

**Curso de
Microbiologia/Bacteriologia**

Fisiologia Bacteriana

Dr Marcio V. B. Dias

Fisiologia Bacteriana

-nutrição

-metabolismo

-crescimento

Nutrição Bacteriana

Parte da fisiologia bacteriana que envolve o fornecimento de monômeros que as células necessitam para o crescimento. Esses “monômeros” são substâncias denominadas **nutrientes**

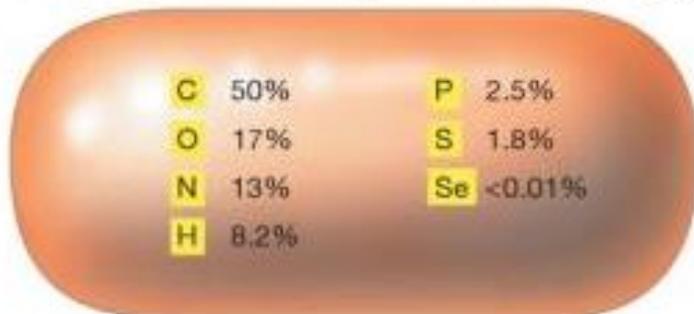


Organismos diferentes = requerem conjuntos e quantidades distintas de nutrientes

Macronutrientes: necessários em grande quantidades

Micronutrientes: necessários em quantidade traço

Essential elements as a percent of cell dry weight



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

Macronutrientes

<i>Element</i>	<i>Physiological function</i>	<i>Required concentration (mol l⁻¹)</i>
Carbon	Constituent of organic cellular material. Often the energy source.	$>10^{-2}$
Nitrogen	Constituent of proteins, nucleic acids and coenzymes.	10^{-3}
Hydrogen	Organic cellular material and water.	—
Oxygen	Organic cellular material and water.	—
Sulfur	Required for aerobic respiration. Constituent of proteins and certain coenzymes.	10^{-4}
Phosphorus	Constituent of nucleic acids, phospholipids, nucleotides and certain coenzymes.	10^{-4} to 10^{-2}
Potassium	Principal inorganic cation in the cell and cofactor for some enzymes.	10^{-4} to 10^{-3}
Magnesium	Cofactor for many enzymes, chlorophylls (photosynthetic microbes) and present in cell walls and membranes.	10^{-4} to 10^{-3}

Micronutrientes ou elementos traço

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

<i>Element</i>	<i>Cellular function or molecule of which a part</i>
Boron (B)	Autoinducer for quorum sensing in bacteria; also found in some polyketide antibiotics
Chromium (Cr)	Possible but not proven component for glucose metabolism (necessary in mammals)
Cobalt (Co)	Vitamin B ₁₂ ; transcobalamin (only in propionic acid bacteria)
Copper (Cu)	In respiration, cytochrome c oxidase; in photosynthesis, plastocyanin, some superoxide dismutases
Iron (Fe) ^b	Cytochromes; catalases; peroxidases; iron-sulfur proteins; oxygenases; all nitrogenases
Manganese (Mn)	Activator of many enzymes; component of certain superoxide dismutases and of the water-splitting enzyme in oxygenic phototrophs (photosystem II)
Molybdenum (Mo)	Certain flavin-containing enzymes; some nitrogenases, nitrate reductases, sulfite oxidases, DMSO-TMAO reductases; some formate dehydrogenases
Nickel (Ni)	Most hydrogenases; coenzyme F ₄₃₀ of methanogens; carbon monoxide dehydrogenase; urease
Selenium (Se)	Formate dehydrogenase; some hydrogenases; the amino acid selenocysteine
Tungsten (W)	Some formate dehydrogenases; oxotransferases of hyperthermophiles
Vanadium (V)	Vanadium nitrogenase; bromoperoxidase
Zinc (Zn)	Carbonic anhydrase; alcohol dehydrogenase; RNA and DNA polymerases; and many DNA-binding proteins

^aNot every micronutrient listed is required by all cells; some metals listed are found in enzymes or cofactors present in only specific microorganisms.

^bNeeded in greater amounts than other trace metals.

Fatores de crescimento = são compostos orgânicos que também são necessários em pequenas quantidades

Vitaminas e co-fatores como ácido p-aminobenzóico, biotina, piridoxal, riboflavina

Meios de cultura = são soluções nutrientes utilizadas para promover o crescimento de microorganismos em laboratório



Imobilização de células



Semisólidos e líquidos

Classes de meios de cultura

-Meios definidos :

- apresentam quantidades precisas de compostos químicos inorgânicos e orgânicos;
- composição exata é conhecida;

-Meios complexos:

- apresentam quantidades indefinidas de substâncias nutritivas, porém impuras, como produtos animais ou vegetais;
- a composição nutricional exata é perdida;

-Meios enriquecidos:

- corresponde a um meio complexo, acrescidos de nutrientes adicionais;



**Defined culture medium
for Escherichia coli**

K_2HPO_4 7 g
 KH_2PO_4 2 g
 $(NH_4)_2SO_4$ 1 g
 $MgSO_4$ 0.1 g
 $CaCl_2$ 0.02 g
Glucose 4–10 g
Trace elements (Fe, Co, Mn, Zn,
Cu, Ni, Mo) 2–10 μ g each
Distilled water 1000 ml
pH 7



(a)

**Complex culture medium for either
E. coli or L. mesenteroides**

Glucose 15 g
Yeast extract 5 g
Peptone 5 g
 KH_2PO_4 2 g
Distilled water 1000 ml
pH 7



(b)

Meio seletivo:

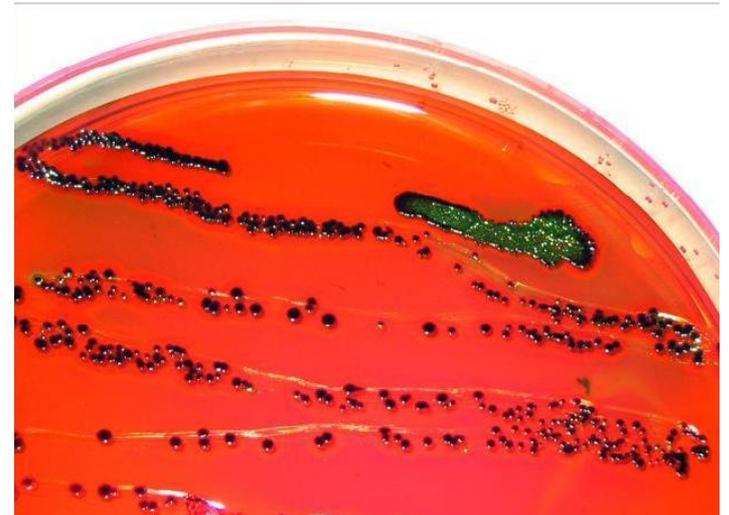
Apresenta compostos que inibem seletivamente o crescimento de algum microorganismo



Meio MacConkey

Meio diferencial:

Apresenta um indicador que permite a diferenciação de reações químicas particulares



Meio eosina azul de metileno

Necessidades nutricionais das bactérias

Defined culture medium for *Escherichia coli*

K_2HPO_4 7 g
 KH_2PO_4 2 g
 $(NH_4)_2SO_4$ 1 g
 $MgSO_4$ 0.1 g
 $CaCl_2$ 0.02 g
 Glucose 4–10 g
 Trace elements (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2–10 μ g each
 Distilled water 1000 ml
 pH 7



(a)

Defined culture medium for *Leuconostoc mesenteroides*

K_2HPO_4 0.6 g
 KH_2PO_4 0.6 g
 NH_4Cl 3 g
 $MgSO_4$ 0.1 g
 Glucose 25 g
 Sodium acetate 25 g
 Amino acids (alanine, arginine, asparagine, aspartate, cysteine, glutamate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine) 100–200 μ g of each
 Purines and pyrimidines (adenine, guanine, uracil, xanthine) 10 mg of each
 Vitamins (biotin, folate, nicotinic acid, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxine, riboflavin, thiamine, pantothenate, *p*-aminobenzoic acid) 0.01–1 mg of each
 Trace elements (as in first column) 2–10 μ g each
 Distilled water 1000 ml
 pH 7

Complex culture medium for either *E. coli* or *L. mesenteroides*

Glucose 15 g
 Yeast extract 5 g
 Peptone 5 g
 KH_2PO_4 2 g
 Distilled water 1000 ml
 pH 7

Defined culture medium for *Thiobacillus thioiparus*

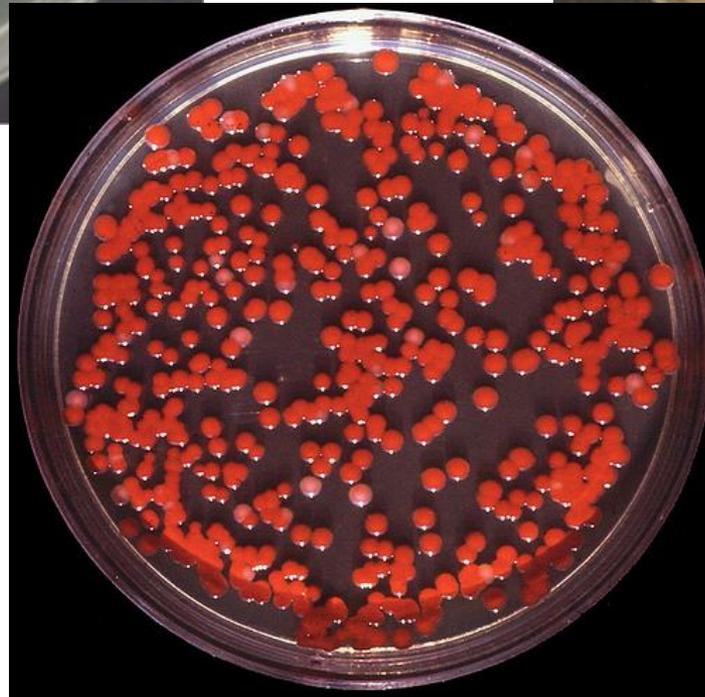
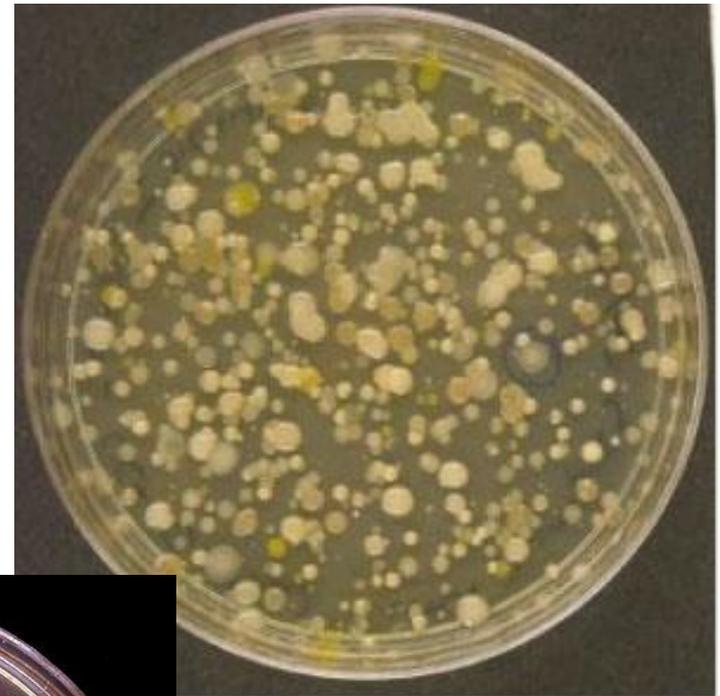
KH_2PO_4 0.5 g
 NH_4Cl 0.5 g
 $MgSO_4$ 0.1 g
 $CaCl_2$ 0.05 g
 KCl 0.5 g
 $Na_2S_2O_3$ 2 g
 Trace elements (as in first column)
 Distilled water 1000 ml
 pH 7
 Carbon source: CO_2 from air



