

Nutrição Bacteriana - Meios de Cultura

Cristiane Guzzo

Departamento de Microbiologia - ICBII-USP

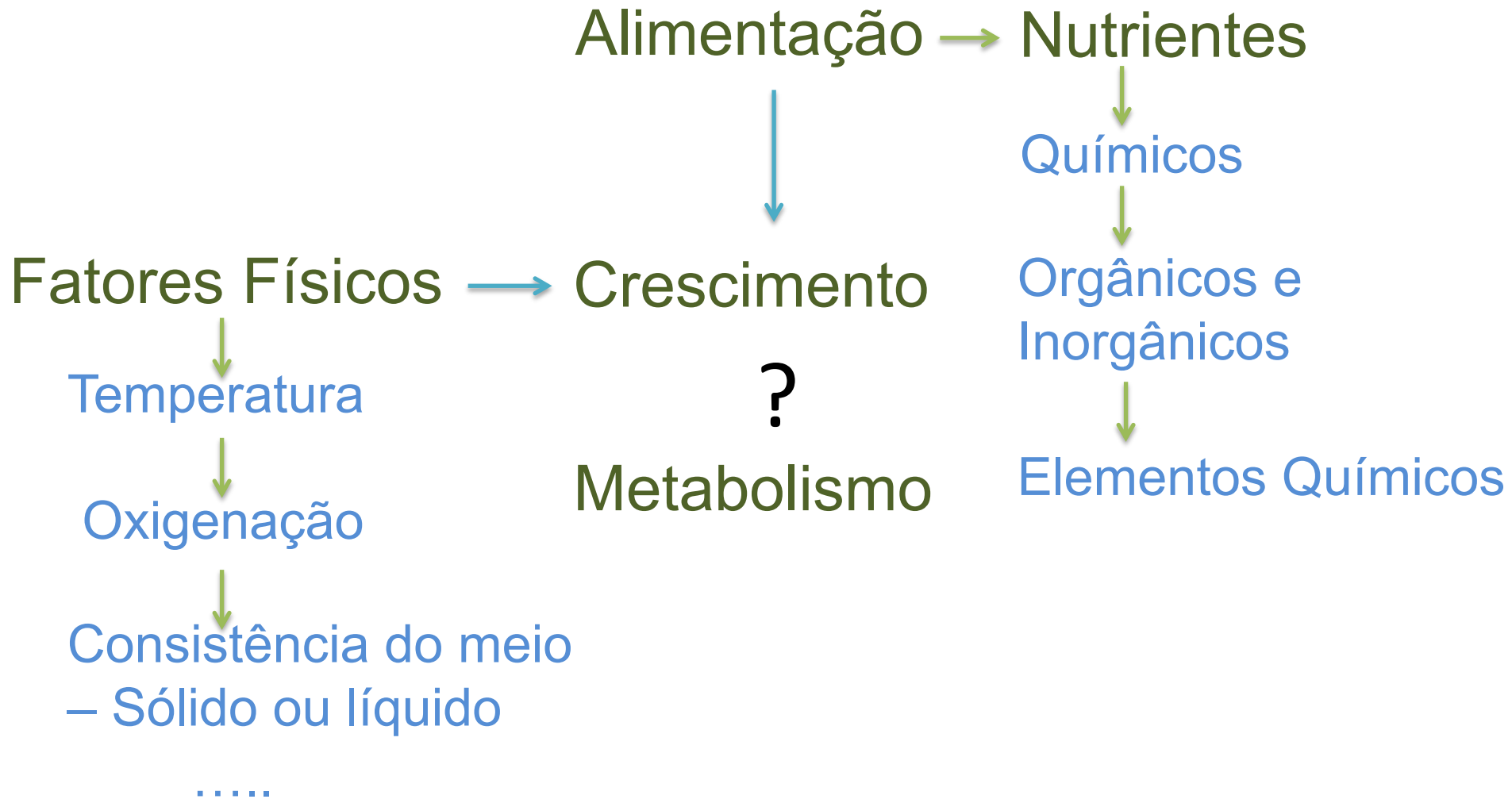
BMM0160 – Farmácia Diurna

São Paulo, 9 de Setembro de 2019

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

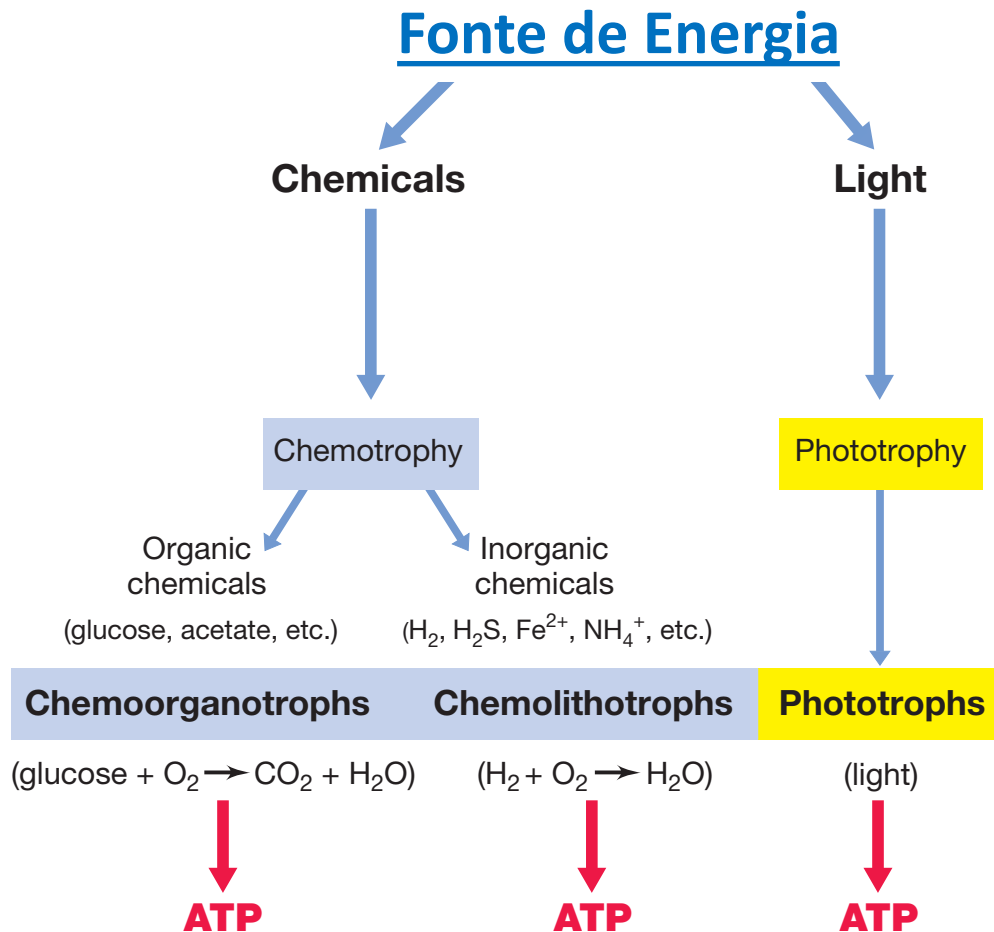
Quais são os fatores que afetam o crescimento microbiano?



Diversidade Metabólica

Capacidade Biossintética:

quanto o organismo consegue sintetizar fatores importantes para o seu crescimento



