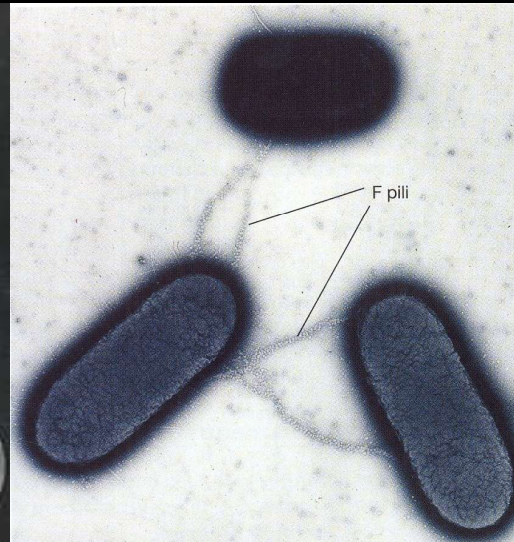


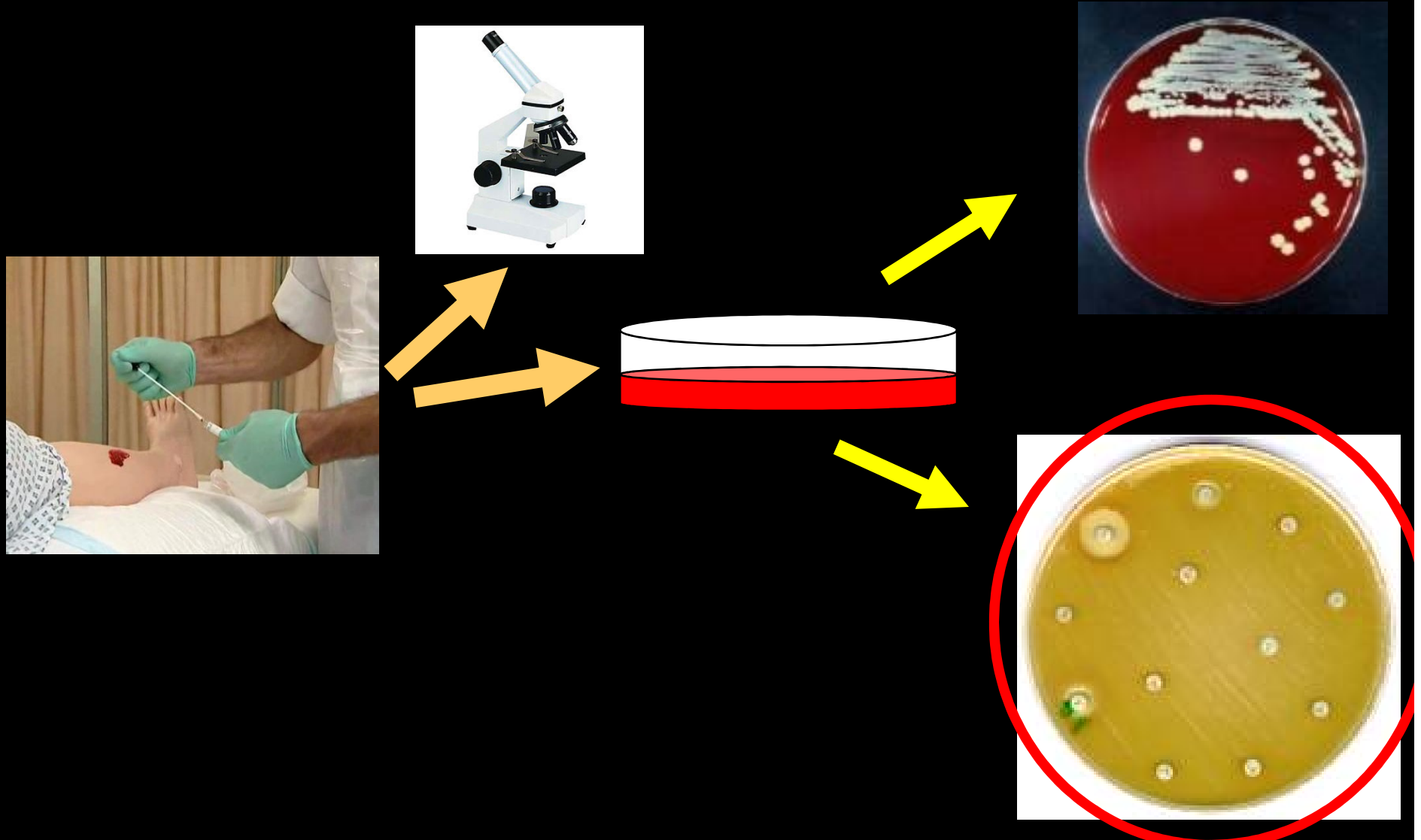
BMM413 – Aula 2: Metabolismo bacteriano: crescimento bacteriano, cultura e isolamento em meios de cultura e identificação bioquímica



Nilton Lincopan
ICB/USP
lincopan@usp.br

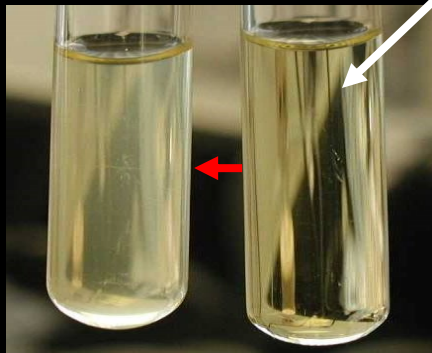
*All images are believed to be in the public domain. If this is not the case, please email the author at lincopan@usp.br and any images will be promptly removed.

Diagnóstico Bacteriológico

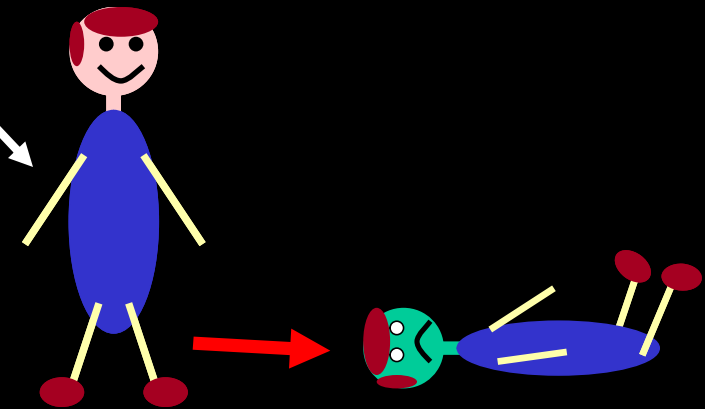


Crescimento bacteriano

NUTRIENTES



Meio de cultura



Hospedeiro

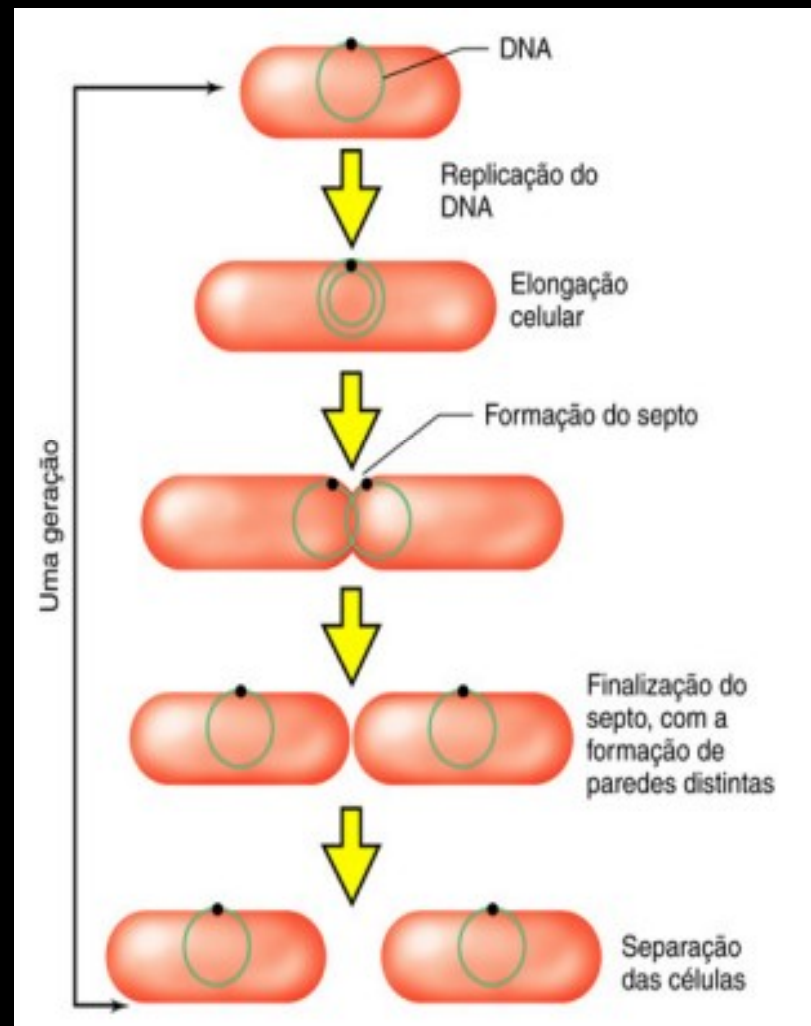
Crescimento bacteriano

Em microbiologia, o termo crescimento refere-se a um **aumento do número de células** e não ao aumento das dimensões celulares. Uma célula dará origem a duas ao fim de um certo tempo, **tempo de geração ou de duplicação.**

Crescimento bacteriano

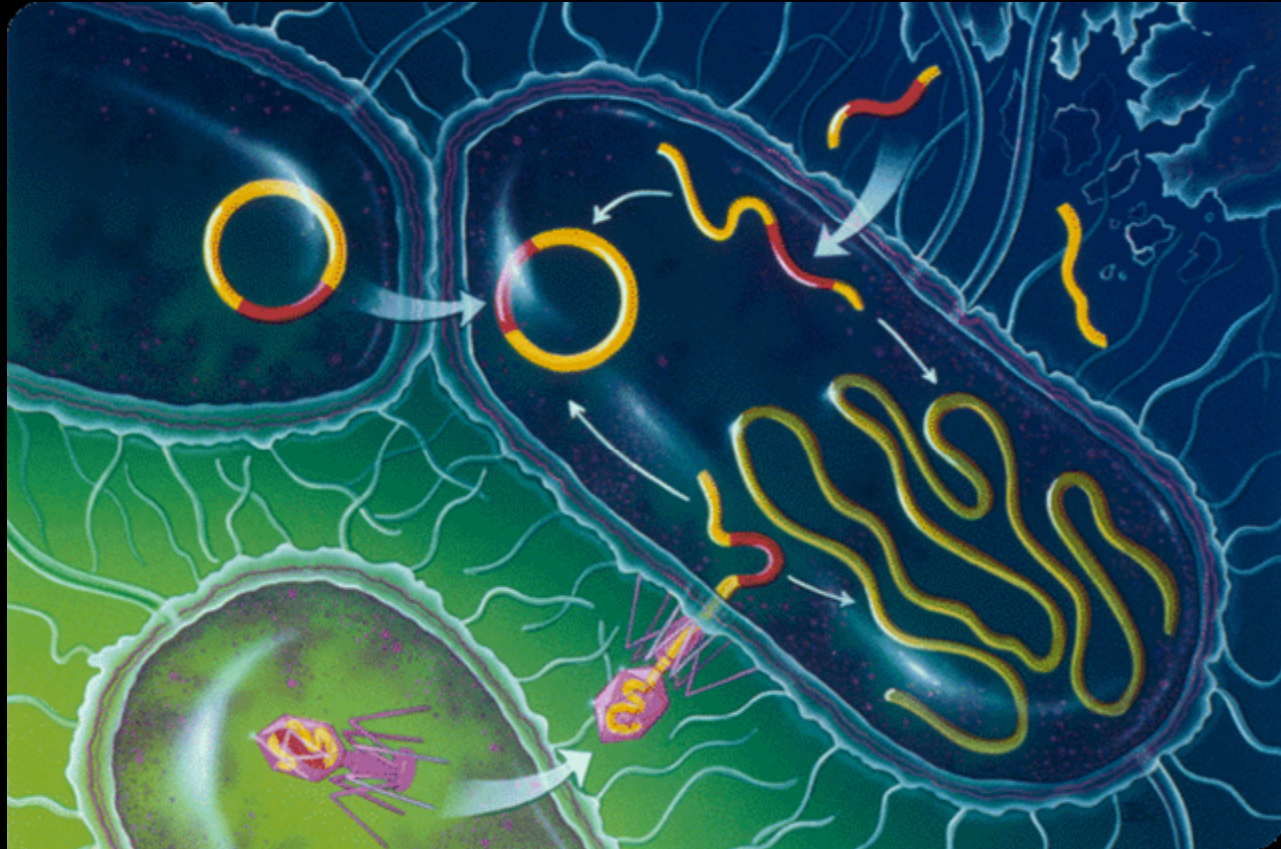
1. Em microbiologia, o termo crescimento refere-se a um **aumento do número de células** e não ao aumento das dimensões celulares. Uma célula dará origem a duas ao fim de um certo tempo, **tempo de geração ou de duplicação.**

Crescimento bacteriano



Fissão binária

Mobilização genética



1. Conjugação
2. Transformação
3. Transdução

Crescimento bacteriano

0 min



20 min



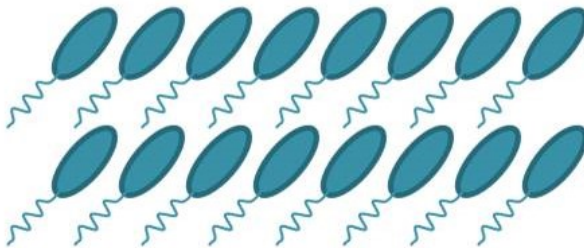
40 min



60 min



80 min



10 hours growth => 1 Billion cells!