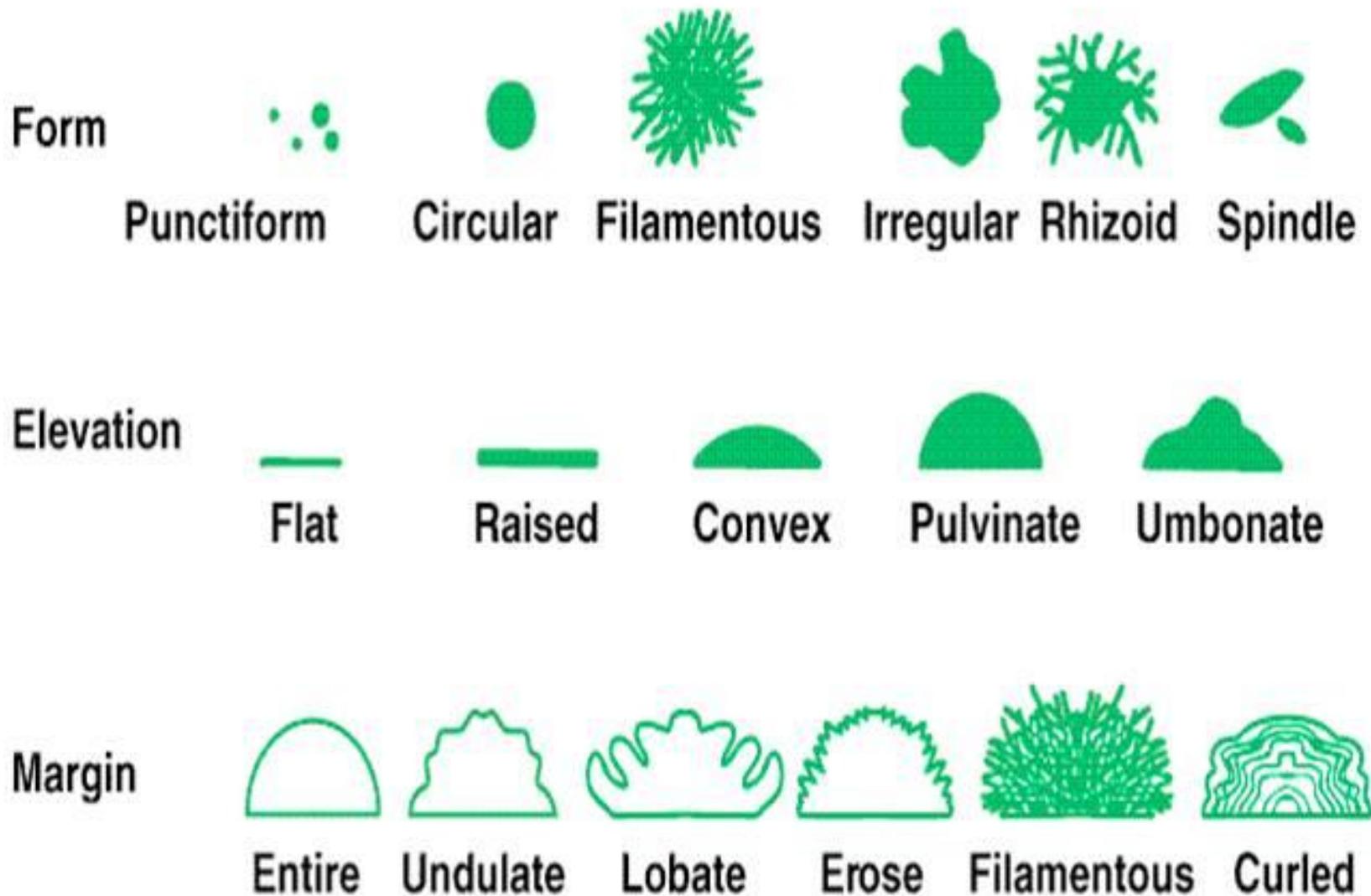
(b)

²The photos are tubes of (a) the defined medium described, and (b) the complex medium described. Note how the complex medium is colored from the various organic extracts and digests that it contains. Photo credits: Cheryl L. Broadie and John Vercillo, Southern Illinois University at Carbondale.

Meios sólidos - Colônias



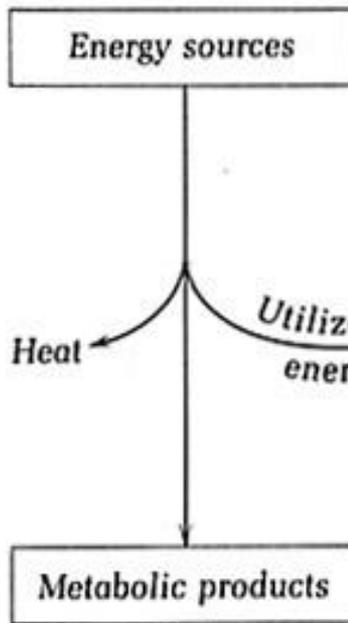
Morfologia das colônias



Metabolismo e diversidade catabólica

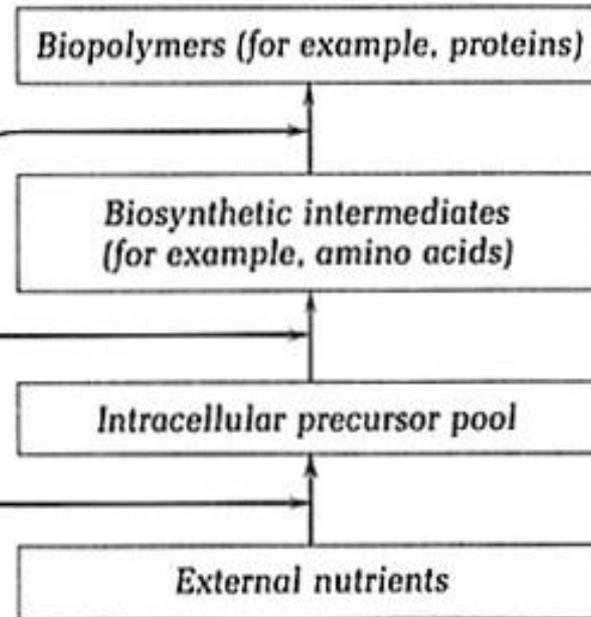
Catabolismo

Energy-yielding metabolism



Anabolismo

Biosynthetic metabolism



Diversidade catabólica das bactérias

Obtenção de carbono:

Autotróficos e fotoautotróficos

Heterotróficos

Necessidade de oxigênio:

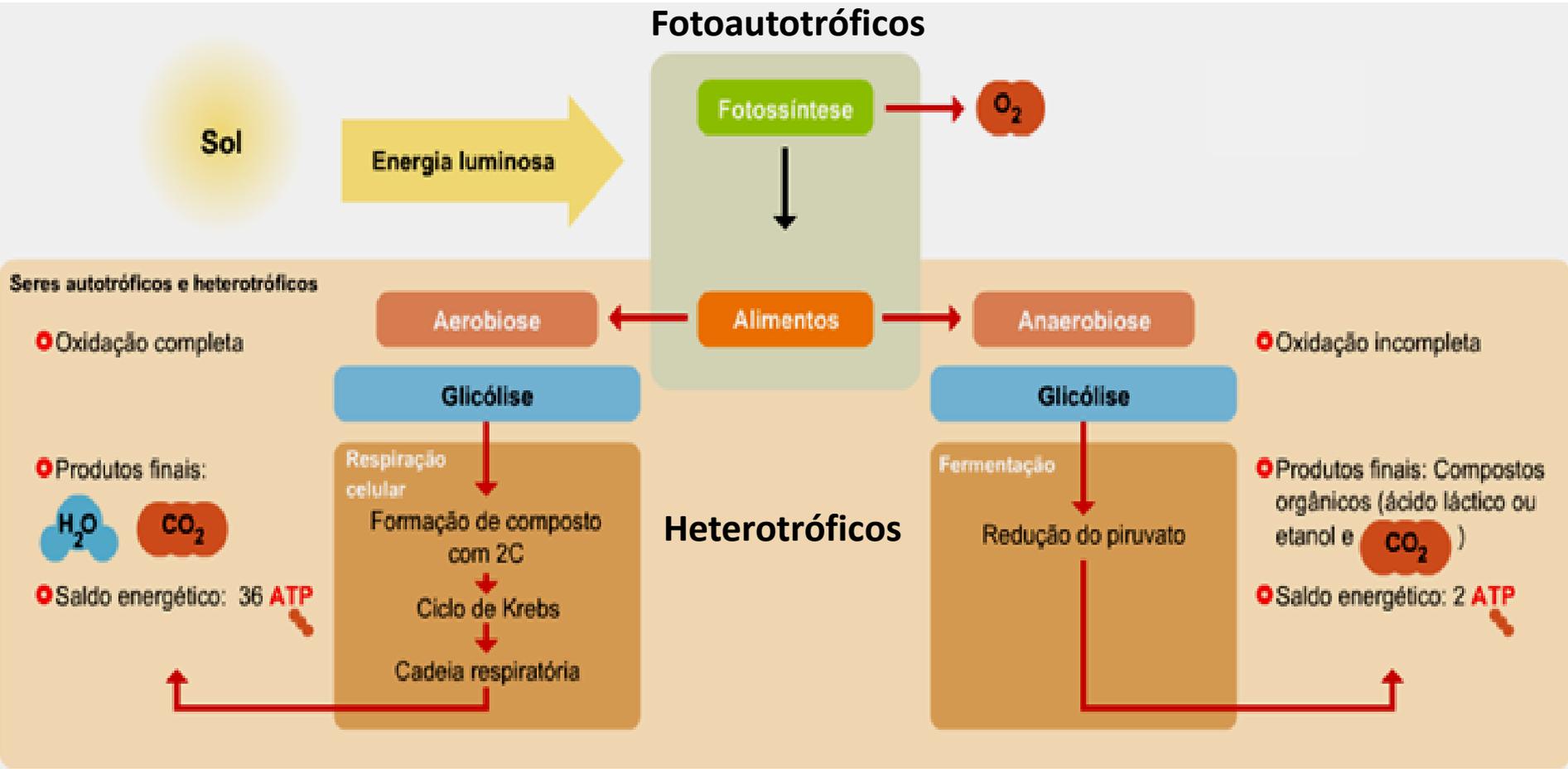
Respiração anaeróbia

Respiração aeróbia

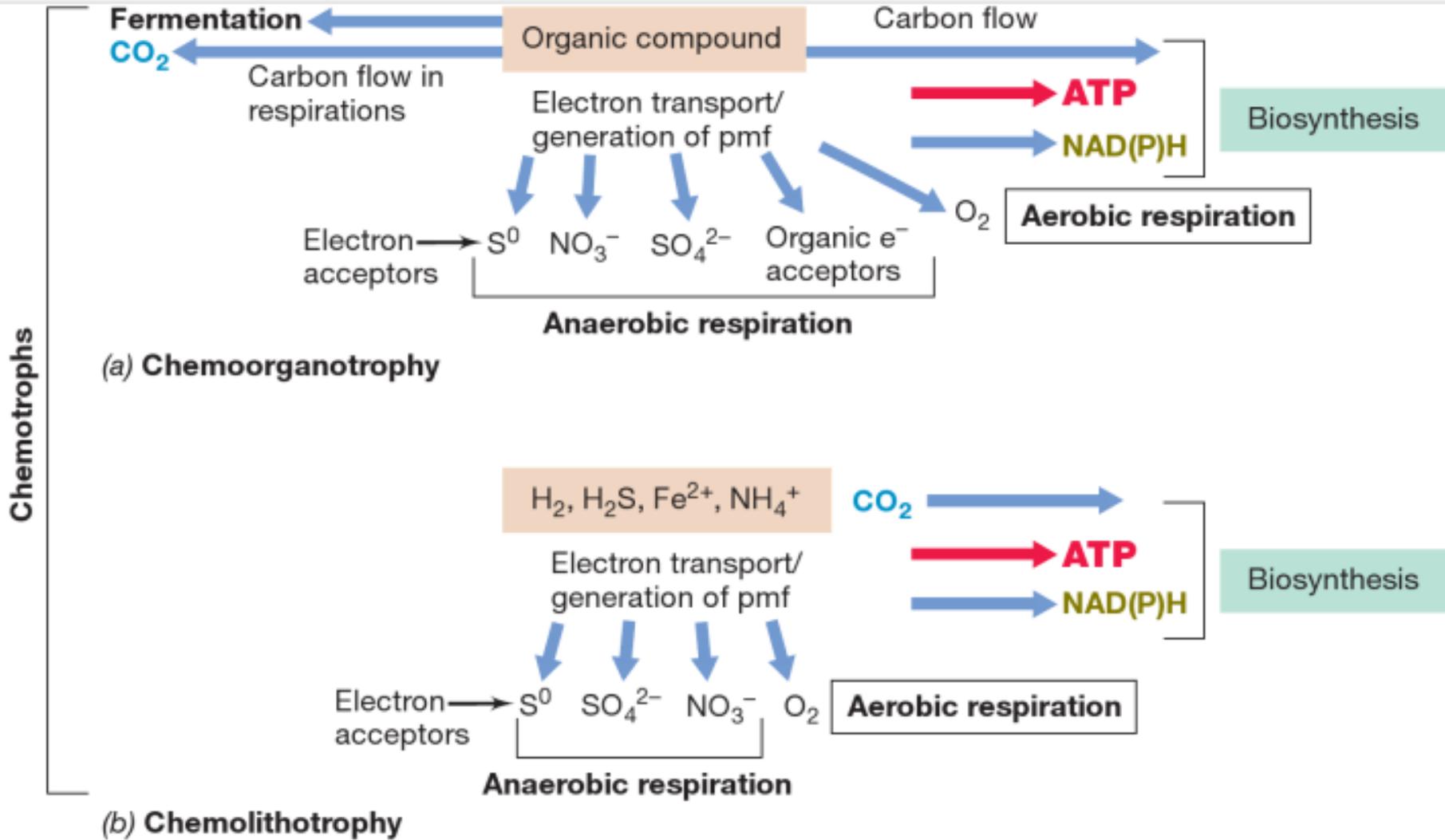
Doadores de elétrons:

Quimiolitotrofia

Quimiorganotrofia



Diversidade catabólica



Crescimento bacteriano

Pode ser considerado em dois níveis:

-individual

-populacional

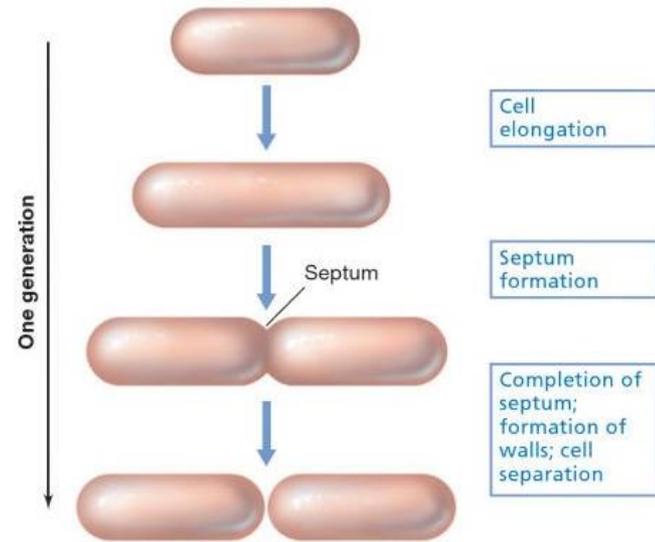
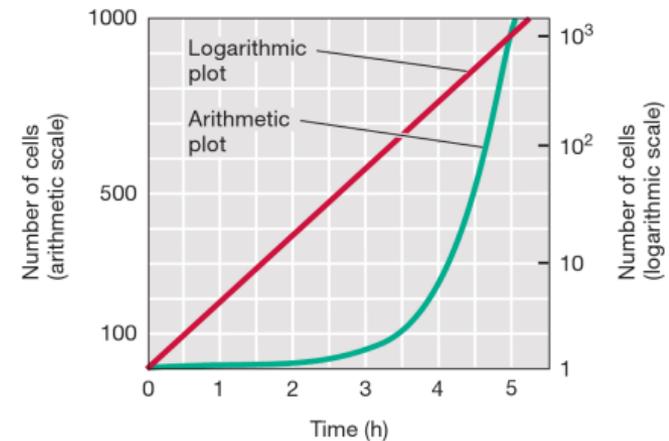


Figure 5.1 Binary fission in a rod-shaped prokaryote. Cell numbers double every generation.

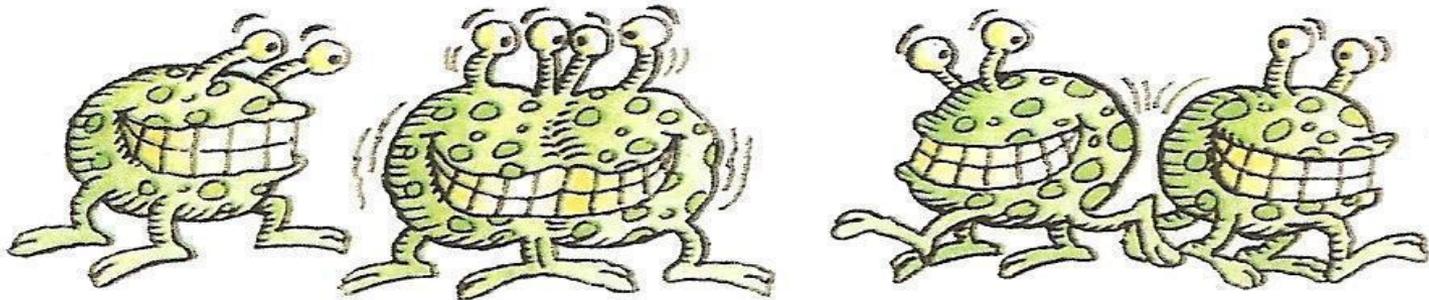


(b)

Figure 5.8 The rate of growth of a microbial culture. (a) Data for a population that doubles every 30 min. (b) Data plotted on arithmetic (left ordinate) and logarithmic (right ordinate) scales.

Crescimento bacteriano

O crescimento microbiano é definido como um aumento do número de células de uma população



Bactérias multiplicam-se por divisão binária

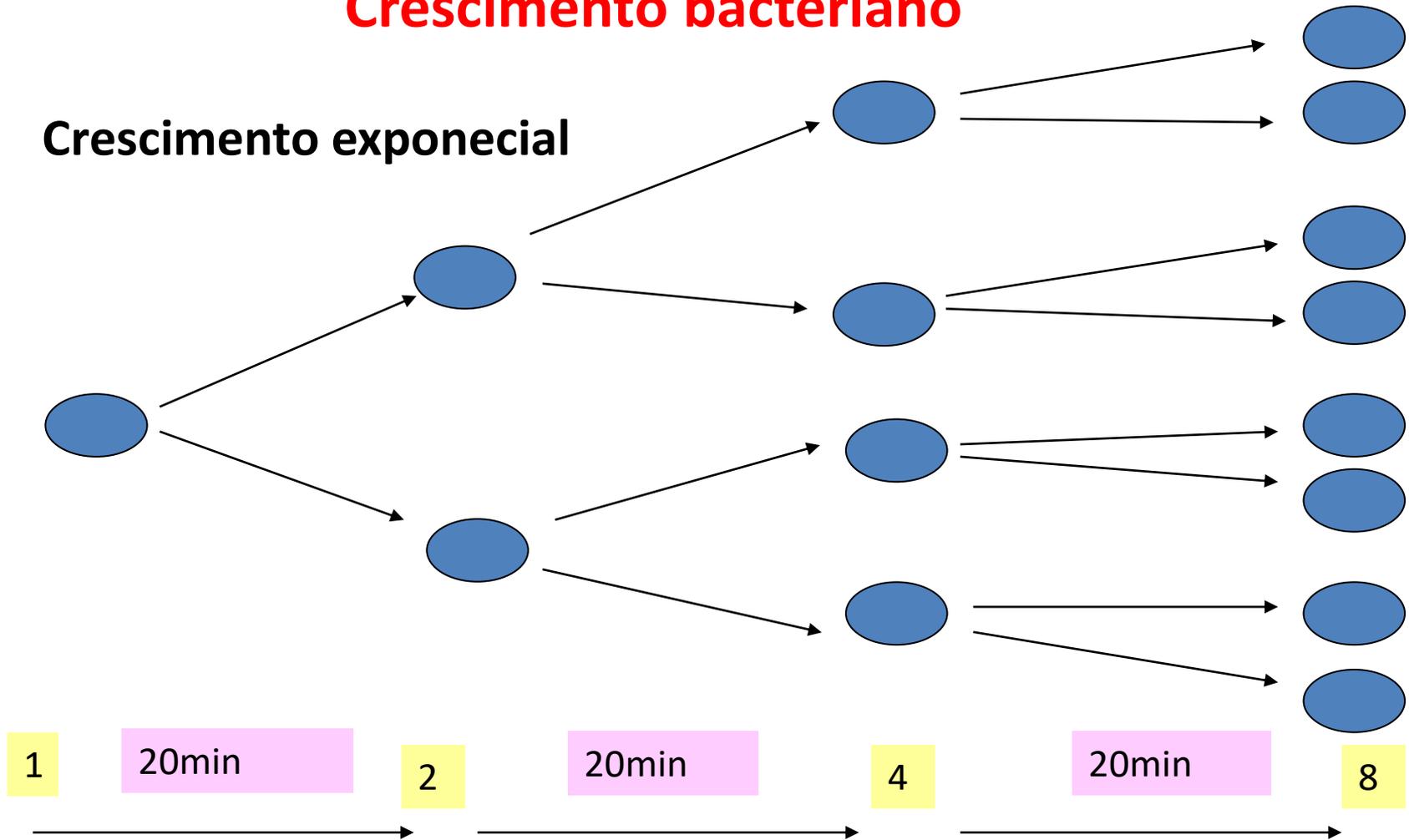


Durante a divisão celular uma célula se transforma em duas

O tempo de geração é variável entre as bactérias

Crescimento bacteriano

Crescimento exponencial



$$X = x_0 \cdot 2^n$$

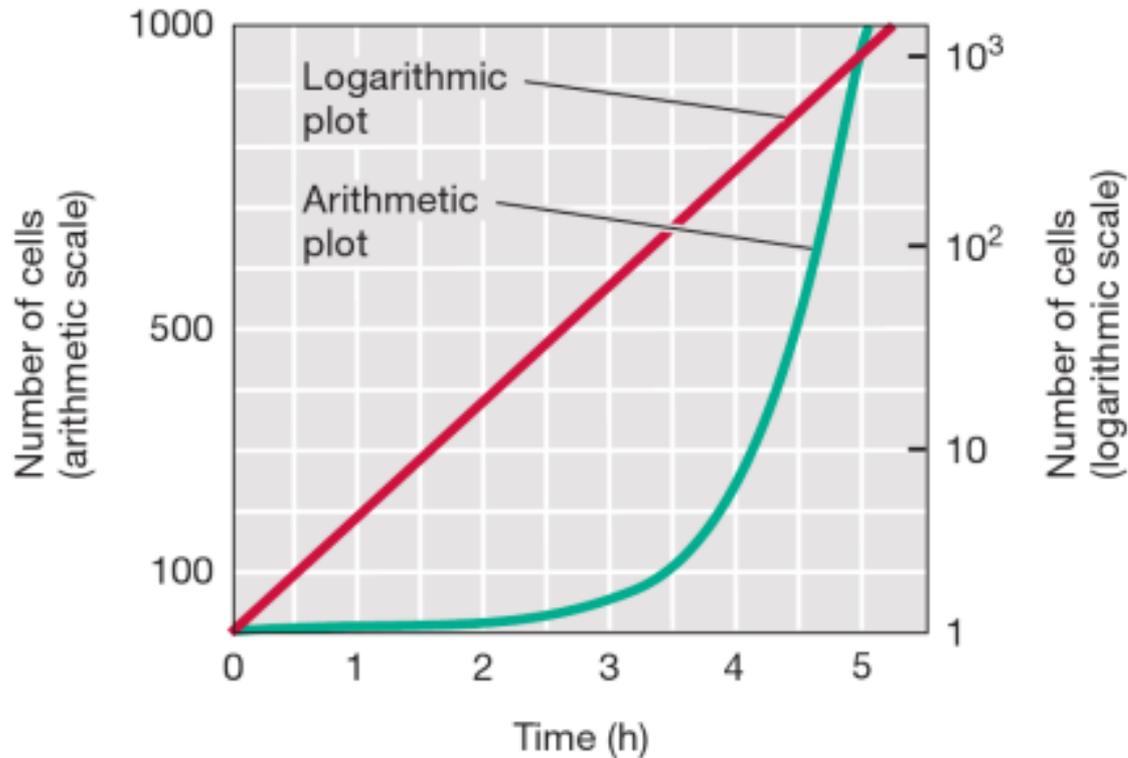
Onde n =
número de
gerações

$$X = 1 \cdot 2^3$$

$$X = 8$$

Crescimento bacteriano

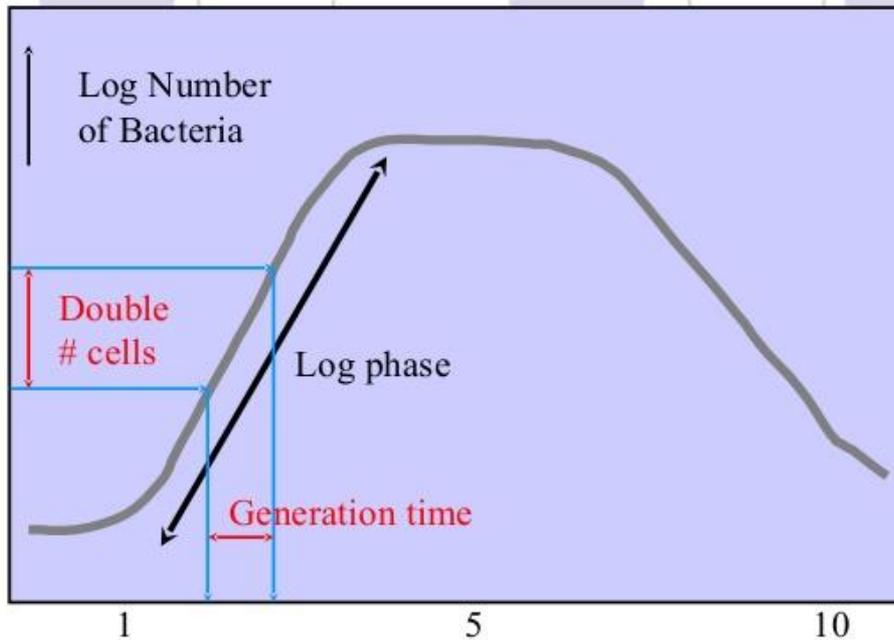
Crescimento exponencial



(b)

Figure 5.8 The rate of growth of a microbial culture. (a) Data for a population that doubles every 30 min. (b) Data plotted on arithmetic (left ordinate) and logarithmic (right ordinate) scales.

