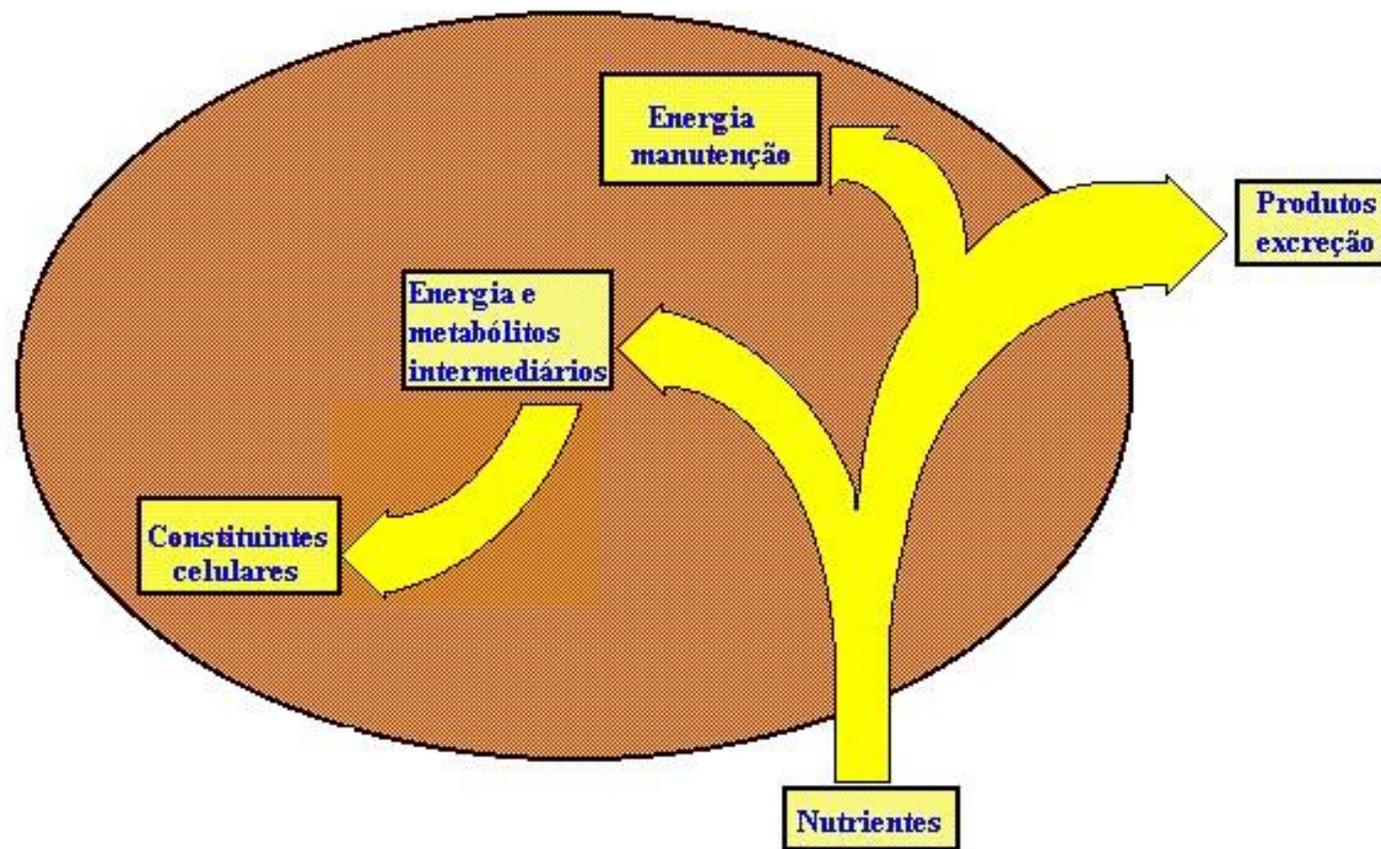
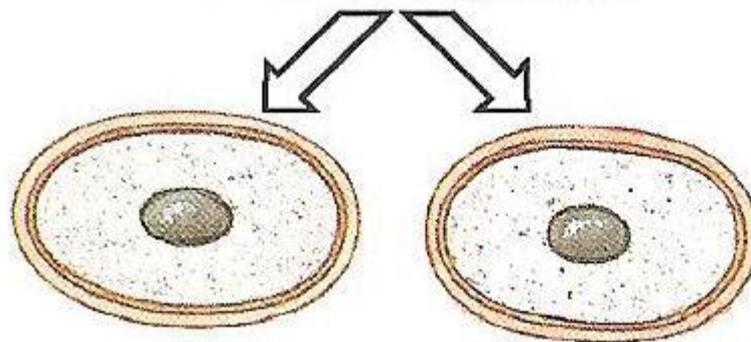
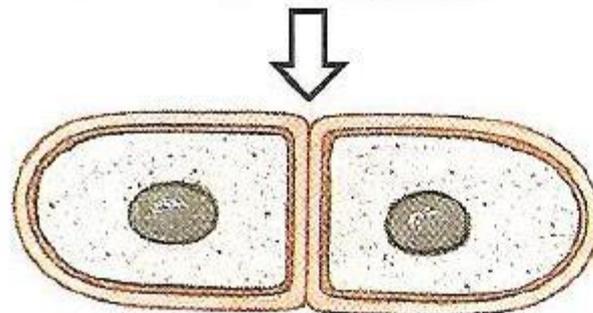
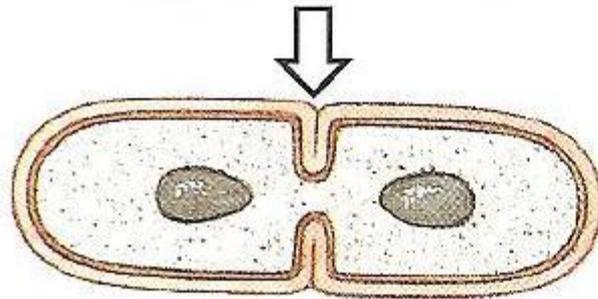
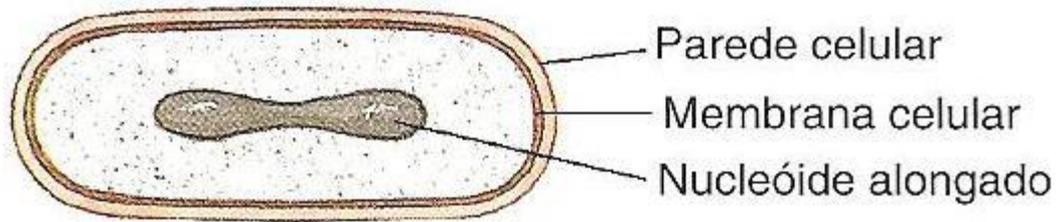

Crescimento bacteriano





CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS – Fases de Crescimento

CRESCIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS 171

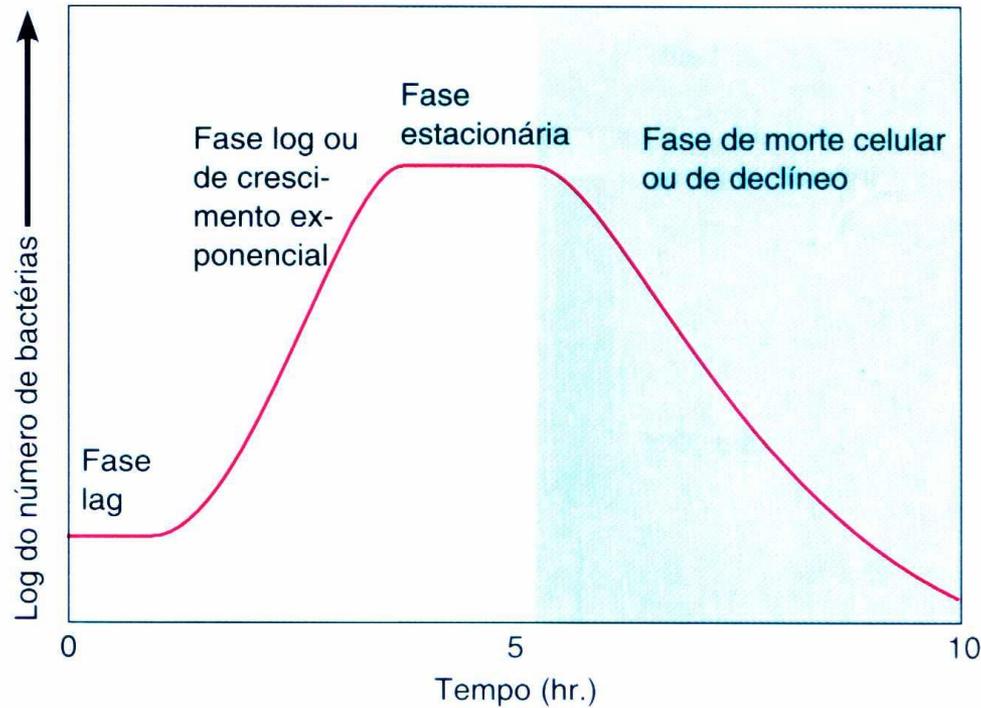


Figura 6.14 Curva de crescimento bacteriano mostrando as quatro fases típicas de crescimento.

Fases de crescimento

Lag – Não há mudança na população bacteriana, aparentemente nada está acontecendo. As células estão se adaptando ao meio de cultura.