Crescimento exponencial

$$N = N_0 \times 2^n$$

onde:

N= número final de células,

N_0 = número inicial de células,

n= número de gerações

Crescimento bacteriano



FASE lag: pouca ou ausência de divisão celular (fase de adaptação)
(estado de latência, com intensa atividade metabólica)

FASE log: início do processo de divisão (período de crescimento, aumento logarítimo)
(reprodução celular extremamente ativa)

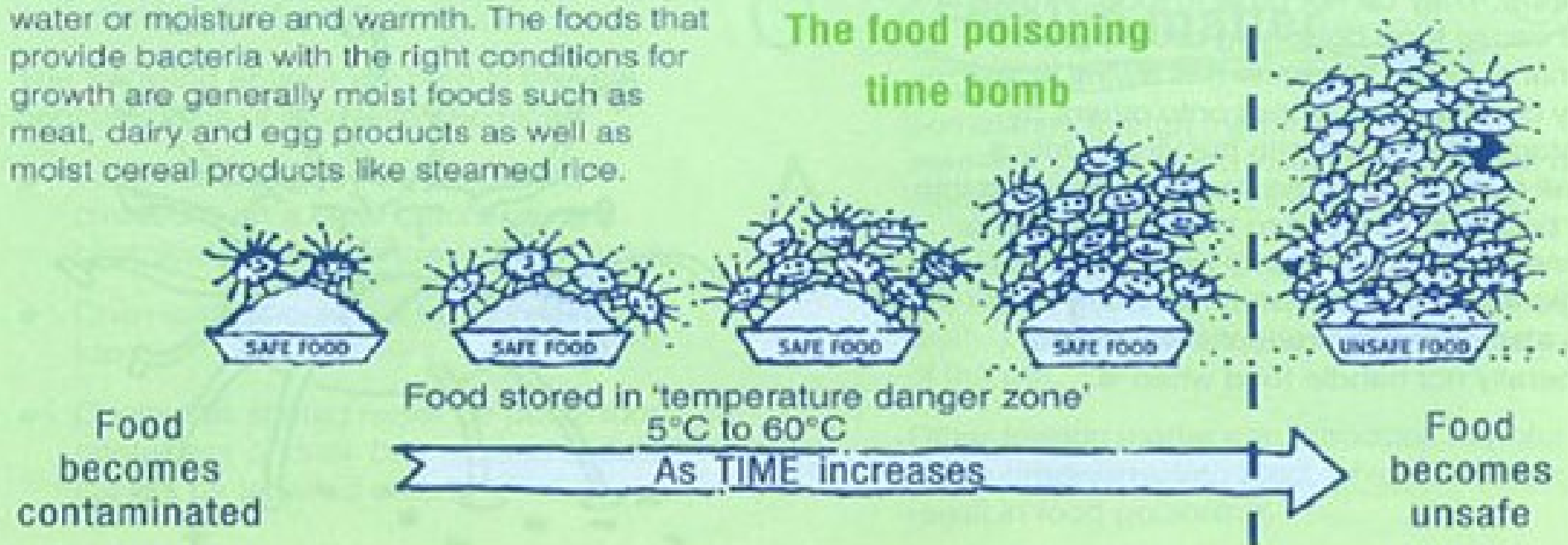
FASE ESTACIONÁRIA: velocidade de crescimento diminui, nº de cél. vivas = nº de cél. mortas

FASE DE MORTE CELULAR: nº de células mortas > células novas.

Crescimento bacteriano aplicação

Conditions for bacterial growth

In order to grow, bacteria need time, food, water or moisture and warmth. The foods that provide bacteria with the right conditions for growth are generally moist foods such as meat, dairy and egg products as well as moist cereal products like steamed rice.



Crescimento bacteriano

Requerimentos nutricionais básicos

1. O crescimento depende da presença de água
2. Macroelementos: H, O, C, N, S, P,
3. Oligoelementos: K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, etc.
4. A incorporação é realizada por processos

químicos = **METABOLISMO:**

Catabolismo: degradação

Anabolismo: síntese

Crescimento bacteriano

Cultivo de bactérias

1. Permite obter um número suficiente de células bacterianas para realizar um estudo.

2. Meio de cultivo:

Fonte de Energia (Oxidação/Fermentação)

Fonte de Carbono

Fonte de Enxofre

Fonte de Fósforo

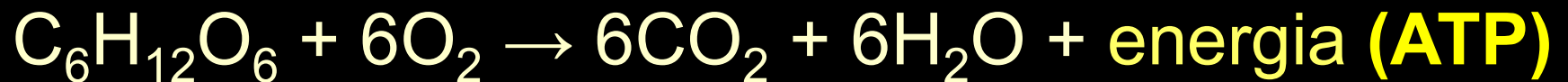
Fonte de Minerais (Mg, Fe, K, Mn, Cu, Zn)

Fatores de Crescimento

Crescimento bacteriano

Fonte de Energia

1. Oxidação: Do ponto de vista da bioquímica, a **respiração celular** é o processo de conversão das ligações químicas de moléculas ricas em energia que possa ser usada nos processos vitais. **Respiração aeróbia:**

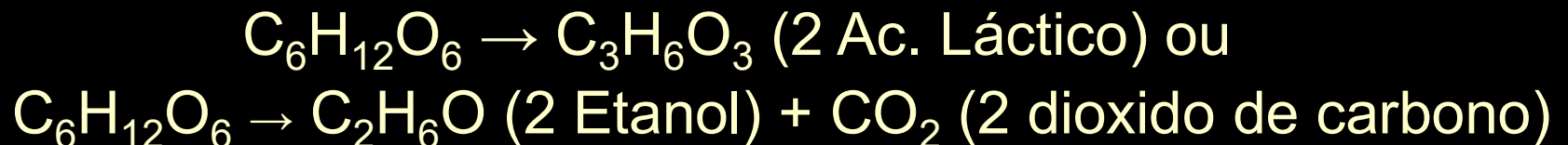


Crescimento bacteriano

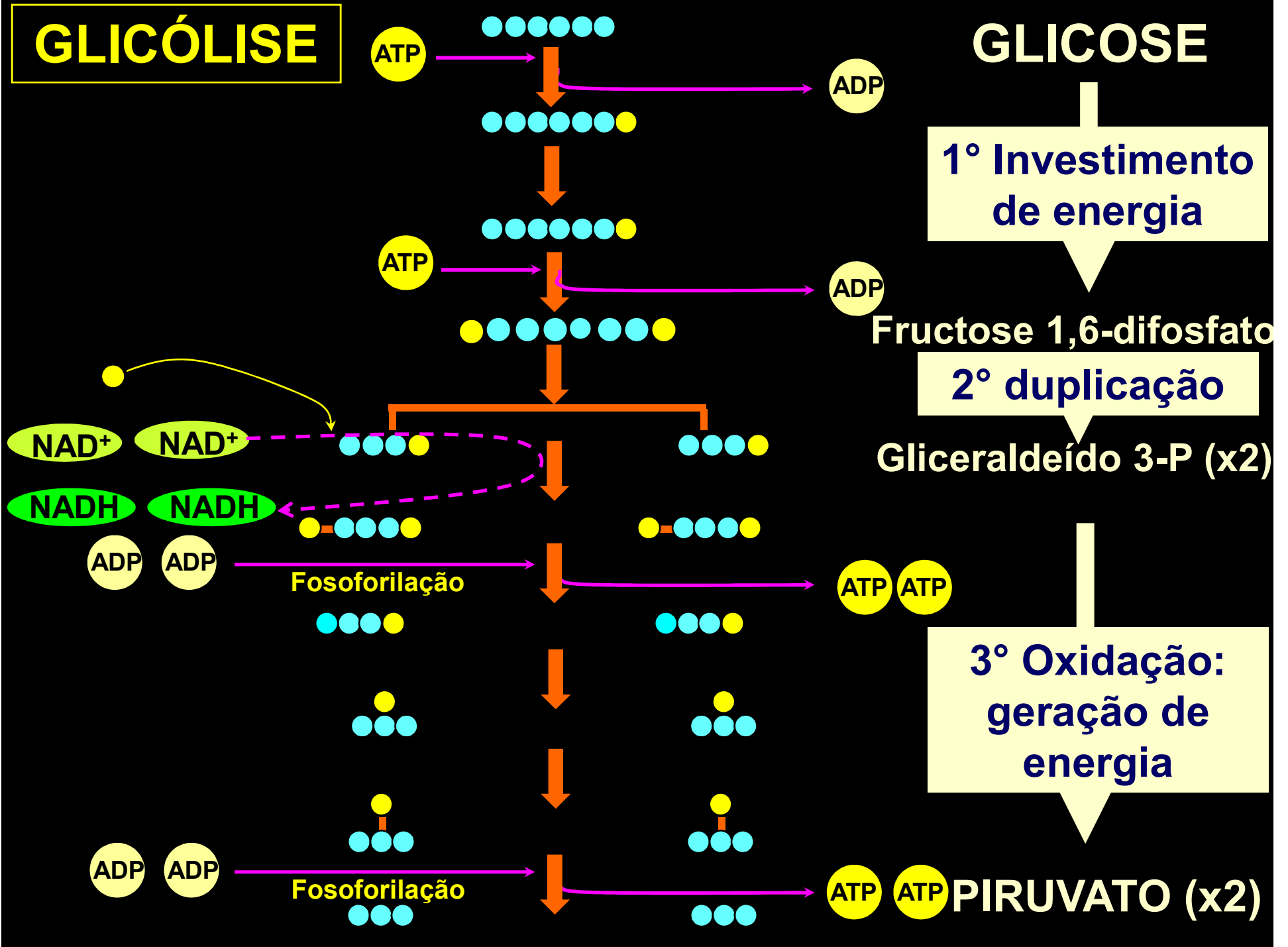
Fonte de Energia

2. Fermentação: **Respiração anaeróbia**. Um processo em que o **piruvato** é apenas parcialmente oxidado, não se segue o ciclo de Krebs e não há produção de **ATP** numa cadeia de transporte de elétrons. No entanto, a fermentação é útil para a célula porque regenera o **dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD)**, que é consumido durante a glicólise.

Outras moléculas, como **NO₂**, **SO₂** são os aceptores finais na cadeia de transporte de elétrons.



GLICÓLISE



GLICOSE

1° Investimento de energia

Fructose 1,6-difosfato

2° duplicação

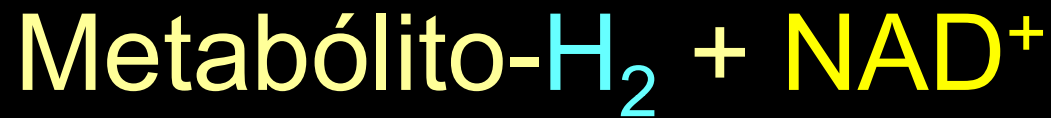
Gliceraldeído 3-P (x2)

3° Oxidação: geração de energia

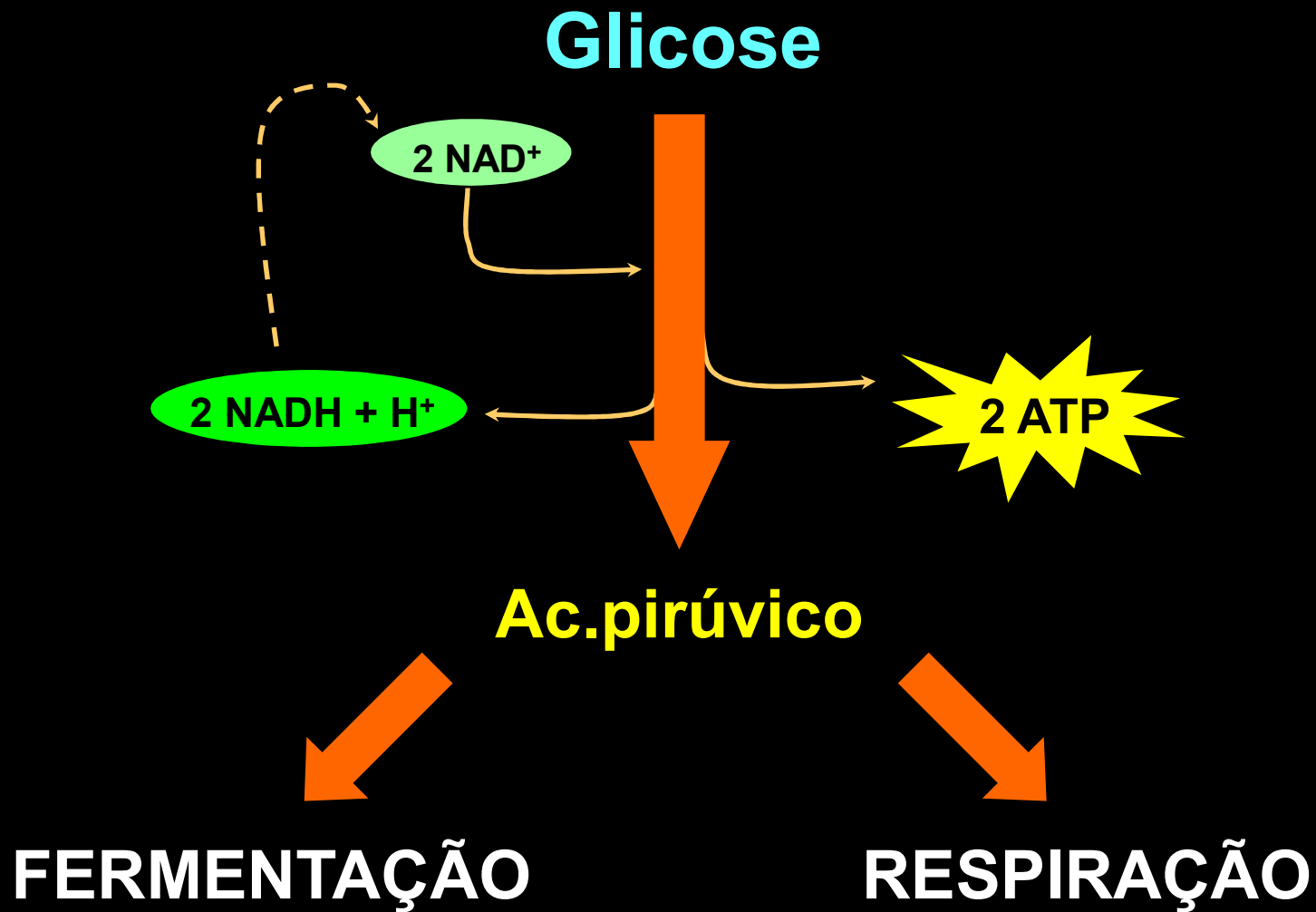
ATP ATP PIRUVATO (x2)