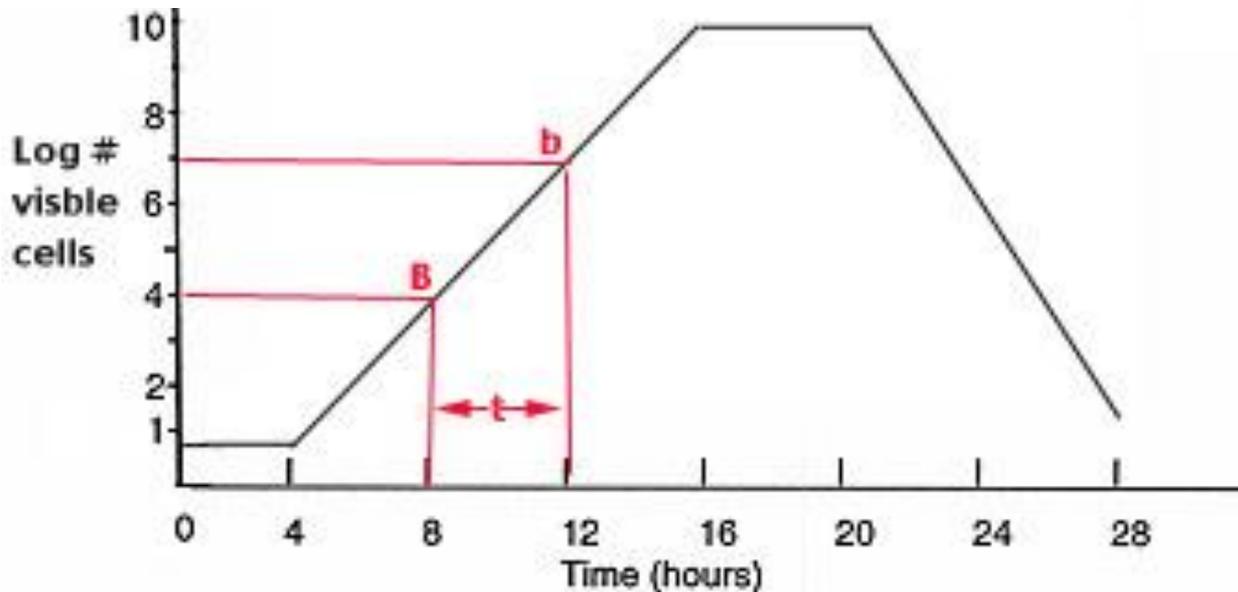
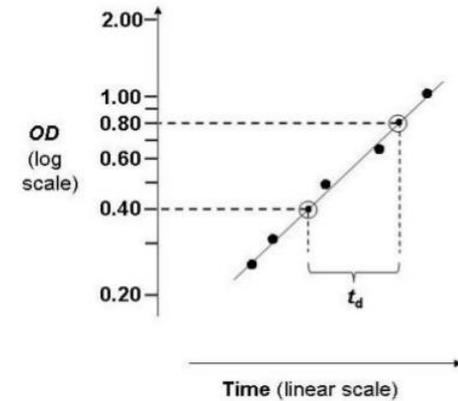
Calculation of Generation Time



07.09.08

DT Anis (h) work

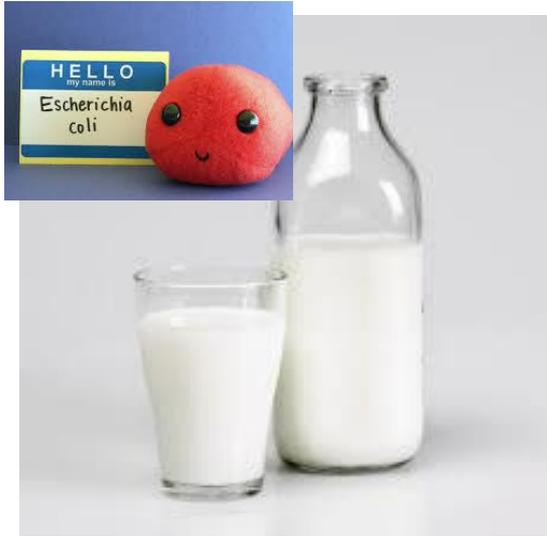
Calculating doubling (generation) time from an OD measurement (indirect method):



g = tempo de geração
 $1/g$ = taxa de divisão ou número de gerações

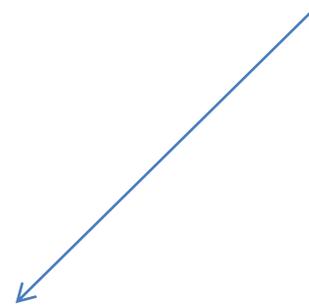
Crescimento bacteriano

Tempo de geração = 20 minutos



2 horas

$$X = 1 \times 2^6 = 64$$



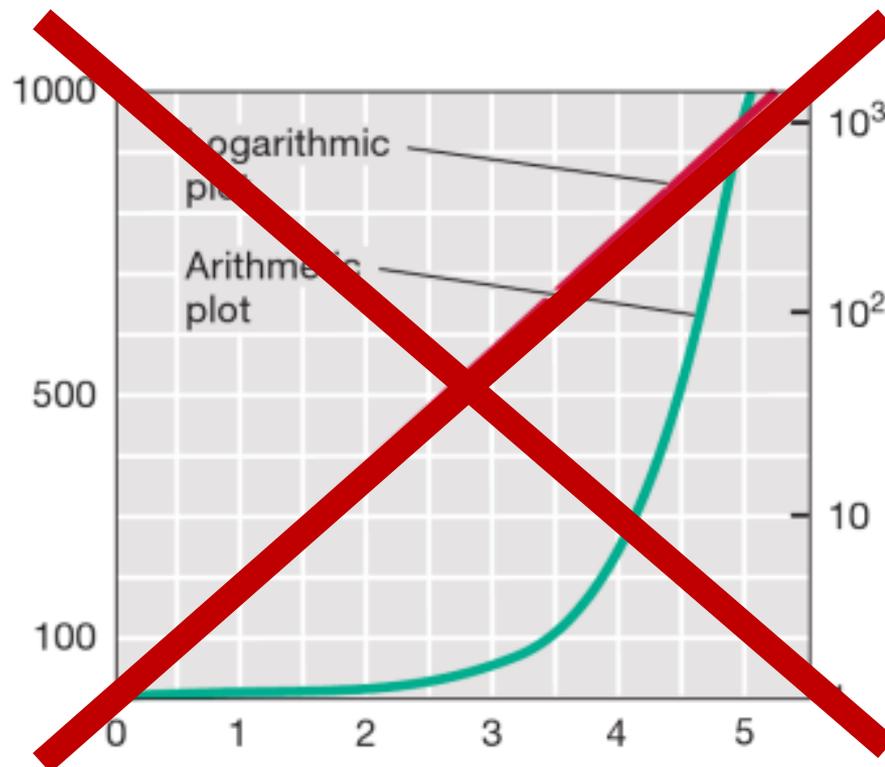
24 horas



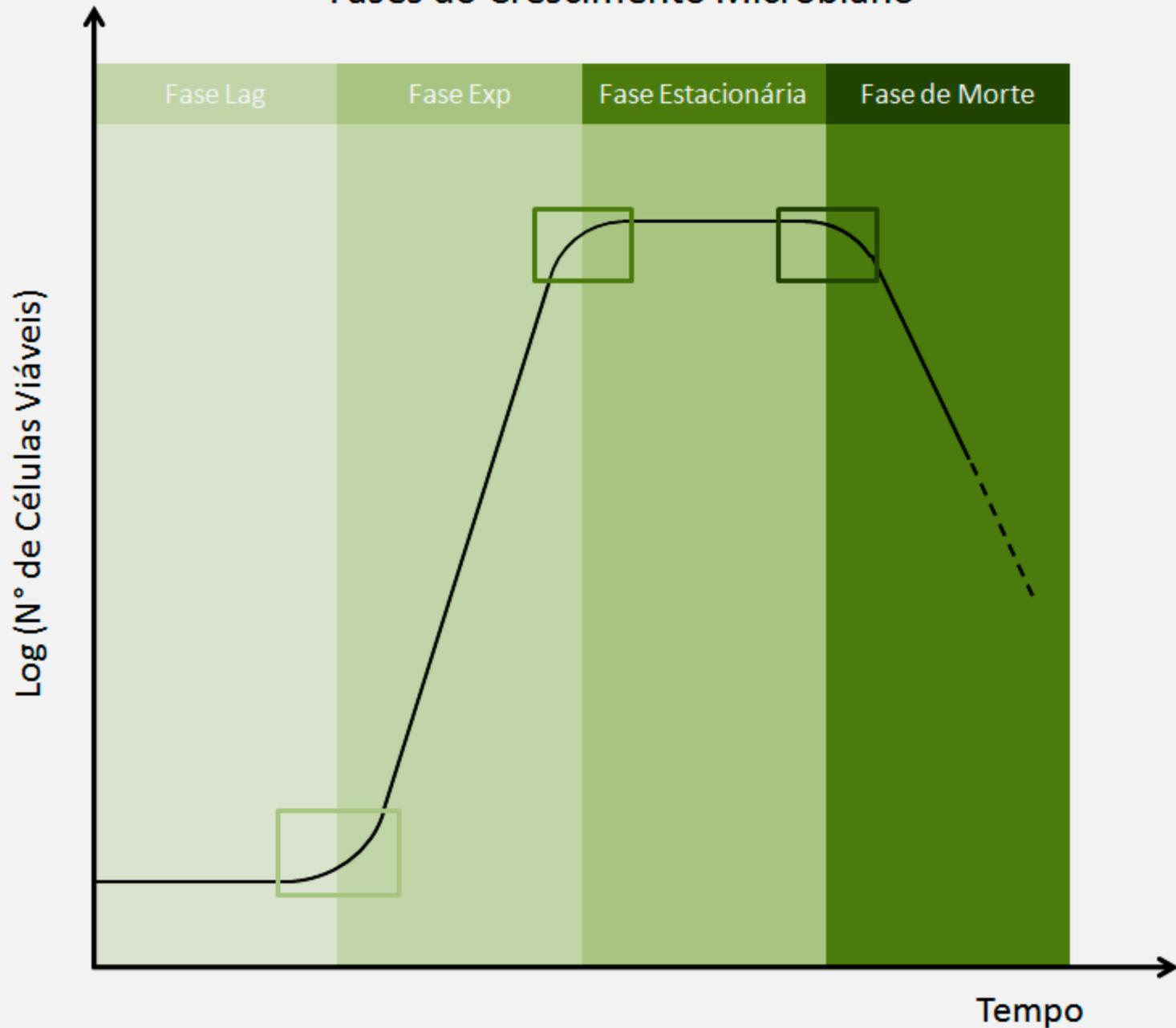
$$X = 1 \times 2^{72} = 4.7 \times 10^{21}$$

O ciclo de crescimento bacteriano

O crescimento exponencial não continua indefinitamente



Fases do Crescimento Microbiano



Fases do ciclo de crescimento microbiano:

-Fase Lag

-Tempo para adaptação ao meio

-Fase exponencial

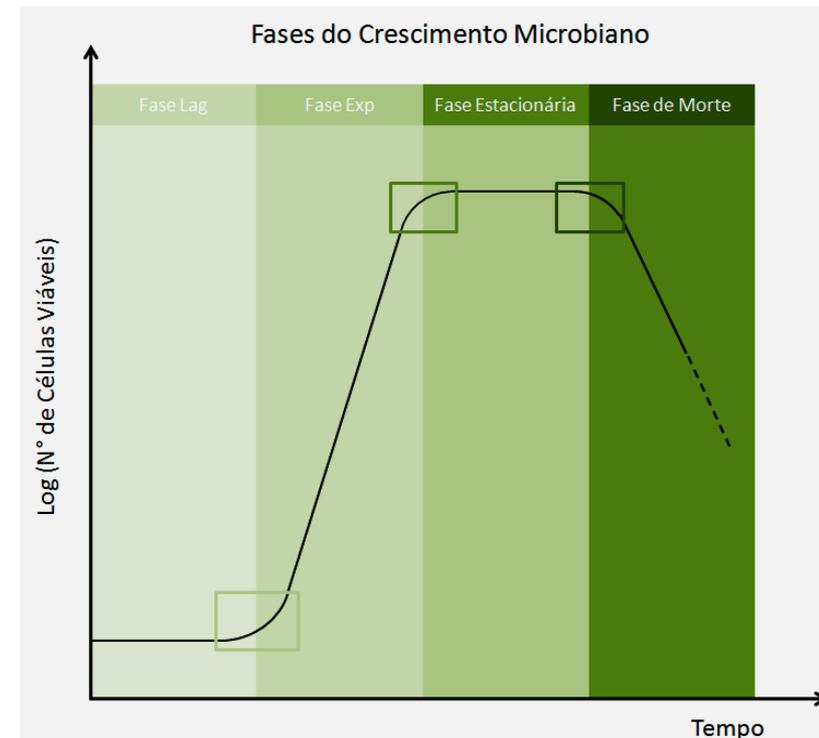
-Fase em que cada célula se divide formando duas

