

Crescimento microbiano



Biologia IV

Profa. Ilana Camargo

Crescimento microbiano

Os produtos da divisão celular são iguais:



Fissão binária: bactérias convencionais

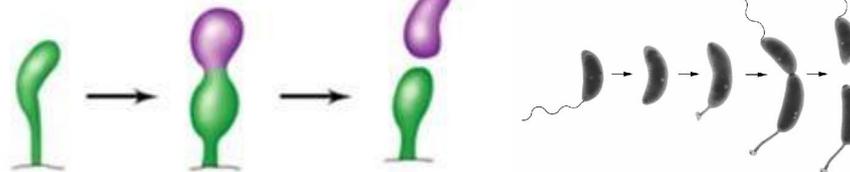
Os produtos da divisão celular são desiguais:



Brotamento simples: *Pirella*, *Blastobacter*



Brotamento a partir de hifas: *Hyphomicrobium*,
Rhodomicrobium, *Pedomicrobium*



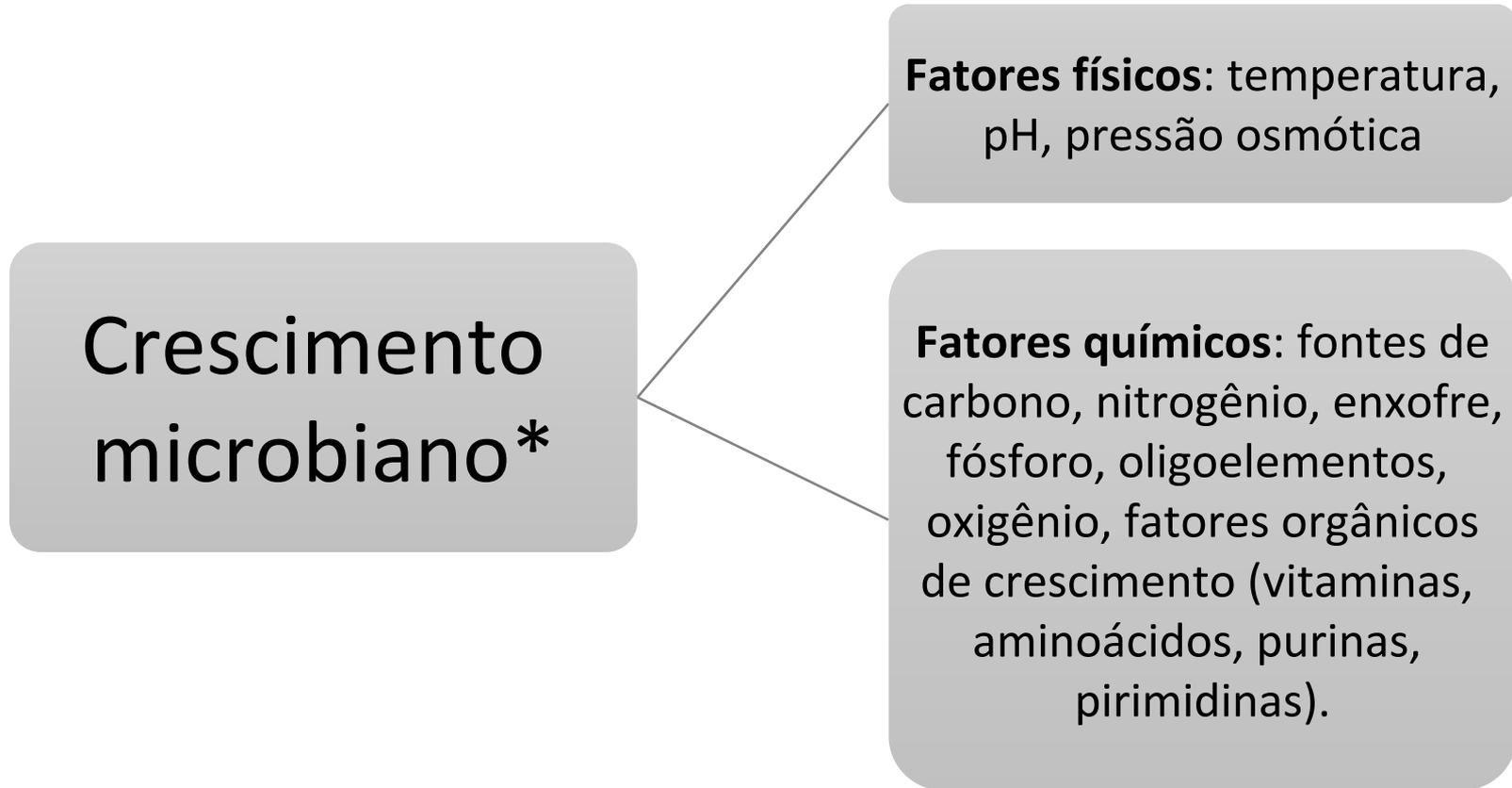
Divisão celular de um organismo pedunculado: *Caulobacter*

Células natatórias (expansivas)

Pedúnculo

Crescimento polar sem diferenciação do tamanho celular:
Rhodopseudomonas, *Nitrobacter*, *Methylosinus*

Fatores necessários para o crescimento

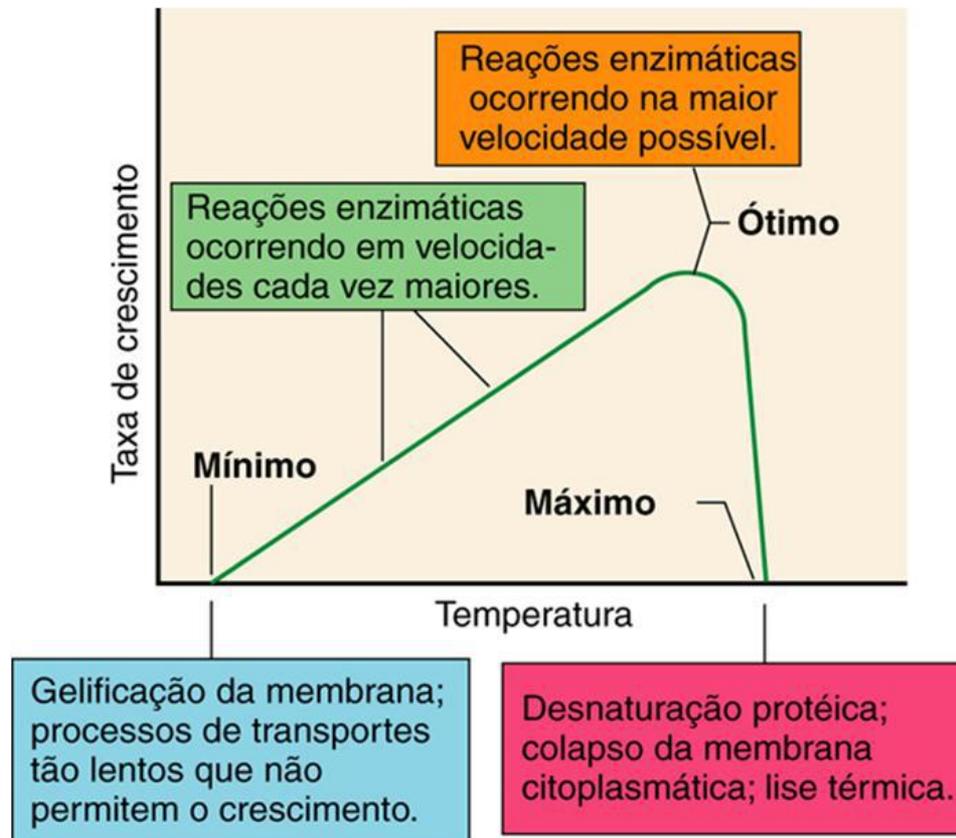


* **Crescimento microbiano:** em microbiologia, refere-se ao aumento no número de células.

Efeito da temperatura na taxa de crescimento

(Fonte: Madigan et al., 2004).

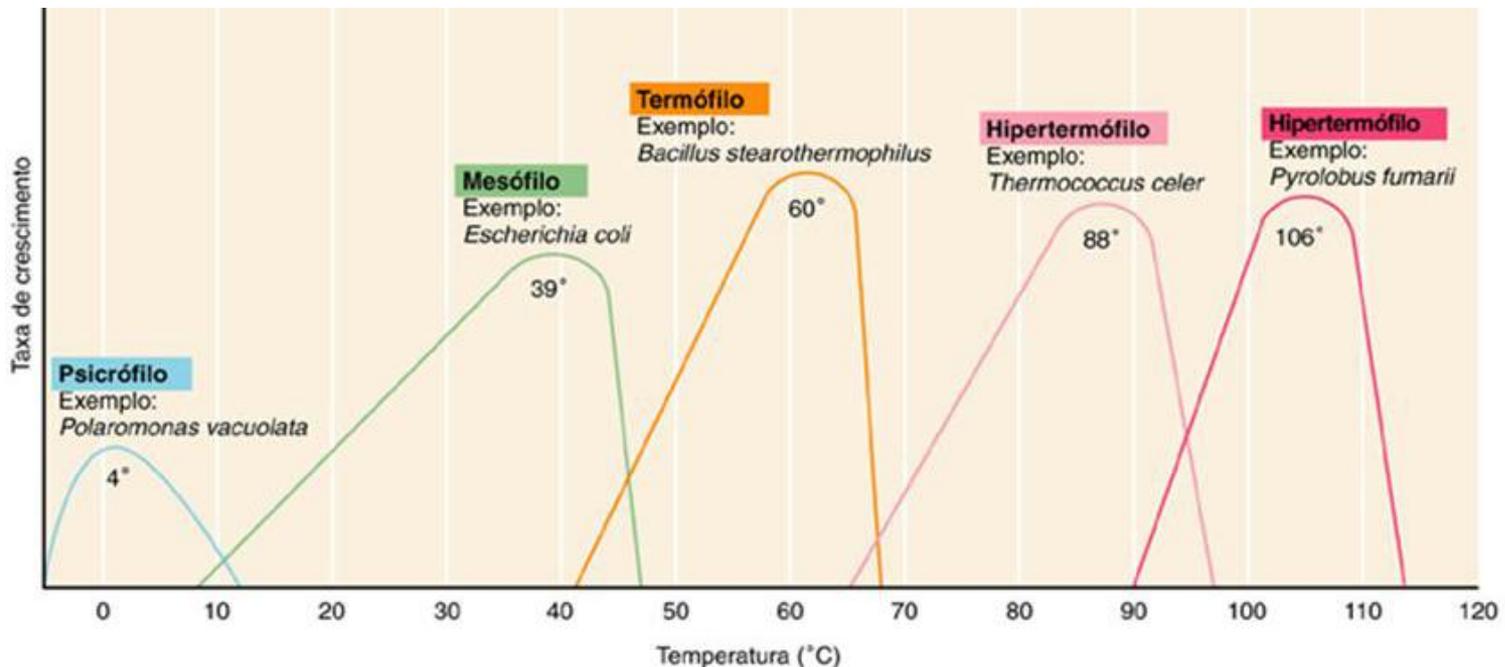
Taxa de crescimento = variação do número de células ou da massa celular por unidade de tempo