Oxidação de substratos por NAD⁺

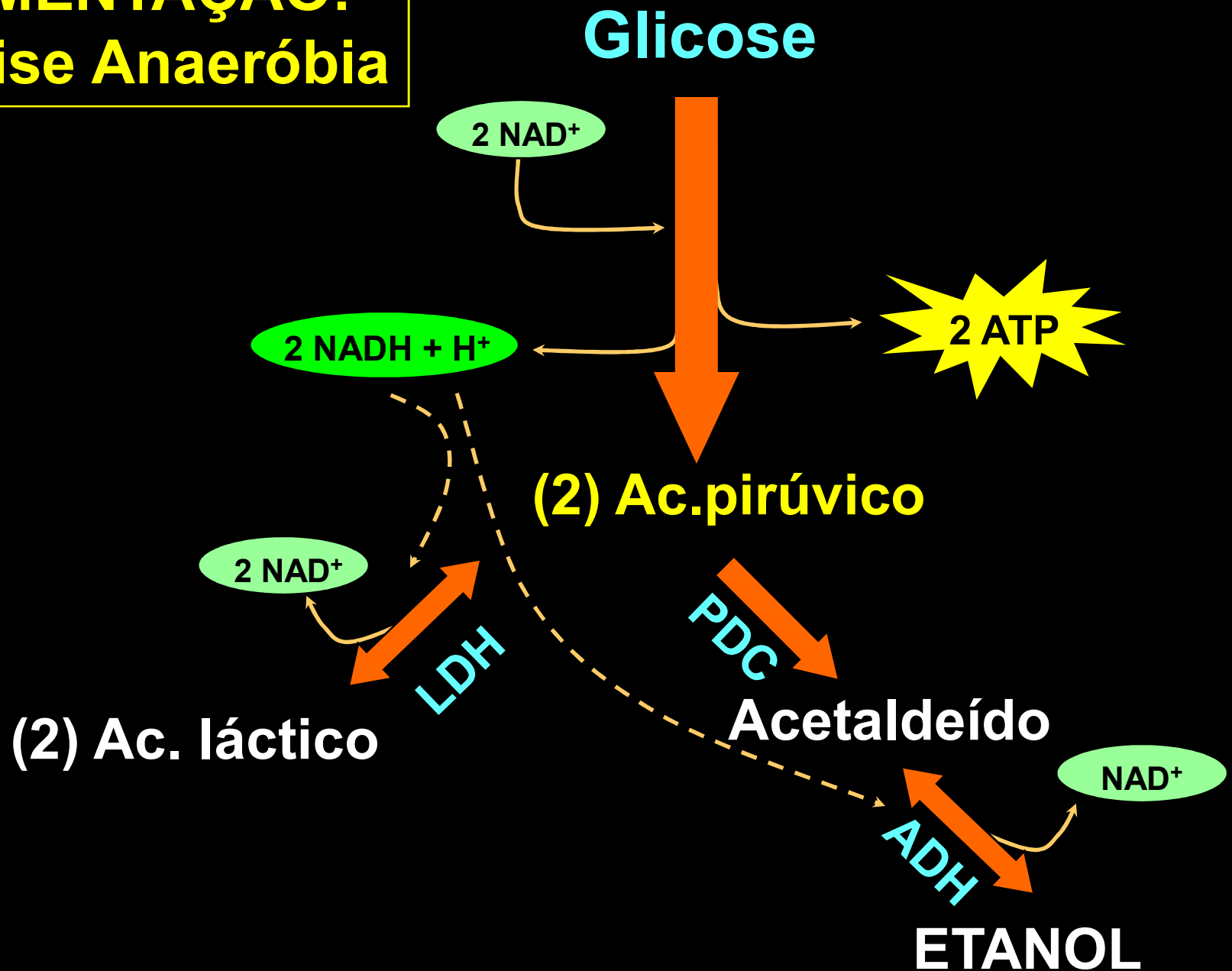
NAD= Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo



GLICÓLISE

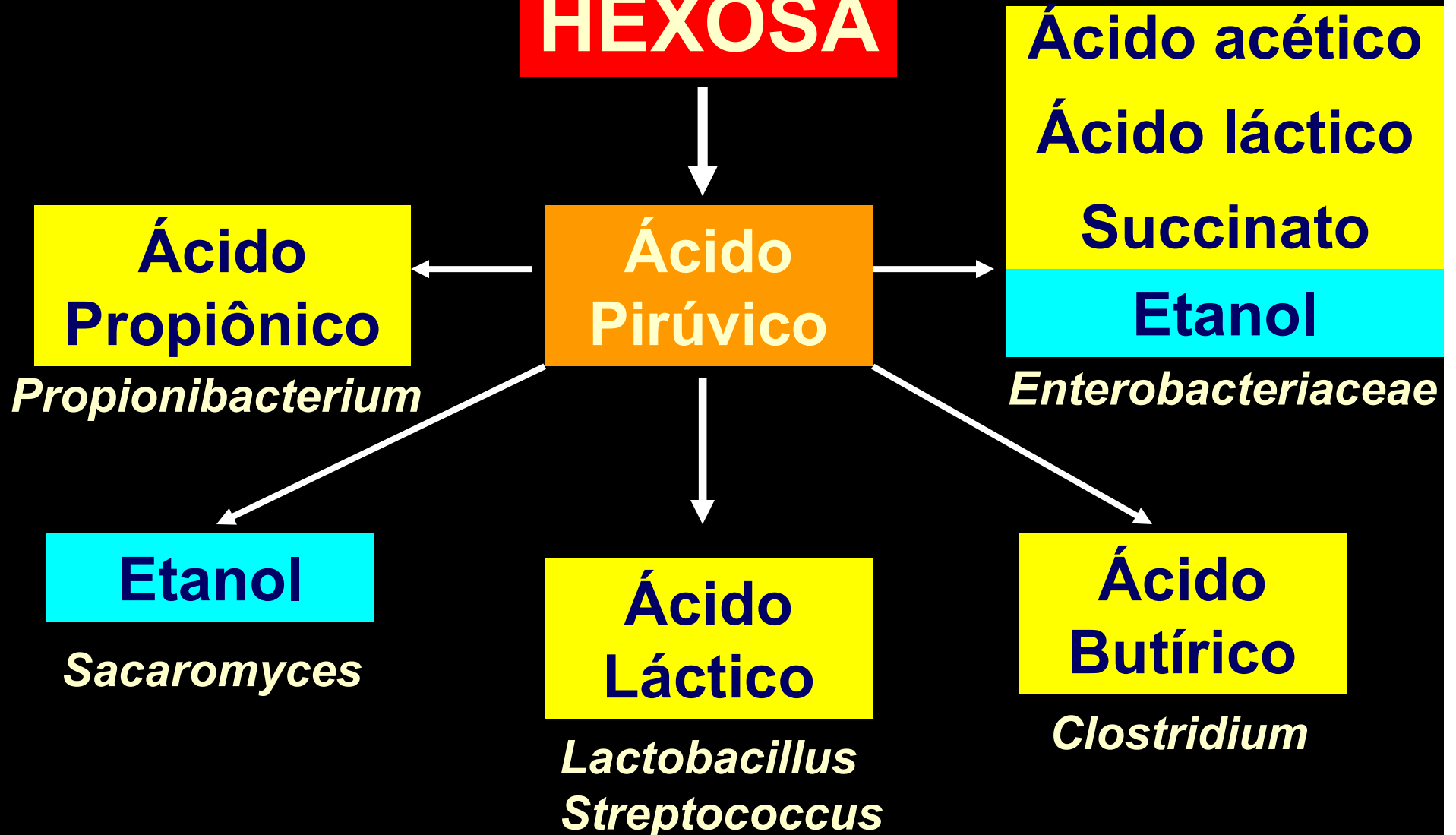


FERMENTAÇÃO: Glicólise Anaeróbica

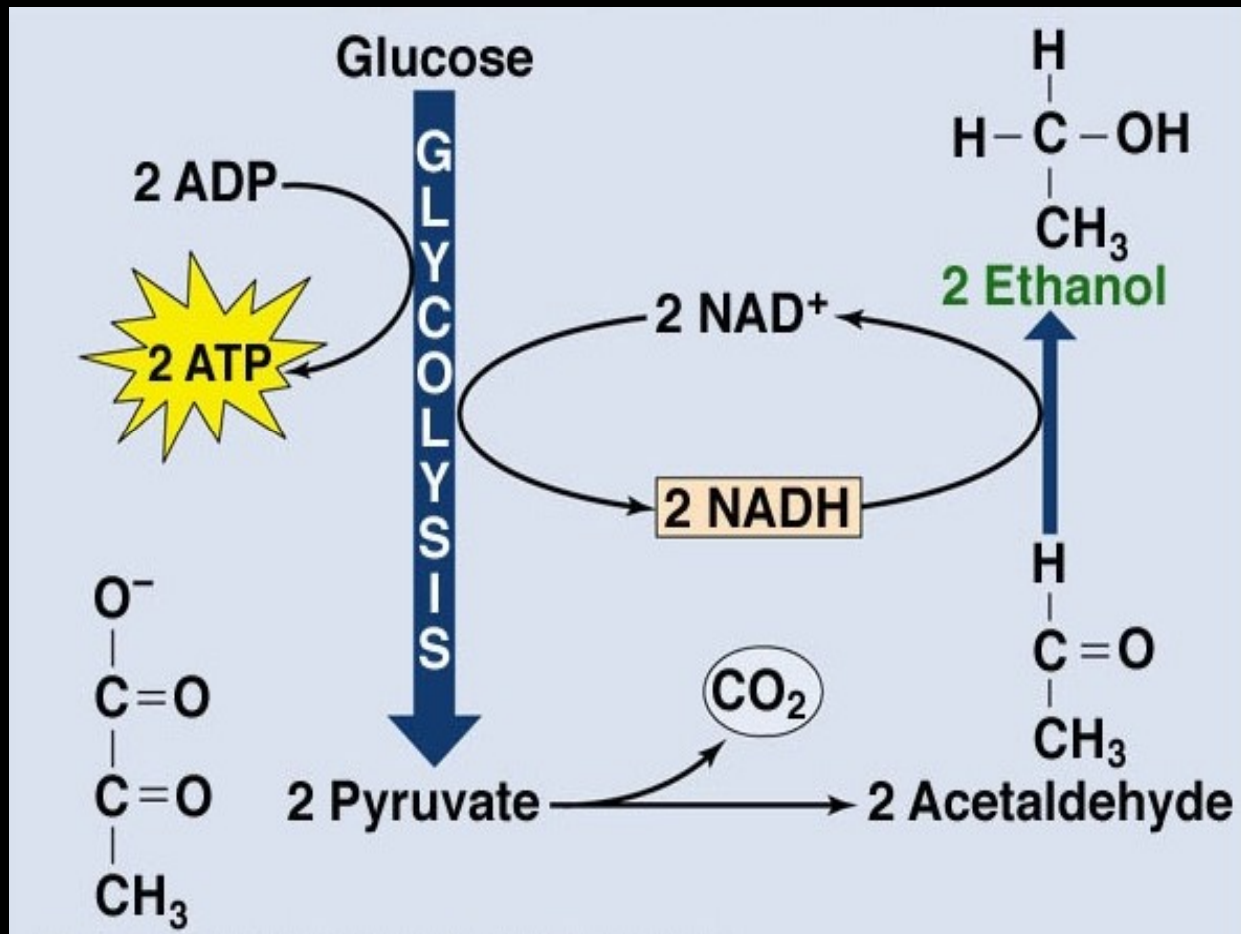


FERMENTAÇÃO: Glicólise Anaeróbica

HEXOSA

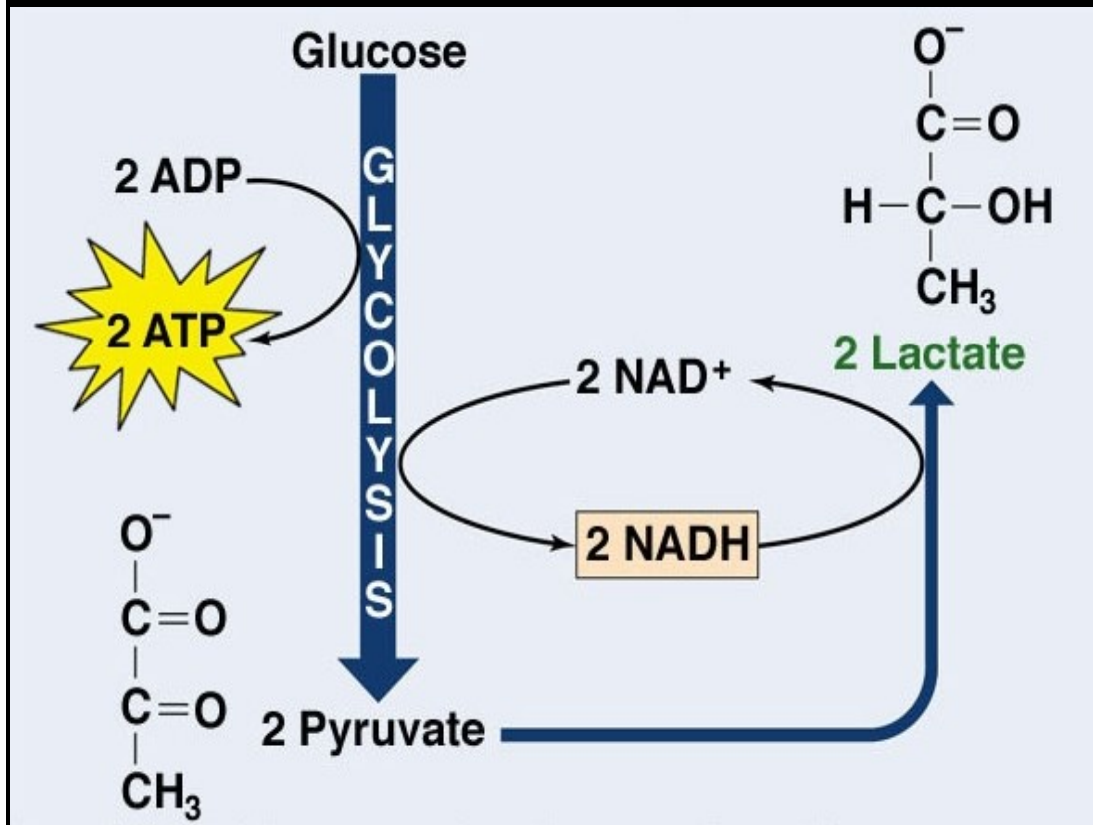


Fermentação



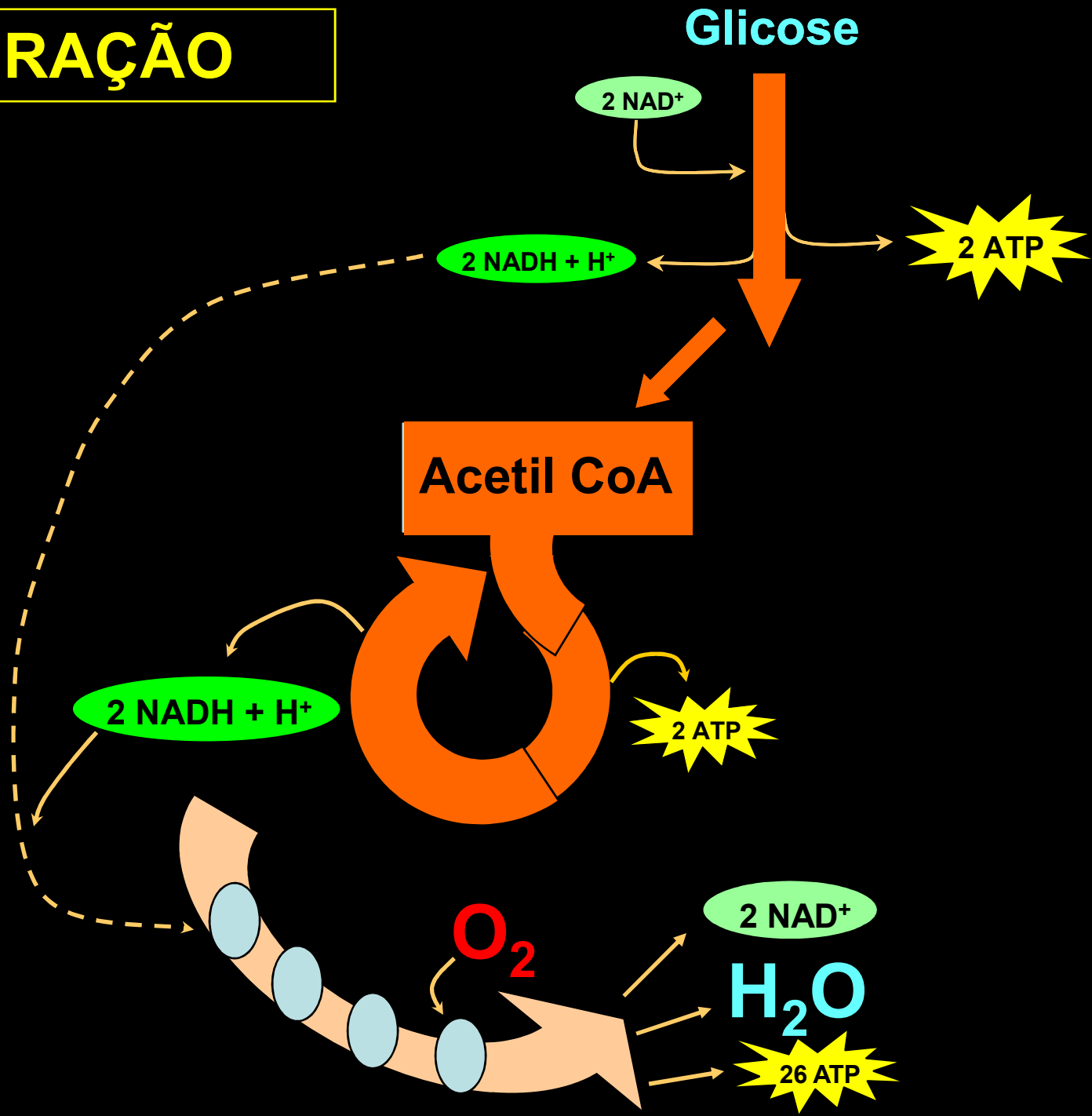
Produção de Alcool

Fermentação



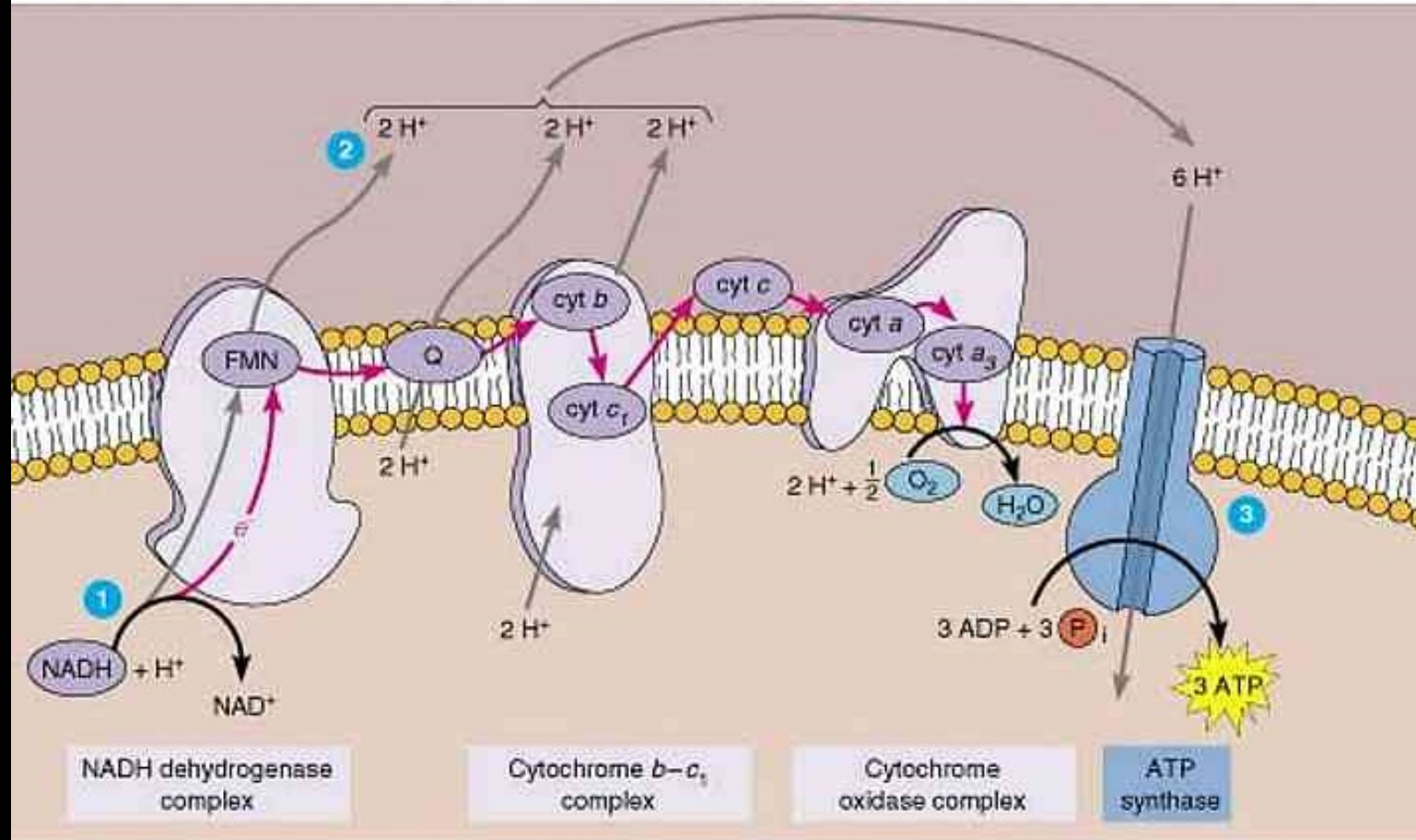
Produção de ácido láctico

RESPIRAÇÃO



RESPIRAÇÃO

ELECTRON TRANSPORT CHAIN



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

<http://www.youtube.com/watch?v=Idy2XAIZIVA>

Bactérias Gram negativas:

Anaeróbias Facultativos

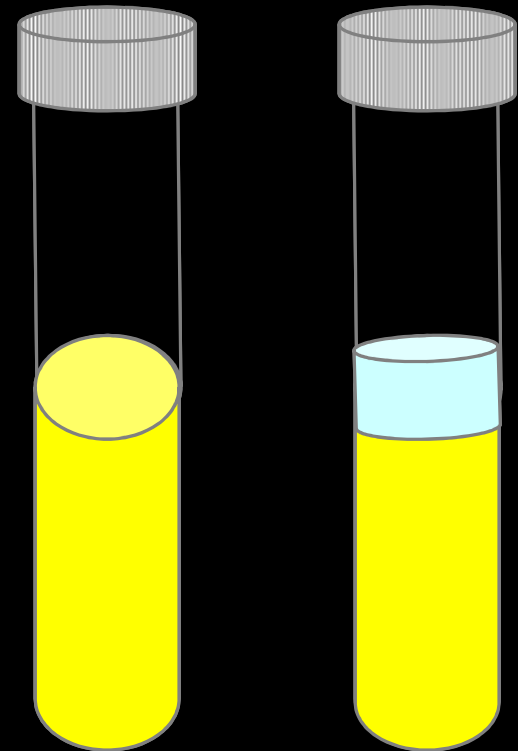
Fermentadores da Glicose

F. Enterobacteriaceae

F. Vibrionaceae

F. Aeromonadaceae

O / F



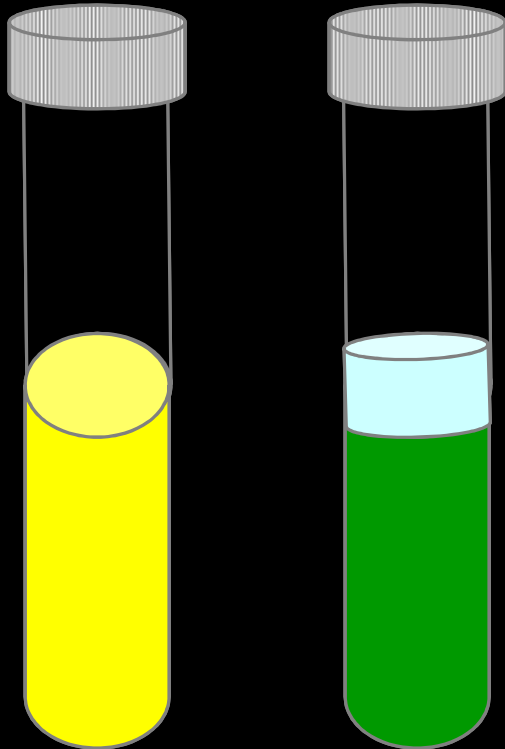
Bactérias Gram negativas:

Aeróbias Estritas

O / F

Não Fermentadores da Glicose

Pseudomonas spp.



Crescimento bacteriano

Cultivo de bactérias

1. Permite obter um número suficiente de células bacteriana para realizar um estudo.

2. Méio de cultivo:

Fonte de Energia (Oxidação/Fermentação)

Fonte de Carbono

Fonte de Enxofre

Fonte de Fósforo

Fonte de Minerais (Mg, Fe, K, Mn, Cu, Zn)

Fatores de Crescimento

Crescimento bacteriano

Fatores de crescimento

1. Também conhecidos como vitaminas
2. Substâncias que são parte da célula, porém não podem ser sintetizadas.

Aminoácidos (proteínas)

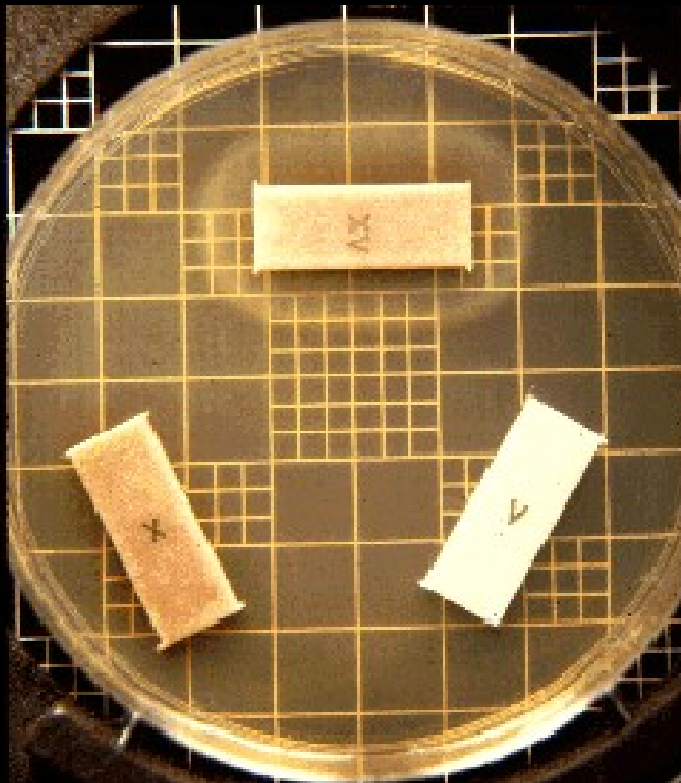
Purinas e pirimidinas (ác. Nucléicos)

Vitaminas (co-enzima, grupo prostético)

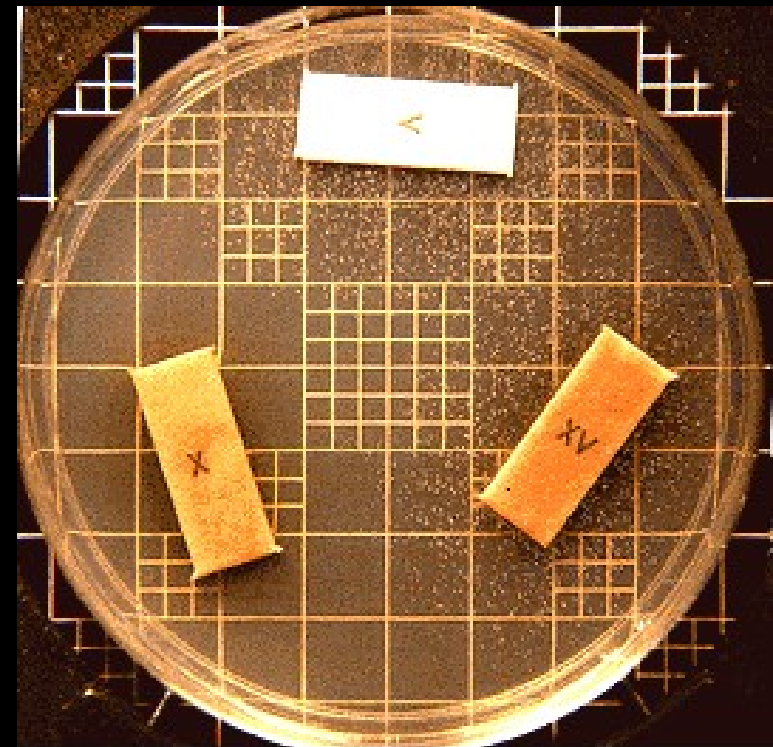
3. Bactérias que precisam de estes fatores são denominadas de **AUXOTRÓFICAS**