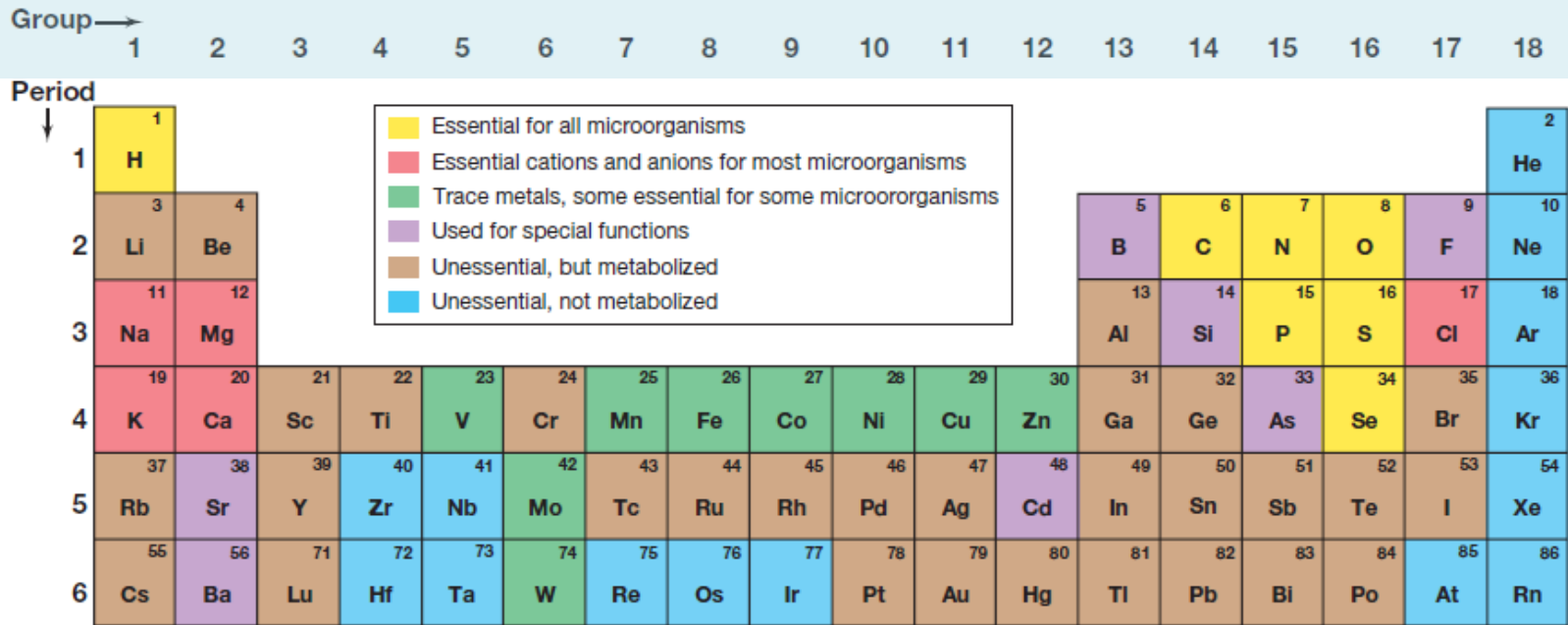
Fonte de Carbono

Autotróficos: CO_2

Heterotróficos: compostos orgânicos

Nutrição Microbiana

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)

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.

Geralmente os microelementos estão em baixa concentração no ambiente – como obtê-los?

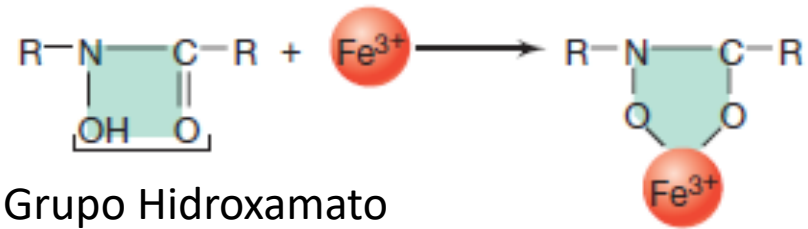
- Vamos olhar para o Ferro!

- Condições anóxicas está na forma Fe^{+2}

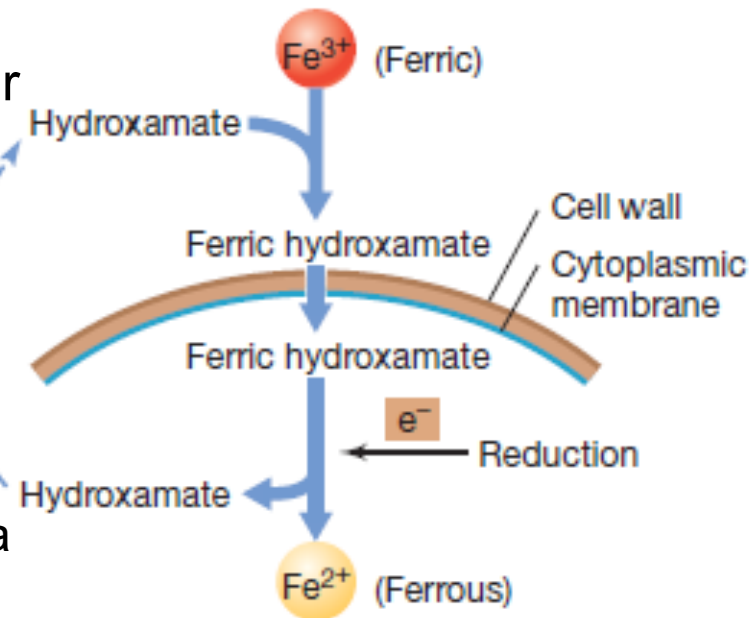
- Condições óxicas está na forma de Fe^{+3} , Grupo Hidroxamato insolúvel e se depositam em minerais

- 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)

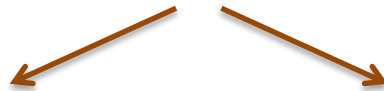


Classificação dos meios de Cultura em Laboratório

Meio de Cultura

Meios de Cultura

Condições nutricionais para o crescimento de um microrganismo



1. Meio Definido (Meio Mínimo)

Adição precisa de compostos orgânicos e inorgânicos

Composição química definida

2. Meio Complexo (Meio Rico)

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

3. Meio Seletivo

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

4. Meio Diferenciado

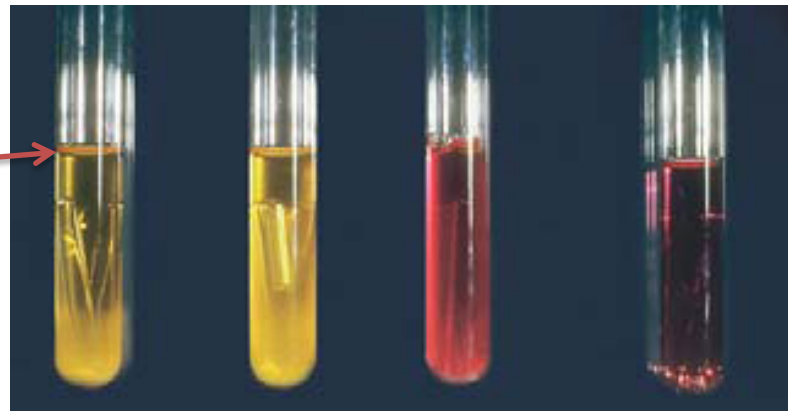
Adiciona um indicador (corante, por exemplo), diferenciar reações químicas que ocorrem durante o crescimento .

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. -

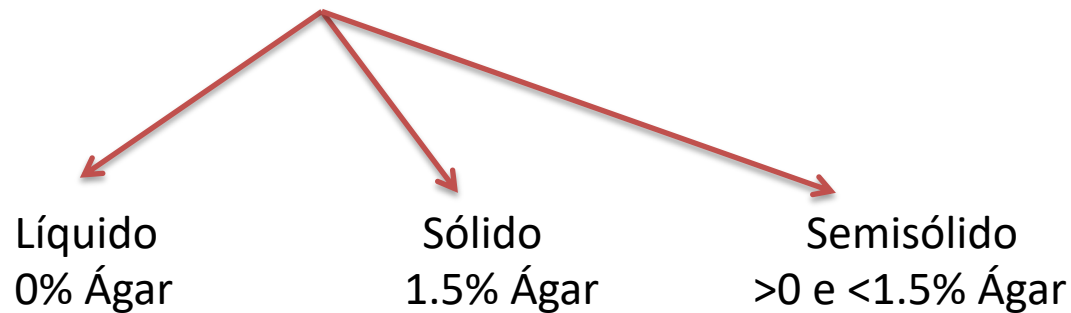
Não inoculado

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

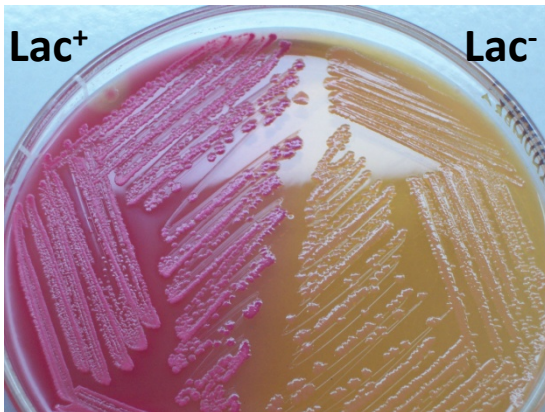
Cultivo de Microrganismos em Laboratório

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



Diferentes Meios de Cultura usado em laboratório

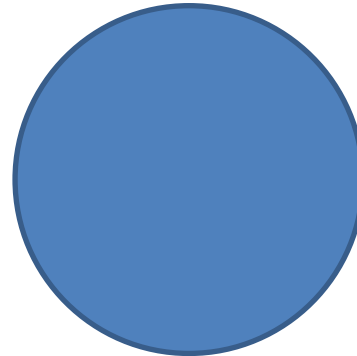
Ágar MacConkey



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

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

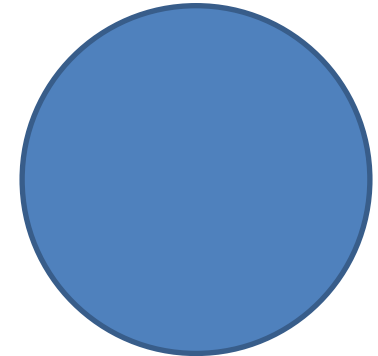
Ágar Staphylococcus 110 Stone Gelatin Ágar