Temperaturas cardiais: mínima, ótima e máxima (variáveis nos diferentes microrganismos)

Temperatura

- Temperatura de crescimento pode ser **mínima**, **ótima** e **máxima**. Maioria cresce em um intervalo de 30°C entre mínima e máxima.
- **Psicrófilos**: profundezas de oceanos e regiões polares (algas clorofíceas e diatomáceas).
- **Mesófilos**: Temperatura ótima entre 25 e 40°C. Maioria das bactérias.
- **Termófilos**: Temperatura entre 45 e 80°C. Fontes termais, camadas superiores de solos que sofrem intensa radiação solar, esterco e silo em fermentação.
- **Hipertermófilos**: Temperatura ótima superior à 80°C. Fontes termais, como as do Parque Yellowstone. Principalmente membros de Archaea.

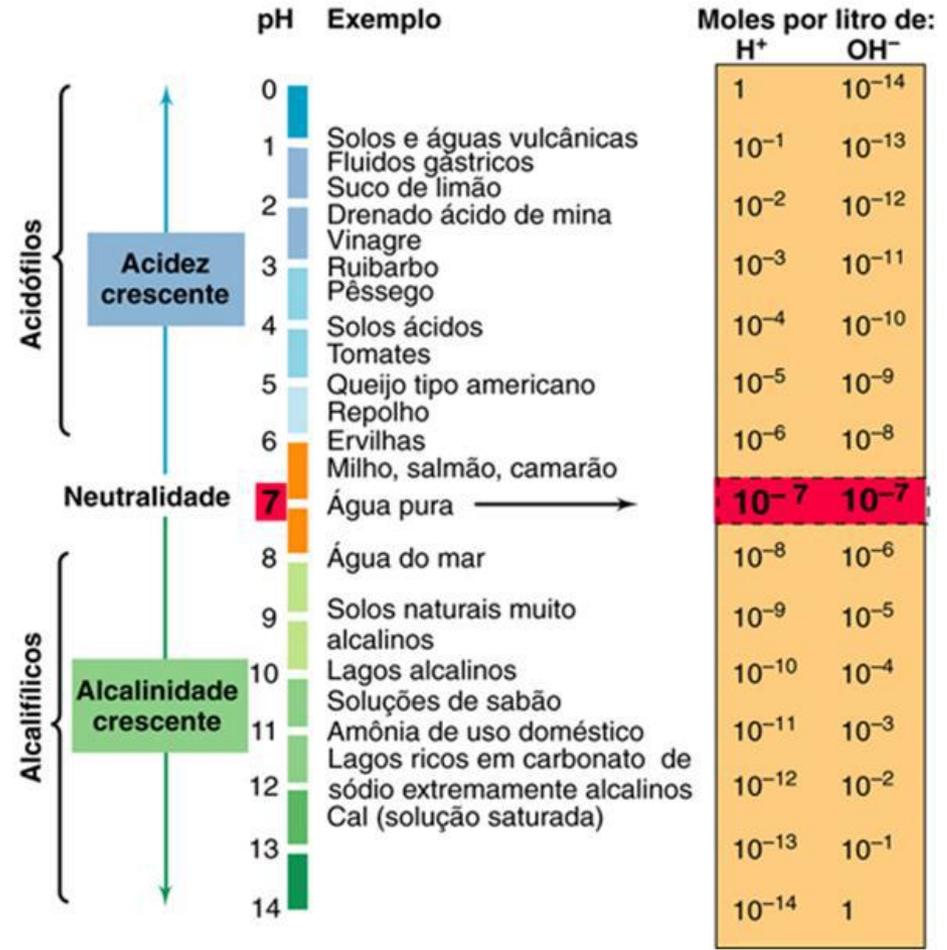


Relação da temperatura com as taxas de crescimento. As temperaturas ótimas de cada organismo estão indicadas. (Fonte: Madigan et al., 2004).

pH

pH ótimo de crescimento refere-se ao **pH do meio externo**; o **pH intracelular** deve permanecer próximo à **neutralidade**.

- Maior parte das bactérias cresce entre pH 6,5 e 7,5.
- **Acidófilos**: muitos fungos (pH ótimo em torno de 5 ou inferior), vários gêneros de Archaea.
- **Alcalifílicos**: muitas espécies de *Bacillus* e algumas arqueias (que também são halofílicas).
- Adição de sais de fosfato (KH_2PO_4) em meios de cultura funcionam como tampão para neutralizar, por exemplo, ácidos produzidos por bactérias em crescimento.



A escala de pH. (Fonte: Madigan et al., 2004).

Tabela 5.2 Relações dos microrganismos e pH

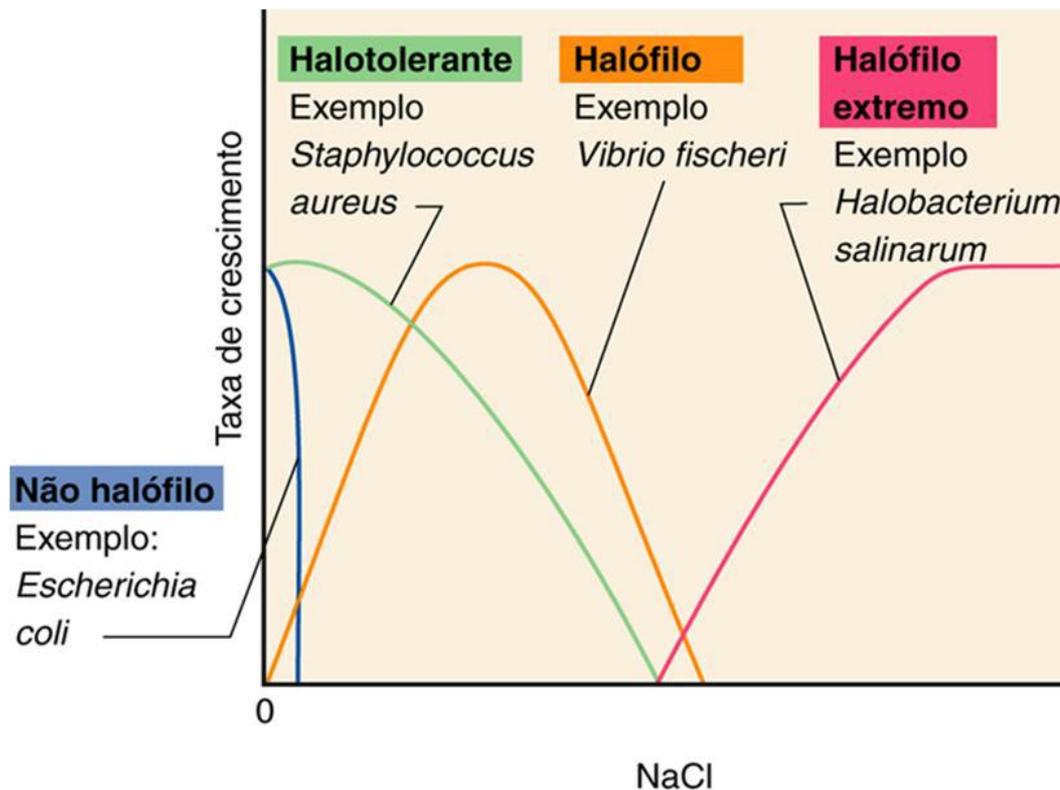
<i>Classe fisiológica (faixa ótima)</i>	<i>pH aproximado para crescimento ótimo</i>	<i>Exemplo de organismo^a</i>
Neutrófilos (pH > 5,5 e < 8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidófilos (pH < 5,5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alcalifílicos (pH ≥ 8)	8	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
	9	<i>Bacillus firmus</i>
	10	<i>Natronobacterium gregoryi</i>

^a*Picrophilus* e *Natronobacterium* são do domínio *Archaea*; todos os outros são do domínio *Bacteria*.

Pressão osmótica

Os microrganismos que tem necessidades específicas de NaCl para seu crescimento ótimo podem ser :

- **halófilos discretos:** [] baixas – 1 a 6%
- **halófilos moderados:** [] moderadas – 6 a 15%
- **halófilos extremos:** [] altas – 15 a 30%



Efeito da concentração do íon sódio no crescimento de microrganismos com diferentes tolerâncias ou necessidades de sal.

(Madigan et al., 2004).

Relações dos microrganismos com o oxigênio

Aeróbios

Aeróbios estritos ou obrigatórios

Microaerófilos

Aeróbios facultativos

Anaeróbios

Obrigatórios

Aerotolerantes

Relações dos microrganismos com o oxigênio

Microrganismos variam quanto suas necessidades ou tolerância ao oxigênio

- **Aeróbios** – microrganismos capazes de utilizar o Oxigênio molecular, O_2 . (Ar contém 21% de O_2)

-Produzem mais energia a partir do uso de nutrientes.

- **Aeróbios estritos ou obrigatórios**: São os microrganismos que necessitam de O_2 para sua sobrevivência.

Relações dos microrganismos com o oxigênio

- Microaerófilos

Aeróbios necessitando de O_2 , *mas em concentrações menores do que a encontrada no ar.*

São sensíveis aos radicais superóxidos ou peróxidos, produzidos em concentrações letais quando em condições de altas concentrações de oxigênio.

Relações dos microrganismos com o oxigênio

- Aeróbios facultativos

Podem utilizar o O_2 quando disponível, mas na sua ausência, são capazes de continuar seu crescimento através da **respiração anaeróbia ou da fermentação**.