-Fase estacionária

-Cessamento da fase exponencial e não ocorre crescimento ou diminuição

-Fase de morte

-Eventualmente ocorre a morte das células

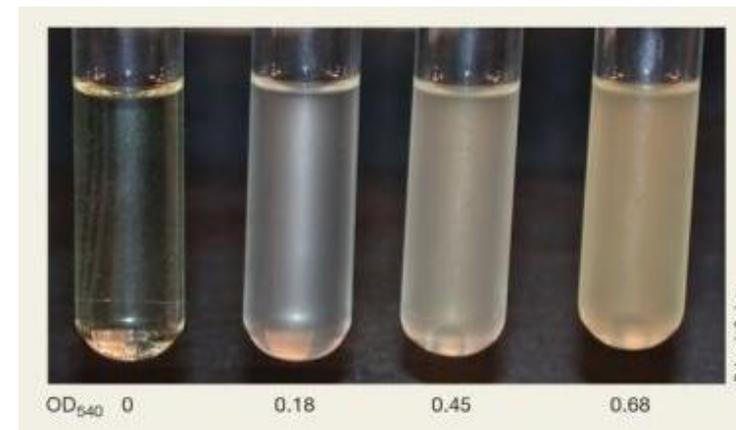


Mensuração do crescimento bacteriano

O crescimento de uma população bacteriana pode ser medida por:

- Alteração no número de células
- alteração na concentração de algum componente da célula

Ex: contagens de células e turbidez



Medidas dos números totais de células: contagemns microscópicas

Uso do microscópio para observar e enumerar as células presentes

Contagem de células totais

-pode ser feito a partir de amostras secas em lâminas
uso de corantes

amostras líquidas
uso de câmeras de contagem

Procedimento de contagem microscópica direta

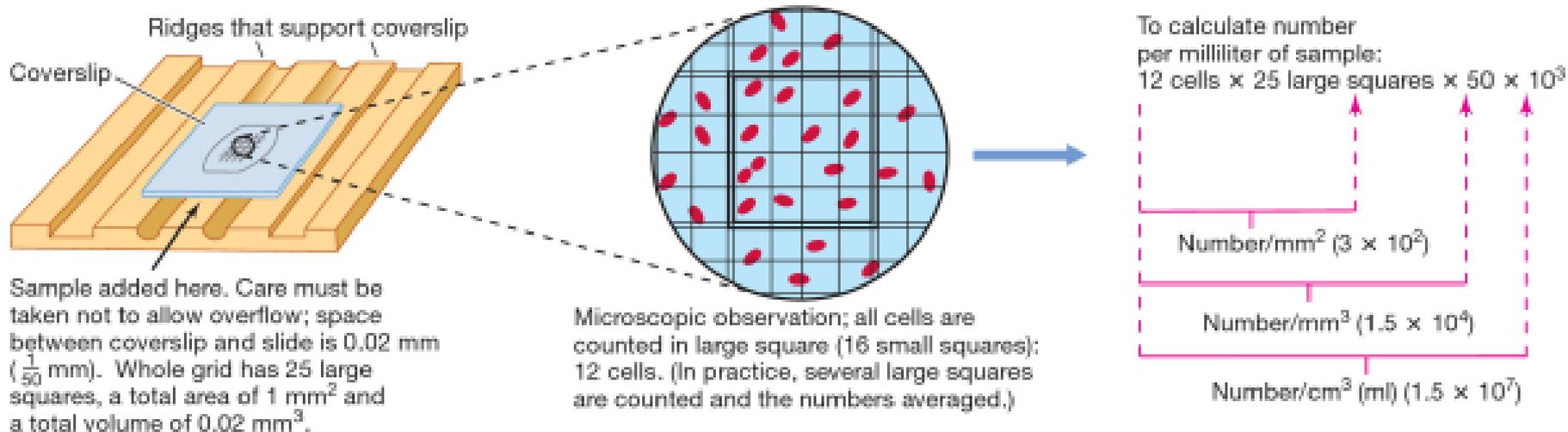
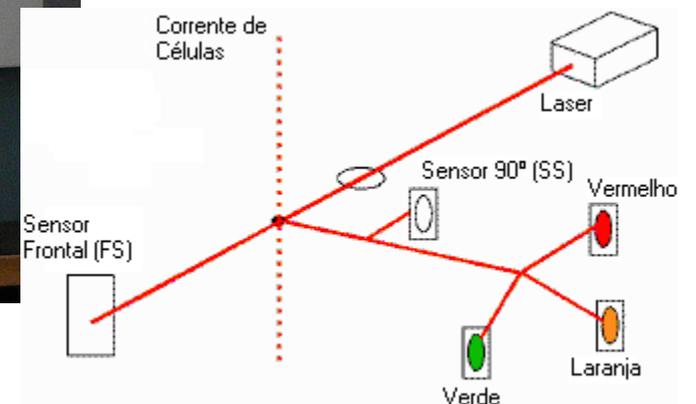
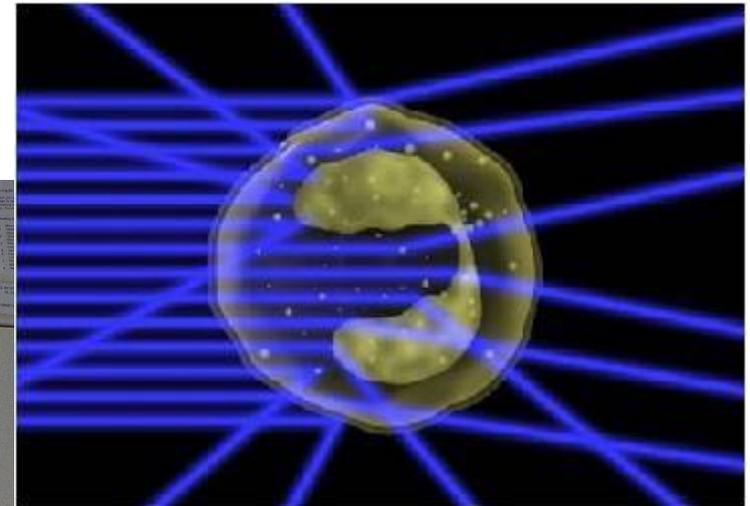


Figure 5.14 Direct microscopic counting procedure using the Petroff–Hausser counting chamber. A phase-contrast microscope is typically used to count the cells to avoid the necessity for staining.

Desvantagens da contagem direta

- Necessidade de corantes;
- não aplicável a células pequenas;
- indistinção de células vivas e mortas;
- precisão é dificilmente alcançada;
- necessário trabalhar com culturas com baixa densidade;
- necessidade de imobilização para células móveis;
- fragmentos de materiais pode facilmente ser confundido com células

Citometria de fluxo



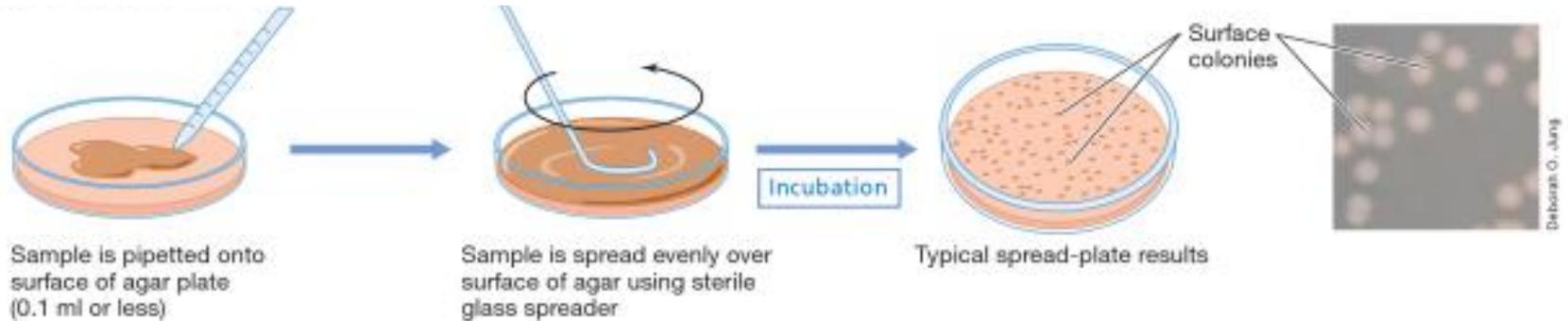
Contagem de viáveis:

Células viáveis são aquelas capazes de se dividir e formar colônias

Também chamada de contagem em placa

Contagem de células viáveis em placas

Método de semeadura por espalhamento



Método de semeadura em profundidade

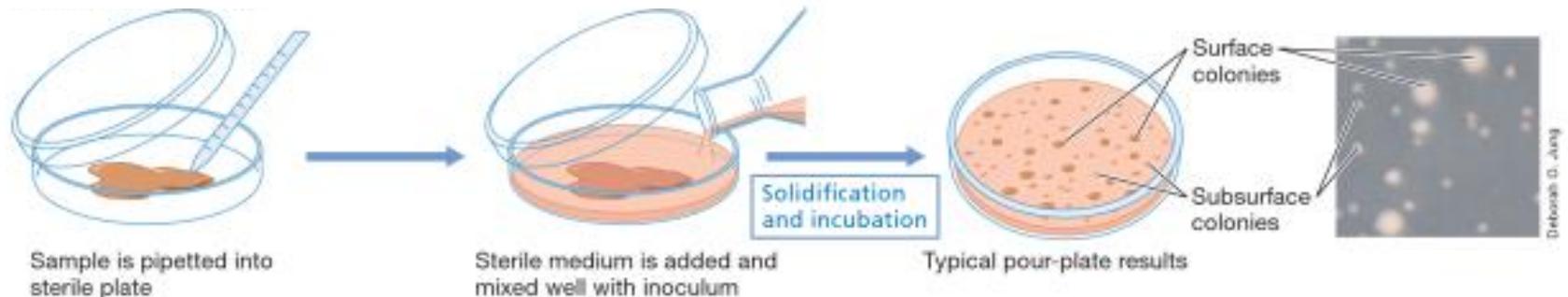
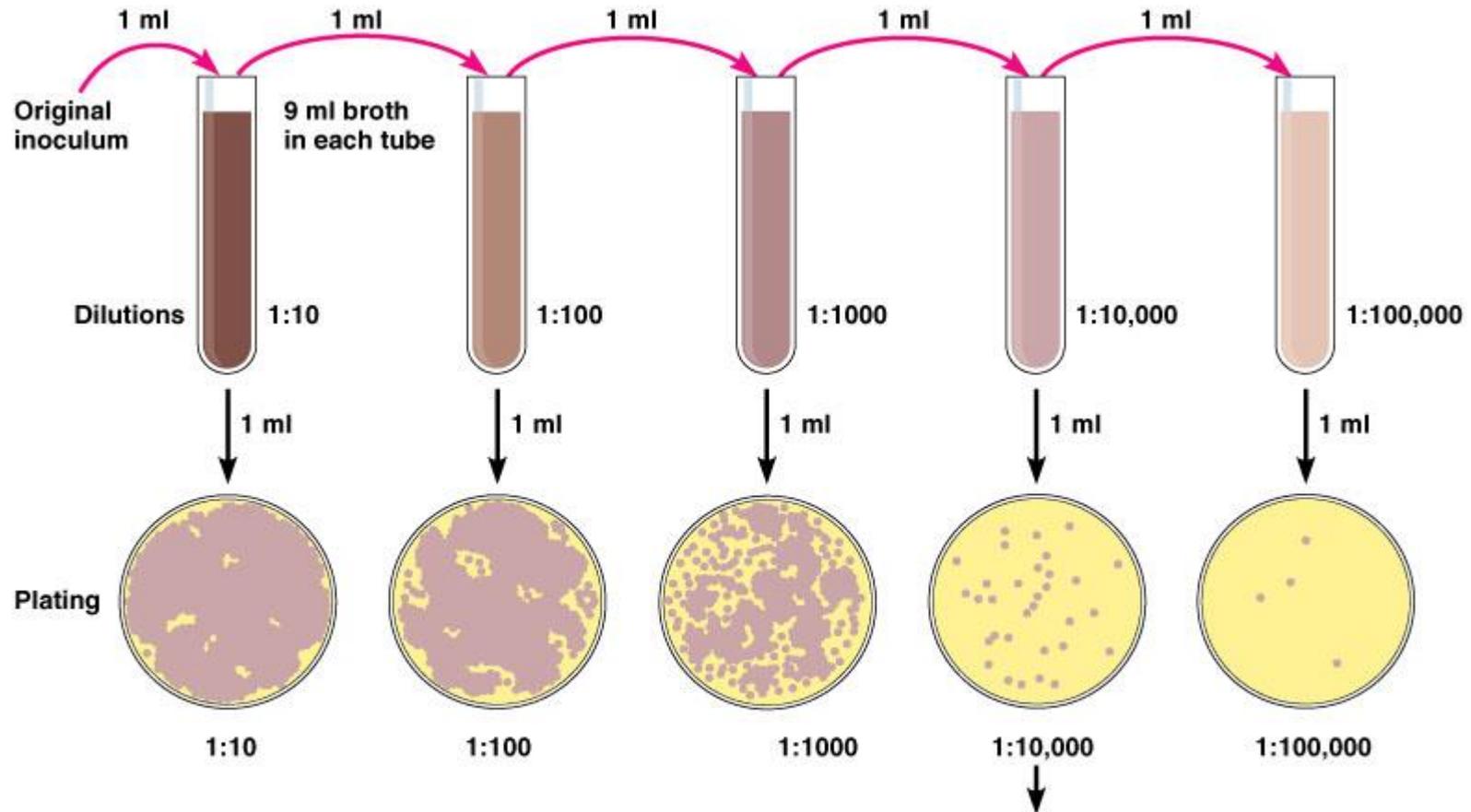


Figure 5.15 Two methods for the viable count. In the pour-plate method, colonies form within the agar as well as on the agar surface. On the far right are photos of colonies of *Escherichia coli* formed from cells plated by the spread-plate method (top) or the pour-plate method (bottom).

