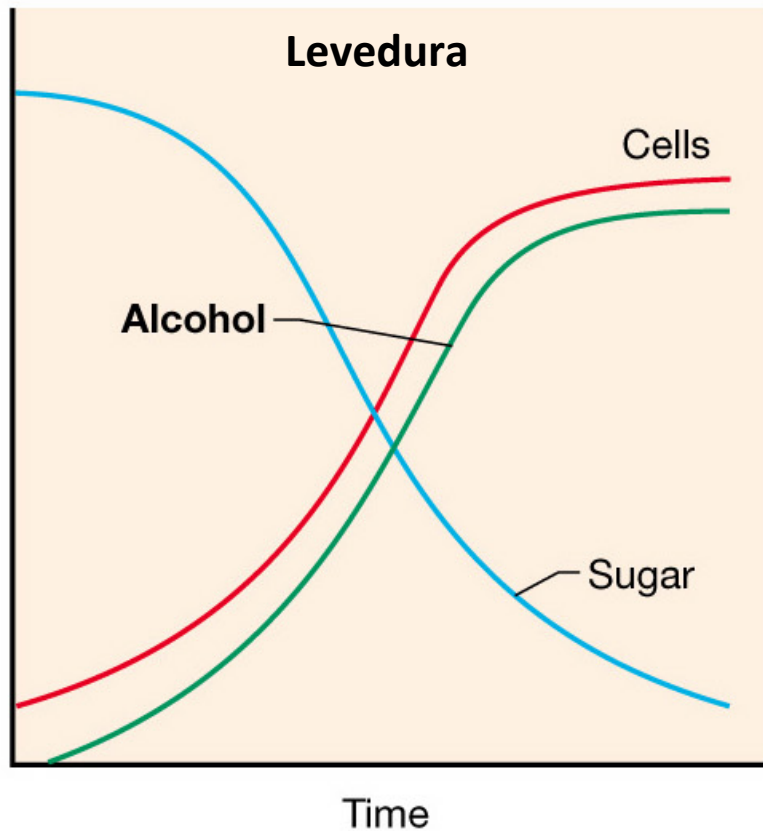
D.O é subestimada em quantidade de células elevadas

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

Metabólitos Primário e Secundário

Crescimento Primário

Metabólico constantemente sintetizado

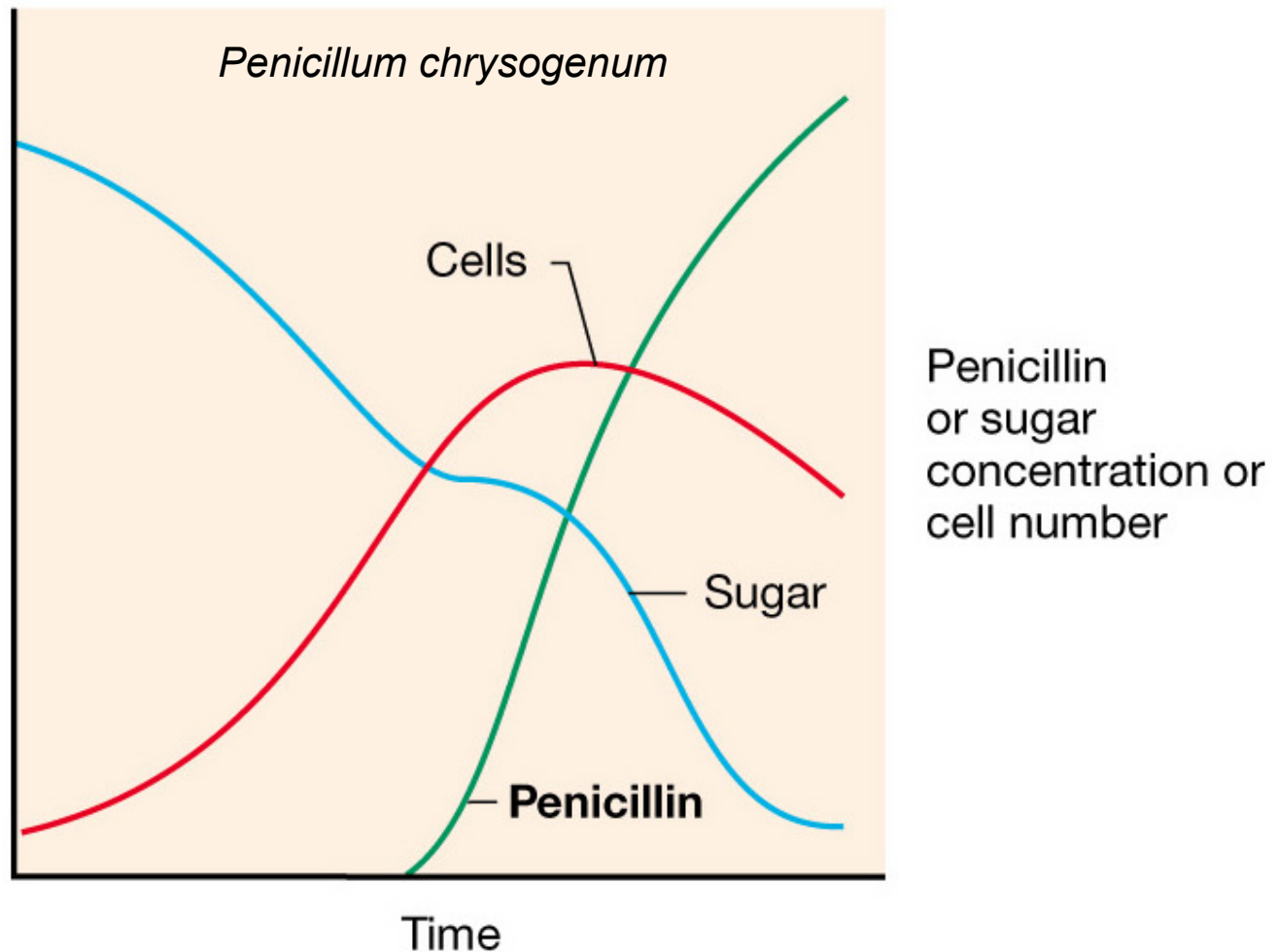


- Geralmente não são produzidos em grandes quantidades
- Faz parte do metabolismo

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 $\mu = 20$ 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?