A eficiência na produção de energia diminui quando o O_2 não está disponível.

Exemplo: *Escherichia coli*

Outras bactérias substituem o oxigênio, durante a **respiração anaeróbia**, por aceptores de elétrons como os íons nitrato.

Relações dos microrganismos com o oxigênio

Alguns microrganismos não são capazes de respirar oxigênio:



- Anaeróbios obrigatórios ou estritos

São microrganismos que não utilizam o O_2 para reações de produção de energia.

O_2 pode ser um produto danoso para muitos destes.

Exemplo: **Gênero *Clostridium* = tétano e botulismo**

Relações dos microrganismos com o oxigênio

- Anaeróbios aerotolerantes

Toleram a presença do oxigênio, mas não podem utilizá-lo para seu crescimento.

Fermentam carboidratos produzindo ácido lático.

O acúmulo deste ácido inibe o crescimento da microbiota competitiva aeróbia estabelecendo um nicho ecológico.

Exemplo: *Lactobacillus*

Podem tolerar o oxigênio devido a produção de SOD.

Tabela 5.5 Relações dos microrganismos com o oxigênio

Grupo	Relação com O₂	Tipo de metabolismo	Exemplo^a	Hábitat^b
Aeróbios				
Obrigatórios	Exigido	Respiração aeróbia	<i>Micrococcus luteus</i> (B)	Pele, poeira
Facultativos	Não exigido, mas com melhor crescimento em O ₂	Respiração aeróbia, respiração anaeróbia, fermentação	<i>Escherichia coli</i> (B)	Intestino grosso de mamíferos
Microaerófilos	Exigido, mas em níveis inferiores aos atmosféricos	Respiração aeróbia	<i>Spirillum volutans</i> (B)	Água de lagos
Anaeróbios				
Aerotolerantes	Não exigido, sem melhor crescimento na presença de O ₂	Fermentação	<i>Streptococcus pyogenes</i> (B)	Trato superior
Obrigatórios	Nocivo ou letal	Fermentação ou respiração anaeróbia	<i>Methanobacterium formicicum</i> (A)	Lodo de esgoto, sedimentos de lagos anóxicos

^aAs letras entre parênteses indicam o *status* filogenético (B, *Bacteria*; A, *Archaea*). São conhecidos representantes de cada domínio de procariotos em todas as categorias. A maioria dos eucariotos é aeróbia obrigatória, embora sejam conhecidos aeróbios facultativos (p. ex., leveduras) e anaeróbios obrigatórios (p. ex., certos protozoários e fungos).

^bSão listados os habitats típicos de cada exemplo de organismo; muitos outros poderiam ser listados.

Nutrientes

Macronutrientes

Micronutrientes

Macronutrientes → necessários em grandes quantidades

- **Carbono** – elemento principal de todas as macromoléculas biológicas:
 - corresponde a 50% do peso seco da célula bacteriana típica.
 - fontes orgânicas de C – proteínas, carboidratos e lipídeos
 - fonte inorgânica de C – CO_2
- **Nitrogênio** – importante constituinte de proteínas, ácidos nucleicos:
 - corresponde a 12-14% do peso seco da célula bacteriana típica.
 - encontrado na natureza principalmente na forma de compostos inorgânicos: amônia (NH_3), nitrato (NO_3^-) ou N_2 .
 - fontes orgânicas: aminoácidos, bases nitrogenadas.
- **Fósforo e Enxofre** – juntos, correspondem a 4% do peso seco da célula bacteriana típica:
 - **Fósforo** necessário para a síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídeos. Forma usual encontrada na natureza – íon fosfato PO_4^{3-} .
 - **Enxofre** – constituinte dos aa cisteína e metionina e também de vitaminas (tiamina, biotina). Maior parte do enxofre utilizado nos processos celulares vem de fontes inorgânicas: íon sulfato (SO_4^{2-}) e sulfeto (HS^-).

Macronutrientes

Tabela 5.1

Macronutrientes encontrados na natureza e em meios de cultura

Elemento	Forma usual do nutriente, encontrada na natureza	Forma química, fornecida nos meios de cultura
Carbono (C)	CO ₂ , compostos orgânicos	Glicose, malato, acetato, piruvato, aminoácidos, centenas de outros compostos ou misturas complexas (extrato de levedura, peptona e assim por diante)
Hidrogênio (H)	H ₂ O, compostos orgânicos	H ₂ O, compostos orgânicos
Oxigênio (O)	H ₂ O, O ₂ , compostos orgânicos	H ₂ O, O ₂ , compostos orgânicos
Nitrogênio (N)	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , compostos orgânicos nitrogenados	<i>Inorgânica</i> : NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ <i>Orgânica</i> : aminoácidos, bases nitrogenadas dos nucleotídeos, muitos outros compostos orgânicos que contêm N
Fósforo (P)	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Enxofre (S)	H ₂ S, SO ₄ ²⁻ , compostos orgânicos sulfurados, sulfetos metálicos (FeS, CuS, ZnS, NiS etc.)	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, cisteína, outros compostos orgânicos sulfurados
Potássio (K)	K ⁺ em solução ou em vários sais de K	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnésio (Mg)	Mg ²⁺ em solução ou em vários sais de Mg	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sódio (Na)	Na ⁺ em solução, como NaCl, ou outros sais de Na	NaCl
Cálcio (Ca)	Ca ²⁺ em solução, como CaSO ₄ , ou outros sais de Ca	CaCl ₂
Ferro (Fe)	Fe ²⁺ ou Fe ³⁺ em solução, como FeS, Fe(OH) ₃ , ou muitos outros sais de Fe	FeCl ₃ , FeSO ₄ , várias soluções com ferro quelado (Fe ³⁺ EDTA, citrato de Fe ³⁺ e assim por diante)

Madigan et al., 2004.

Micronutrientes (elementos-traço)

Tabela 5.2

Micronutrientes (elementos traços) necessários aos seres vivos^a

Elemento	Função celular
Cromo (Cr)	Requerido por mamíferos no metabolismo da glicose; microrganismos não o necessitam
Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ ; transcarboxilase (bactérias que metabolizam ácido propiônico)
Cobre (Cu)	Respiração; citocromo <i>c</i> oxidase; fotossíntese; plastocianina e algumas superóxido dismutases
Manganês (Mn)	Ativador de muitas enzimas; presente em certas superóxido dismutases e na enzima que cliva a água, em fototróficos oxigênicos (Fotossistema II)
Molibdênio (Mo)	Certas enzimas contendo flavina; nitrogenase, nitrato redutase, sulfito oxidase, DMSO-TMAO redutases e algumas formato desidrogenases
Níquel (Ni)	Maioria das hidrogenases; coenzima F ₄₃₀ de metanogênicos; monóxido de carbono desidrogenase; urease
Selênio (Se)	Formato desidrogenase; algumas hidrogenases; no aminoácido selenocisteína
Tungstênio (W)	Algumas formato desidrogenases; oxotransferases de hipertermófilos
Vanádio (V)	Vanádio nitrogenase; bromoperoxidase
Zinco (Zn)	Anidrase carbônica; álcool desidrogenase; RNA e DNA polimerases e muitas proteínas de ligação ao DNA
Ferro (Fe) ^b	Citocromos; catalases; peroxidases; proteínas contendo ferro e enxofre; oxigenases; todas as nitrogenases

a Nem todos os micronutrientes listados são requeridos por todas as células; alguns dos metais listados são encontrados em enzimas de apenas alguns microrganismos específicos.

b Necessário em maiores quantidades que os outros metais traços.

Madigan et al., 2004.

Fatores orgânicos de crescimento

Algumas bactérias necessitam de fontes extracelulares de vitaminas, que atuam como coenzimas. Ex. bactérias lácticas (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*)

Tabela 5.3

Fatores de crescimento: vitaminas e suas funções

Vitamina	Função
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	Precursor do ácido fólico
Ácido fólico	Metabolismo de um carbono; transferência de grupos metil
Biotina	Biossíntese de ácidos graxos; β -descarboxilações; algumas reações de fixação do CO ₂
Cobalamina (B ₁₂)	Redução e transferência de fragmentos contendo um carbono; síntese de desoxirribose
Ácido lipóico	Transferência de grupos acil na descarboxilação do piruvato e do α -cetoglutarato
Ácido nicotínico (niacina)	Precursor de NAD ⁺ (ver Figura 5.10); transferência de elétrons nas reações de oxidação-redução
Ácido pantotênico	Precursor da coenzima A; ativação do acetil e de outros derivados de acil
Riboflavina	Precursor de FMN (ver Figura 5.15), FAD em flavoproteínas envolvidas no transporte de elétrons
Tiamina (B ₁)	α -descarboxilações; transcetolase
Vitaminas B ₆ (grupo piridoxal-piridoxamina)	Transformações de aminoácidos e cetoácidos
Grupo da vitamina K: quinonas	Transporte de elétrons; síntese de esfingolípídeos
Hidroxamatos	Compostos que se ligam ao ferro; solubilização e transporte de ferro para o interior da célula

Microrganismos em meio de cultura

Meio de cultura satisfatório

Crescimento e multiplicação

Síntese de seus próprios monômeros

Deverá conter:

Fonte de carbono

Nitrogênio

Sais inorgânicos

Em certos casos:

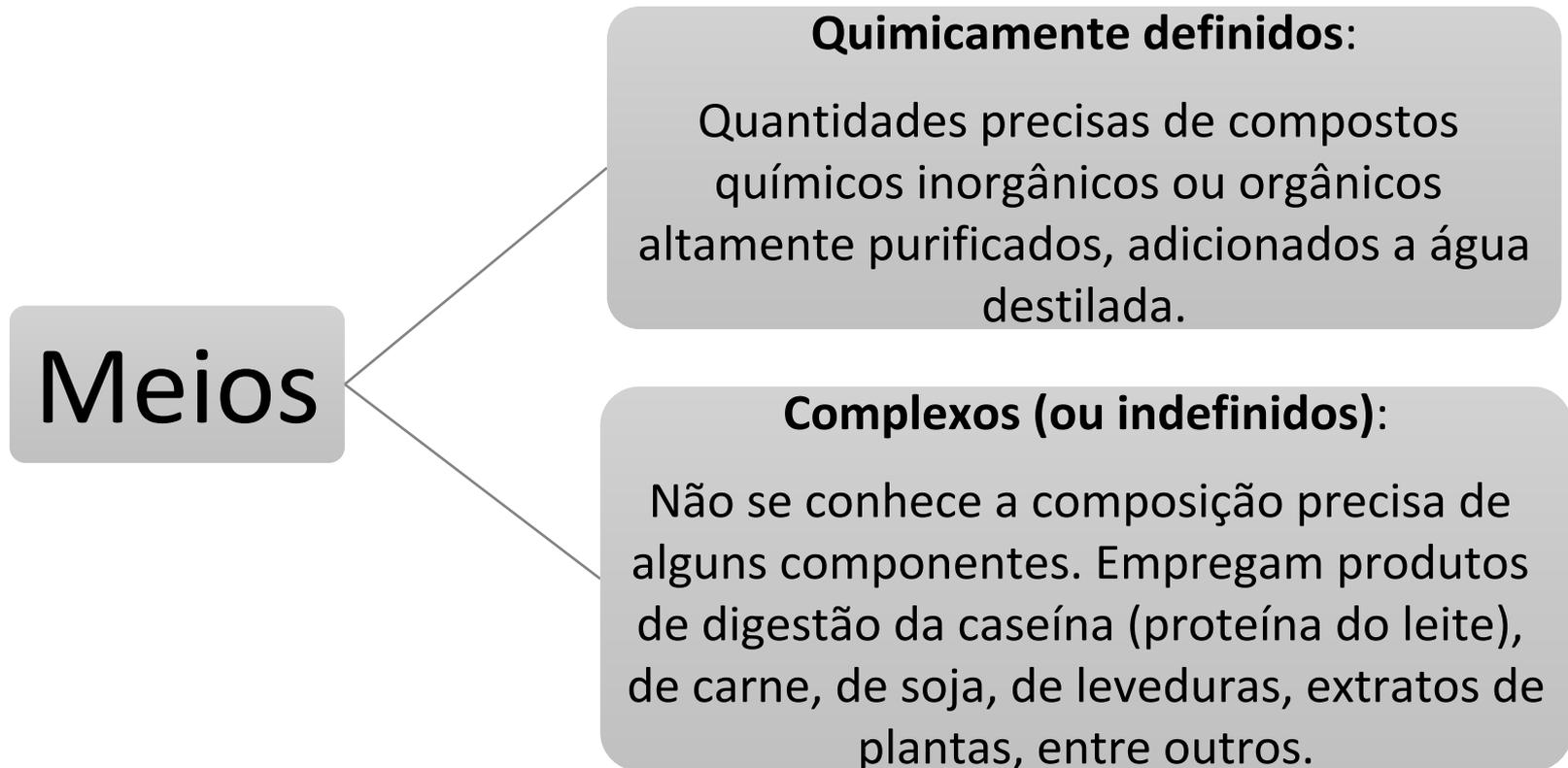
Vitaminas (tiamina, biotina, cobalamina...)

Outros fatores de crescimento

(Aminoácidos, purinas, pirimidinas)

Meios de Cultura

- **Soluções nutrientes utilizadas para promover o crescimento de microrganismos em laboratório.**
- **Inóculo:** microrganismos que são colocados em um meio de cultura para iniciar o crescimento.
- **Cultura:** microrganismos que crescem e se multiplicam nos meios de cultura.



Ágar: polissacarídeo complexo solidificante obtido de algas marinhas.

- ❖ Poucos microrganismos degradam o ágar.
- ❖ Temperatura de fusão inferior à temperatura da água.
- ❖ Permanece líquido até 40°C.
- ❖ Na técnica de *Pour plate* o ágar é mantido a 50°C e é adicionado sobre o inóculo sem afetar, ou causar danos a bactéria.
- ❖ Dependendo de sua concentração os meios podem ser classificados quanto a consistência:
 - Líquido – menos de 1g de ágar por litro de água
 - Semi-sólido – 4 g/L
 - Sólido – 15 a 18 g/L

Classificação quanto à função:

-Seletivo

-Diferencial

-Enriquecedor

-Transporte

Meios Seletivos

Favorece o crescimento da bactéria de interesse impedindo o crescimento de outras bactérias.

Inibidores: substâncias capazes de inibir algumas bactérias que não são de interesse.

1) **Corantes:** verde brilhante, eosina, cristal violeta...

2) **Metais pesados:** Bismuto;

3) **Substâncias químicas:** azida, citrato, desoxicolato, selenito e álcool feniletílico...

4) **Agentes antimicrobianos:** vancomicina, cloranfenicol

5) **Meio hipertônico:** alta concentração de sal (7,5%)

Meio Diferencial

Utilizado para fácil detecção da colônia da bactéria de interesse quando existem outras bactérias crescendo na mesma placa do meio

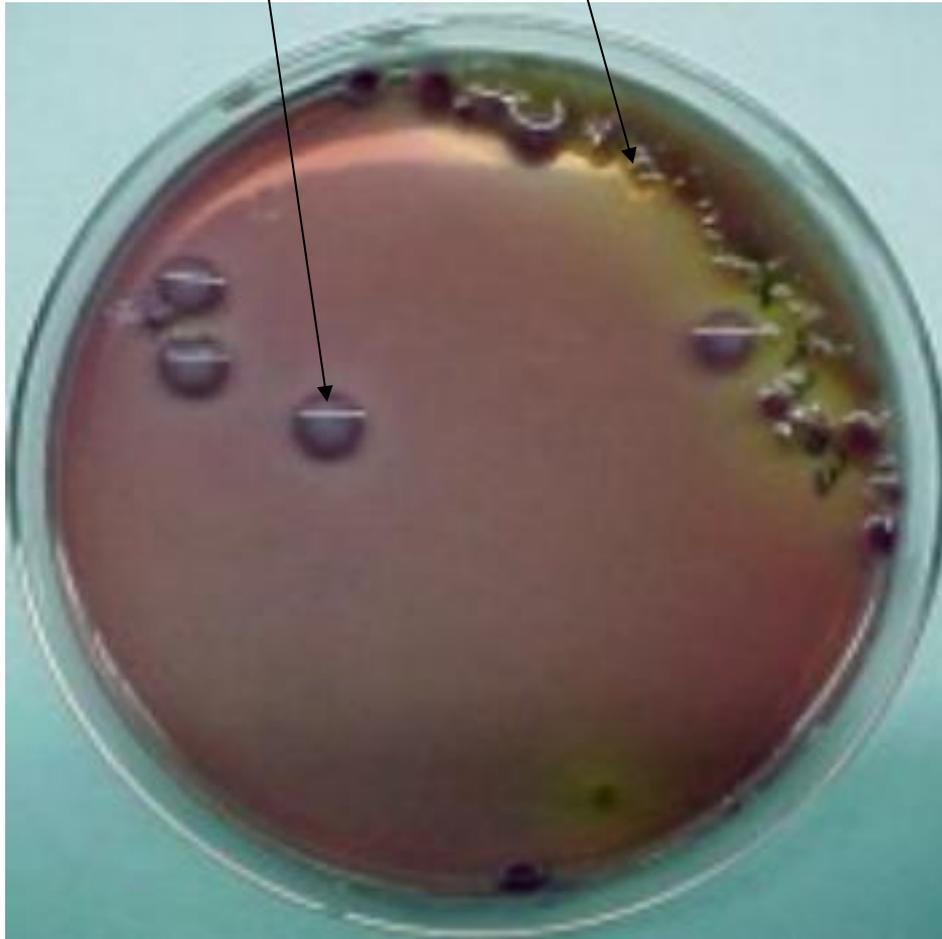
Substâncias utilizadas como indicadores de atividade enzimáticas que auxiliam na identificação

-Indicadores de pH: fucsina, azul de metileno, vermelho neutro, vermelho de fenol e púrpura de bromocresol. Medem as variações de pH que resultam do metabolismo bacteriano de certos substratos.

- Indicadores diversos: detectam produtos bacterianos específicos. Ex.: íons ferro e ferroso para a detecção de sulfato de hidrogênio

Lactose +

Lactose -



MacConkey

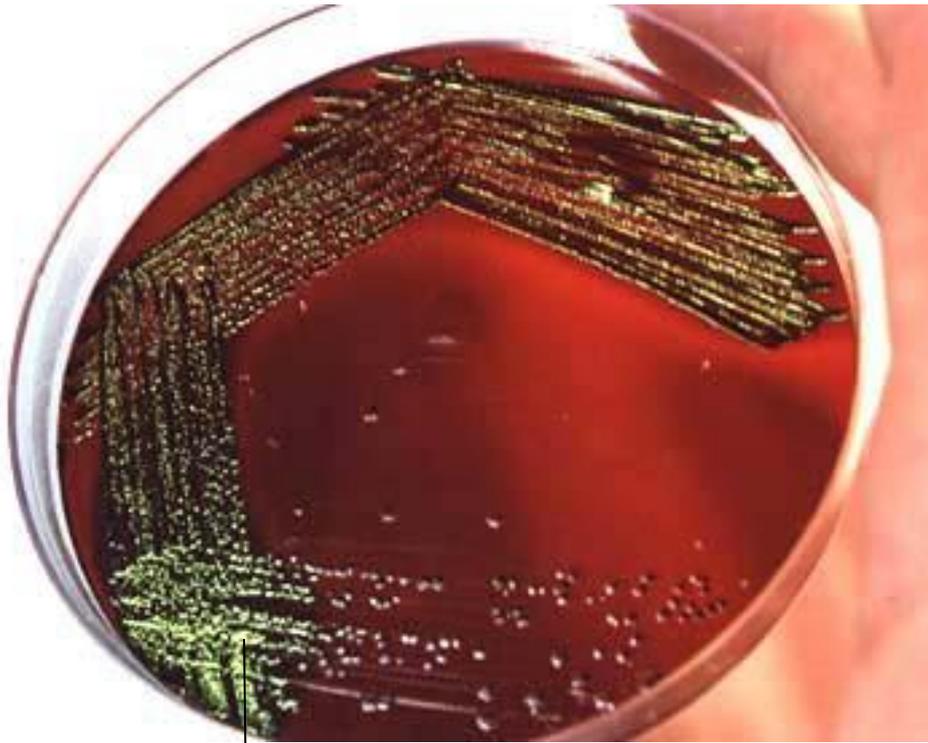
Cultura mista!!!!!!