Exponencial – As células estão totalmente adaptadas ao meio de cultura e se multiplicam com a máxima capacidade possível.

Estacionária – Não há mudança na população bacteriana. A taxa de crescimento se iguala a taxa de morte.

CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS – Condição Ideal

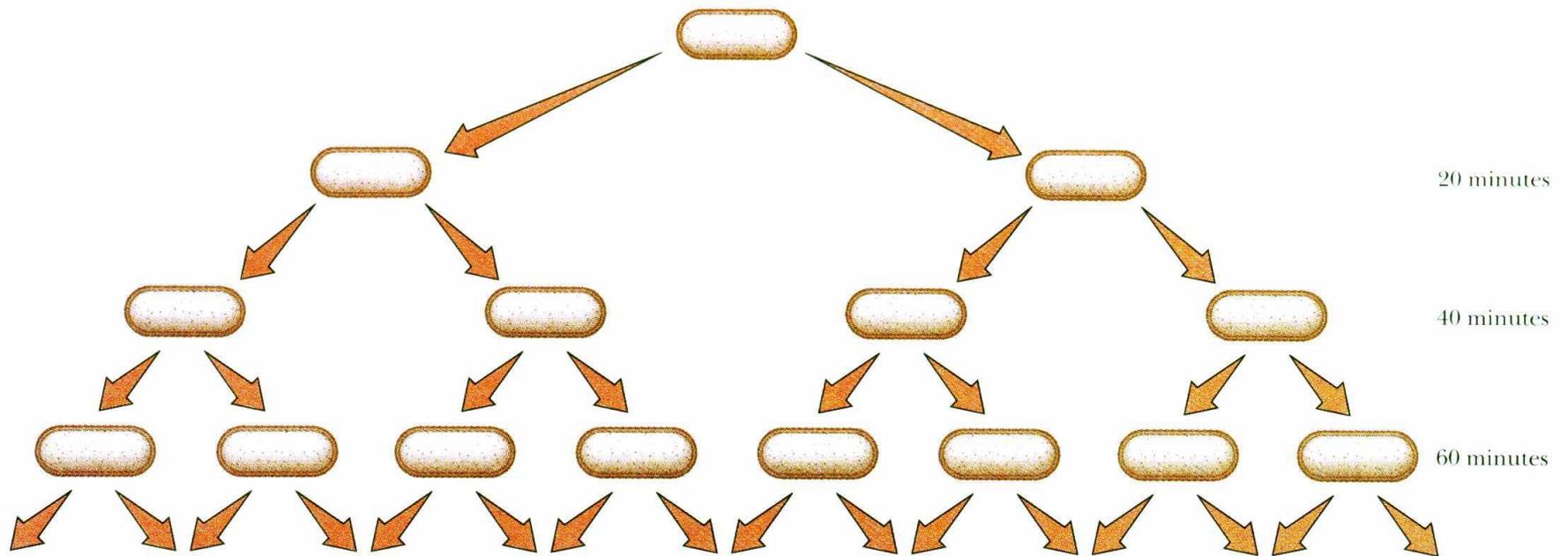
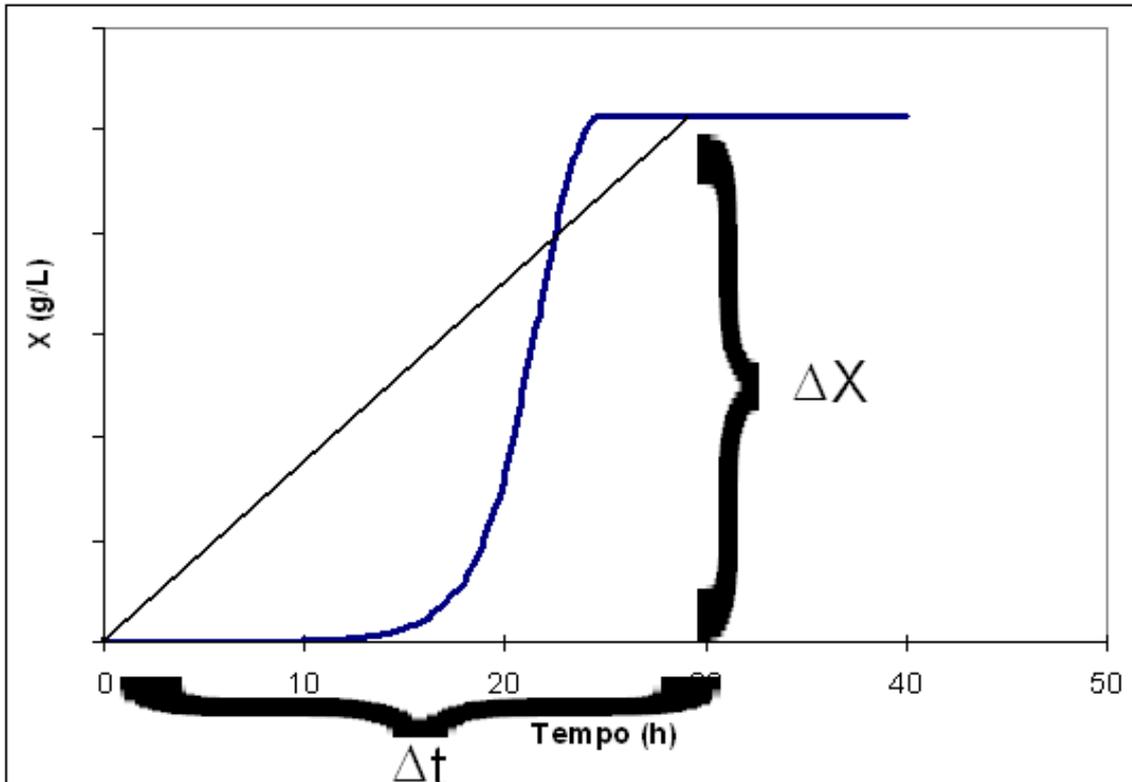


Figure 6.1 A depiction of exponential phase population growth. One cell of a microorganism with a 20-minute generation would yield 8 progeny in one hour.

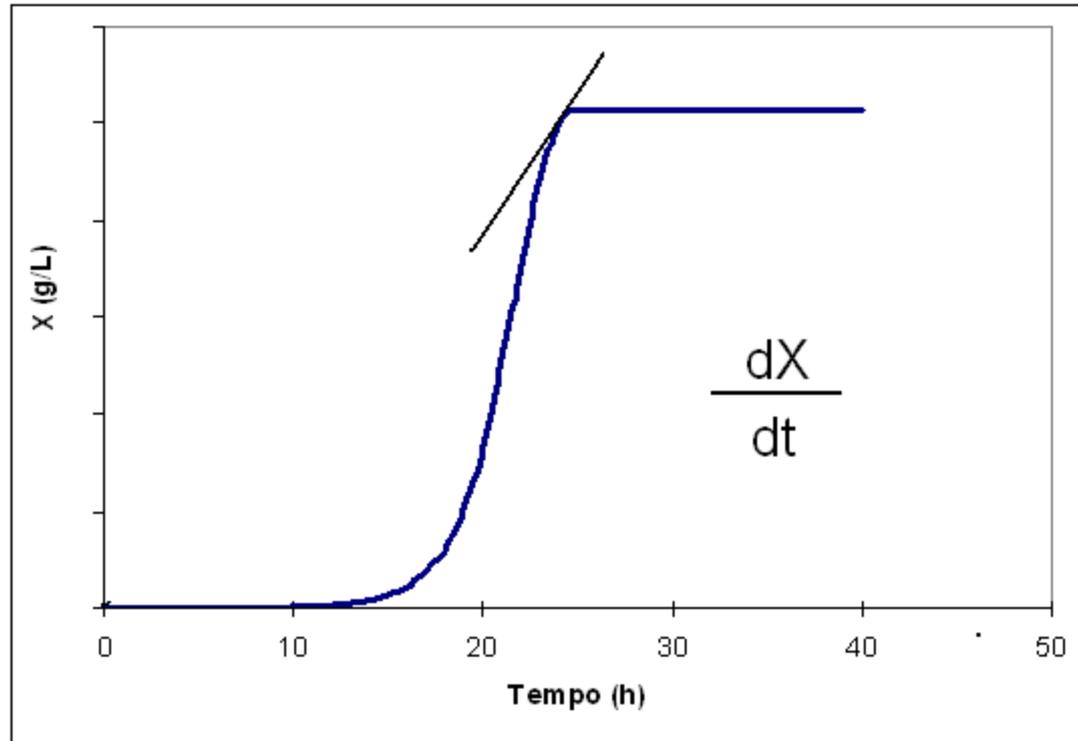
Parâmetros de cultivo velocidades (Produtividades)