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

Classificação dos microrganismos com base no seu meio ambiente & como isso afeta seu crescimento

Fatores que afetam o Crescimento microbiano

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

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

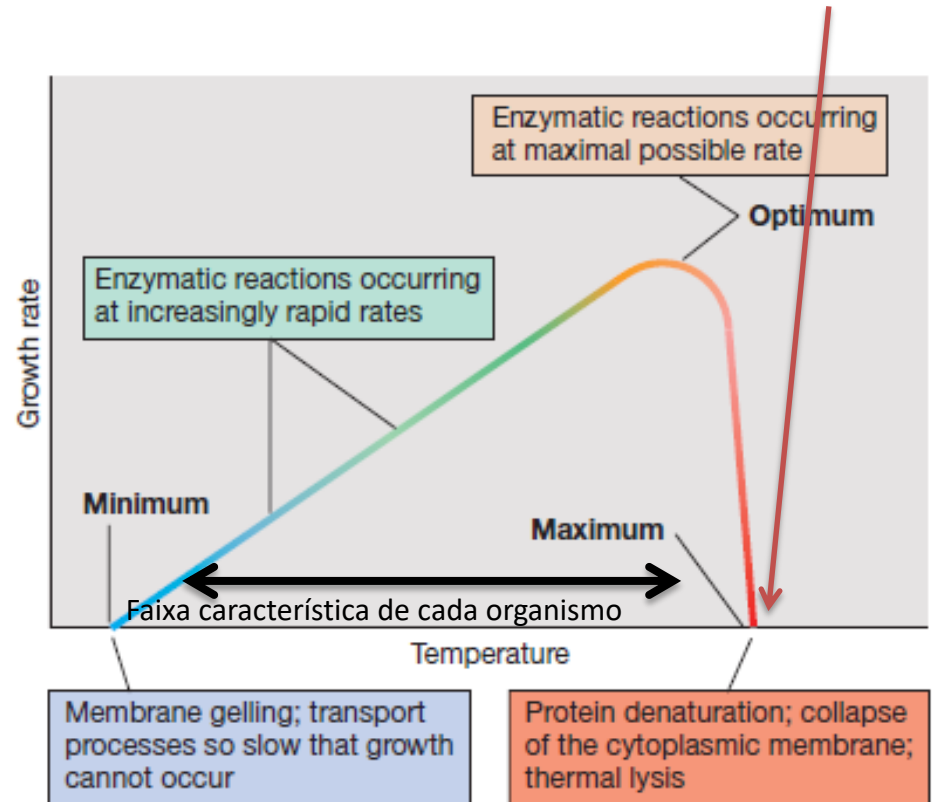
- **Ótima**

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

- **Máxima**

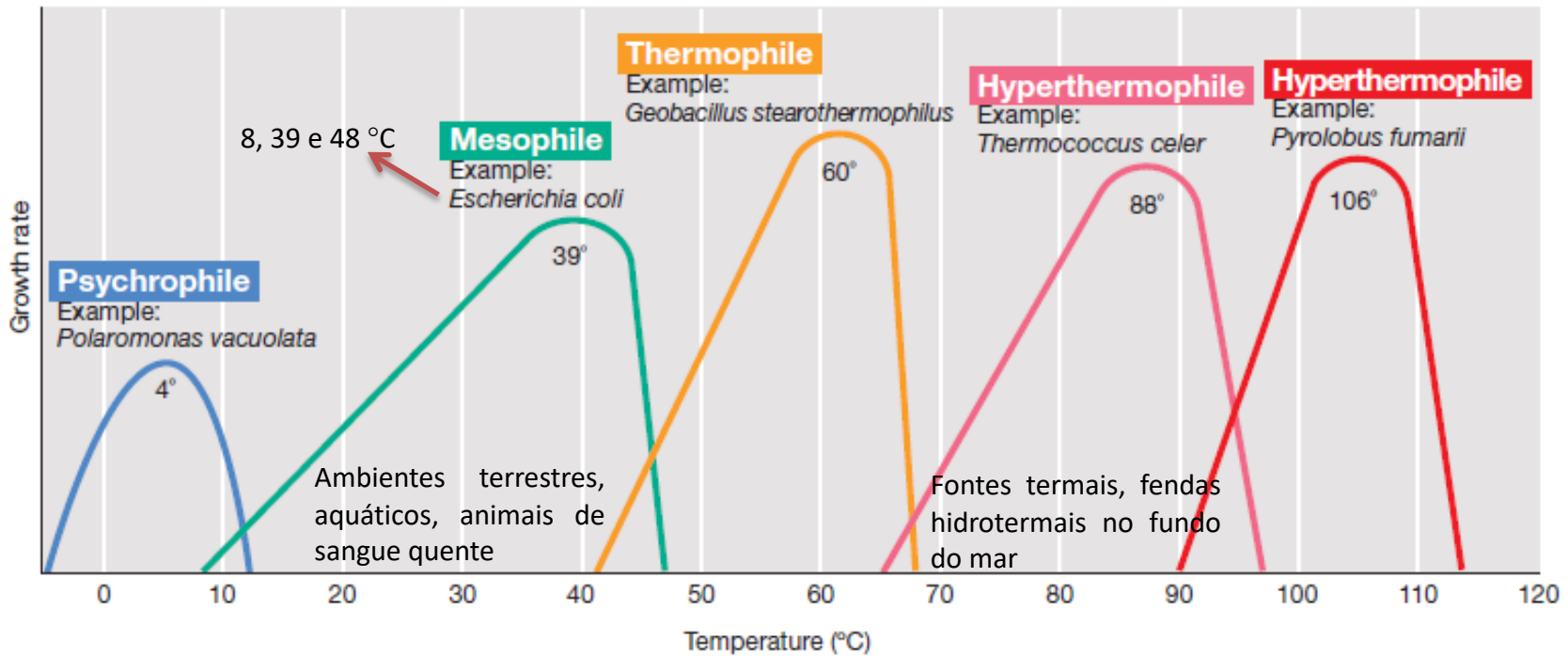
- Faixa normal de variação de temperatura é 25-40 °C
- Não conseguem crescer em todas as faixas

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).

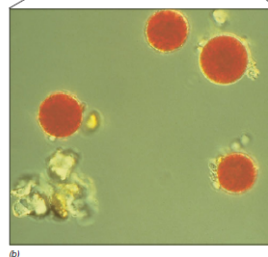
- Ambientes frios na Terra

- Ártico
 - Antártida
 - No fundo do mar (1-3 °C)

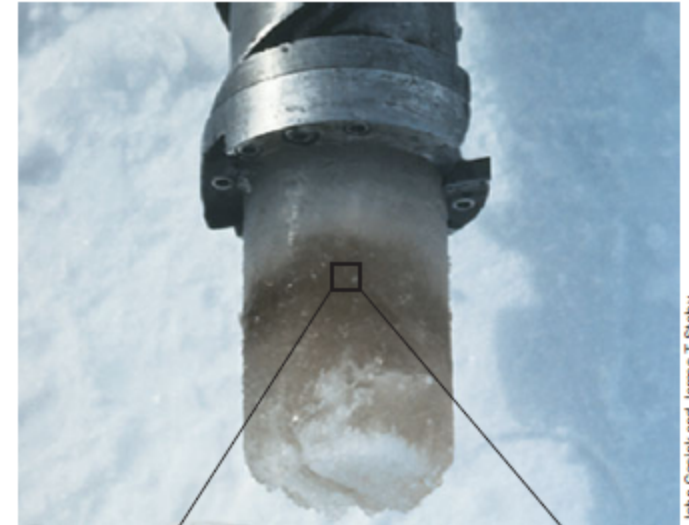
Essas algas formam massas densas no interior do gelo (sulcos de água líquida)

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

California
Algas da neve
Chlamydomonas nivalis

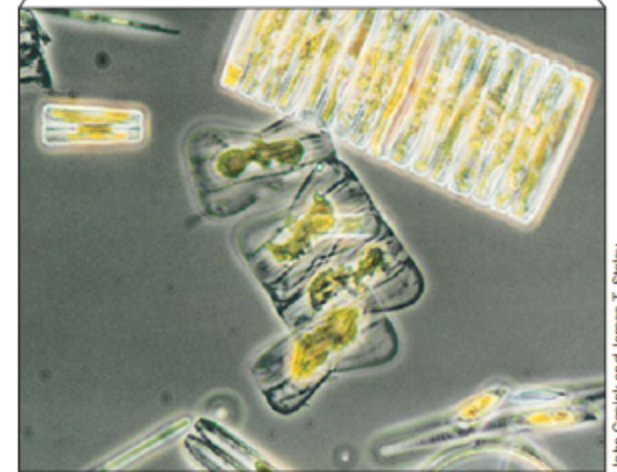


Antártida



(a)

Algas verdes (eucariótos fototróficos)



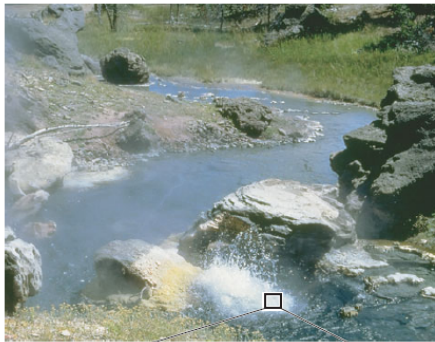
(b)

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

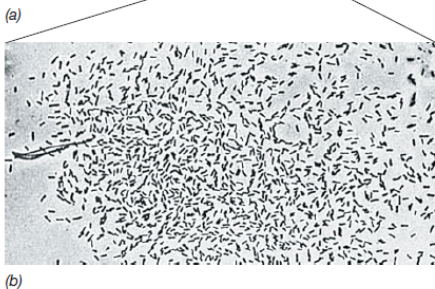


Figure 5.22 Growth of hyperthermophiles in boiling water.