**Seletivo para enterobactérias
(Gram-negativo) a partir de
fezes, urina, alimentos, água...**

**E.M.B.
(Eosina Azul de metileno)**

**Para isolamento de
Enterobactérias
(Gram-negativo)**

**Corantes inibem
Gram-positivo**



↓
**Brilho verde metálico
Escherichia coli???**

Bactérias produtoras de ácidos fortes formam brilho verde metálico causado pela precipitação do corante nas colônias:
SUGESTIVO de *E. coli*!!!

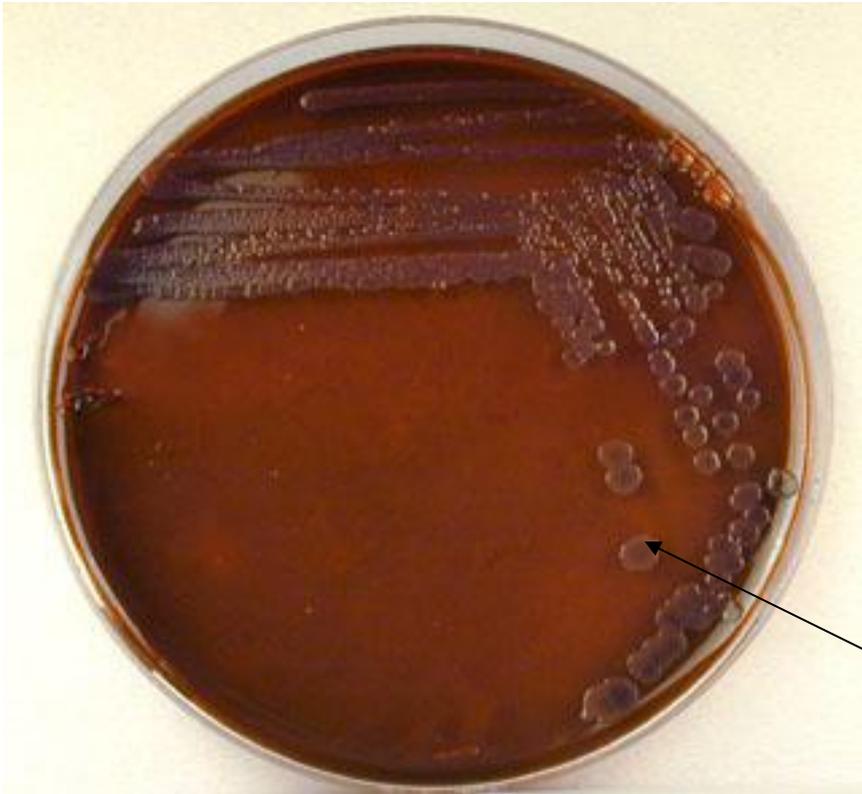
Meio seletivo e diferencial

**E.M.B.
(Eosina Azul de metileno)**

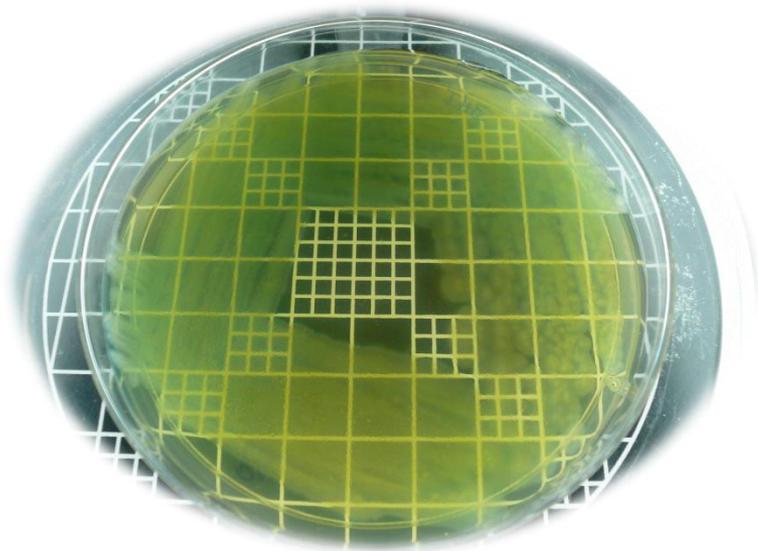
**Para isolamento de
Enterobactérias
(Gram-negativo)**

**Corantes inibem
Gram-positivo**

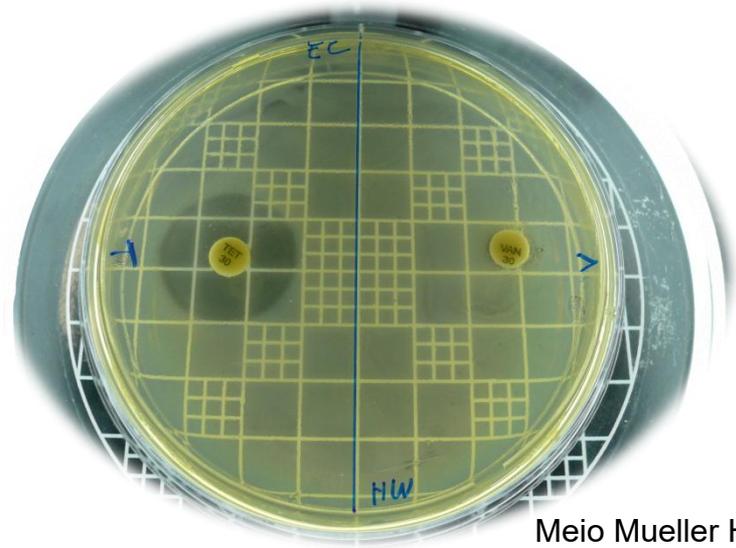
**Colônias pardo rósea
Produtora de ácido fraco
*Ex: Enterobacter sp***



Meio seletivo e diferencial



Pseudomonas aeruginosa
Pigmento **verde** natural



Meio Mueller Hinton



Escherichia coli

Brilho **verde metálico**
somente no meio
EMB!



Serratia marcescens
Pigmento **vermelho** natural!!

Meio EMB

Meios de Cultura

Meios

```
graph LR; Meios[Meios] --- Seletivo[Seletivo]; Meios --- Diferencial[Diferencial]; Meios --- Enriquecimento[de Enriquecimento];
```

Seletivo:

Favorece o crescimento do microrganismo de interesse e impede o crescimento de outros.

Ex.: Ágar sulfeto de bismuto para isolamento de *Salmonella typhi* a partir das fezes.

Diferencial:

Permite a fácil identificação da colônia da bactéria de interesse, dentre as colônias de outras bactérias crescidas no meio.

Ex.: Meio ágar sangue para detectar a presença de *Streptococcus pyogenes* (forma-se um halo claro em torno da colônia pela lise das hemáceas)

de Enriquecimento:

Semelhante ao seletivo, mas suplementado por nutrientes especiais, com a característica de aumentar o número da bactéria de interesse tornando-a detectável.

Rico X Enriquecimento

Rico: é o meio que é suplementado com sangue, soro, suplementos vitamínicos e extrato de levedura para isolar microrganismos exigentes.

Ex: ágar Mueller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro e ágar chocolate

Meio de enriquecimento: Incrementa o crescimento de certas espécies bacterianas ao mesmo tempo que inibe o desenvolvimento de microrganismos que não sejam de interesse.

Ex.: Caldo GN e Caldo selenito.

Controle do crescimento microbiano

Controle do crescimento microbiano

- ✓ Termos importantes
- ✓ Controle antimicrobiano por agentes físicos
- ✓ Controle antimicrobiano por agentes químicos
- ✓ Agentes antimicrobianos utilizados *in vivo*
- ✓ Resistência a antimicrobianos

Termos importantes

- **Esterilização:** destruição de todas as formas de vida microbiana (incluindo os endósporos e vírus).
- **Desinfecção*:** processo de eliminação das **formas vegetativas** de praticamente todos os microrganismo patogênicos de objetos ou superfícies inertes (não garante a eliminação de todos os microrganismos, nem endósporos).
 - quando em tecido vivo = **Anti-sepsia**
- **Desinfetante:** Agente antimicrobiano utilizado em objetos inanimados, mas pode ser prejudicial aos tecidos humanos.
- **Agente anti-séptico:** agente antimicrobiano, voltado para a destruição dos microrganismos patogênicos, suficientemente atóxico para ser aplicados em tecidos vivos.
- **Descontaminação:** tratamento que torna seguro o manuseio de um objeto ou superfície inanimada (= remoção dos microrganismos).

Termos importantes

- **Agentes bactericida, fungicida, viricida:** que matam bactérias, fungos e vírus, respectivamente.
- **Agentes bacteriostático, fungistático, viriostático:** que inibem o crescimento de bactérias, fungos e vírus, respectivamente.

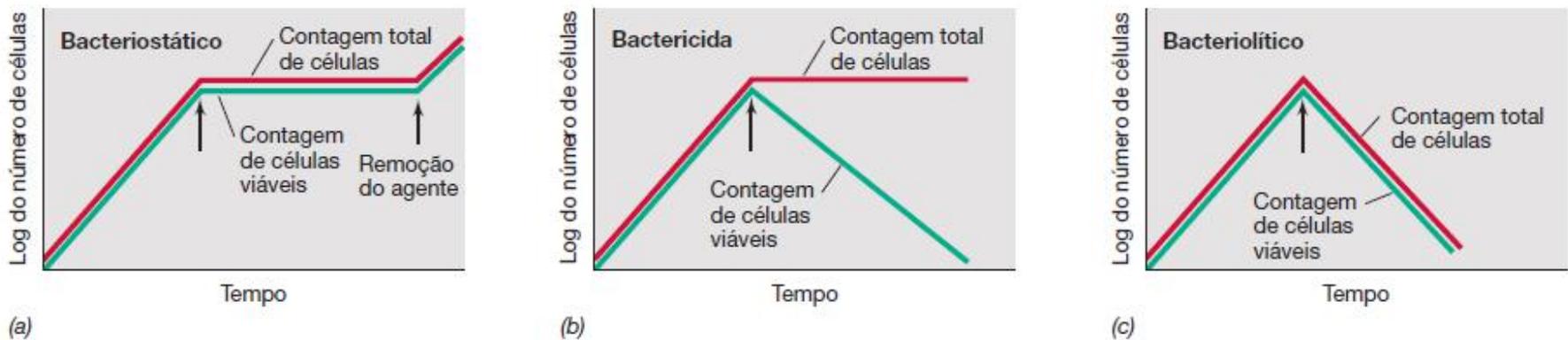
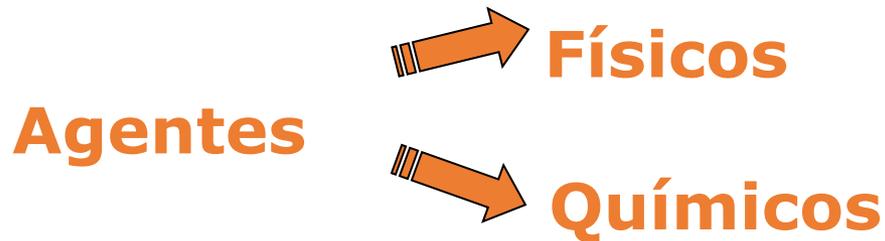


Figura 5.39 Diferentes agentes antimicrobianos. (a) Agentes bacteriostáticos inibem, mas não matam. (b) Agentes bactericidas matam. (c) Agentes bacteriolíticos lisam as células. Na altura indicada pela seta, uma

concentração de inibição de crescimento de cada agente antimicrobiano foi adicionada a uma cultura em crescimento exponencial. A turbidez e as contagens de células viáveis mostradas são características de cada tipo de agente.