Crescimento bacteriano

Fatores de crescimento



Haemophilus influenzae /nutritional factors
X=hemin Y= NAD



Haemophilus parainfluenzae
x=hemin v= NAD

AUXOTRÓFICAS

Crescimento bacteriano

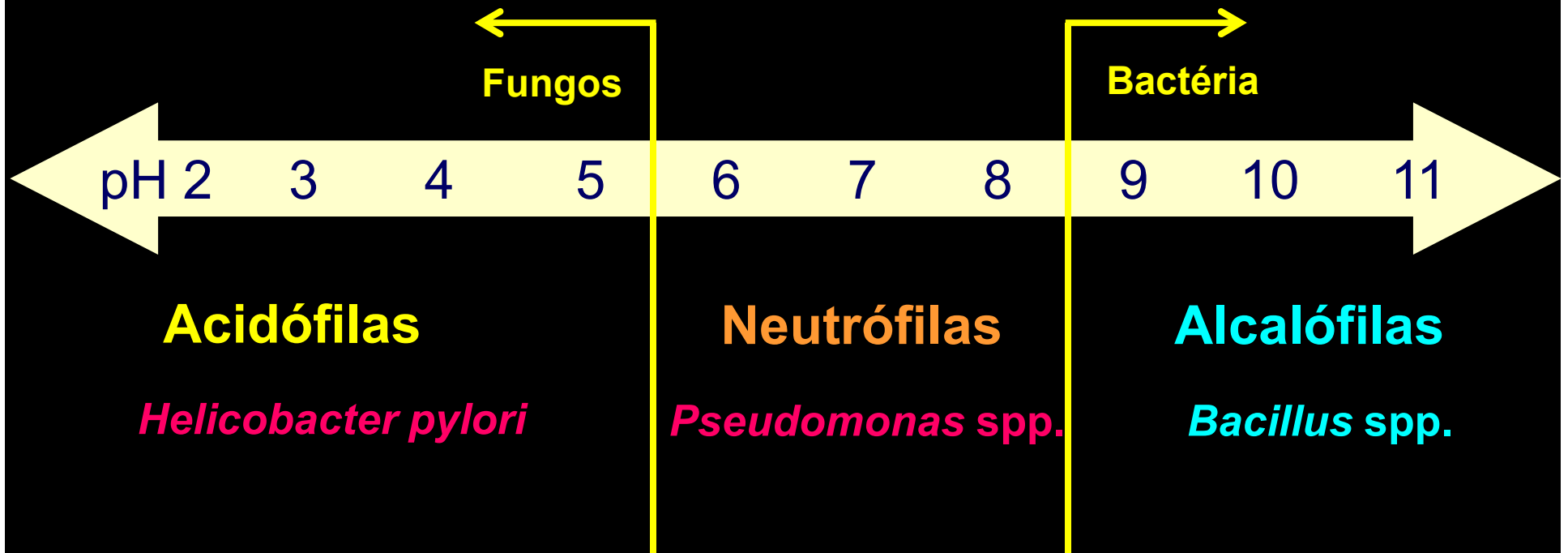
Tipos nutricionais

1. Quimiotrófico: respiração/fermentação = Energia
2. Quimiorganotrófico = Energia = C. orgânicos
3. Autotróficos: obtém Carbono celular pela fixação de CO_2
4. Heterótrofos: obtém Carbono pela assimilação de compostos orgânicos (precisam de outros).

Crescimento bacteriano

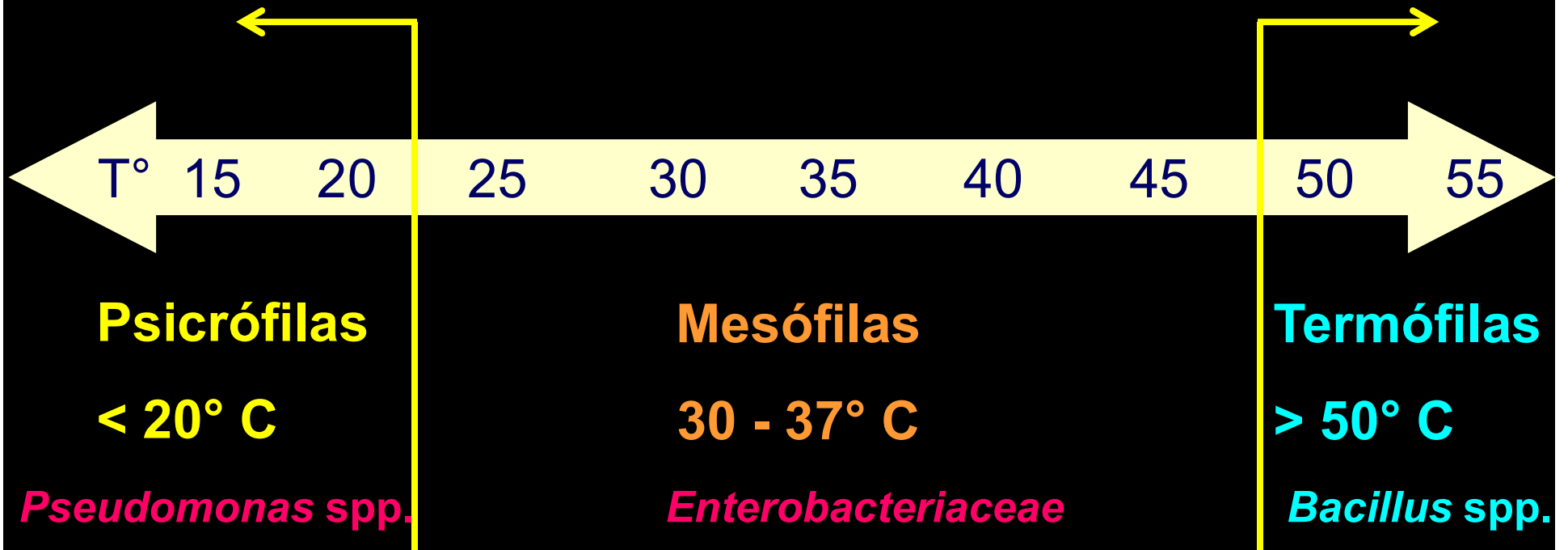
Fatores Ambientais : pH

1. Regulado pela concentração de $[H^+/OH^-]$
2. pH neutro $[H^+] = [OH^-] = \text{pH } 7,0$



Crescimento bacteriano

Fatores Ambientais : Temperatura

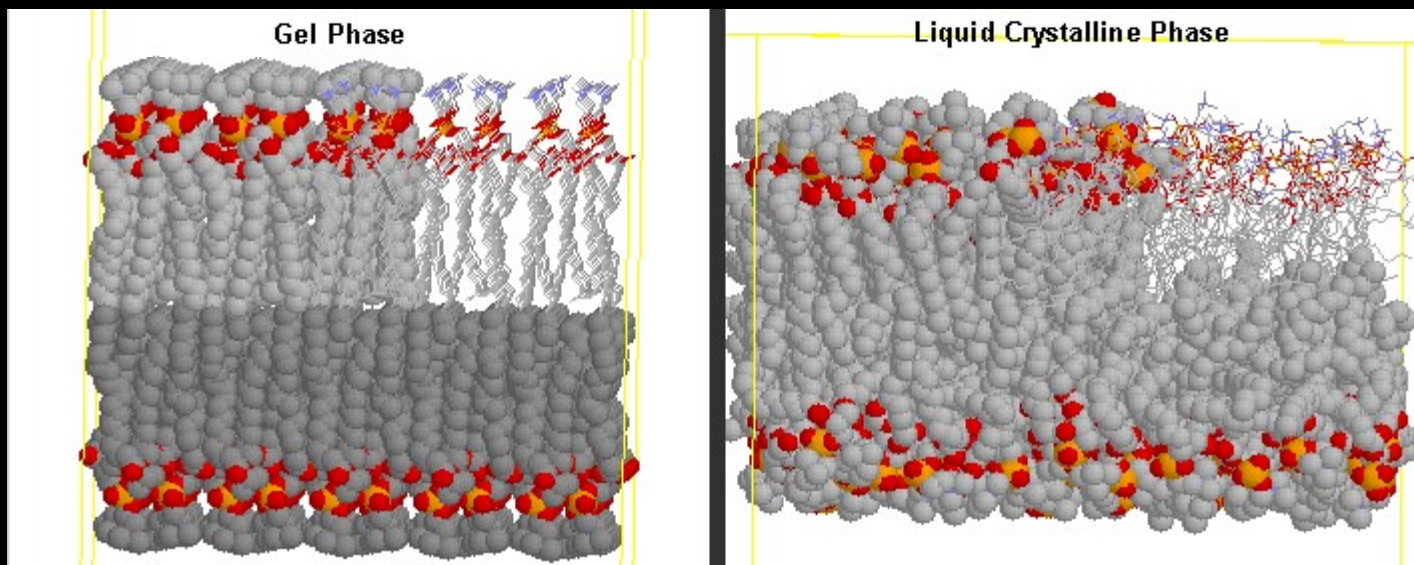


Crescimento bacteriano

Fatores Ambientais : Temperatura

Transição de fase de lípides (T_m)

T° 15 20 25 30 35 40 45 50 55



Ácido palmítico; 16:0; $T_m = 63.1^\circ \text{C}$

Ácido palmitoleico; 16:1 (Δ^9); $T_m = -0,5^\circ \text{C}$

Crescimento bacteriano

Fatores Ambientais : Atmosfera

Segundo o requerimento de O_2 , as bactérias se classificam em:

1. Aeróbias estritas: só crescem na presença de O_2

2. Anaeróbias

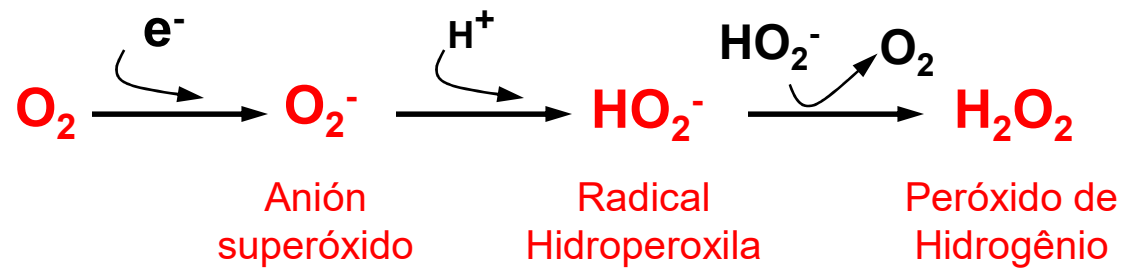
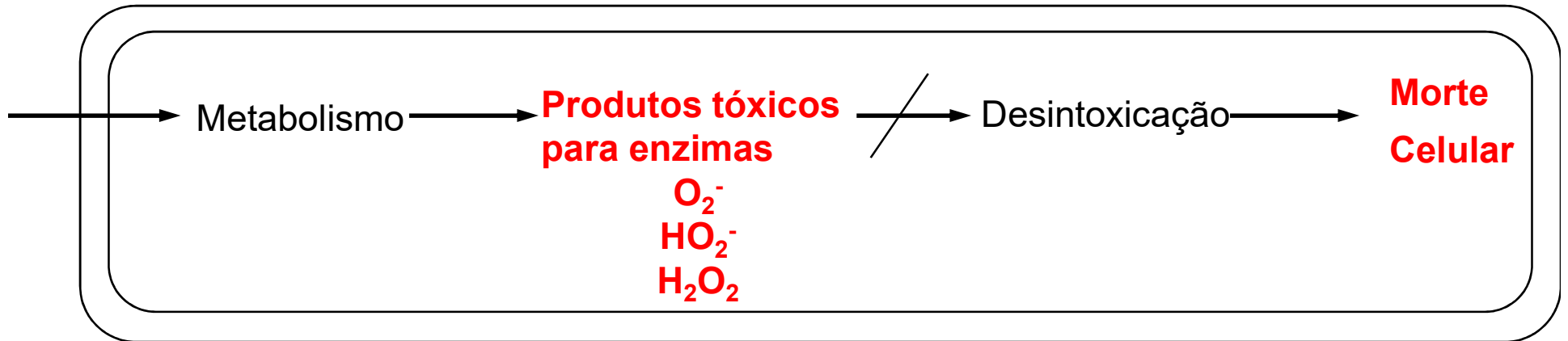
facultativas: presença ou ausência de O_2

estritas: ausência de O_2 (O_2 é tóxico)

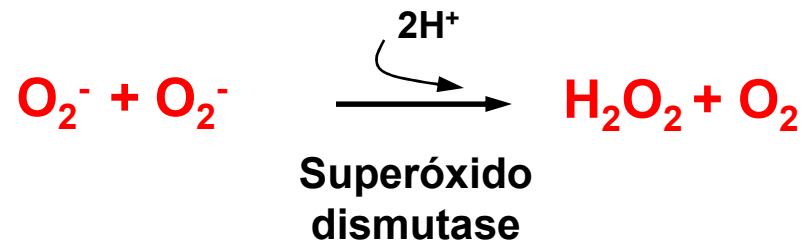
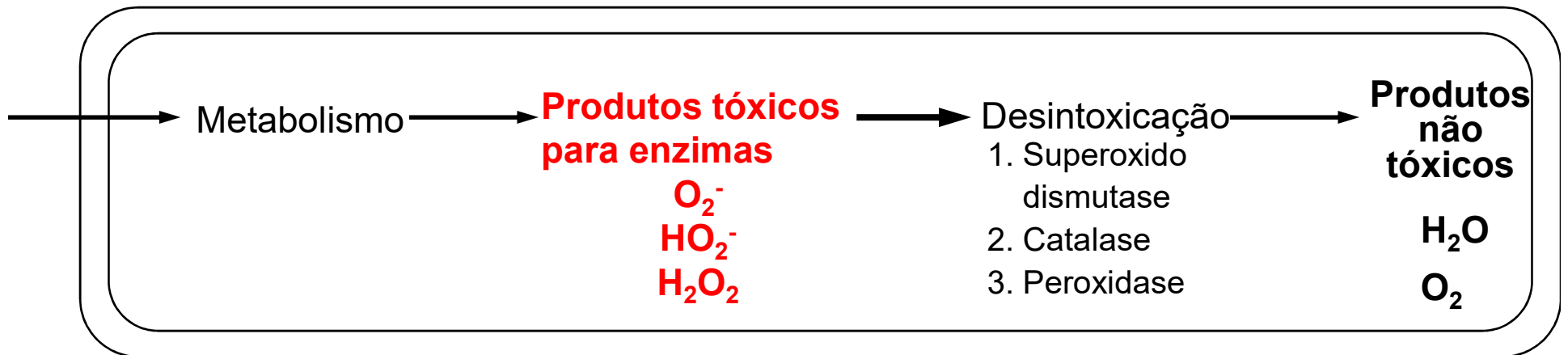
aerotolerantes: podem crescer na presença de O_2 , porém a energia é obtida por fermentação