Diluição seriada para contagem de células



Calculation: Number of colonies on plate \times reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $1/10,000$ dilution, then the count is $32 \times 10,000 = 320,000/\text{ml}$ in sample.)

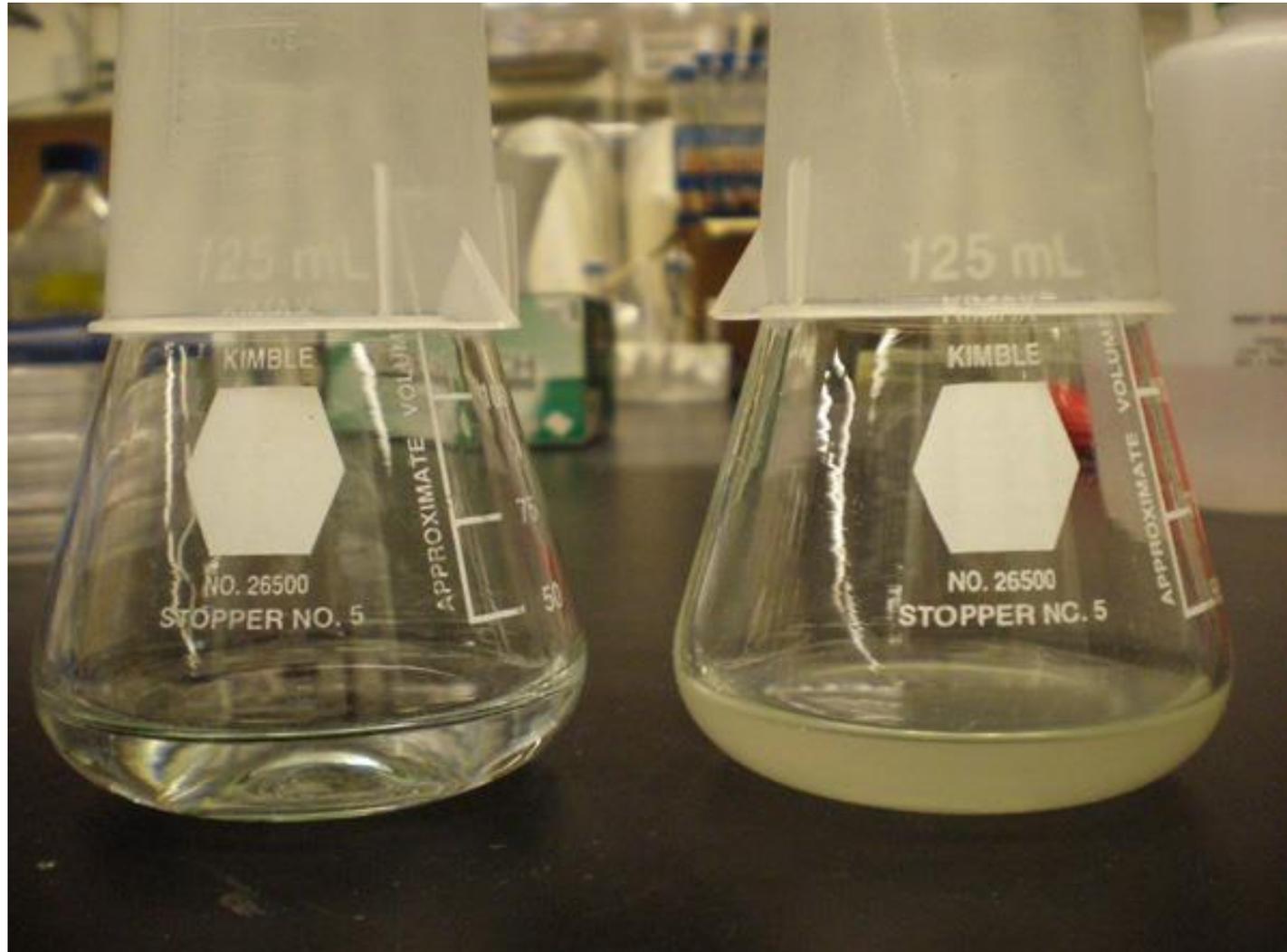
Fontes de erros na contagem de viáveis

- pipetagem
- não homogeneização
- formação de agregados de células
- colônias muito pequenas
- presença de massas sólidas no meio

Aplicações

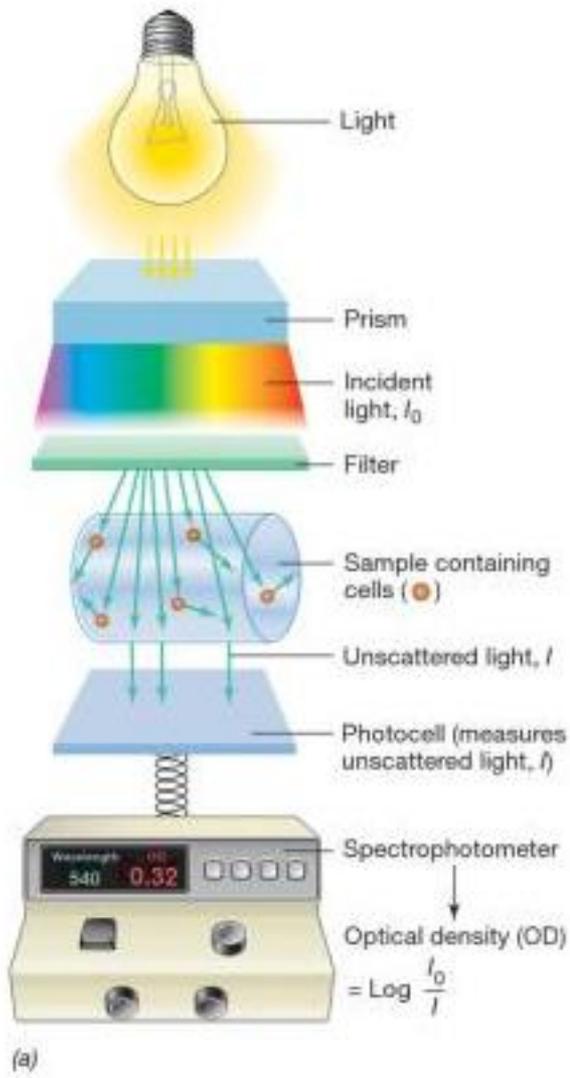
Alimentos; medicina e qualidade de água

Turbidimetry



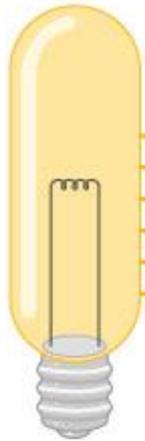
Medida da massa bacteriana: métodos turbidimétricos

Cálculo da OD (optical density)

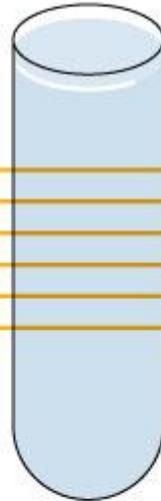


	A	B	C	D	E
1					
2					
3	BACTERIAL GROWTH CURVE DATA TABLE				
4					
5					
6	Minutes	Absorbancy at 660 nm			
7	Incubation	CSHA	TSB		
8		0	0.021	0.014	
9		30	0.022	0.015	
10		60	0.025	0.019	
11		90	0.034	0.033	
12		120	0.051	0.065	
13		150	0.078	0.124	
14		180	0.118	0.238	
15		210	0.179	0.460	
16		240	0.273	0.698	
17		270	0.420	0.910	
18		300	0.598	1.070	

Light source

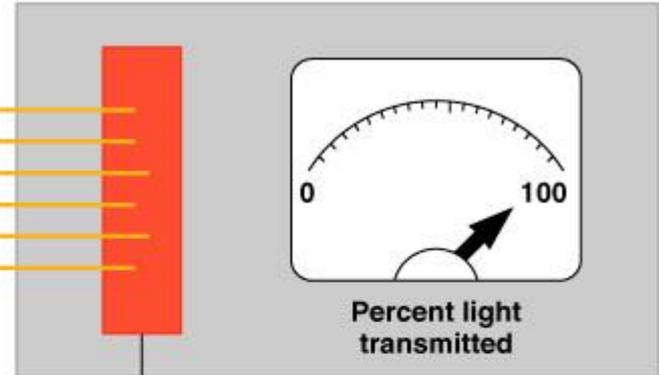


Direct light

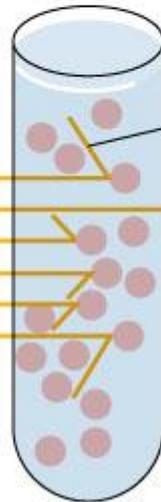
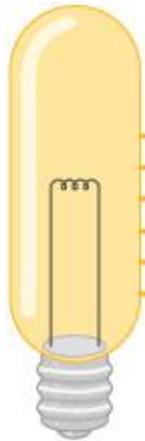


Blank

Spectrophotometer

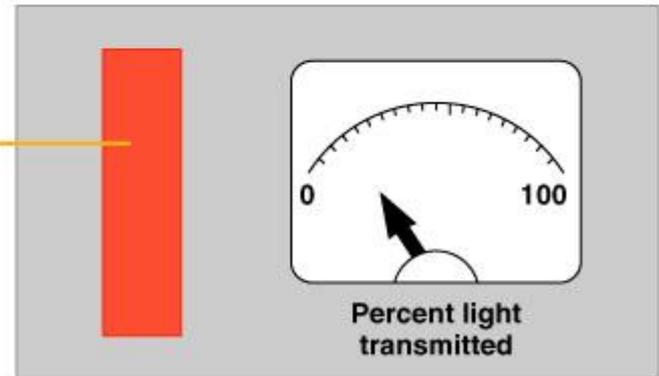


Light-sensitive detector



Scattered light that does not reach detector

Bacterial suspension



Fatores ambientais que afetam o crescimento bacteriano

-Temperatura;

-pH;

-Disponibilidade de água;

-Oxigênio;

-Outros fatores (pressão e radiação por exemplo);