Ações dos agentes de controle microbiano

- alteração da permeabilidade da membrana plasmática
- danos às proteínas e aos ácidos nucleicos



Ações dos agentes de controle microbiano

- **alteração da permeabilidade da membrana plasmática**

Regula ativamente a passagem de nutrientes para a célula e a eliminação de dejetos da mesma.

→ Lesão aos lipídeos ou proteínas da membrana plasmática por agentes antimicrobianos, como os compostos de amônio quaternário, causa tipicamente o vazamento do conteúdo celular no meio circundante e interfere com o crescimento da célula

Ações dos agentes de controle microbiano

- Danos às proteínas e aos ácidos nucleicos

Bactérias = “sacos de enzimas”



Proteínas vitais para atividades celulares



dependem da sua forma tridimensional

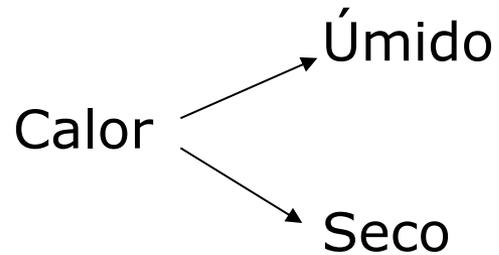
Calor ou produtos químicos → rompimento das ligações de hidrogênio

Pontes dissulfeto

Dano aos ácidos nucleicos → calor, radiação ou substâncias químicas impedem a realização de funções metabólicas, replicação

Agentes físicos de controle

Agentes físicos de controle



**Desnaturação
de enzimas**

Resistência ao calor difere entre os microrganismos

Métodos físicos de controle microbiano

TABELA 7.5

Métodos Físicos Usados para o Controle do Crescimento Microbiano

Método	Mecanismo de Ação	Comentário	Uso Preferencial
Calor			
1. Calor úmido			
a. Fervura ou	Desnaturação das proteínas	Mata fungos e células bacterianas vegetativas patogênicas e quase todos os vírus em 10 min; menos efetivo para endosporos	Pratos, bacias, jarros, equipamento variado
b. Autoclave	Desnaturação das proteínas	Método muito efetivo de esterilização; em cerca de 15 psi de pressão (121°C), todas as células vegetativas e seus endosporos são mortos em cerca de 15 minutos	Meios microbiológicos, soluções, roupa de cama, utensílios, curativos, equipamento e outros itens que podem suportar temperatura e pressão
2. Pasteurização	Desnaturação das proteínas	Tratamento com calor para o leite (72°C por cerca de 15 seg) que mata todos os patógenos e a maioria dos não-patogênicos	Leite, creme e certas bebidas alcoólicas (cerveja e vinho)
3. Calor seco			
a. Chama direta	Queima os contaminantes até se tornarem cinzas	Método muito eficaz de esterilização	Alças de inoculação
b. Incineração	Queima até se tornarem cinzas	Método muito eficaz de esterilização	Copos de papel, curativos contaminados, carcaças de animais, sacos e panos de limpeza
c. Esterilização com ar quente	Oxidação	Método muito eficaz de esterilização, mas requer temperatura de 170°C por cerca de 2 horas	Vidros vazios, instrumentos, agulhas e seringas de vidro

Filtração	Separação das bactérias do líquido de suspensão	Remove os micróbios através da passagem de um líquido ou gás através de um material semelhante a uma tela; a maioria dos filtros em uso consiste de acetato de celulose ou nitrocelulose	Útil para esterilizar líquidos (enzimas, vacinas) que são destruídos pelo calor
------------------	---	--	---

Frio

1. Refrigeração	Redução das reações químicas e possíveis alterações nas proteínas	Tem efeito bacteriostático	Conservação dos alimentos, drogas e culturas
2. Congelamento profundo (veja o Capítulo 6, página 169)	Redução das reações químicas e possíveis alterações nas proteínas	Um método eficaz para conservar culturas microbianas, em que as culturas são congeladas rapidamente a -50 e -95°C	Conservação dos alimentos, drogas e culturas
3. Liofilização (veja o Capítulo 6, página 169)	Redução das reações químicas e possíveis alterações nas proteínas	Método mais eficaz para a conservação prolongada de culturas microbianas; a água é removida por alto vácuo em baixa temperatura	Conservação dos alimentos, drogas e culturas

Alta Pressão	Alteração da estrutura molecular de proteínas e carboidratos	Conservação de cores, sabores e valores nutricionais	Sucos de fruta
Dessecação	Interrupção do metabolismo	Envolve a remoção de água dos micróbios; principalmente bacteriostática	Conservação dos alimentos
Pressão Osmótica	Plasmólise	Resulta na perda de água das células microbianas	Conservação dos alimentos
Radiação			
1. Ionizante	Destruição do DNA	Não-disseminado na esterilização de rotina	Usado para esterilizar produtos farmacêuticos e suprimentos médicos e dentários
2. Não-ionizante	Lesão ao DNA	Radiação não muito penetrante	Controle de ambiente fechado com lâmpada UV (germicida)

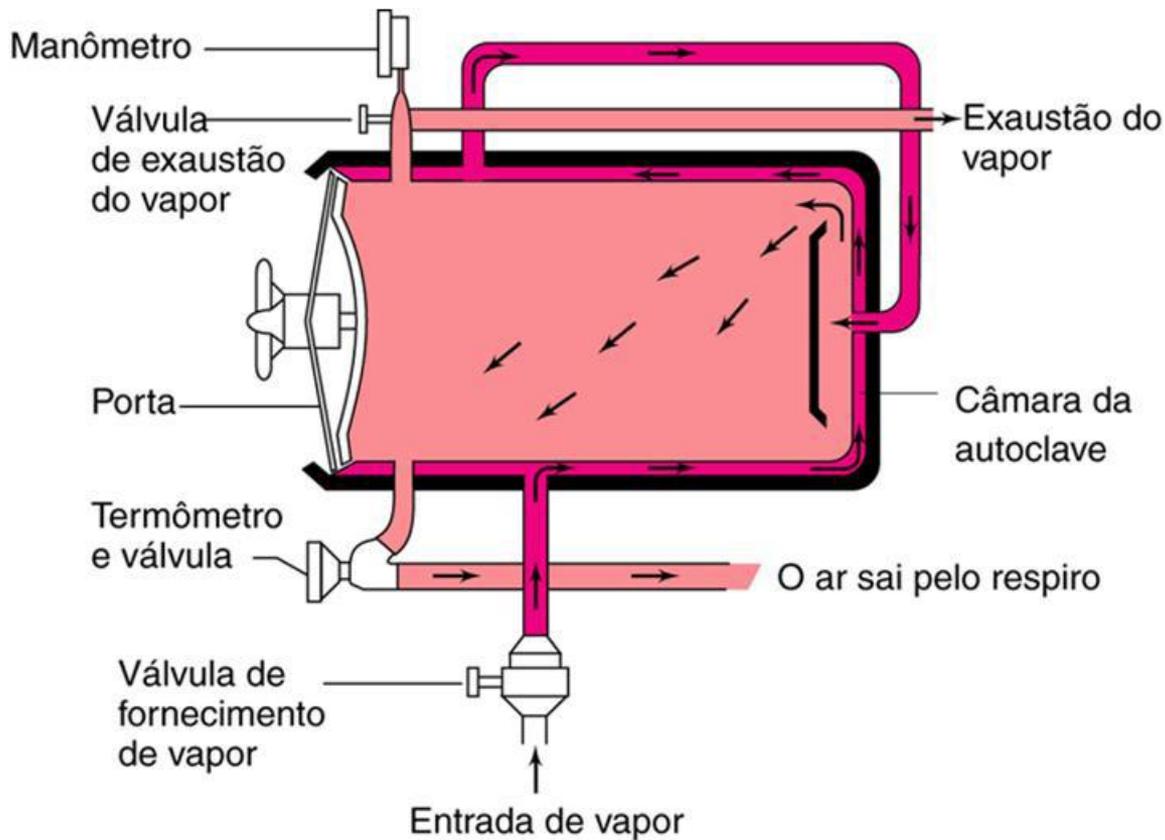
Métodos físicos de controle microbiano

- **Fervura (100°C ao nível do mar)** → mata formas vegetativas dos patógenos bacterianos, quase todos os vírus, e os fungos e seus esporos dentro de ~ 10 minutos
 - Vapor de fluxo livre (não pressurizado) equivalente à água fervente, no entanto, endósporos e alguns vírus não são destruídos tão rapidamente
 - Vírus da hepatite pode sobreviver até 30 minutos de fervura
 - Alguns endósporos bacterianos podem resistir à fervura por mais de 20 horas
- Fervura nem sempre é um bom procedimento confiável de esterilização, mas a fervura breve matará a maioria dos microrganismos patógenos → alimentos e água seguros para ingestão