3. Microaerófilas: precisam de um 5 – 10% de CO_2

Anaeróbico



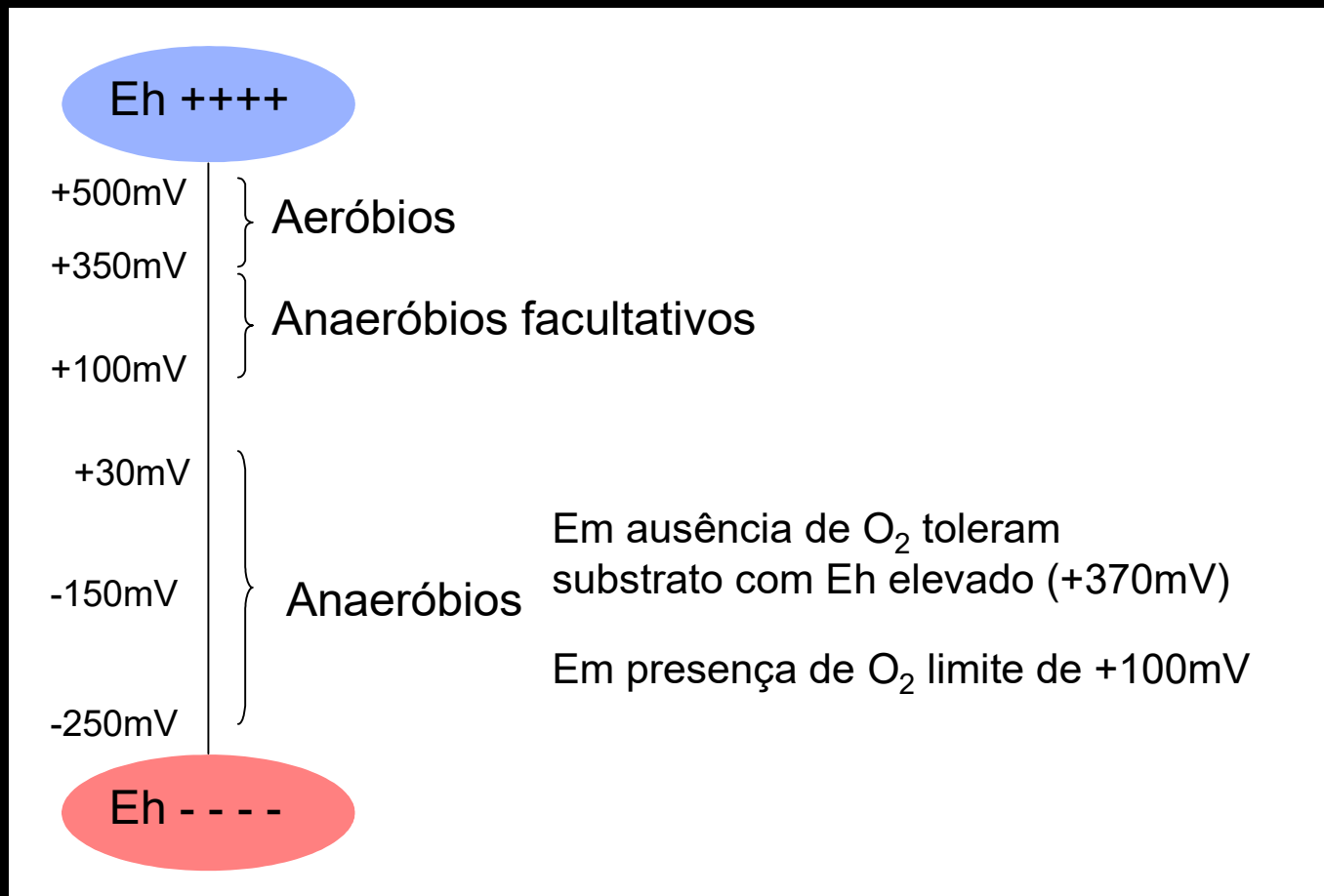
Aeróbio / Anaeróbio Facultativo



Potencial de oxi-redução (Eh)

- É a medida da tendência de um sistema reversível em ganhar ou perder elétrons (expresso em mV)
- Composto oxidado = Eh + + + +
- Composto reduzido = Eh - - - -

Potencial de oxi-redução (Eh)



Anaeróbios estritos
***Clostridium* spp.**



Câmara de Anaerobiose

Anaeróbios estrictos *Clostridium* spp.



Crescimento bacteriano

Fatores Ambientais : Atmosfera



Crescimento bacteriano

Efeito do oxigênio sobre o crescimento de vários tipos de bactérias

AERÓBIO
ESTRITOS

ANAERÓBIO
ESTRITO

ANAERÓBIO
FACULTATIVO

MICRO
AERÓFILO

ANAERÓBIO
AEROTOLERANTES



Crescimento bacteriano

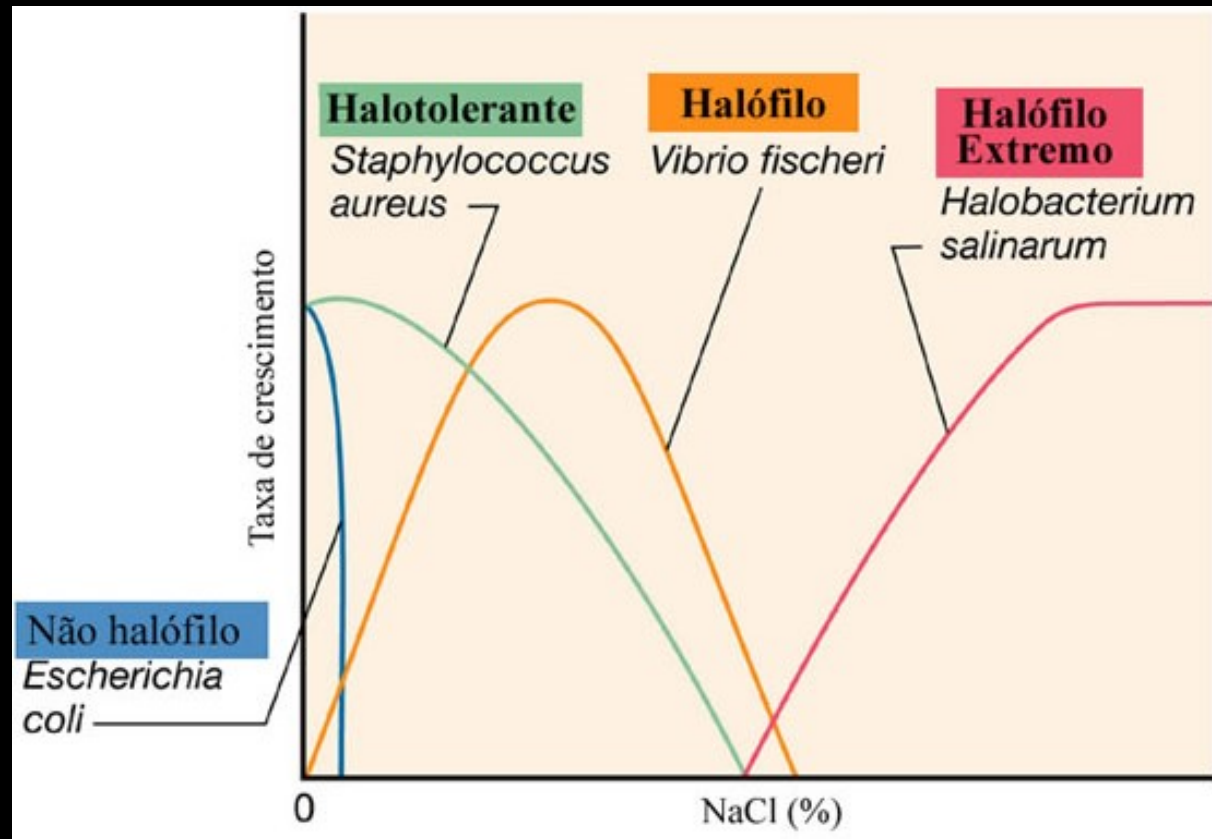
Fatores Ambientais : Pressão osmótica e força iônica

Não Halófilos: não necessitam de sal e não toleram a presença no meio.

Halotolerantes: não necessitam de sal mas toleram a presença no meio.

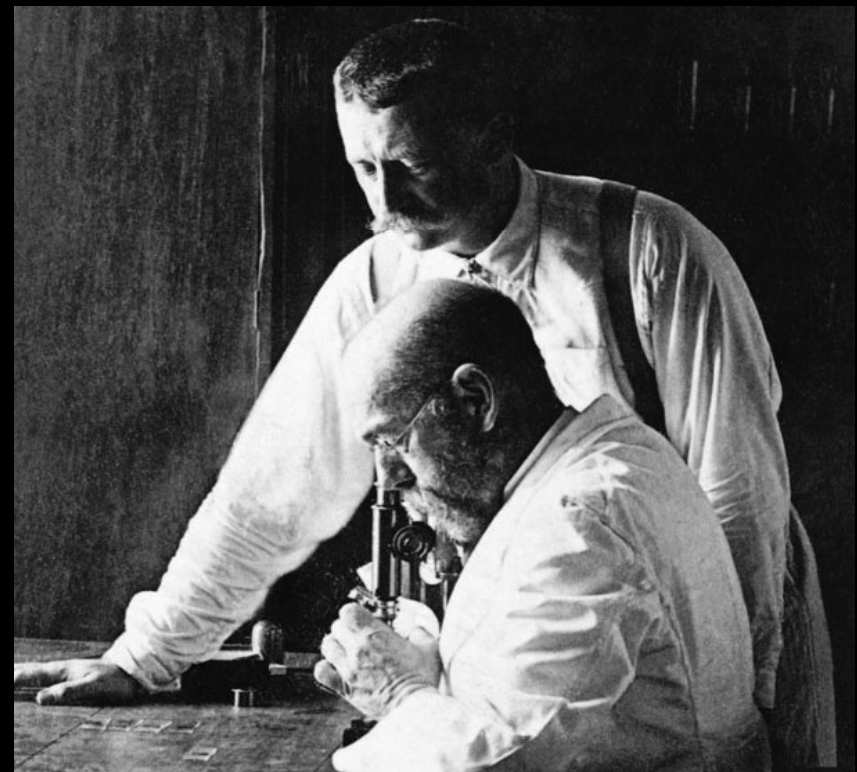
Halófilos: necessitam de sal em uma concentração moderada

Halófilos extremos: necessitam de sal em altas concentrações.



Crescimento bacteriano

Meios de cultura



Robert Koch (1843-1910)
Desenvolveu métodos de cultura pura

Crescimento bacteriano

Meios de cultura

Preparados estéreis que contém todos os nutrientes e elementos necessários para o desenvolvimento microbiano.

Segundo o estado físico se classificam em:

1. Meios líquidos
2. Meios semi-sólidos
3. Meios sólidos (ágar 1,5 – 2,0%)

Crescimento bacteriano

Meios Líquidos (caldo)



O crescimento bacteriano é detectado através da turbidez

Crescimento bacteriano

Meios semi-sólidos



Meio de transporte: cary-blair, stuart, amies

Crescimento bacteriano

Meios sólidos (Ágar)



Permite obter cultura pura de bactérias com colônias isoladas

Crescimento bacteriano

Meios de cultivo: composição química

Meios sintéticos: composto por substâncias químicas conhecidas (Bacto ágar, ágar peptona)

Meios complexos: além dos compostos químicos conhecidos contém extrato de carne, levedura, hidrolisados de proteína (TSB, TSA)

Crescimento bacteriano

Meios de cultivo: utilização

Meio comum (simples): crescimento de um grande número de bactérias



Trypticase soja ágar (TSA)

Micococcus luteus

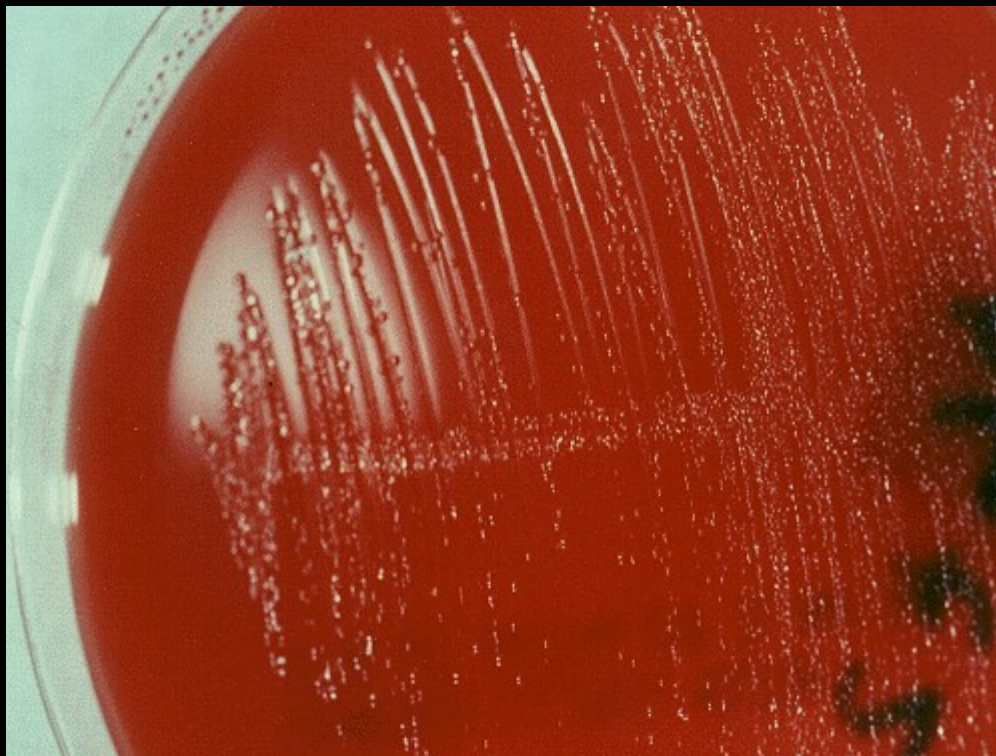
37° C / 24 h.