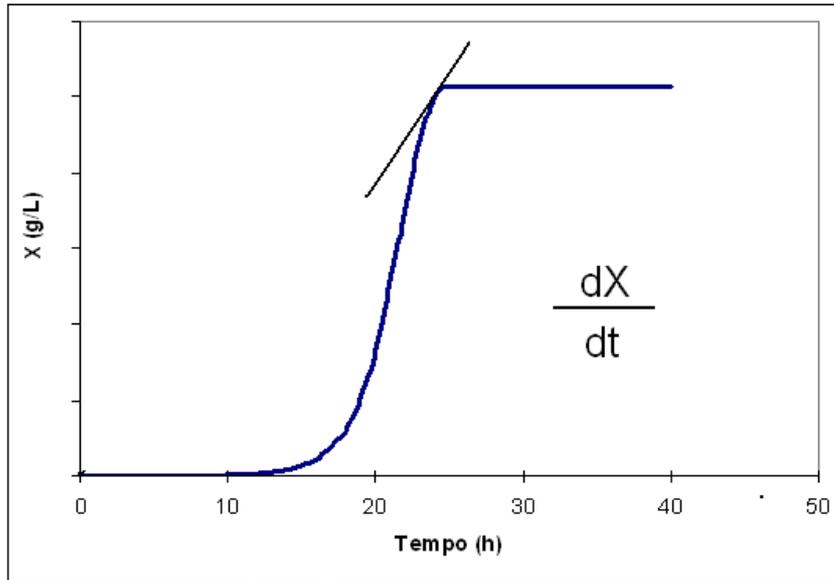
$$V = \frac{\Delta X}{\Delta t}$$

$$P = \frac{\Delta X}{\Delta t}$$

Parâmetros de cultivo velocidades instantâneas



Parâmetros de cultivo velocidades específicas



$$\mu_X = \frac{dX}{dt} \frac{1}{X}$$

Parâmetros de cultivo velocidades específicas



$$\mu_x = \frac{dX}{dt} \frac{1}{X}$$

Rearranjando

$$\frac{1}{X} dX = \mu_x dt$$

Integrando

$$\int_0^t \frac{1}{X} dX = \int_0^t \mu_x dt$$

$$\ln X / X_0 = \mu_x t$$

$$\ln X - \ln X_0 = \mu_x t$$

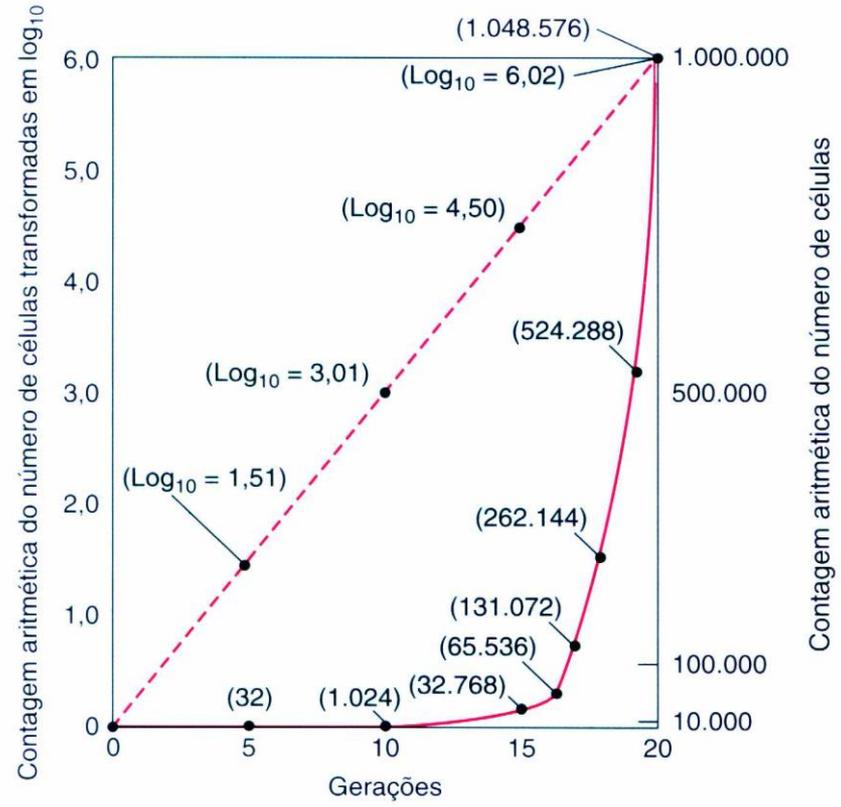
Rearranjando

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_x t$$

$$y = a + b.x$$

CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS – Curva de Crescimento

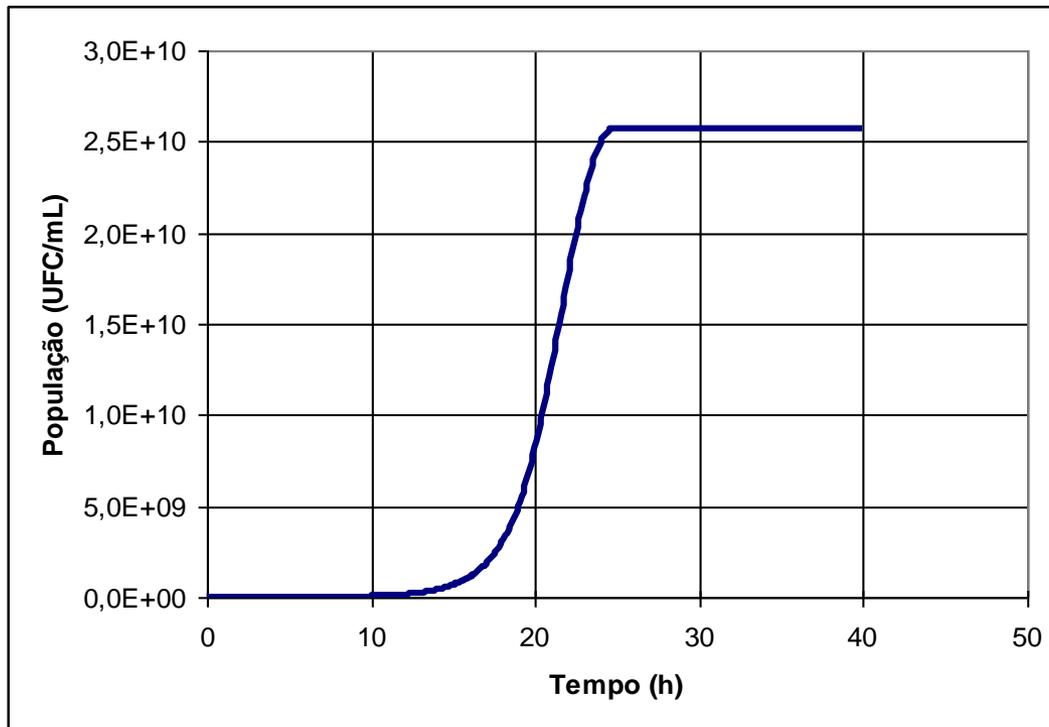
Número de Gerações	Contagem Aritmética de Células	Contagem de Células Considerando Log ₁₀ do Valor Aritmético
0	1	0
5 (2 ⁵) =	32	1,51
10 (2 ¹⁰) =	1.024	3,01
15 (2 ¹⁵) =	32.768	4,52
16 (2 ¹⁶) =	65.536	4,82
17 (2 ¹⁷) =	131.072	5,12
18 (2 ¹⁸) =	262.144	5,42
19 (2 ¹⁹) =	524.288	5,72
20 (2 ²⁰) =	1.048.576	6,02



$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t$$

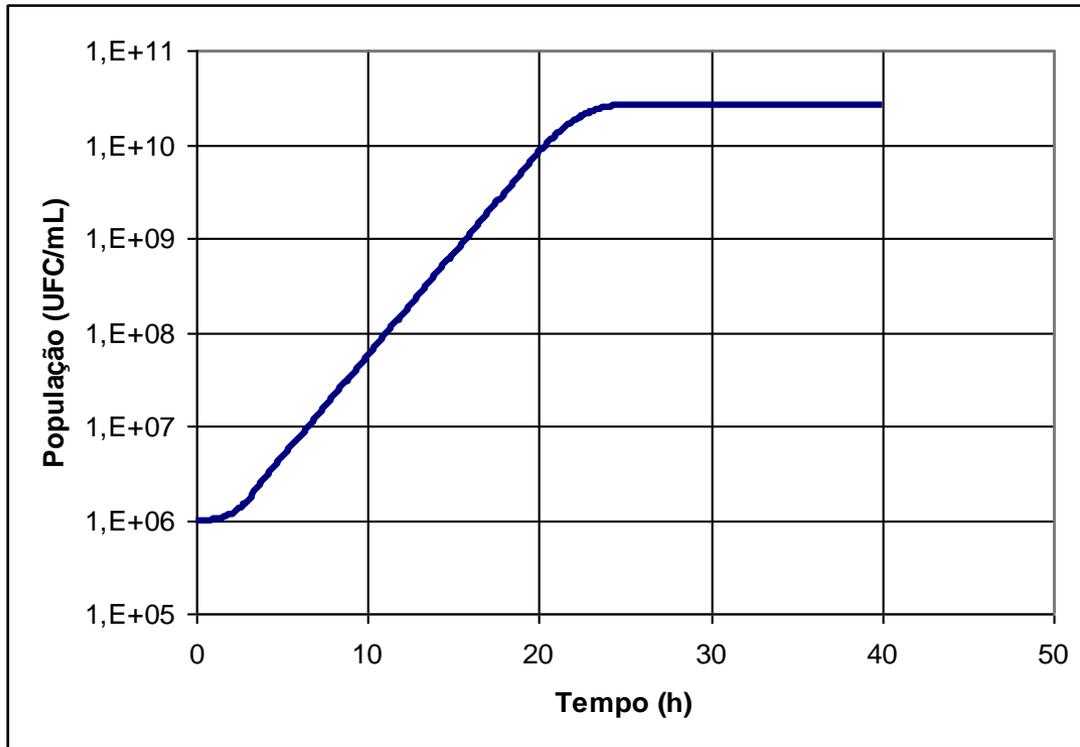
Figura 6.13 Representação gráfica logarítmica (linha pontilhada) e aritmética (linha contínua) da curva de crescimento de uma população em fase de crescimento exponencial.