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

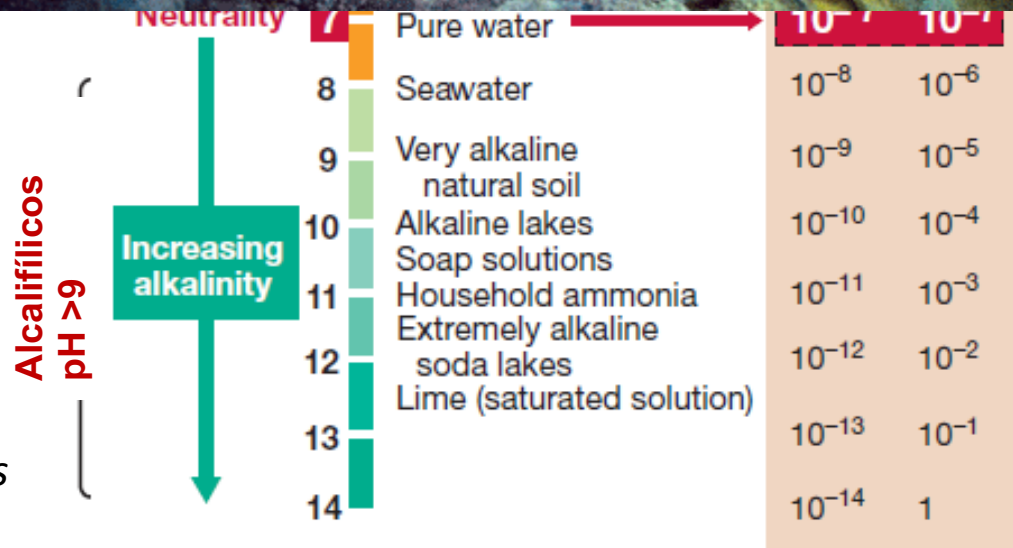
Table 5.1 Presently known upper temperature limits for growth of living organisms

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 (médios ambientes)
- Poucos em $\text{pH} < 3$ e > 9
- Acidofílicos
 - Maior quantidade de fungos (poucos, 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 >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

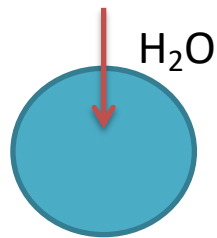
<i>Physiological class (optima range)</i>	<i>Approximate pH optimum for growth</i>	<i>Example organism^a</i>
Neutrophile (pH >5.5 and <8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidophile (pH <5.5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alkaliphile (pH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

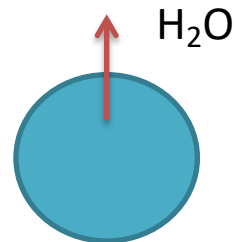
Efeito Osmótico

- 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 +

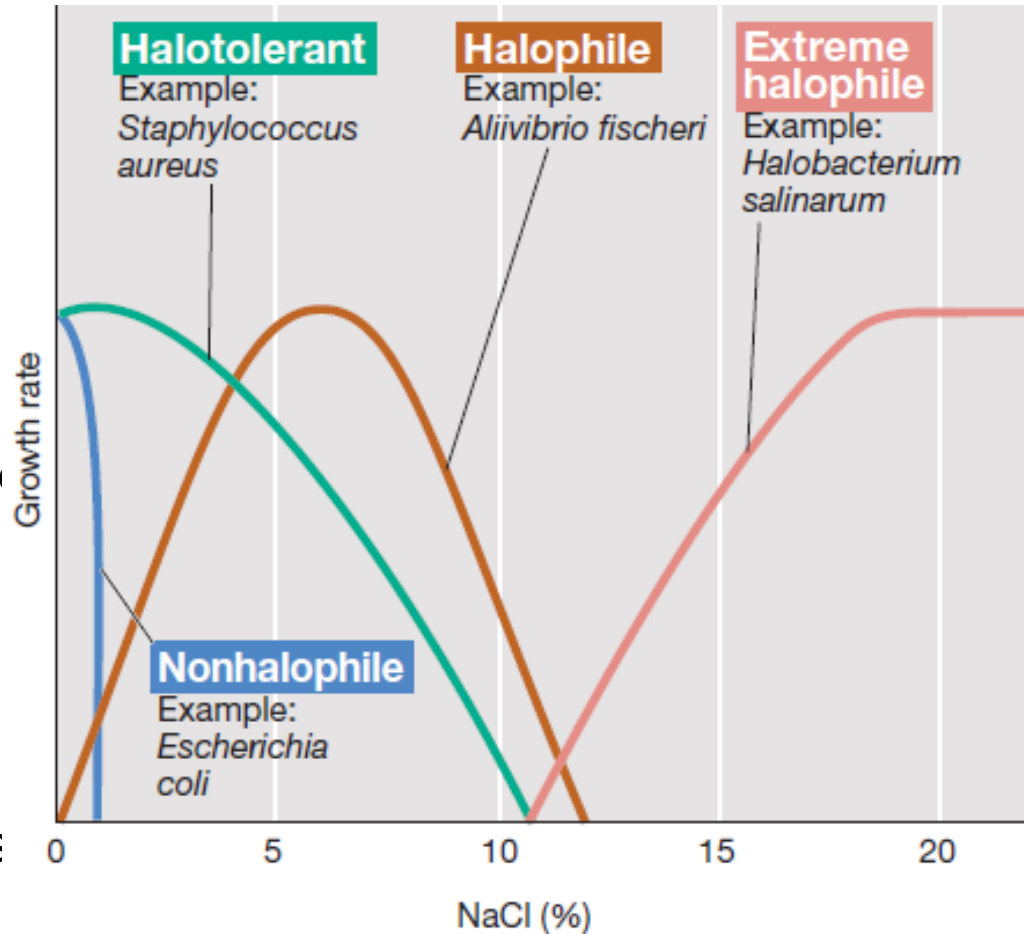


Pode causar morte celular-desidratação



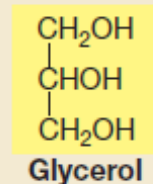
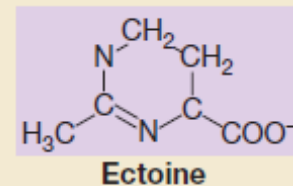
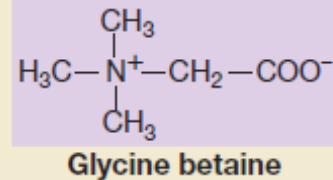
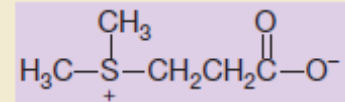
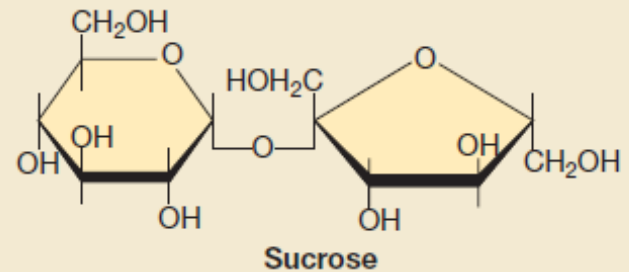
Efeito Osmótico