Aerobióses

Crescimento bacteriano

Meios de cultivo: utilização

Meio enriquecido: isolamento de bactérias exigentes, porém, crescem tanto Gram +/ Gram -



Ágar sangue:

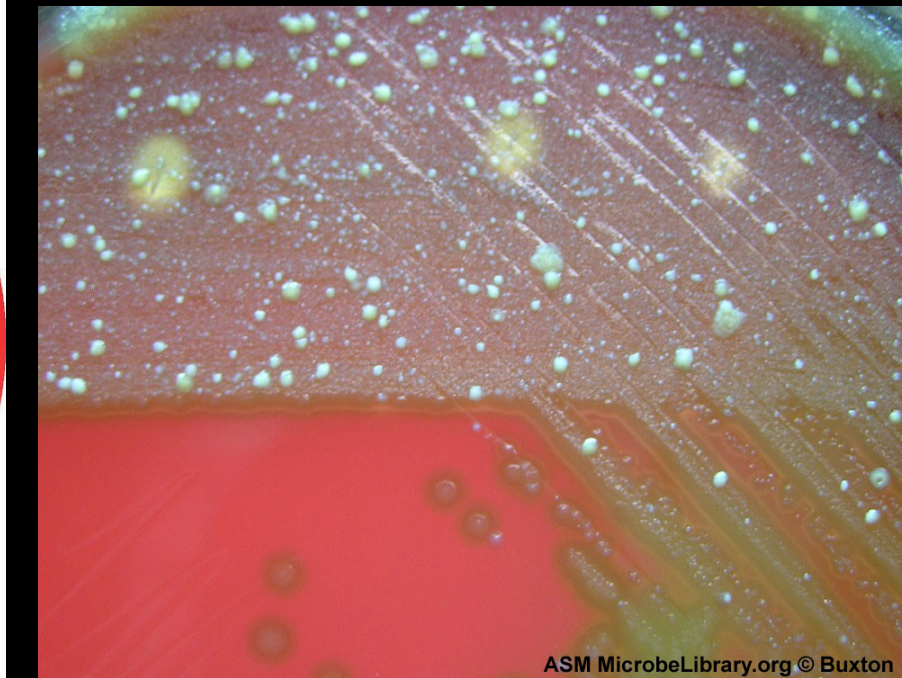
Ágar peptona + 5%
de sangue

Streptococcus spp.

Crescimento bacteriano

Meios de cultivo: utilização

O meio Ágar Sangue (AS) permite visualizar hemólise produzida pela expressão de hemolisinas



Crescimento bacteriano

Meios de cultivo: utilização

Meio enriquecido: isolamento de bactérias exigentes, porém, crescem tanto Gram +/ Gram -

Ágar chocolate:

Ágar peptona + 5% de sangue aquecida

Neisseria spp.



Crescimento bacteriano

Meios de cultivo: utilização

Meio seletivo: isolamento de uma bactéria previamente determinada.



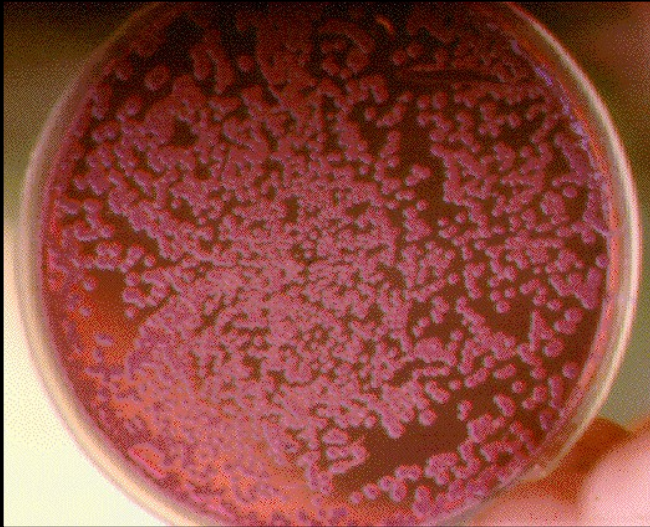
Ágar Mac Conkey:

Inibidores: sais
biliares e cristal
violeta

Crescimento seletivo de bactérias Gram negativas

Crescimento bacteriano

Meio seletivo indicador: isolamento de uma bactéria previamente determinada.



Lactose positiva



Lactose negativa

Ágar Mac Conkey:

Inibidores: sais biliares e cristal violeta

Indicador de pH: vermelho neutro

Crescimento bacteriano Gram positivo

Meio seletivo indicador: isolamento de uma bactéria previamente determinada.

Staphylococcus epidermidis
Manitol -



Staphylococcus aureus
Manitol +

Ágar Manitol Sal (Chapman):

Inibidores: NaCl 6,5%

Indicador de pH: vermelho de fenol

Crescimento bacteriano

Meio seletivo indicador: isolamento de uma bactéria previamente determinada.



sacarose positiva



sacarose negativa

Ágar TCBS: (tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose):