Temperatura e crescimento bacteriano

Temperaturas cardiais

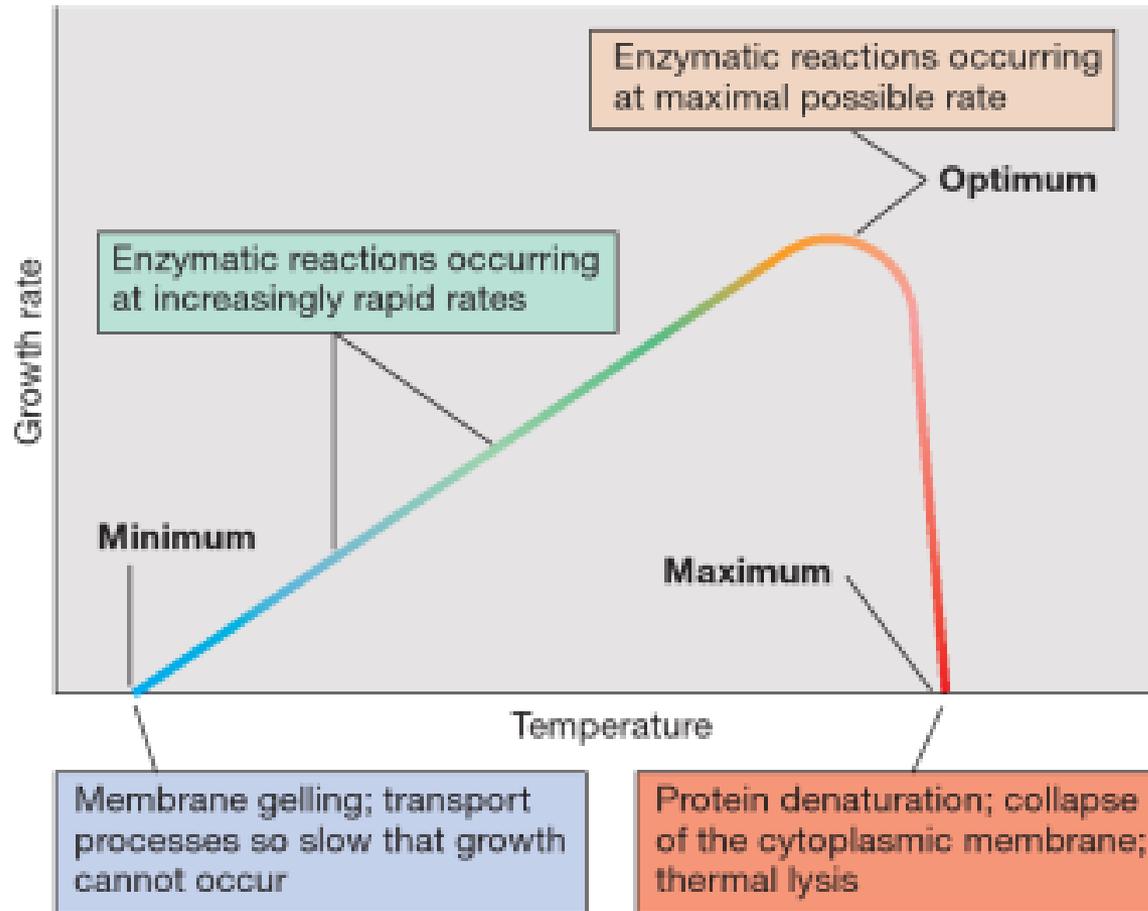
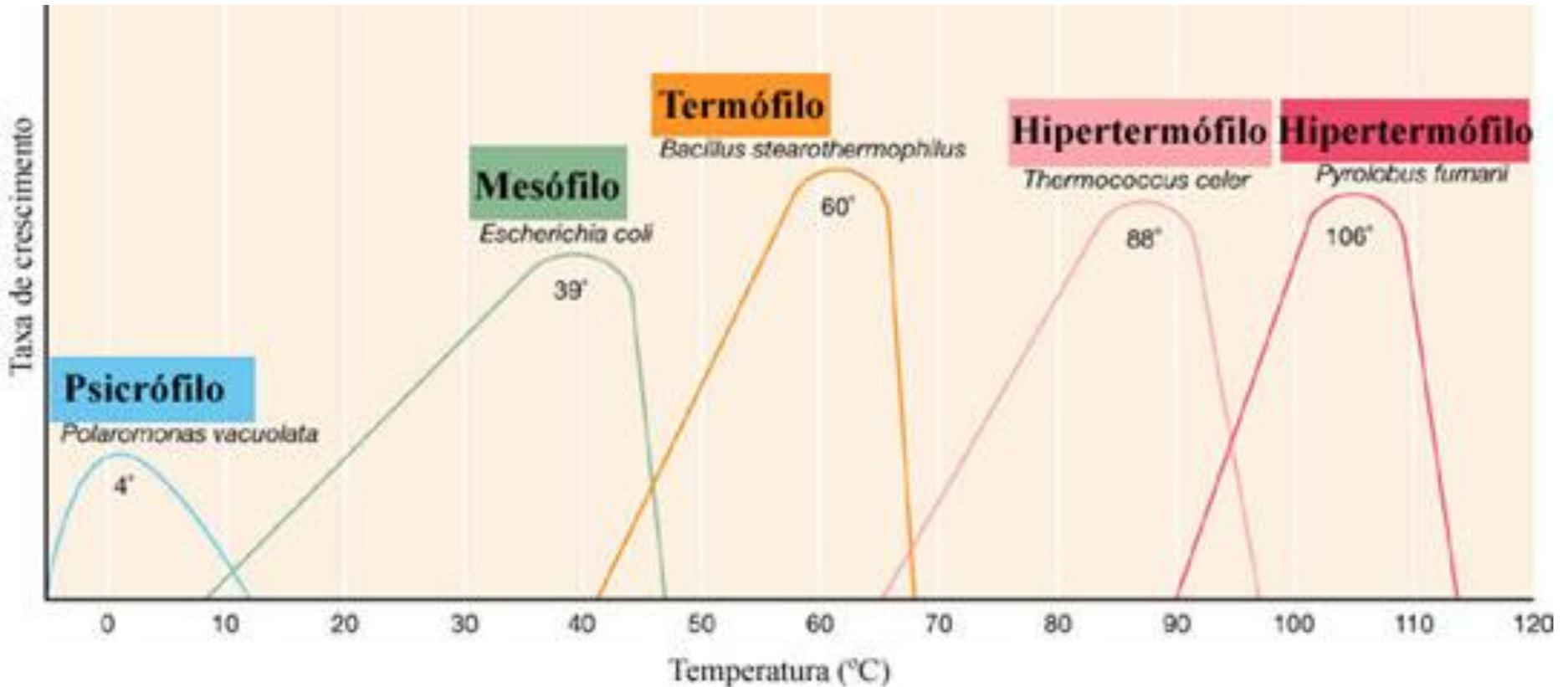


Figure 5.18 The cardinal temperatures: minimum, optimum, and maximum. The actual values may vary greatly for different organisms (see Figure 5.19).

Relações entre temperatura e crescimento de bactérias de diferentes classes térmicas



↓
extremófilo

↓
extremófilo

Bactérias psicrófilas e psicrotolerantes

Psicrófilos = temperatura ótima de crescimento = 15°C ou inferior e temperatura máxima é abaixo de 20 °C e temperatura mínima de 0°C;

Psicrotolerantes = capazes de crescer a 0°C, mas com ótimo entre 20-40°C



aiiiii, que frio!

Adaptações ao frio

- proteínas com maior número de α -hélices
- proteínas com maior número de aminoácidos polares
- proteínas com menor número de ligações fracas
- Membranas com maior quantidade de ácidos graxos insaturados ou poli-insaturados



Bactérias termófilas e hipertermófilas

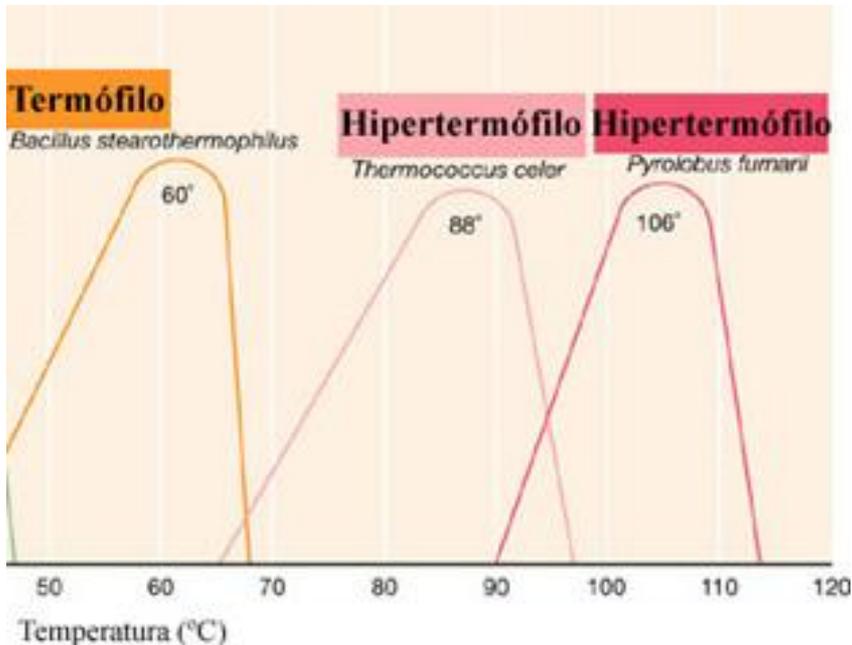
Termófilas = temperatura ótima é superior a 45 °C

Hipertermófilas = temperatura ótima é superior a 80 °C

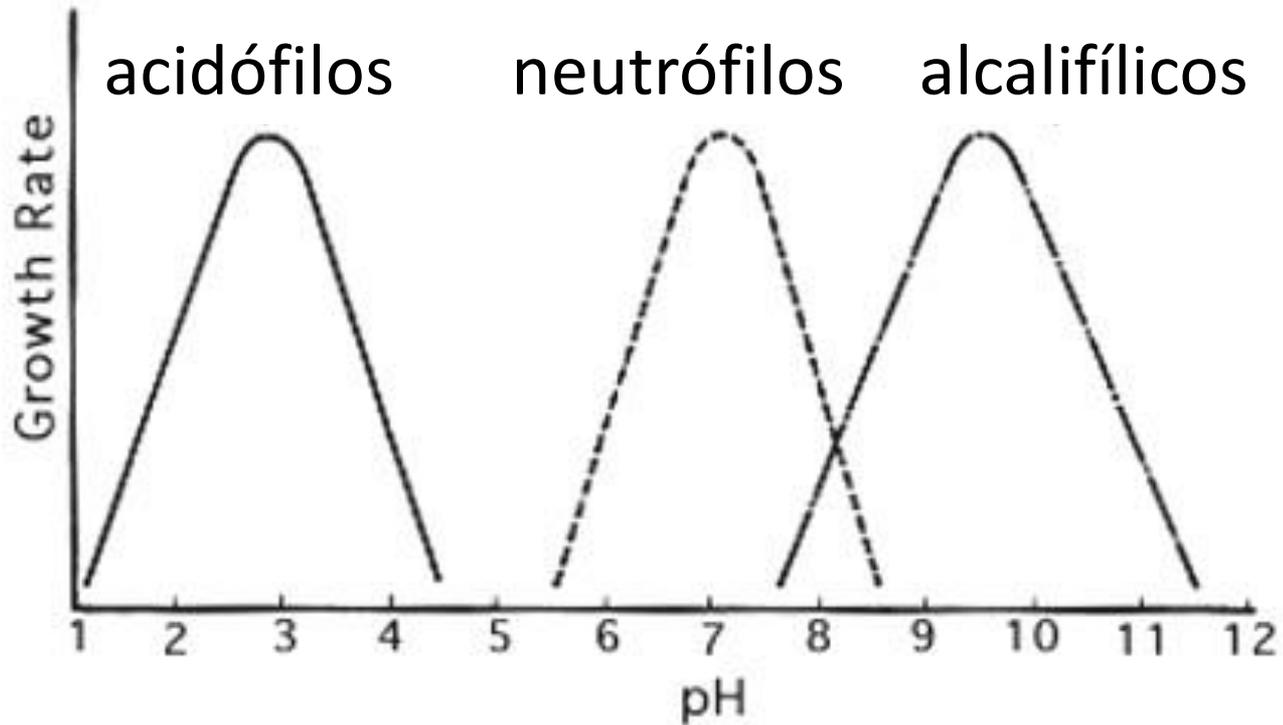


Adaptações ao calor:

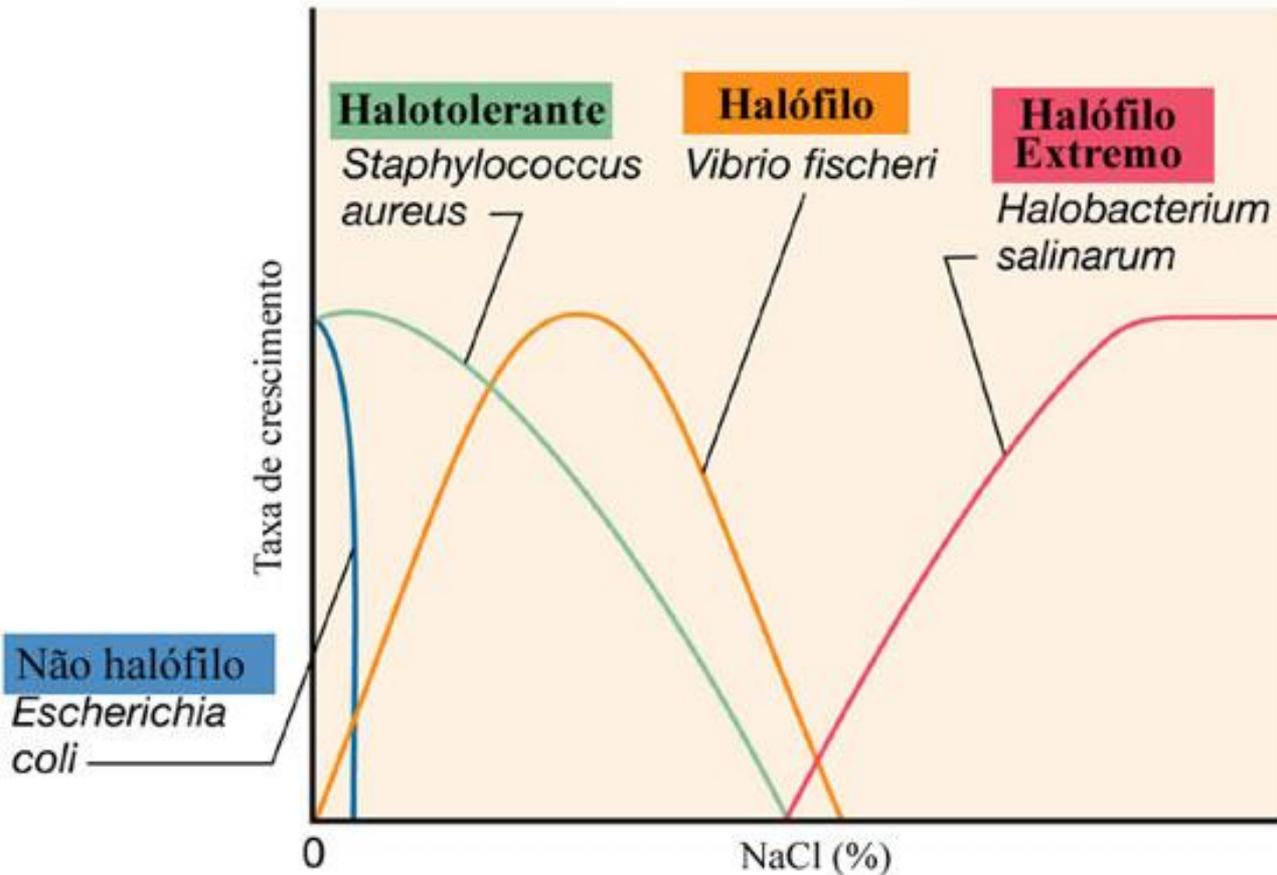
- Aumento de ligações dissulfeto e iônicas nas proteínas
- Proteínas com interiores mais hidrofóbicos
- Presença de solutos como di-inositol fosfato e diglicerol fosfato
- Lipídeos de membranas com maior número de saturações