- **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



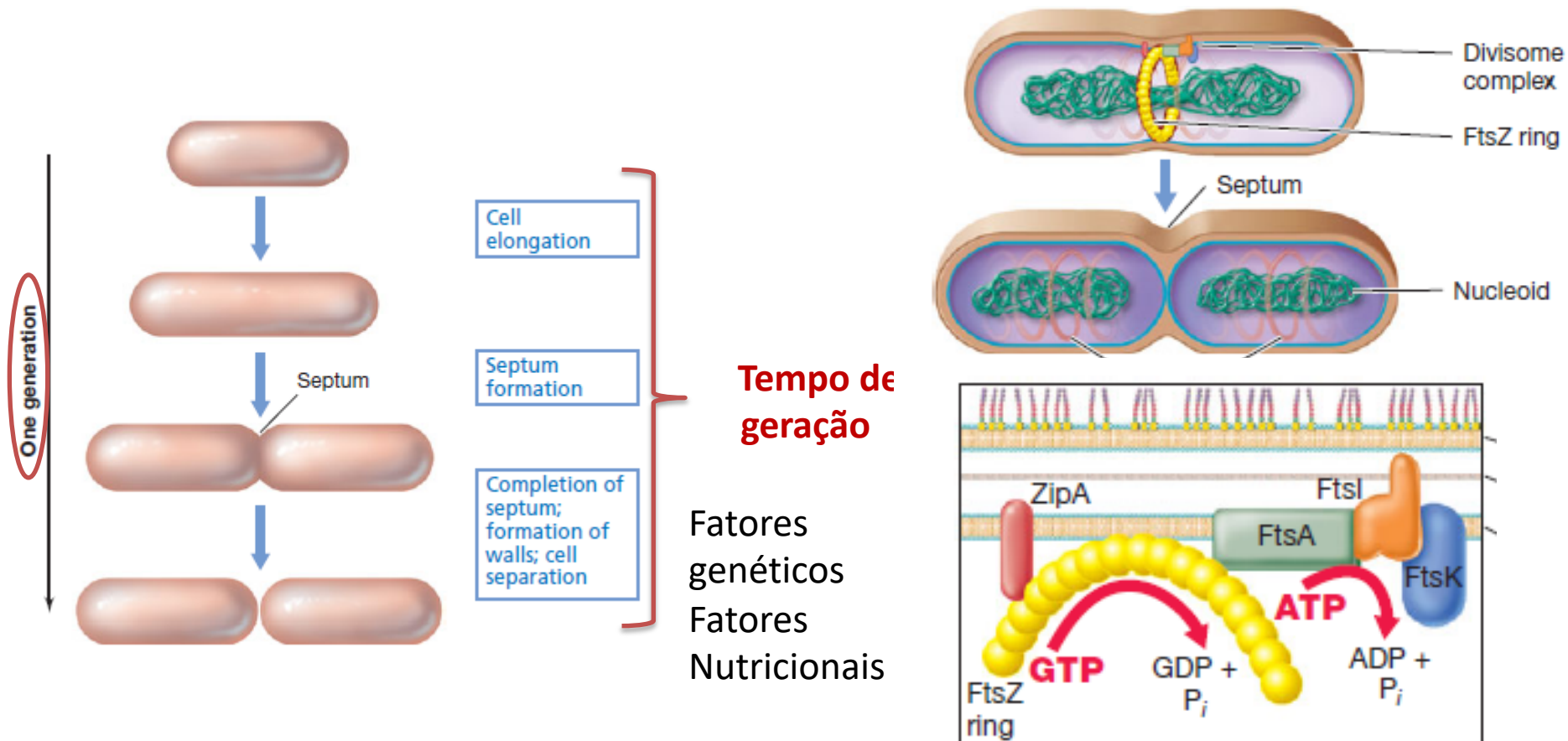
Bactérias não cultiváveis & Metagenômica

- 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.

Crescimento Microbiano

Crescimento Bacteriano e Duplicação Celular

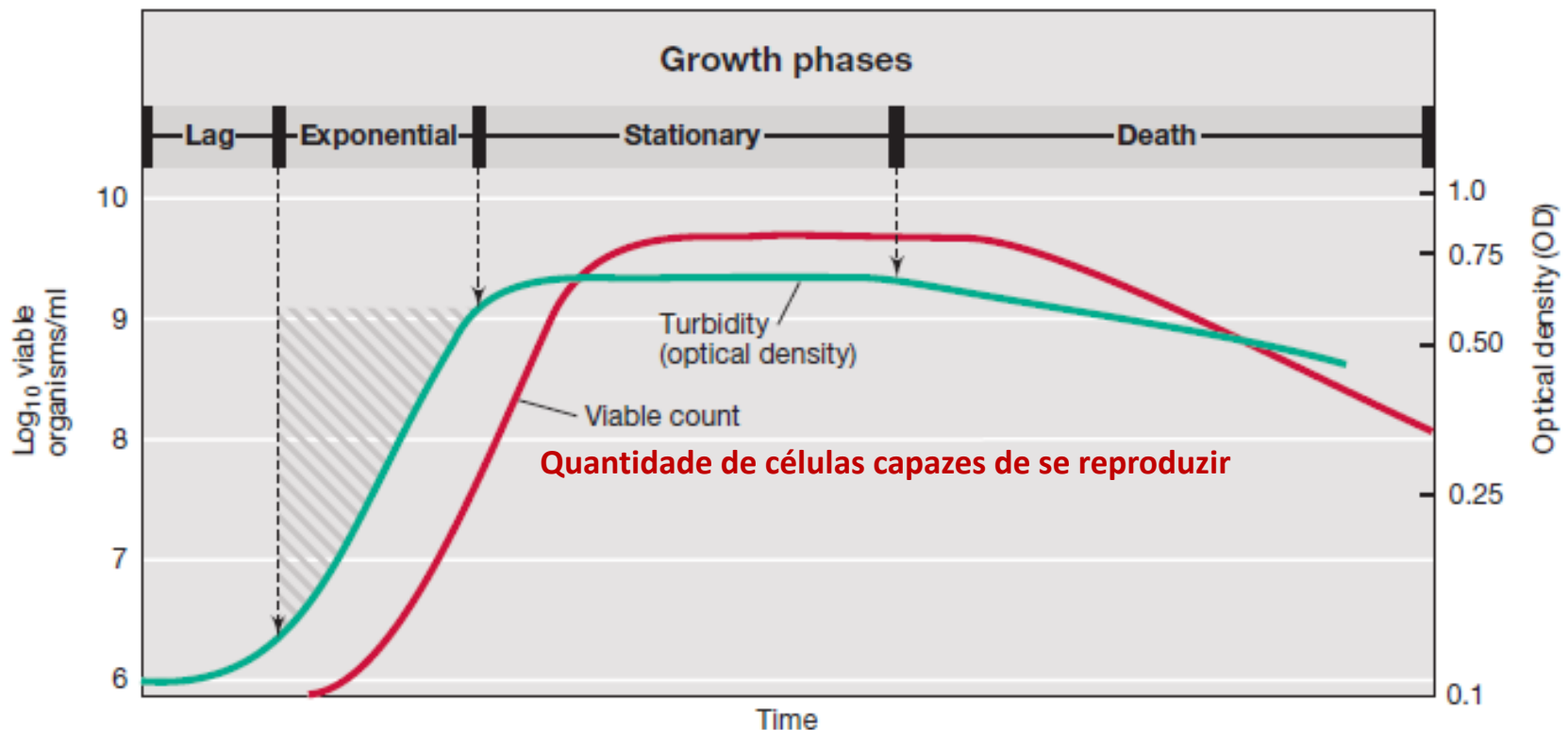
- O processo de divisão celular envolve um conjunto de proteínas conhecidas como Fts (*Filamentous temperature Sensitive*) (Todos os Procaríotos e *Archae*, organelas - mitocôndrias e cloroplastos).



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 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?

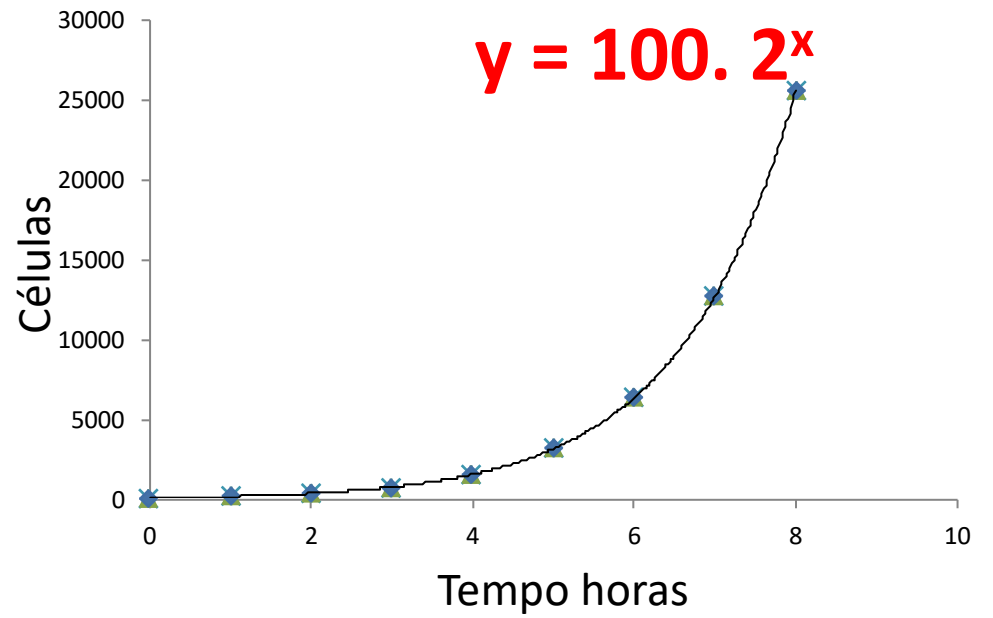
Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256 (2^8)
0.5	2	4.5	512 (2^9)
1	4	5	1,024 (2^{10})
1.5	8	5.5	2,048 (2^{11})
2	16	6	4,096 (2^{12})
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576 (2^{19})