Inibidores: sais biliares e cristal violeta

Indicador de pH: azul de bromotimol

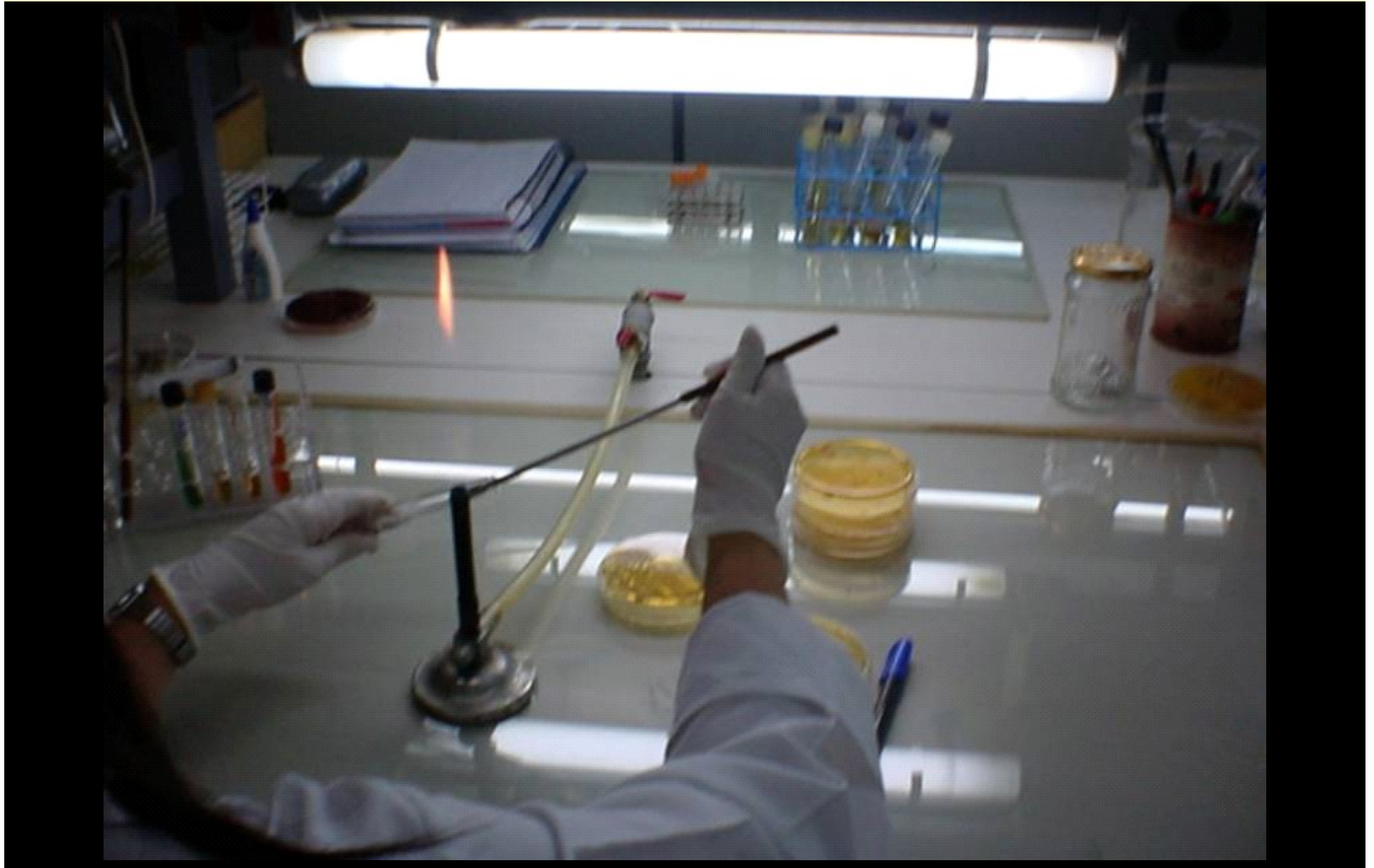
Cultivo e isolamento de bactérias



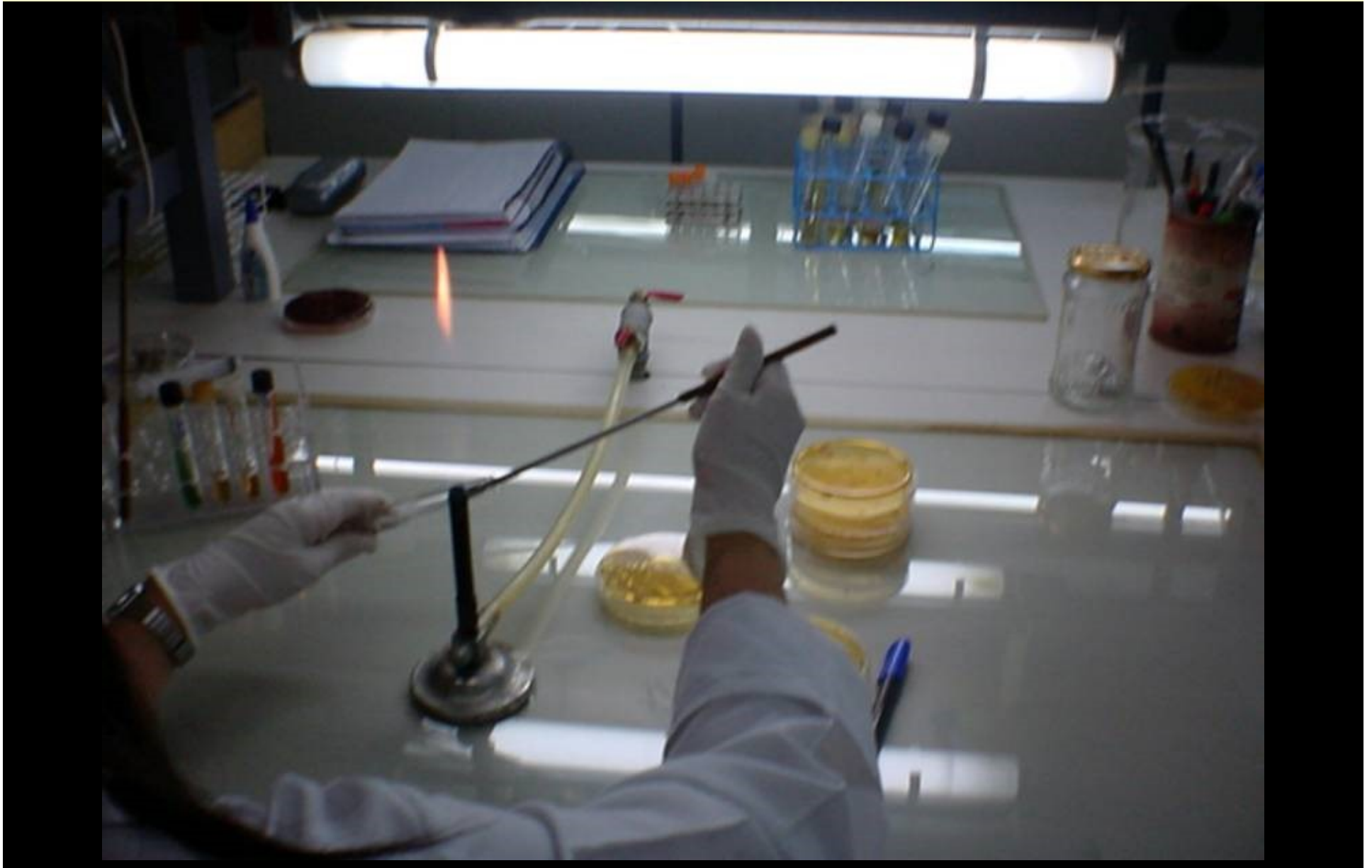
Cultivo e isolamento de bactérias



Cultivo e isolamento de bactérias



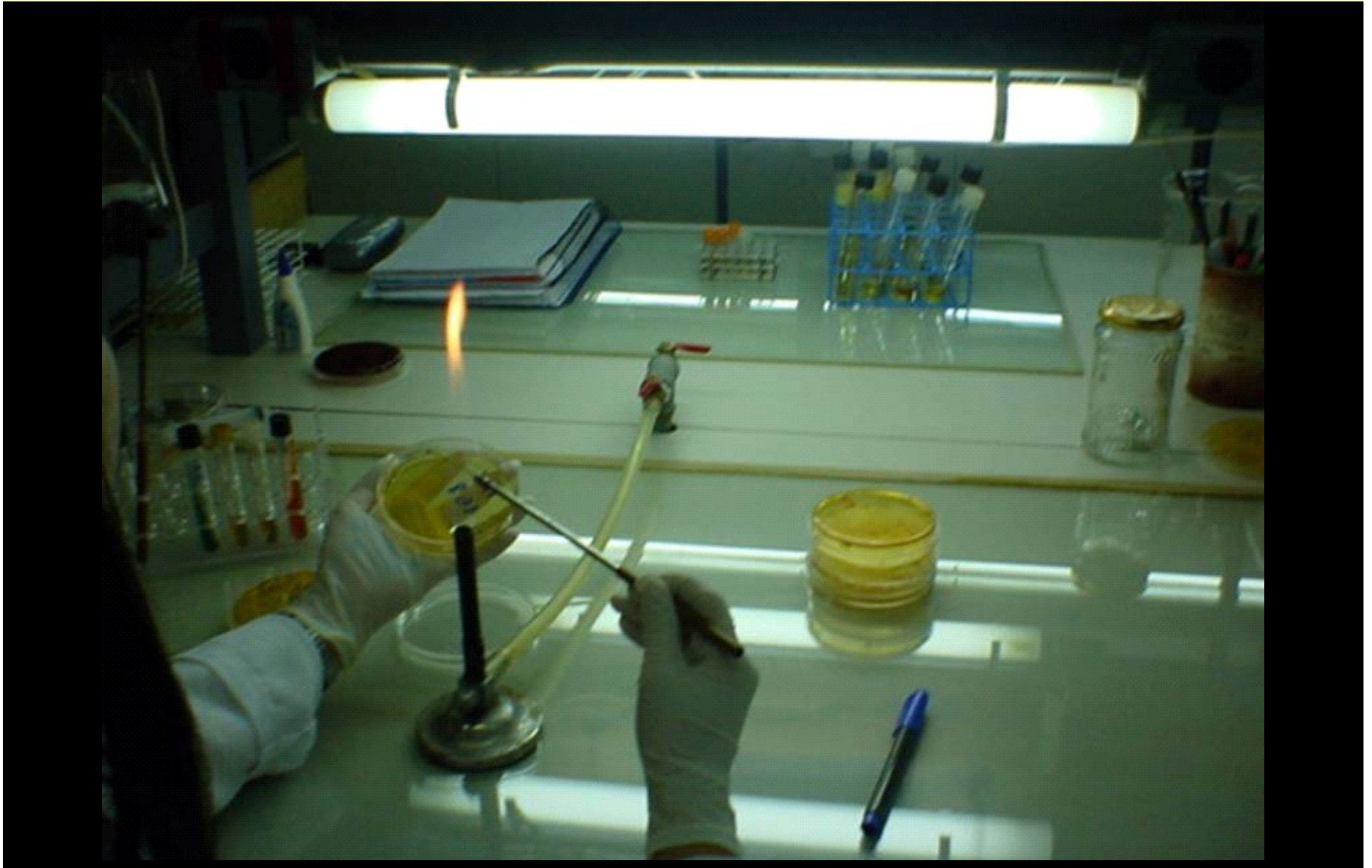
Cultivo e isolamento de bactérias



Cultivo e isolamento de bactérias



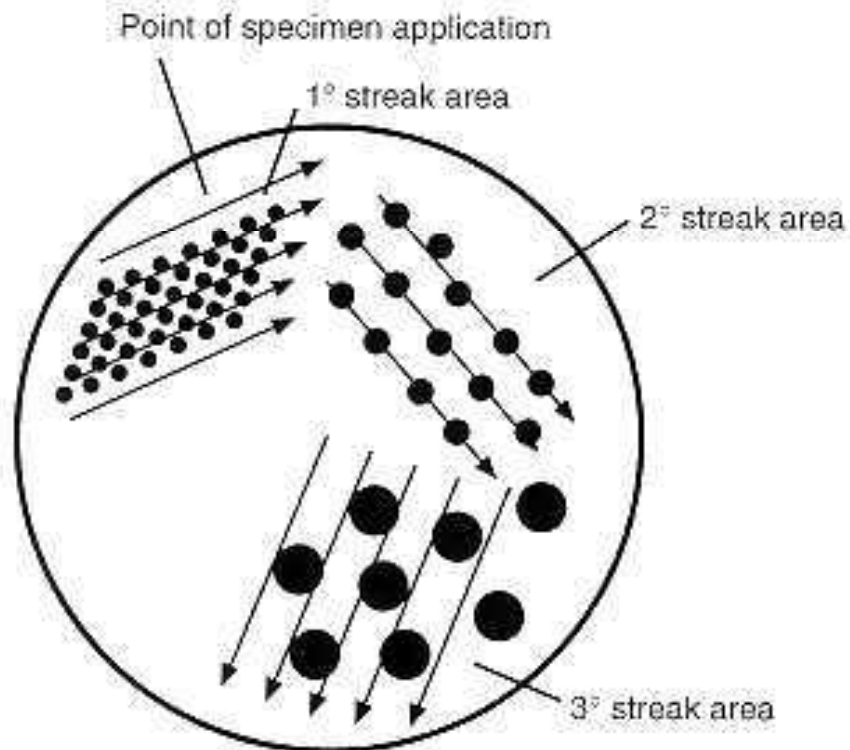
Cultivo e isolamento de bactérias



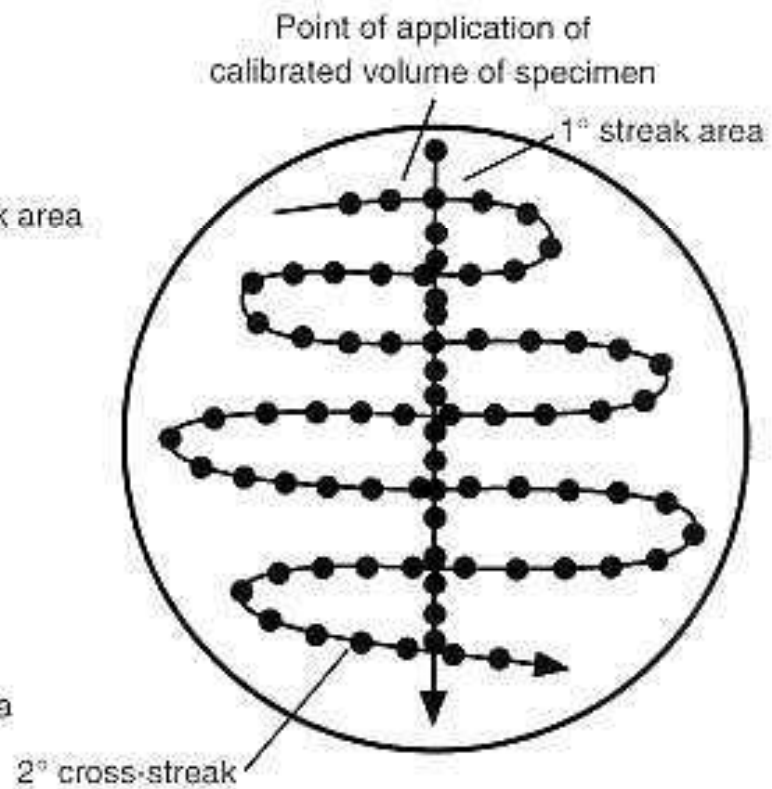
Obtenção de Cultura Pura

Culture Plate Methods

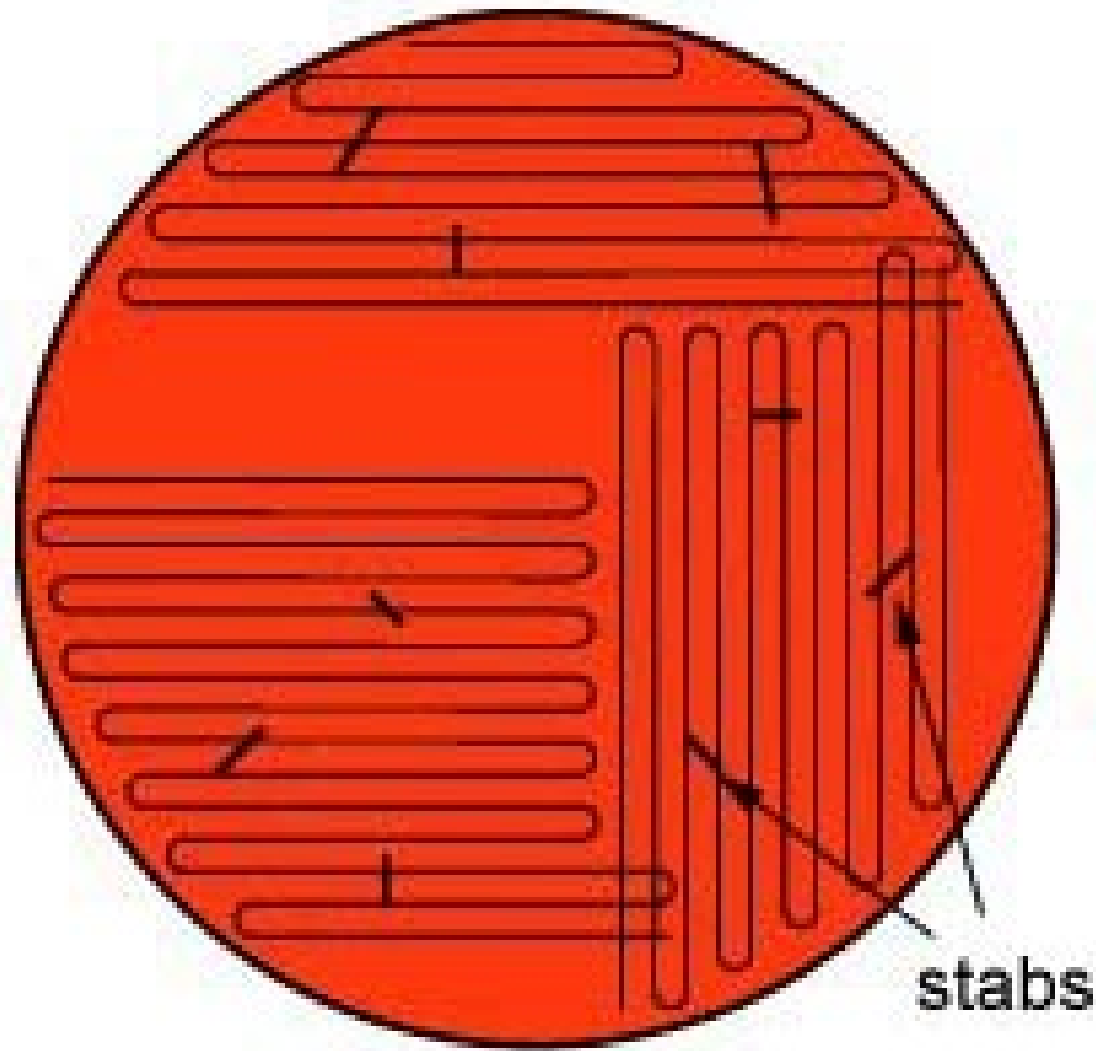
Semi-quantitative



Quantitative



Técnica de esgotamento do inóculo



Cultivo e isolamento de bactérias



Cultivo e isolamento de bactérias

Condições da incubação

- ✓ Atmosfera (O_2 , CO_2)
- ✓ Temperatura ($37^\circ C$ $42^\circ C$)
- ✓ Período (24h...48h.....)

Cultivo e isolamento de bactérias



Incubação 37° C x 24 H

Atmosfera:

Aerobiose ou

Microaerofilia ou

Anaerobiose

Cultivo e isolamento de bactérias



Cultura pura

Colônias isoladas:
agrupamento de
bactérias da mesma
espécie

Morfologias das colônias

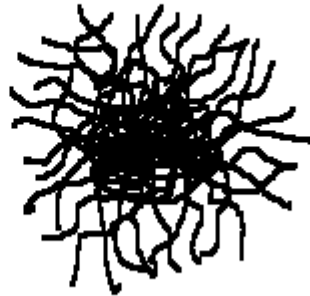
Form



Circular



Irregular



Filamentous



Rhizoid

Elevation



Raised

Convex

Flat

Umbonate

Crateriform

Margin



Entire



Undulate



Filiform

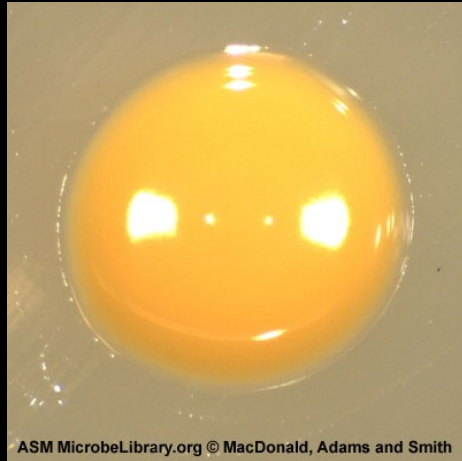


Curled



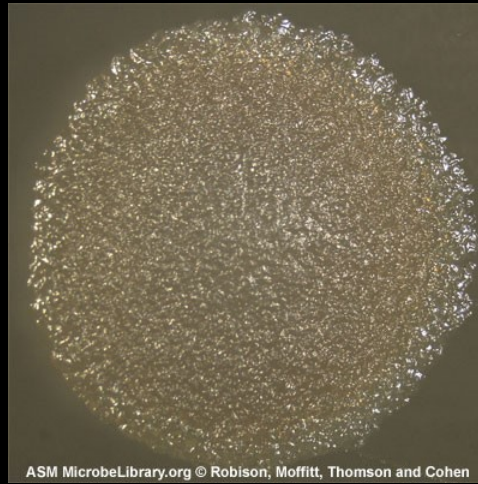
Lobate

Morfologias das colônias



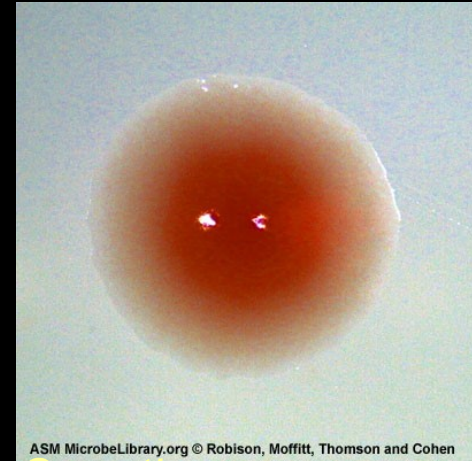
ASM MicrobeLibrary.org © MacDonald, Adams and Smith

S. aureus



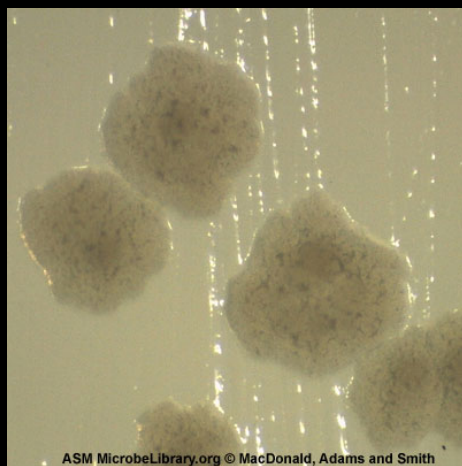
ASM MicrobeLibrary.org © Robison, Moffitt, Thomson and Cohen

Bacillus anthracis



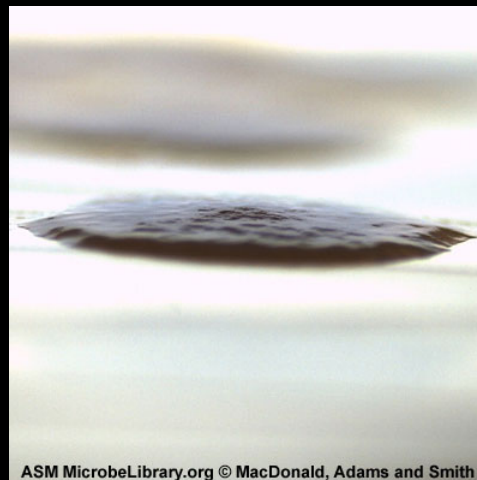
ASM MicrobeLibrary.org © Robison, Moffitt, Thomson and Cohen

Serratia marcescens



ASM MicrobeLibrary.org © MacDonald, Adams and Smith

Mycobacterium smegmatis



ASM MicrobeLibrary.org © MacDonald, Adams and Smith

Pseudomonas spp.



ASM MicrobeLibrary.org © MacDonald, Adams and Smith

Nocardia asteroides