Autoclave

Maior volume → mais tempo



Método preferencial para esterilização a menos que o material seja danificado pelo calor ou umidade

Vapor de fluxo livre → 100°C pressão atmosférica ao nível do mar

1 ATM acima (15 psi) → 121°C → 15 minutos

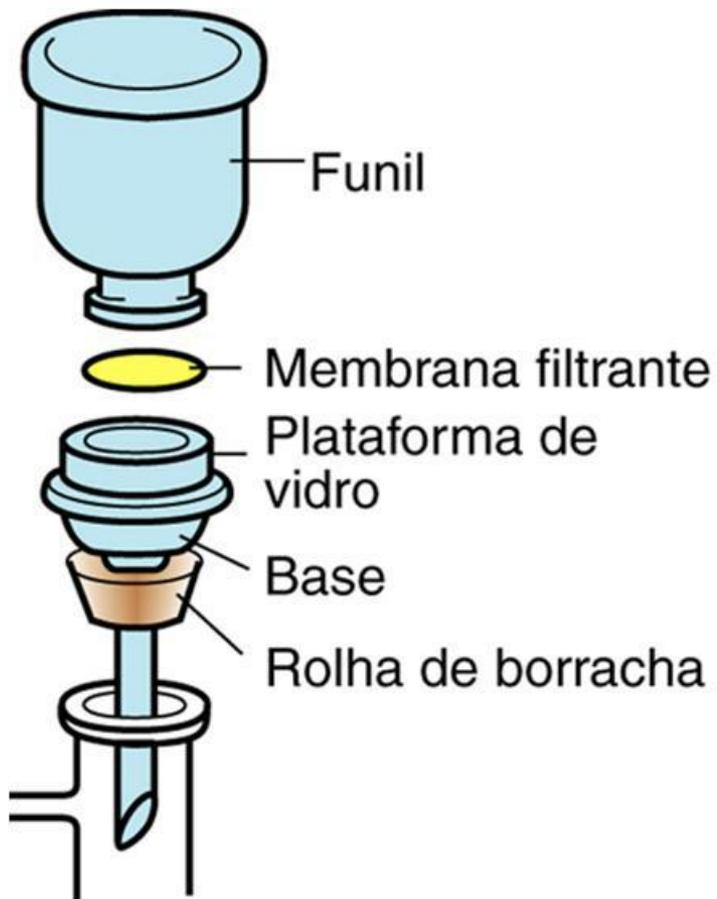
Mata todos os microrganismos e seus endósporos



(c)

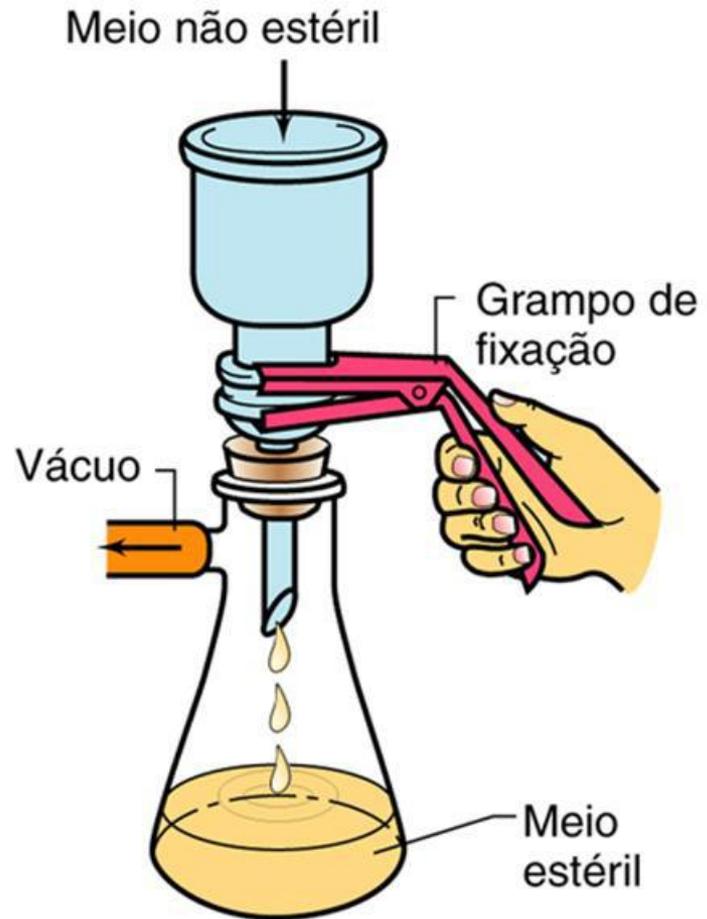
(Tortora, Funke e Case)

J. Martinko



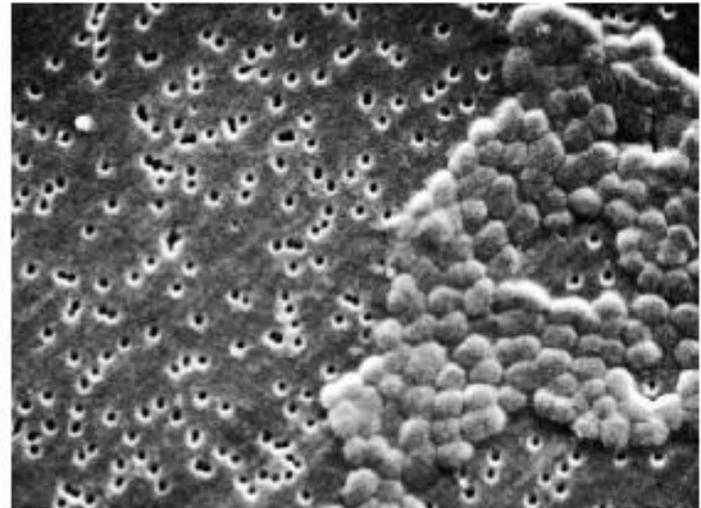
Filtração

Poros de $0,22 \mu\text{m}$





(a)

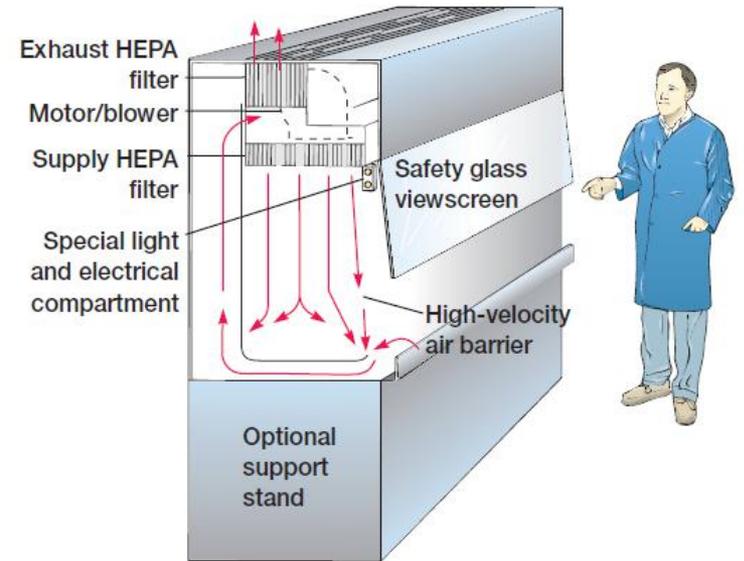


(b)

Figure 7.5 Membrane Filter Types. (a) *Bacillus megaterium* on an Ultipor nylon membrane with a bacterial removal rating of $0.2\ \mu\text{m}$ ($\times 2,000$). (b) *Enterococcus faecalis* resting on a polycarbonate membrane filter with $0.4\ \mu\text{m}$ pores ($\times 5,900$).

Filtração: Filtros HEPA

high efficiency particulate air



(b)

Removem quase todos os microrganismos maiores que cerca de $0,3 \mu\text{m}$ de diâmetro

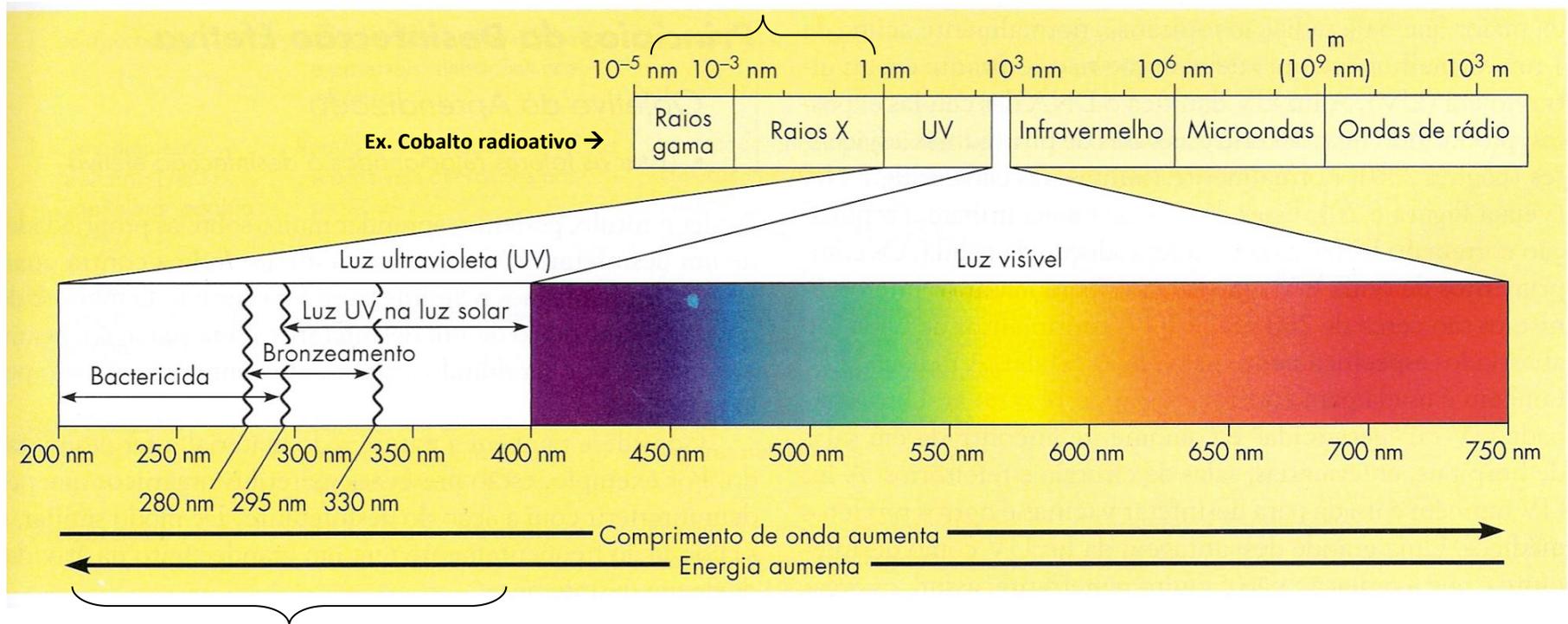
Figure 7.6 A Laminar Flow Biological Safety Cabinet. (a) A technician pipetting potentially hazardous material in a safety cabinet. (b) A schematic diagram showing the airflow pattern.