Cada 30 min. tem mais 1 célula

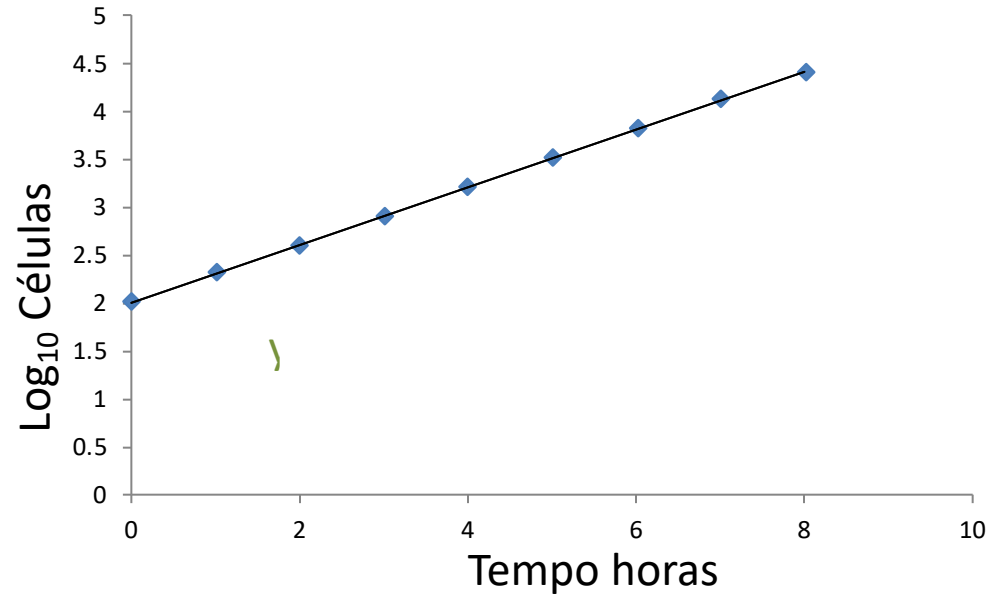
Cada 30 min. tem mais 2048 célula

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

G = 1H



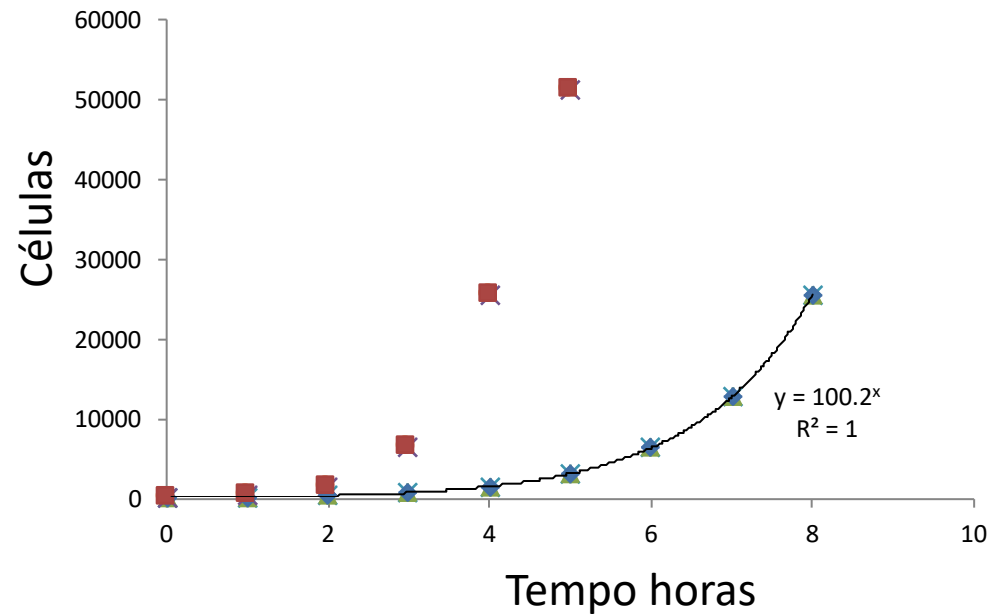
tempo	log(10)
0	2
1	2,301029996
2	2,602059991
3	2,903089987
4	3,204119983
5	3,505149978
6	3,806179974
7	4,10720997
8	4,408239965



Tempo numero 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



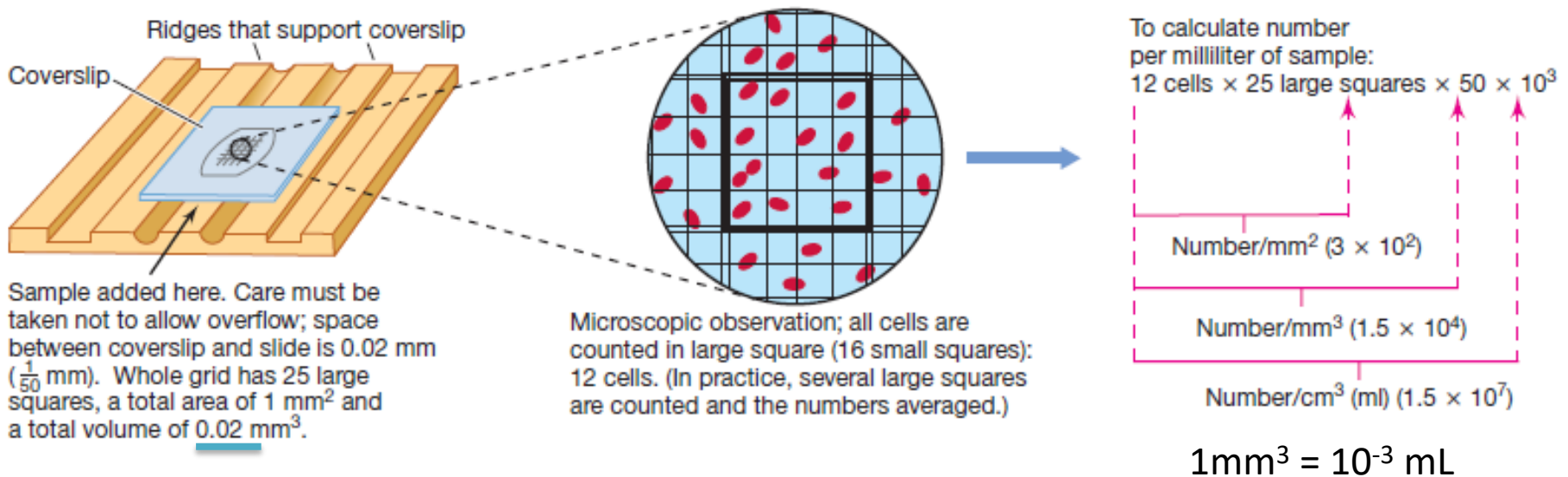
$$N_{\text{total}} = N_{\text{inicial}} \cdot 2^{(\text{tempo total}/\text{tempo de geração})}$$

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



Métodos de contagem de células viáveis/ ou Contagem em Placa

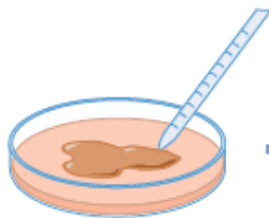
- Contagem de células viáveis (contagem em placa) conta o número de células capazes de se dividir.

1 - Semeadura por espalhamento – colônias

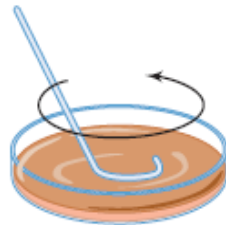
2 - Semeadura em profundidade – colônias na superfície e subsuperfície. Pode usar maior quantidade de células

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

Spread-plate method

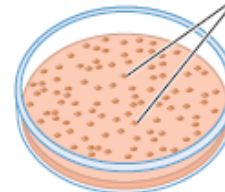


Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)



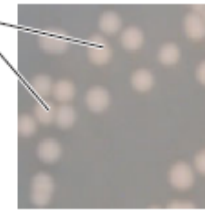
Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader

Incubation



Typical spread-plate results

Surface colonies

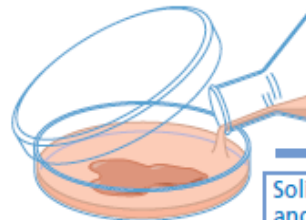


Deborah C. Jung

Pour-plate method

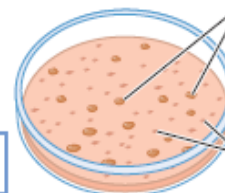


Sample is pipetted into sterile plate



Sterile medium is added and mixed well with inoculum

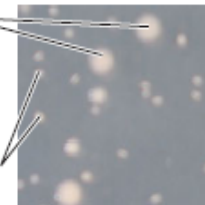
Solidification and incubation



Typical pour-plate results

Surface colonies

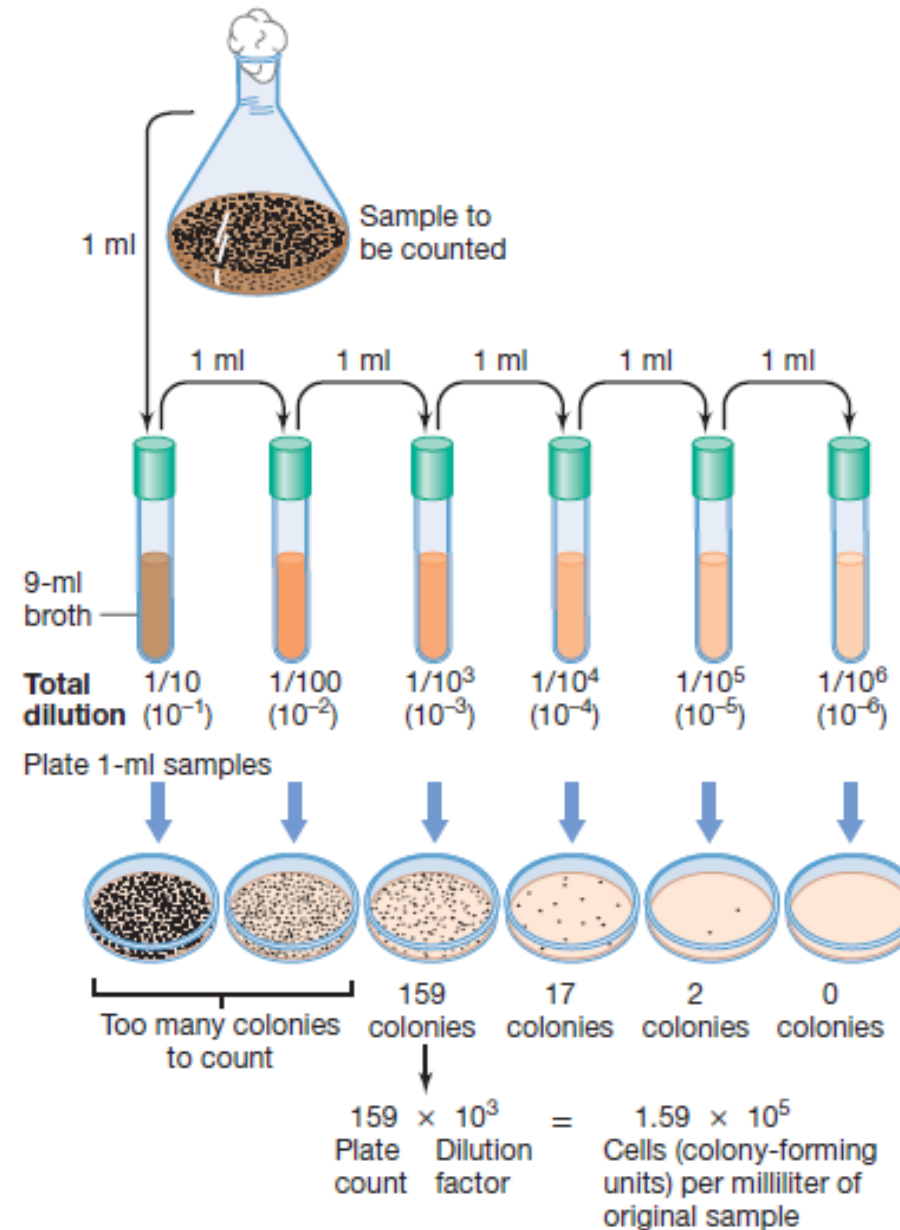
Subsurface colonies



Deborah C. Jung

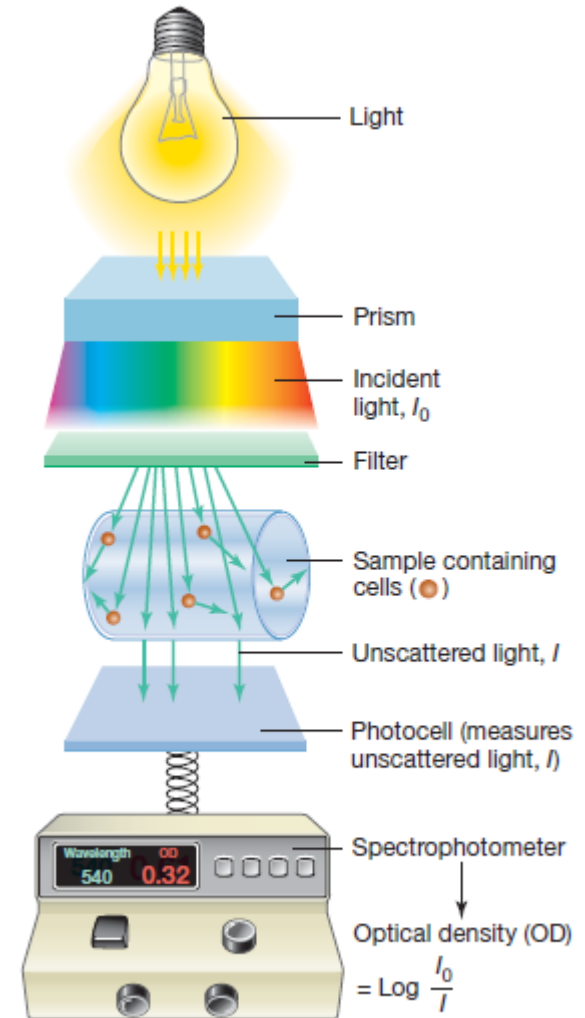
Diluição antes do Plaqueamento

- 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



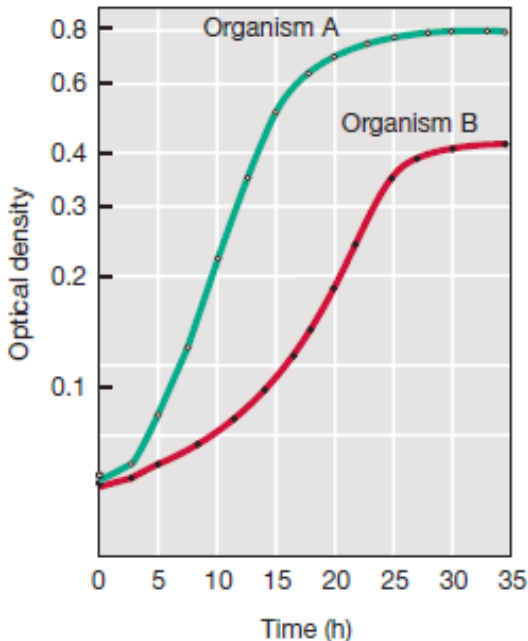
D.O – medida de turbidez

- 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

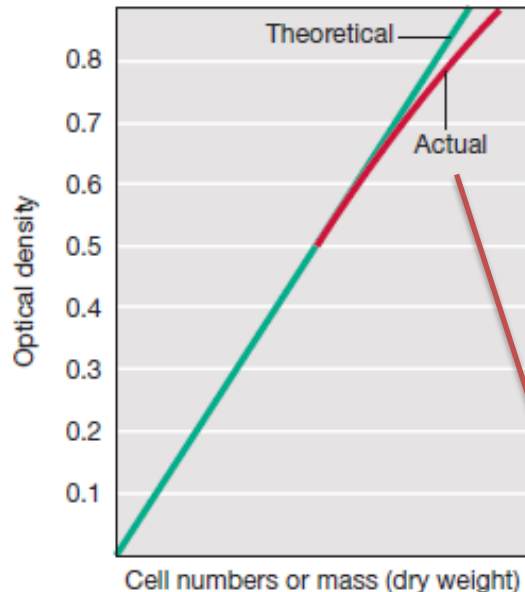


(b)