Fases de crescimento



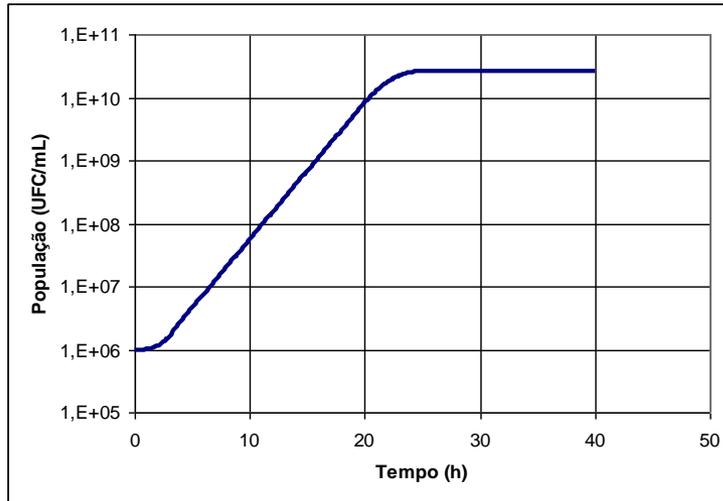
Lag
Exponencial
Estacionária

Fases de crescimento



Lag
Exponencial
Estacionária

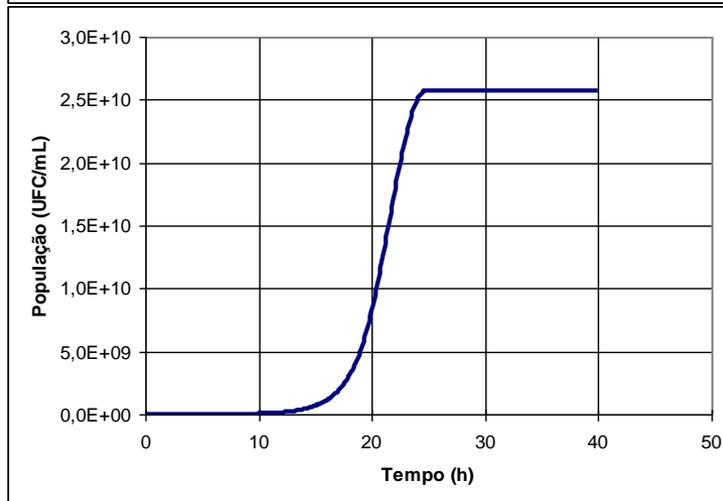
Fases de crescimento



Lag

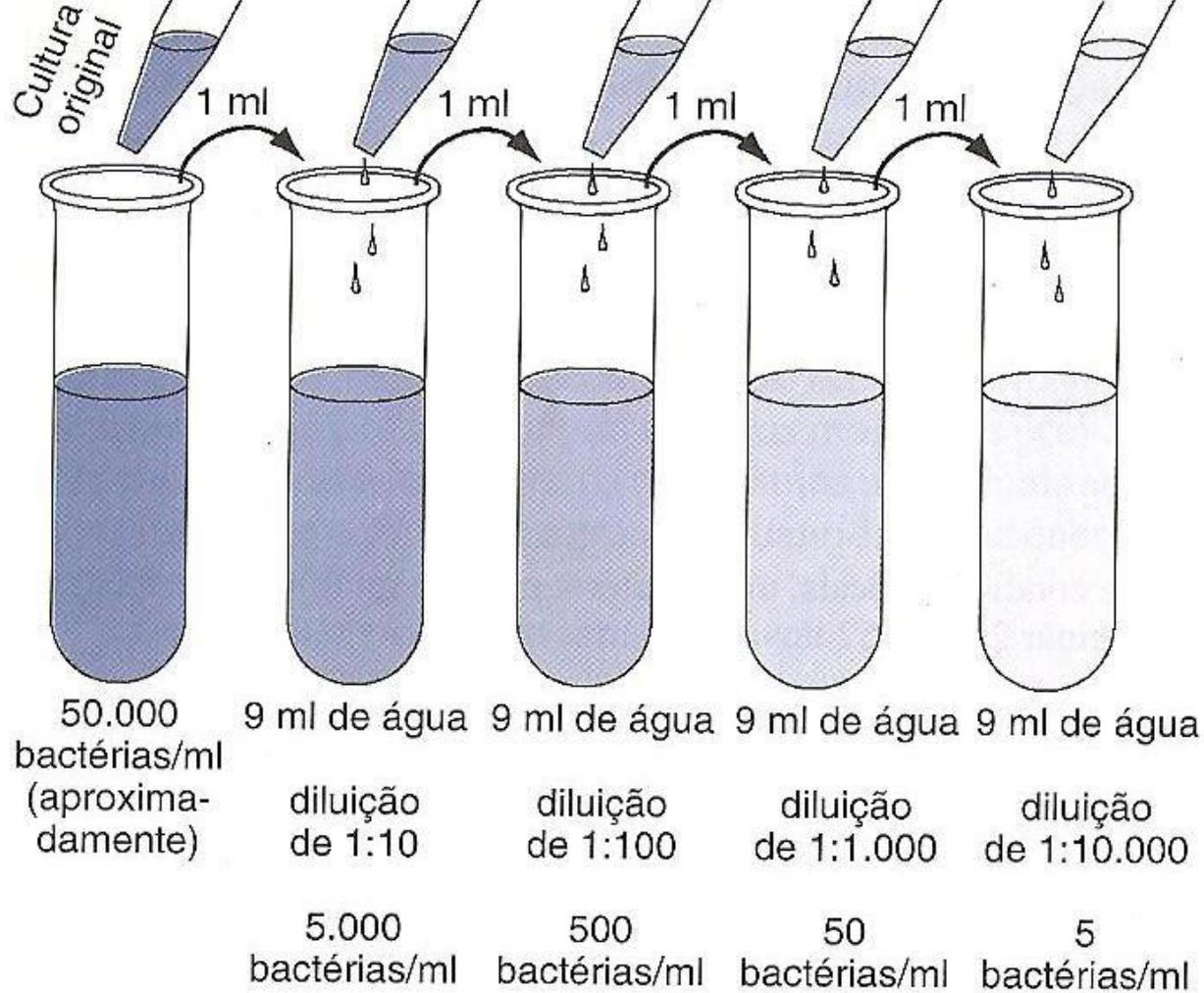
Exponencial

Estacionária



Aceleração

Desaceleração



➤ **Fig. 6.6 Diluição em série.** Retira-se 1 ml de uma cultura em caldo e acrescentam-se 9 ml de água estéril, de modo a diluir a cultura por um fator 10. Este procedimento é repetido, até que a concentração desejada seja alcançada.

QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Diluições seriadas

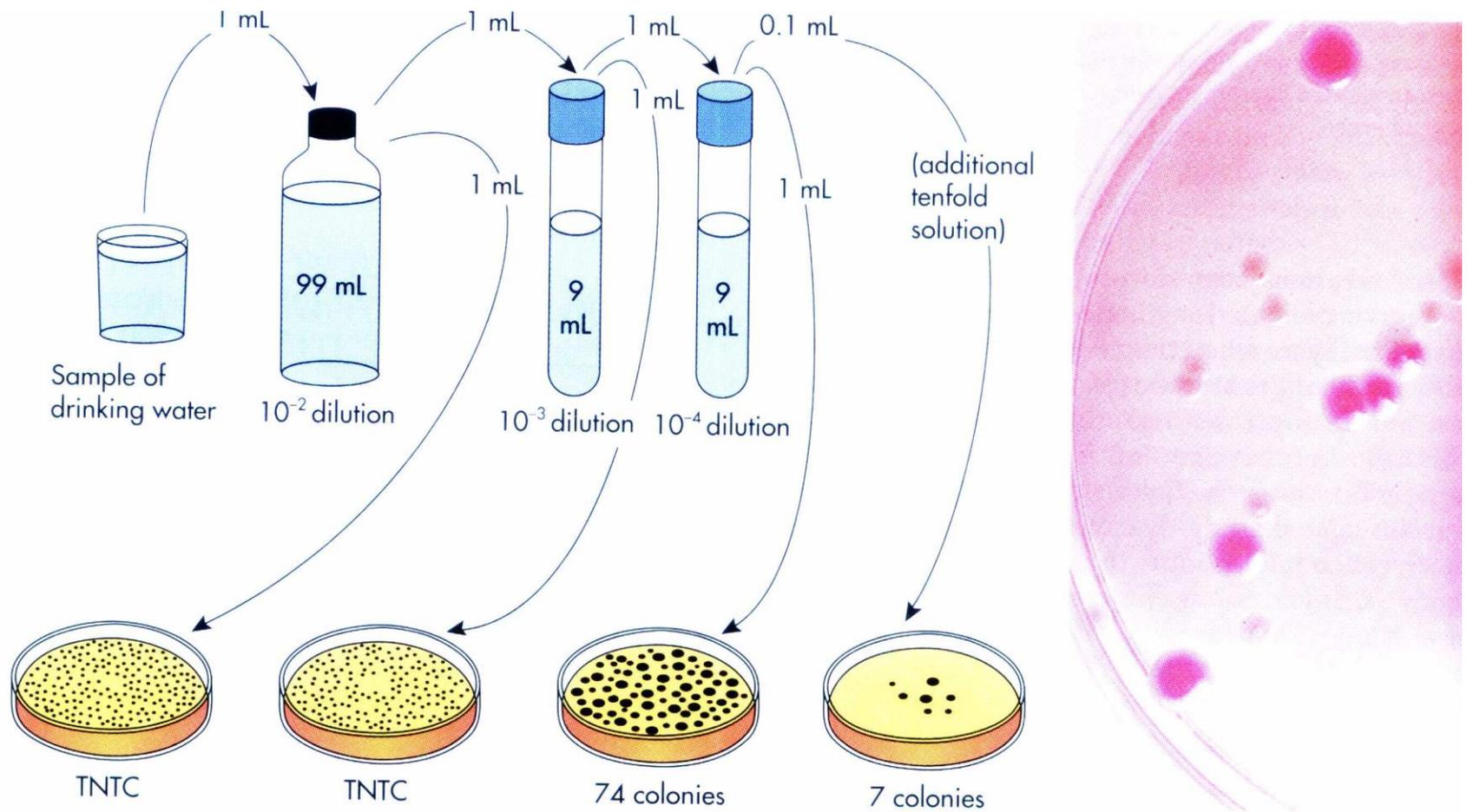


Fig. 2-34 Plate Count Procedure. A, The plate count procedure is used to determine the viable population in a sample containing bacteria. Dilutions are achieved by adding an aliquot of the

QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Pour Plate

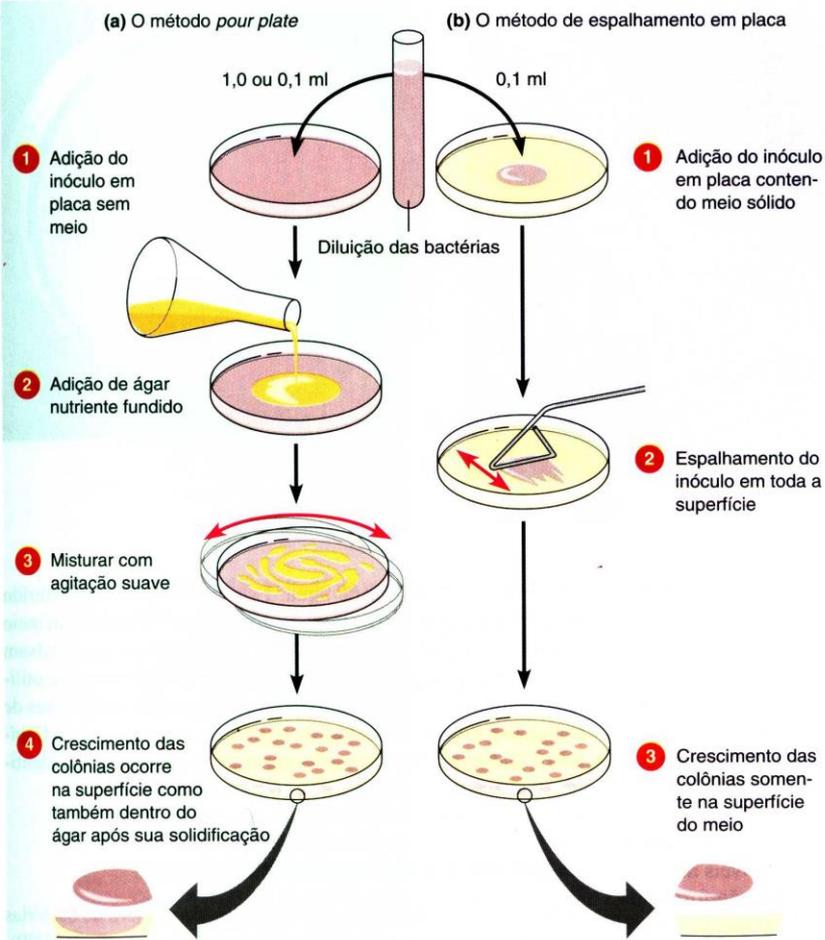


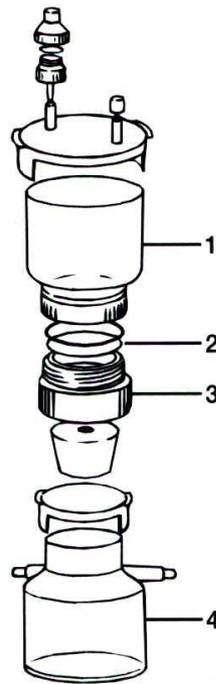
Figura 6.16 Metodologia utilizada para a contagem de colônias em placa.

Como diferem os métodos de espalhamento em placa e o método *pour plate*?

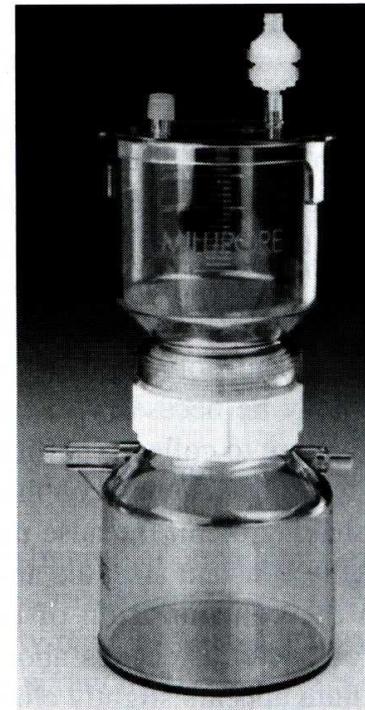
QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Membrana Filtrante

Figure 6.6 A Millipore Membrane Filter System.

(a) Parts of the filter assembly. Some of the more important components are the following: (1) funnel, (2) membrane filter, (3) filter holder base and support, and (4) receiver flask. (b) A complete filtering system. The sample is poured into the funnel and sucked through a membrane filter with the use of vacuum.



(a)



(b)

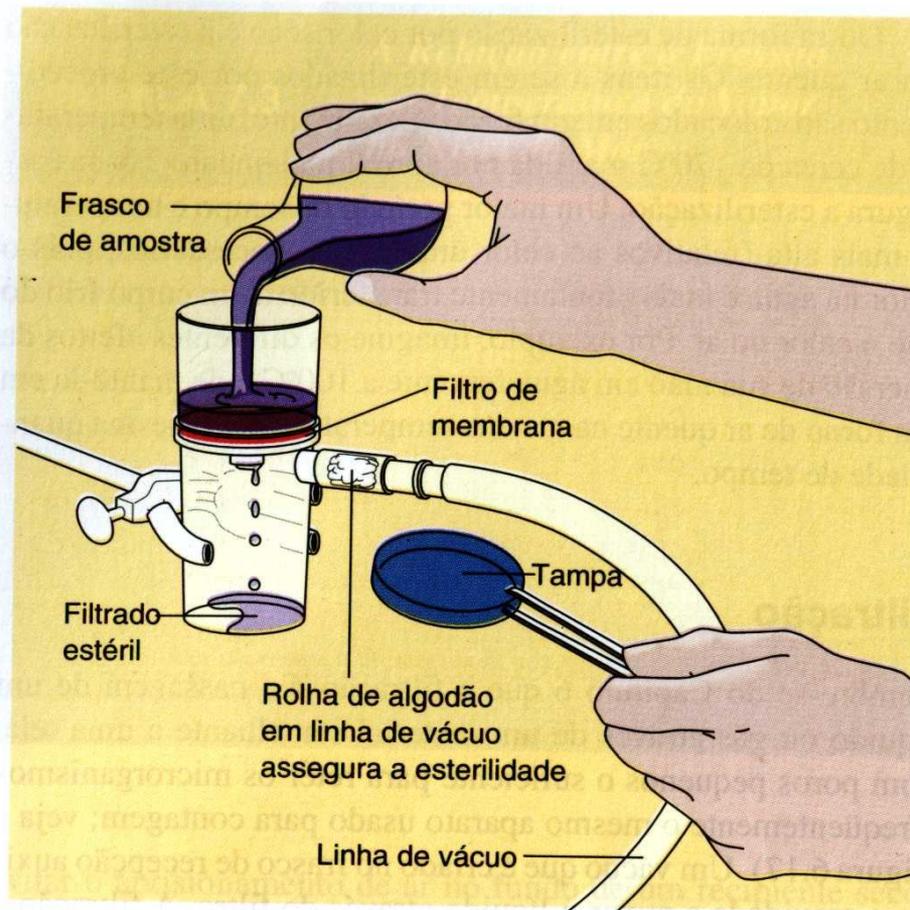


Figura 7.3 Esterilização com filtro, com uma unidade plástica descartável, pré-esterilizada. A amostra é colocada na câmara superior e forçada através do filtro de membrana pelo vácuo, na câmara inferior. Os poros no filtro de membrana são menores que as bactérias, e assim, as bactérias são retidas no filtro. A amostra esterilizada pode então ser decantada da câmara inferior. Um equipamento similar com discos de filtro removíveis é usado para contar as bactérias em amostras (veja a Figura 6.17).