Radiação esterilizante não-ionizante e ionizante

Ionização da água produzindo íons hidroxila altamente reativos que agem no DNA e componentes orgânicos celulares



ionizante



> 1nm = **não ionizante**

Câmara de Biossegurança

- Ligue o fluxo laminar (filtração do ar)
- Limpe a superfície interna com álcool 70%
- Ligue a luz UV por 15 minutos antes de usar



Filtros HEPA

+

Luz Ultra-violeta



Congelamento a baixas temperaturas

- 80°C

- Diminui o metabolismo das bactérias;
- Devido a temperatura ótima da atividade enzimática e devido ao fato de não ter água no estado líquido disponível para reação;
- Efeito bacteriostático.



Métodos químicos de controle microbiano

Tecidos vivos

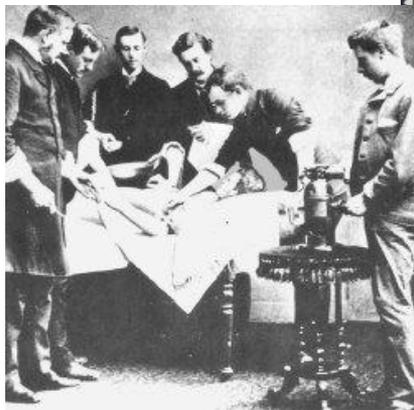
Objetos inanimados

Poucos atingem a esterilidade, a maioria reduz a população para níveis seguros ou removem as formas vegetativas

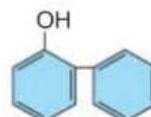
TABELA 7.8

Agentes Químicos Usados para Controlar o Crescimento Microbiano

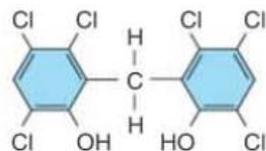
Agente Químico	Mecanismo de Ação	Uso Preferencial	Comentário
Fenol e Compostos Fenólicos			
1. Fenol	Ruptura da membrana plasmática, desnaturação das enzimas	Raramente usado, exceto como padrão de comparação	Raramente usado como desinfetante ou anti-séptico devido à possibilidade de irritação e odor desagradável
2. Compostos Fenólicos	Ruptura da membrana plasmática, desnaturação das enzimas	Superfícies ambientais, instrumentos, superfícies cutâneas e membranas mucosas	Os derivados do fenol são reativos mesmo em presença de material orgânico; um exemplo é o O-fenilfenol
3. Bifenóis	Provável ruptura da membrana plasmática	Sabonete para as mãos e loções hidratantes	O triclosano é um exemplo especialmente comum de um bifenol. Ampla utilização porém mais eficaz contra gram-positivos



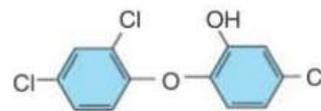
(a) Phenol



(b) O-phenylphenol



(c) Hexachlorophene (a bisphenol)

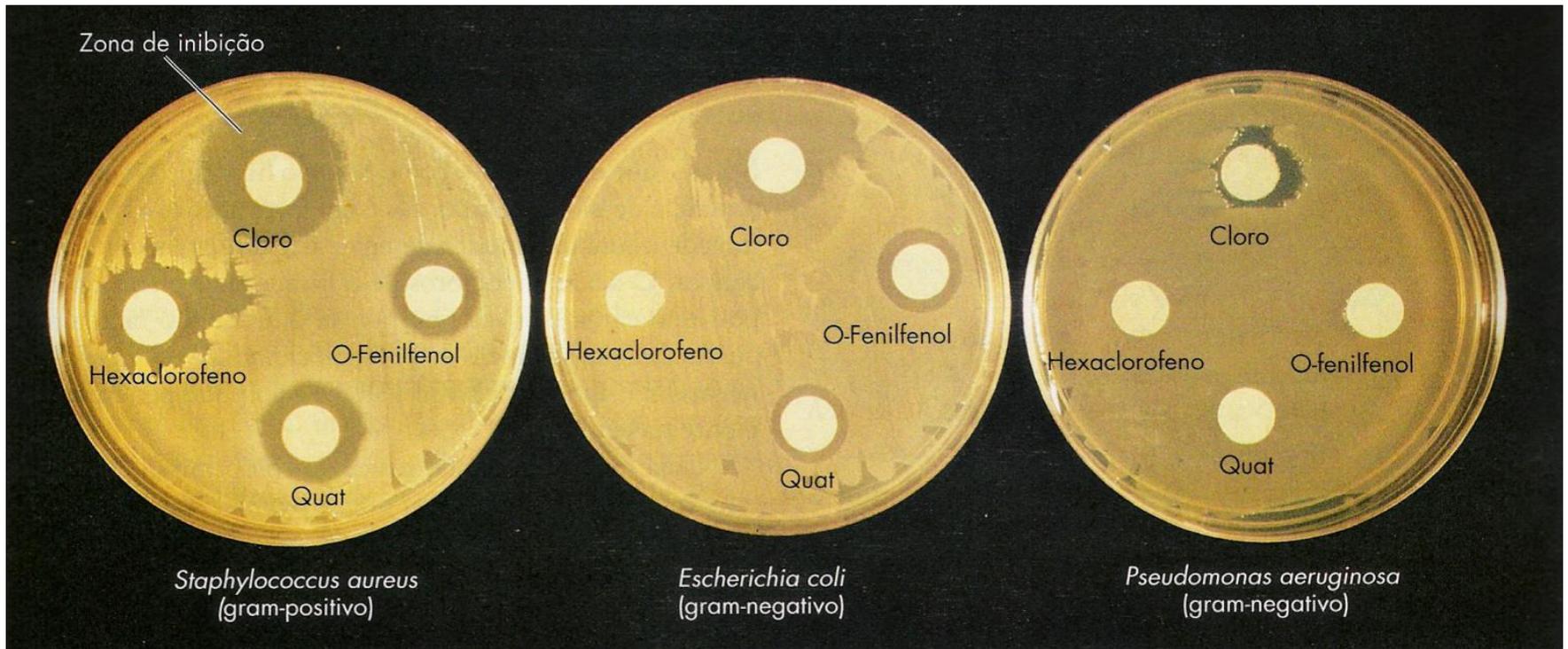


(d) Triclosan (a bisphenol)



Métodos químicos de controle microbiano

- Avaliando um desinfetante – Método de disco-difusão



Métodos químicos de controle microbiano

Tabela 17.3

Anti-sépticos, desinfetantes e esterilizantes

Agente	Uso	Modo de ação
Anti-sépticos		
Álcool (etanol ou isopropanol 60-85%, diluídos em água) ^a	Pele	Solvente de lipídeos e desnaturante de proteínas
Compostos contendo fenol (hexaclorofeno, triclosan, cloroxilenol, clorexidina)	Sabões, loções, cosméticos, desodorantes corporais	Rompem a membrana celular
Detergentes catiônicos, especialmente os compostos quaternários de amônio (cloreto de benzalcônio)	Sabões, loções	Interagem com os fosfolipídeos de membrana
Peróxido de hidrogênio ^a (solução a 3%)	Pele	Agente oxidante
Compostos iodóforos, contendo iodo em solução ^a (Betadine [®])	Pele	Iodinam resíduos de tirosina das proteínas, agente oxidante
Nitrato de prata	Olhos de recém-nascidos, para evitar a cegueira decorrente da infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Precipitação de proteínas

Métodos químicos de controle microbiano

Table 7.6 Biocidal Action of Various Concentrations of Ethanol in Aqueous Solution against *Streptococcus pyogenes*

Concentration of Ethanol (%)	Time of Exposure (sec)				
	10	20	30	40	50
100	G	G	G	G	G
95	NG	NG	NG	NG	NG
90	NG	NG	NG	NG	NG
80	NG	NG	NG	NG	NG
70	NG	NG	NG	NG	NG
60	NG	NG	NG	NG	NG
50	G	G	NG	NG	NG
40	G	G	G	G	G

NOTE:
G = growth
NG = no growth

Mata as bactérias e fungos, mas não tem ação em endósporo e vírus não-envelopados

- Não deixa resíduos!!

70% é a concentração mais usada

60-95% parecem matar coma mesma rapidez

Desnaturação das proteínas requer água!!

Agentes antimicrobianos utilizados *in vivo*

Paul Ehrlich – Bala mágica

“Que mate um microrganismo, sem matar seu hospedeiro”

Idéia de Toxicidade Seletiva!



Agentes antimicrobianos utilizados *in vivo*

- **Agentes quimioterápicos:** sintéticos ou naturais (antibióticos).
- **Antibiótico:** substância produzida por microrganismos que, em pequenas quantidades, inibe o crescimento de outros microrganismos.
- **1940:** primeiro teste clínico da penicilina por um grupo de cientistas da Universidade de Oxford, liderados por Howard Florey e Ernst Chain.
- Mais da metade dos antibióticos produzidos são obtidos de espécies de *Streptomyces* – bactéria filamentosa do solo. Alguns de *Bacillus* e outros dos fungos *Penicillium* e *Cephalosporium*.
- **Droga antimicrobiana ideal é a que tem**
toxicidade seletiva: capacidade do composto de inibir bactérias ou outros agentes patogênicos sem provocar efeitos adversos no hospedeiro.

Estudar:

Capítulos 5, 6 e 7 do livro Tortora et. al. “Microbiologia”
12a Ed. Artmed, 2017.