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

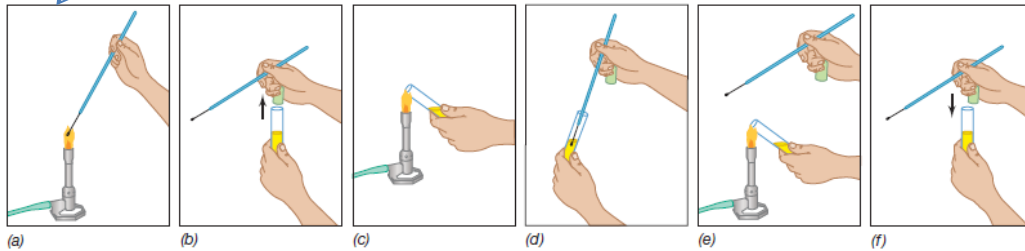


D.O é subestimada em quantidade de células elevadas

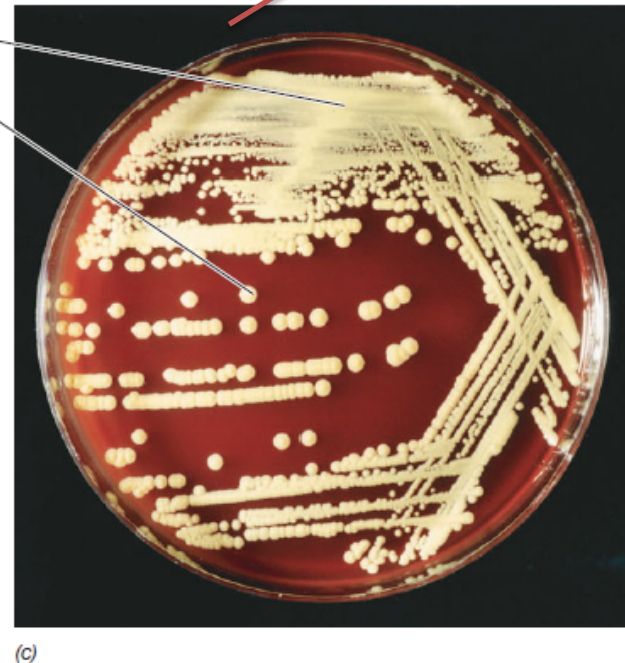
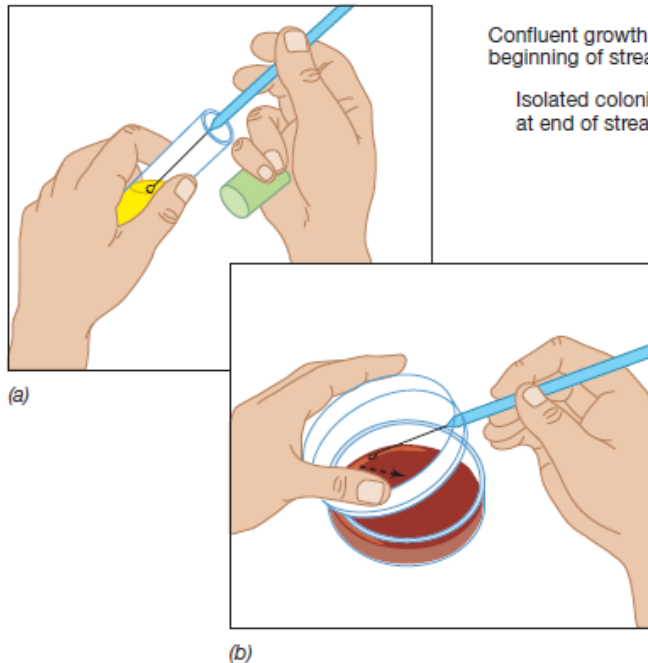
Muitas células – a luz dispersa por uma célula pode ser dispersada por outra, dando a impressão de que não teve dispersão

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



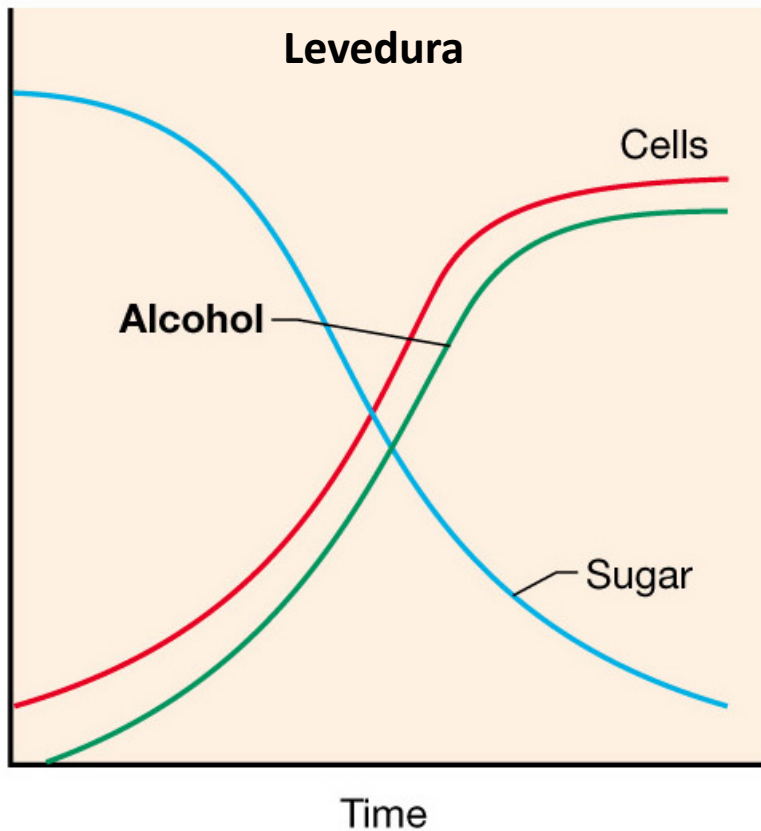
James A. Shapiro, University of Chicago

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

Metabólitos Primário e Secundário

Crescimento Primário

Metabólico constantemente sintetizado

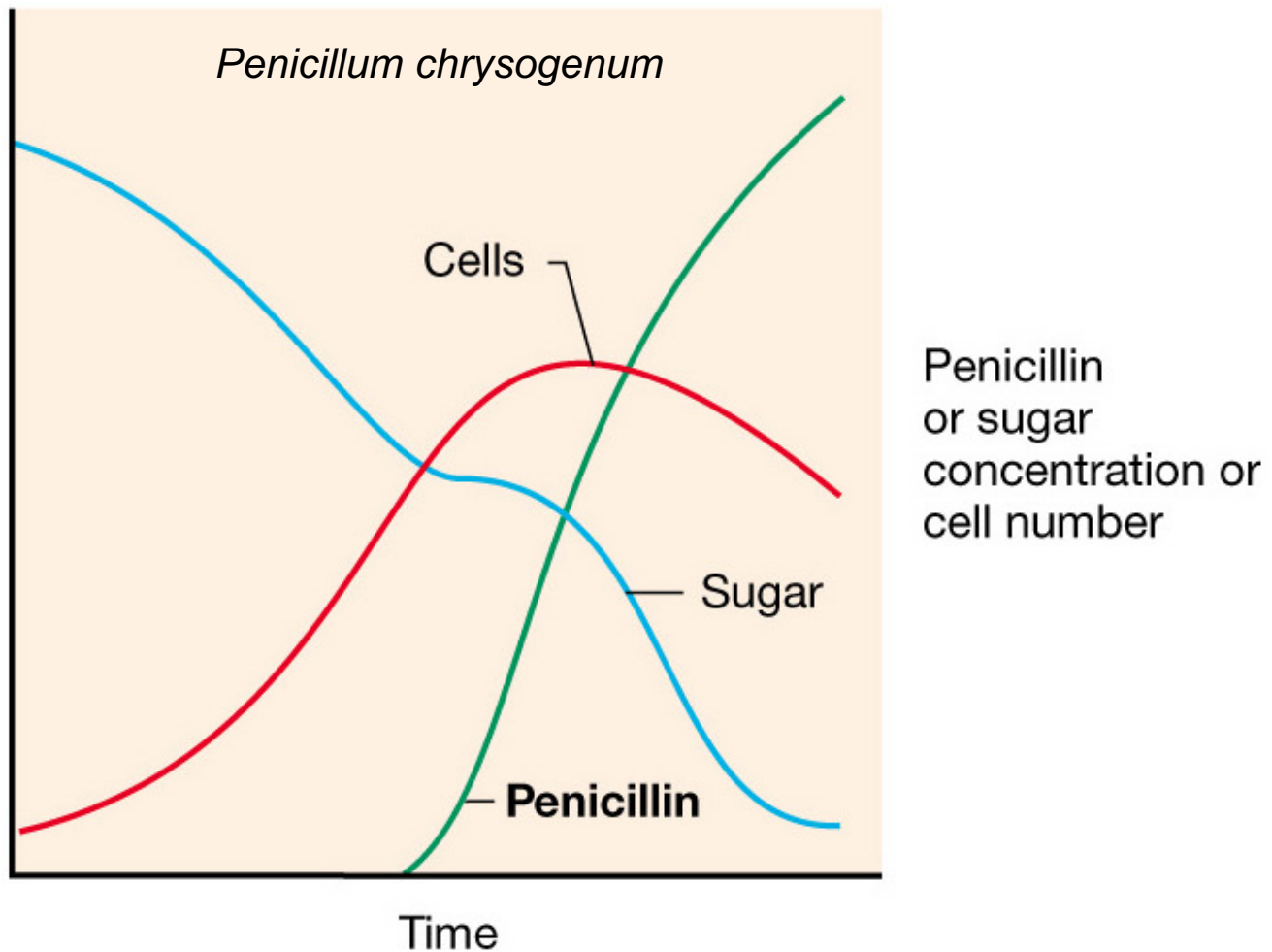


- Geralmente não são produzidos em grandes quantidades
- Faz parte do metabolismo

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?