Existem filtros com poros pequenos o suficiente para reter vírus.

QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Membrana Filtrante

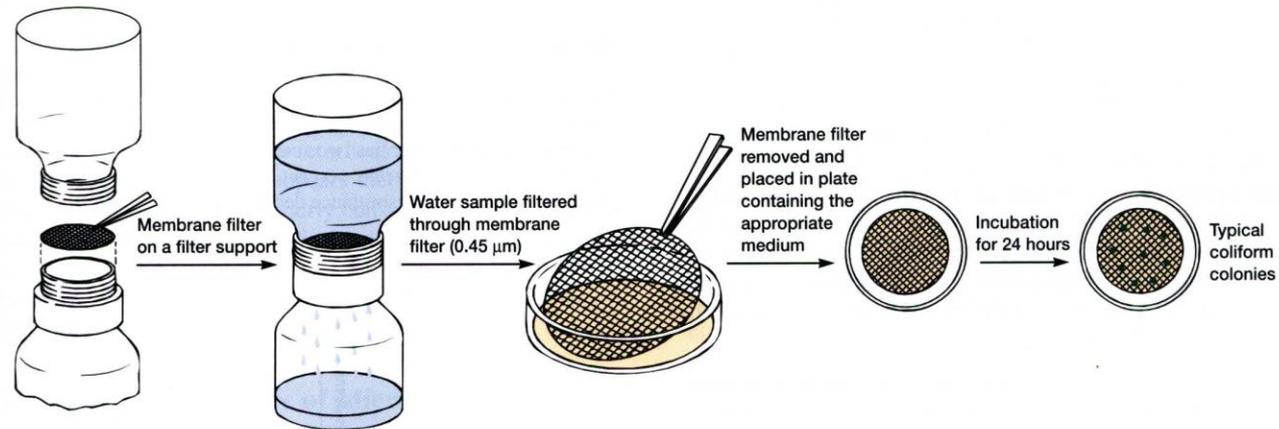


Figure 6.7 The Membrane Filtration Procedure.

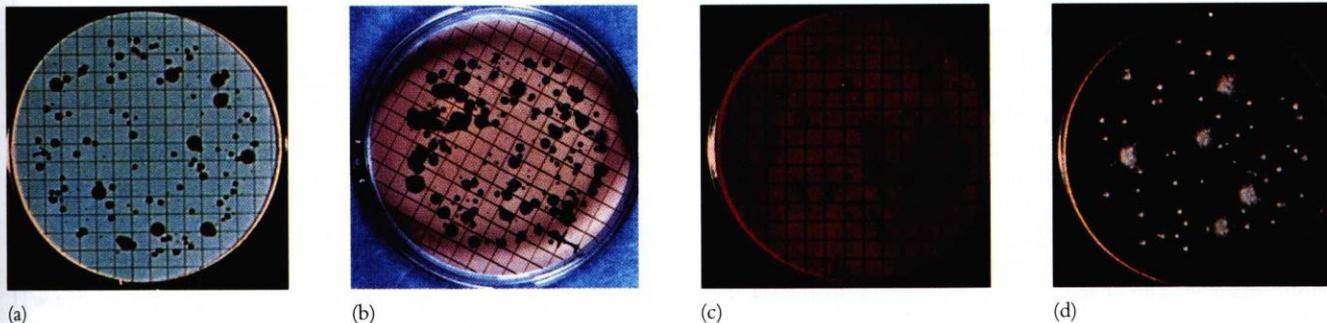
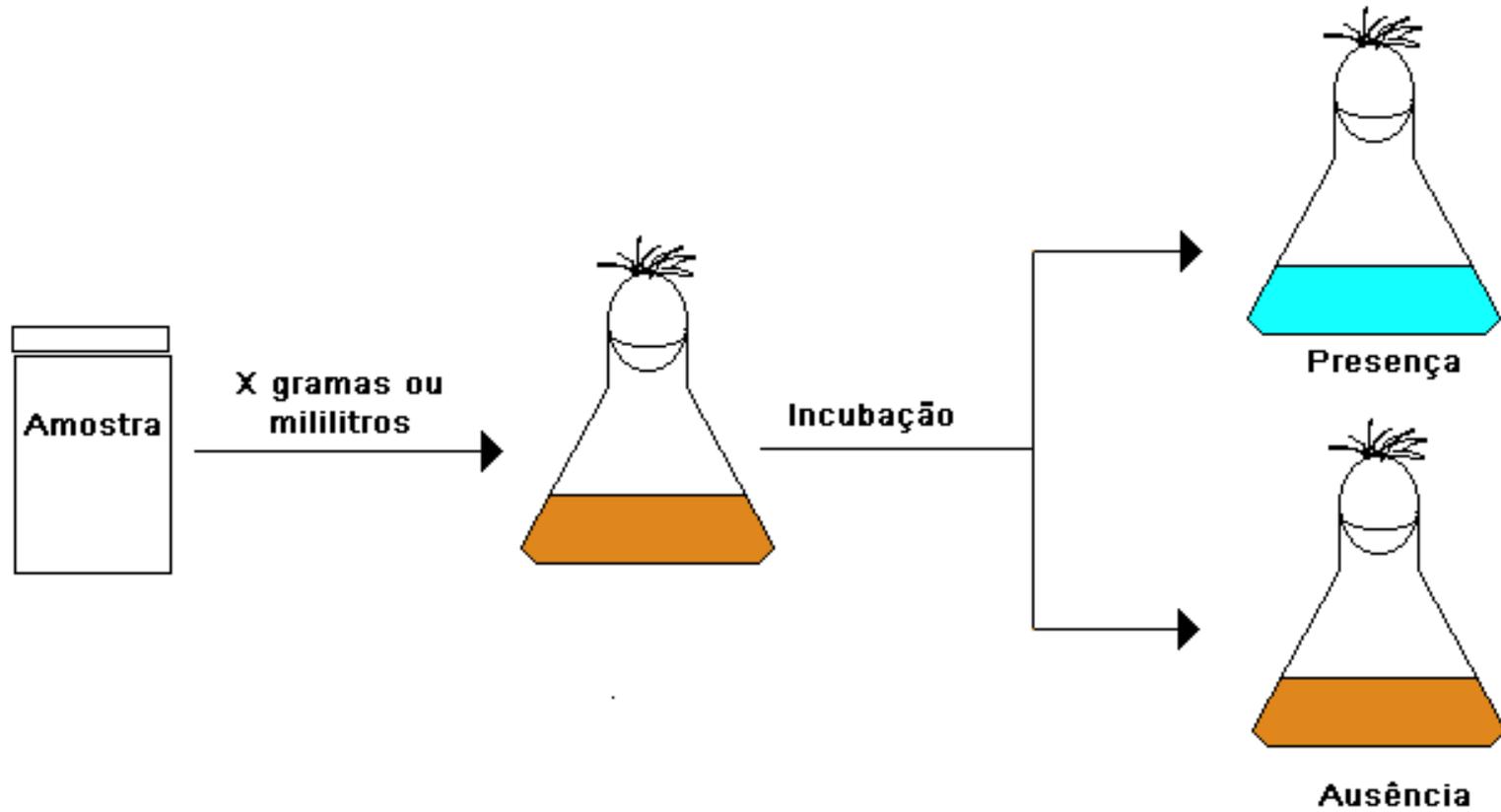


Figure 6.8 Colonies on Membrane Filters. Membrane-filtered samples grown on a variety of media. (a) Standard nutrient media for a total bacterial count. An indicator colors colonies red for easy counting. (b) Fecal coliform medium for detecting fecal coliforms that form blue colonies. (c) m-Endo agar for detecting *E. coli* and other coliforms that produce colonies with a green sheen. (d) Wort agar for the culture of yeasts and molds.

QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Presença/Ausência



QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Número Mais Provável

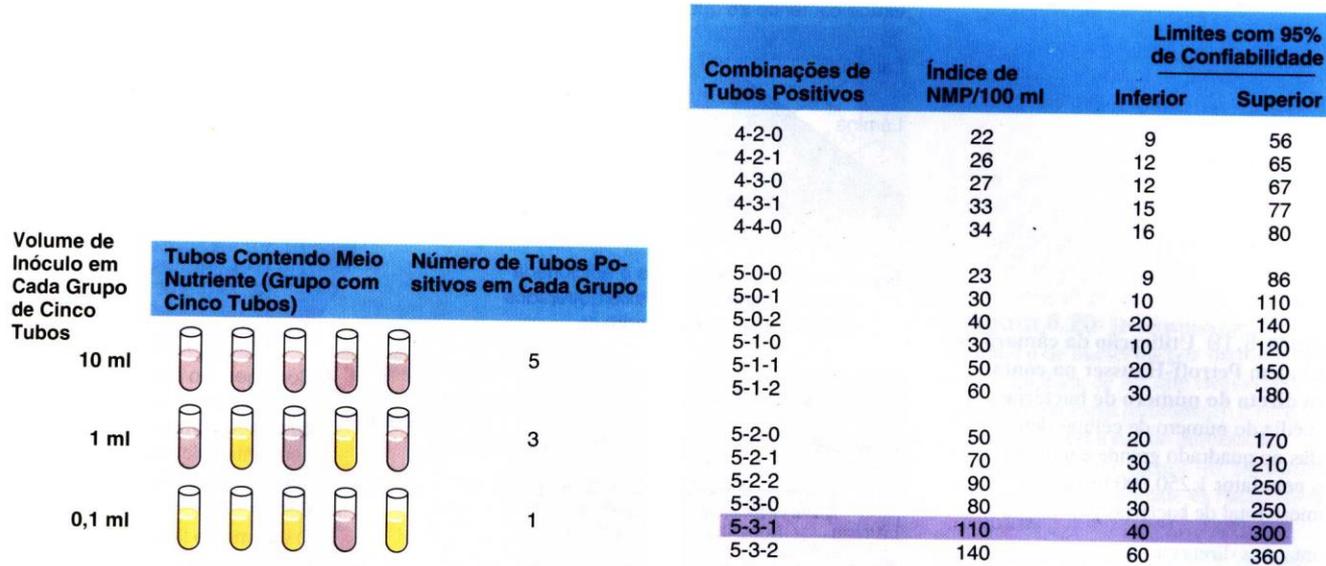
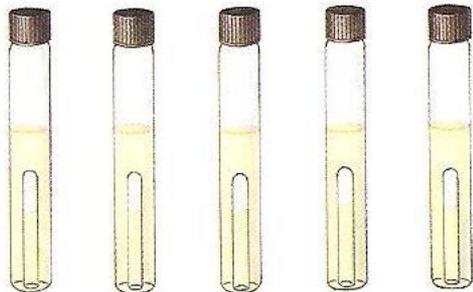
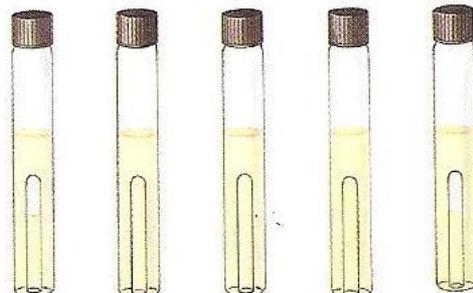
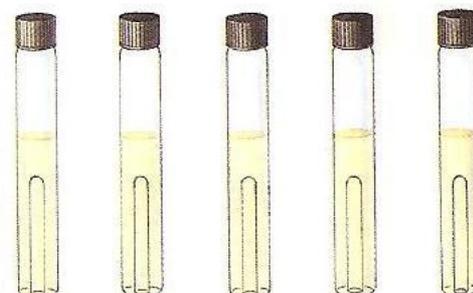


Figura 6.18 Método do número mais provável (MNP). Neste exemplo, são apresentados três grupos de tubos, cada grupo contendo cinco tubos. Cada tubo do primeiro grupo de cinco tubos recebe 10 ml de inóculo, como, por exemplo, uma amostra de água. Cada tubo do segundo grupo de cinco tubos recebe 1 ml de amostra, e do terceiro grupo, 0,1 ml cada. Todos os cinco tubos do primeiro grupo apresentaram crescimento bacteriano, ou seja, resultado positivo, demonstrando a existência de um grande número de bactérias na amostra. No segundo grupo, que recebeu apenas um décimo do inóculo inicial, apenas três tubos apresentaram resultado positivo. No terceiro grupo, que recebeu um centésimo do inóculo inicial, apenas um dos tubos foi positivo. A tabela do MNP nos permite calcular o número estatisticamente provável de bactérias presentes na amostra. O número de tubos positivos é anotado para cada grupo de tubos: na região sombreada do exemplo, os tubos 5, 3 e 1. Se analisarmos esta combinação em uma tabela de MNP, concluiremos que 110% é o índice do MNP, para 100 ml de amostra. Estatisticamente, isso significa que 95% das amostras de água que apresentam esse resultado contêm entre 40-300 bactérias, sendo 110 o número mais freqüente.

Quando pode ser utilizado o método do número mais provável para a determinação do número de bactérias em uma amostra?

Volume de Diluição Adicionado	Resultados das Culturas	Número de Tubos Positivos
10 ml	 + + + + +	5
1 ml	 + - - - +	2
0,1 ml	 - - - - -	0

➤ **Fig. 6.10 Teste do número mais provável (NMP).** Os tubos nos quais bolhas de gás são visíveis (marcados com +) contêm organismos.

QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Câmara de contagem

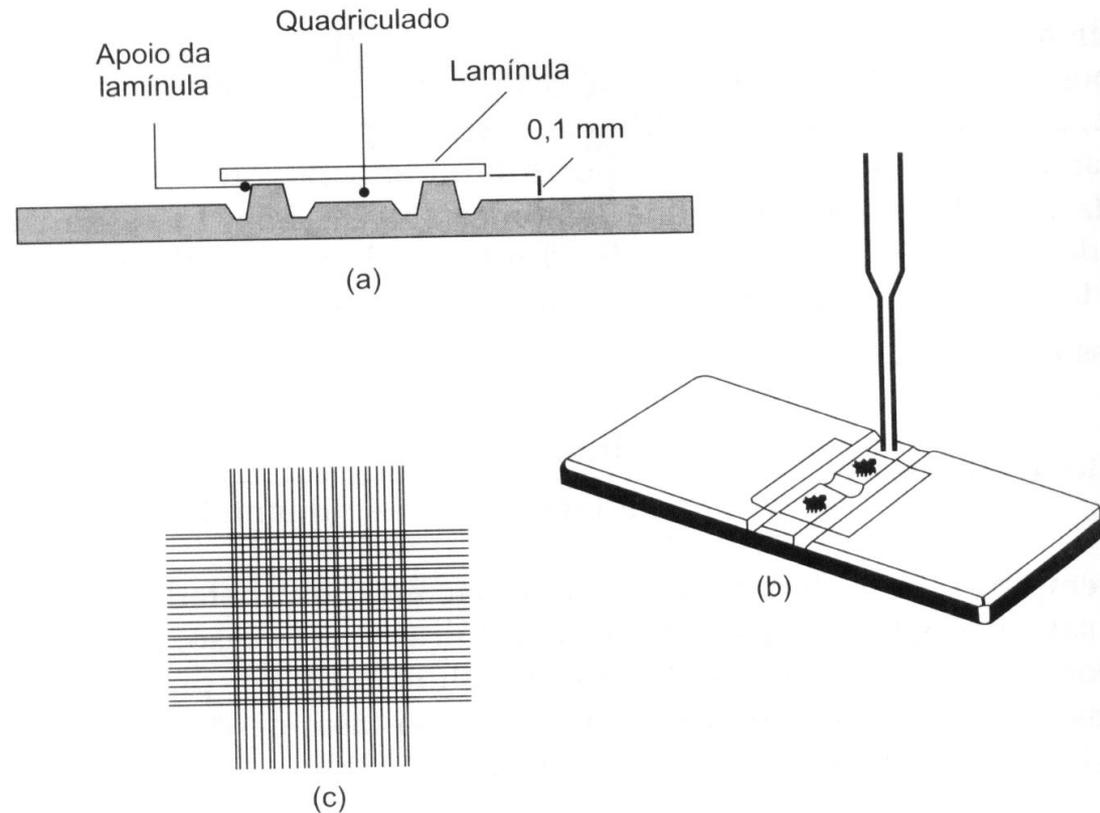
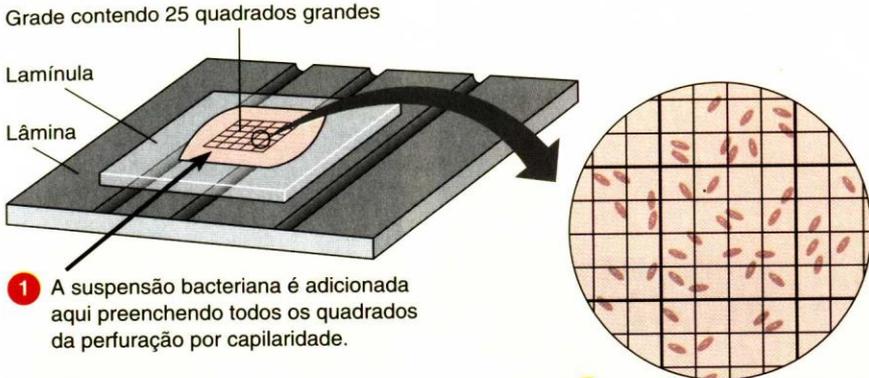
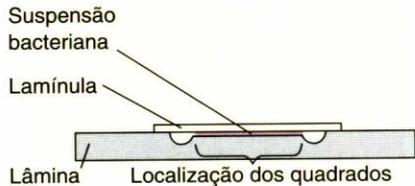


Figura 2.10 – Uma câmara de contagem típica. (a) Vista lateral: consiste numa lâmina grossa de vidro retangular com uma cavidade central de 0,1 mm abaixo do nível das laterais. A plataforma central é separada dos ombros laterais por uma cavidade de cada lado. (b) Vista superior: na superfície de cada metade da plataforma central existe um quadrado dividido em 400 pequenos quadrados, cada um de $\frac{1}{400} \text{ mm}^2$. Uma lamínula deve ser posicionada e comprimida sobre as bordas laterais da câmara; para ter o contato apropriado, a lamínula deve ser escorregada levemente pela superfície enquanto estiver sendo pressionada. (Figura adaptada do livro: *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine* de Paul Singleton – Ed. John Wiley & Sons, 4.^a ed. 1997.)

QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Câmara de contagem



1 A suspensão bacteriana é adicionada aqui preenchendo todos os quadrados da perfuração por capilaridade.



2 Corte lateral da câmara de contagem. A profundidade é conhecida assim como a área dos quadrados, portanto pode ser calculado o volume da suspensão bacteriana adicionado (profundidade x área).

3 Contagem no microscópio. São contadas todas as células de vários quadrados grandes, sendo posteriormente calculada a média. O número de células no quadrado grande mostrado é 14.

4 O volume de líquido em cada quadrado grande é 1/1.250.000 de mililitro. Se o quadrado contém 14 células, como mostrado aqui, portanto existe 14 vezes 1.250.000 (17.500.000) células em cada mililitro.

Figura 6.19 Utilização da câmara de contagem Petroff-Hausser na contagem direta do número de bactérias. A média do número de células determinadas no quadrado grande e multiplicadas pelo fator 1.250.000 fornece o número total de bactérias por mililitro. Contagens diretas ao microscópio são bastante utilizadas para certas aplicações, mas têm a desvantagem de necessitarem de um grande número de células para fornecerem valor significativo.

QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Turbidimetria

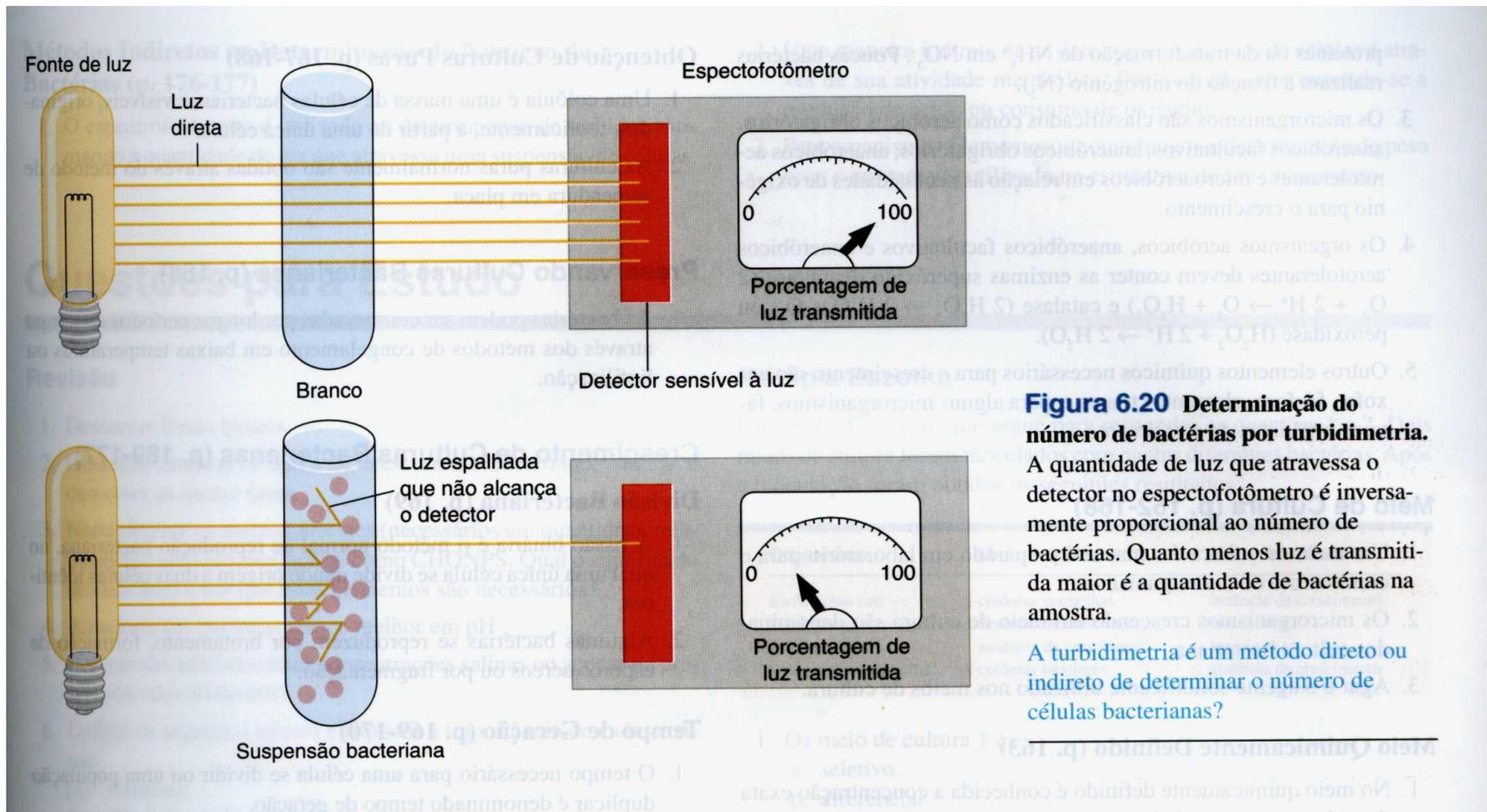
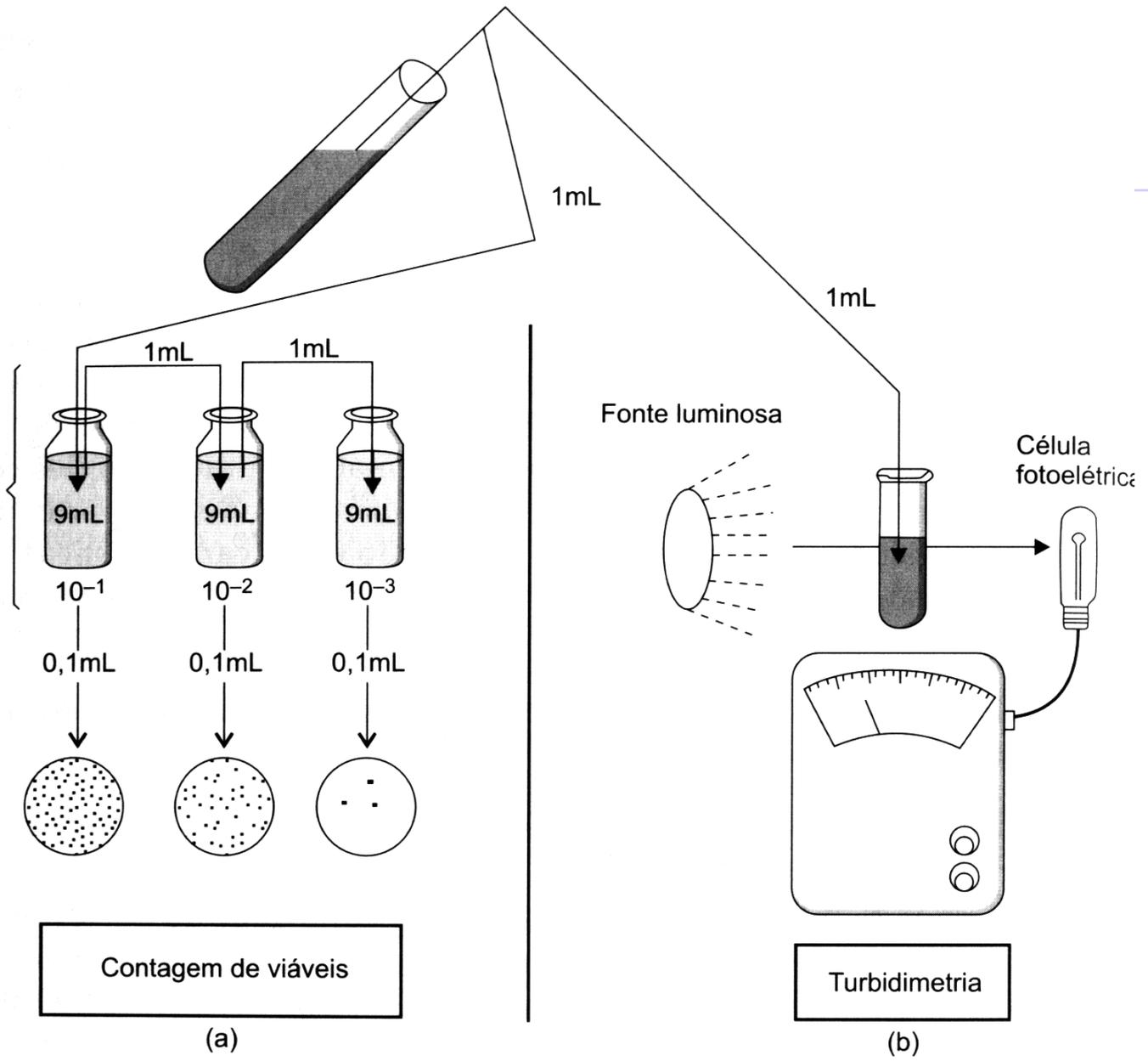


Figura 6.20 Determinação do número de bactérias por turbidimetria.

A quantidade de luz que atravessa o detector no espectrofotômetro é inversamente proporcional ao número de bactérias. Quanto menos luz é transmitida maior é a quantidade de bactérias na amostra.

A turbidimetria é um método direto ou indireto de determinar o número de células bacterianas?

Quantificação de microrganismos



Carvalho, 2001

1 – Métodos utilizados para a quantificação de microrganismos. (a) Contagem de viáveis. (b) Turbidimetria. O desenho apresenta um modelo esquemático de um espectrofotômetro.