Relações entre o pH e crescimento de bactérias



Relações entre osmolaridade e crescimento de bactérias



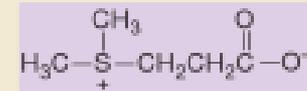
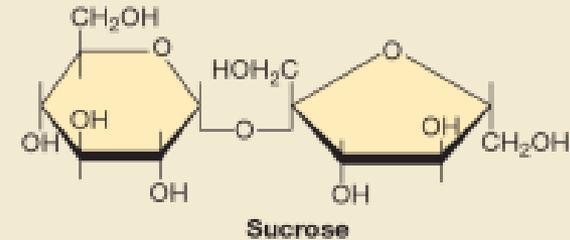
Bactérias osmófilas

Bactérias xerófilas

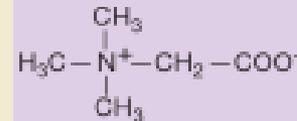
Relações entre osmolaridade e crescimento de bactérias

Solutos compatíveis

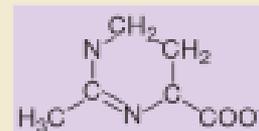
A obtenção de água do ambiente por bactérias halófilas ocorre pela concentração de solutos internos não inibitórios dos processos químicos intracelulares



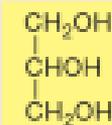
Dimethylsulfoniopropionate



Glycine betaine

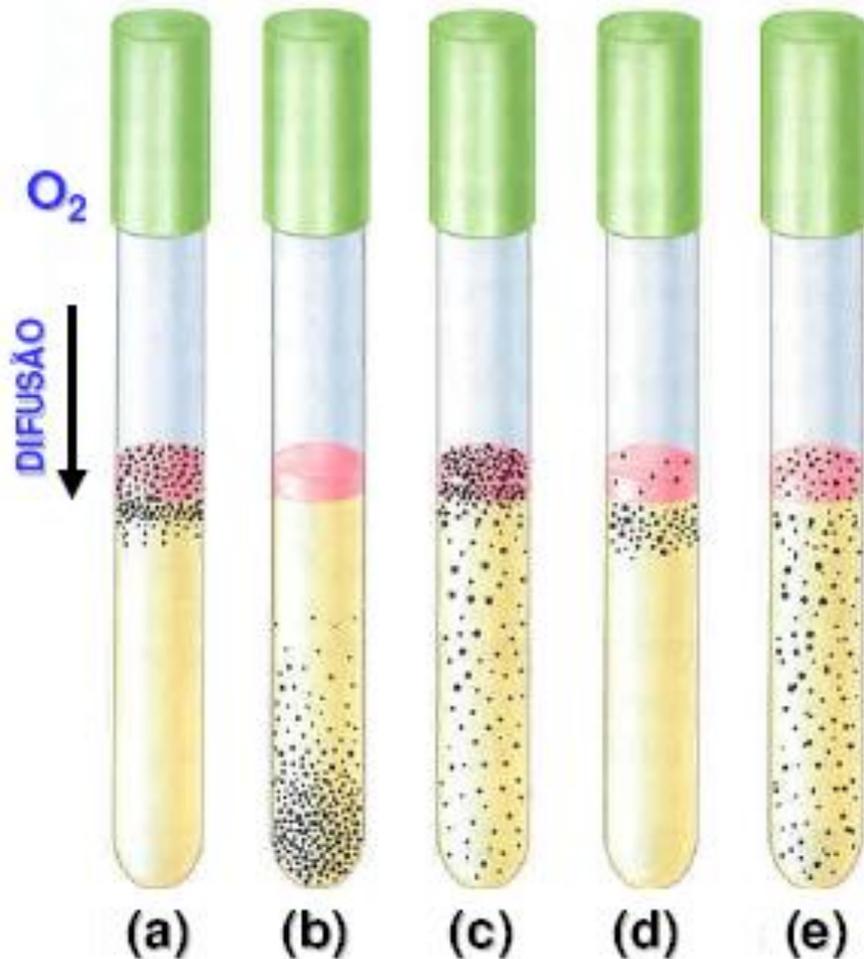


Ectoine



Glycerol

CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS QUANTO AO METABOLISMO DE O₂



Crescimento em meio líquido

a) Aeróbio obrigatório

b) Anaeróbio

c) Aeróbio facultativo

d) Microaerófilo

e) Aerotolerante

Hans Christian Gram

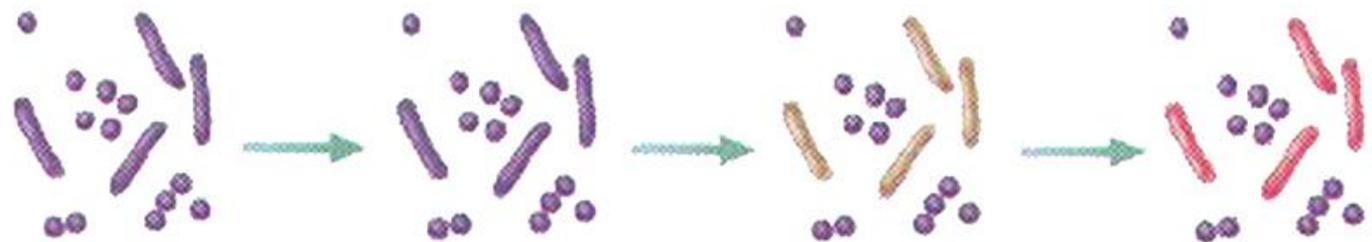
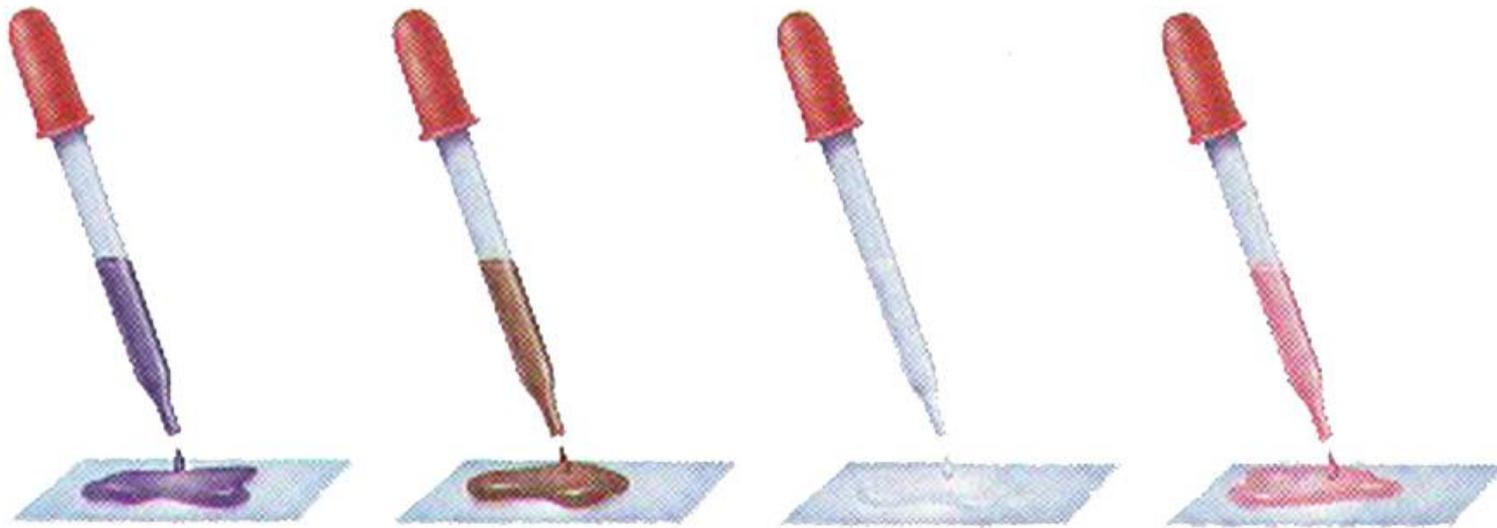
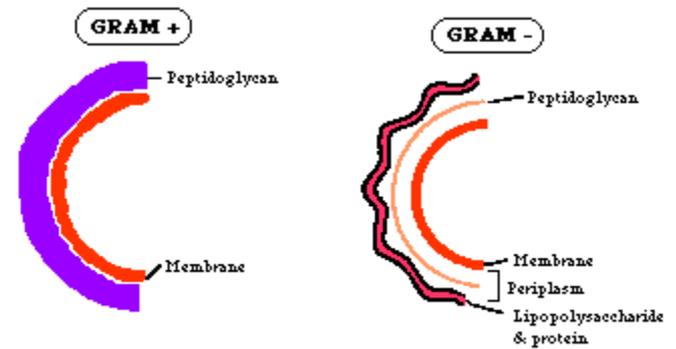


A coloração Gram foi desenvolvida pelo fisiologista dinamarquês, **Hans Christian Gram**, enquanto trabalhava em Berlim em 1883. Ele publicou o processo em 1884. Seu primeiro estudo foi com tecido pulmonar de pacientes que tinham morrido com **pneumonia**

Ingredientes da coloração de Gram



Princípio da coloração de Gram



(a) Application of crystal violet

(b) Application of iodine

(c) Alcohol wash

(d) Application of safranin

Características tintoriais

COLORAÇÃO DIFERENCIAL- GRAM

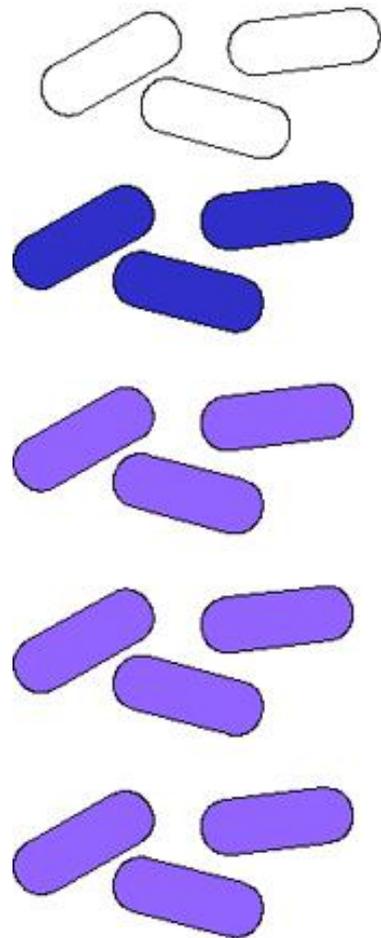
- Diferenças na estrutura da parede celular das bactérias **Gram (+)** e **Gram (-)**
- Camada de peptidoglicano
- Cristal Violeta (CV)
- Iodo
- Mordente: Aumentam afinidade, espessamento
- Complexo Cristal Violeta- Iodo (Lugol)- CVI
- Maior que CV

Características tintoriais

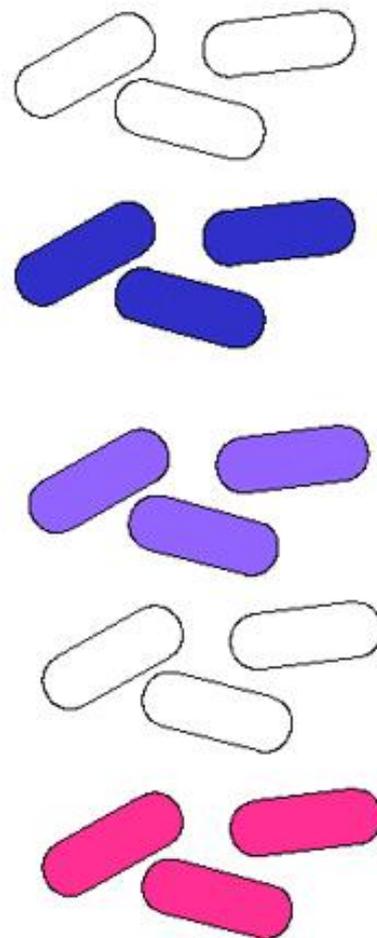
COLORAÇÃO DE GRAM

- Álcool
 - Rompe a camada lipopolissacarídica
 - G(-) não retém CVI
- Contracoradas
 - Fucsina
 - Vermelhas

Gram Positivo



Gram Negativo



Fixação



Cristal Violeta



Lugol

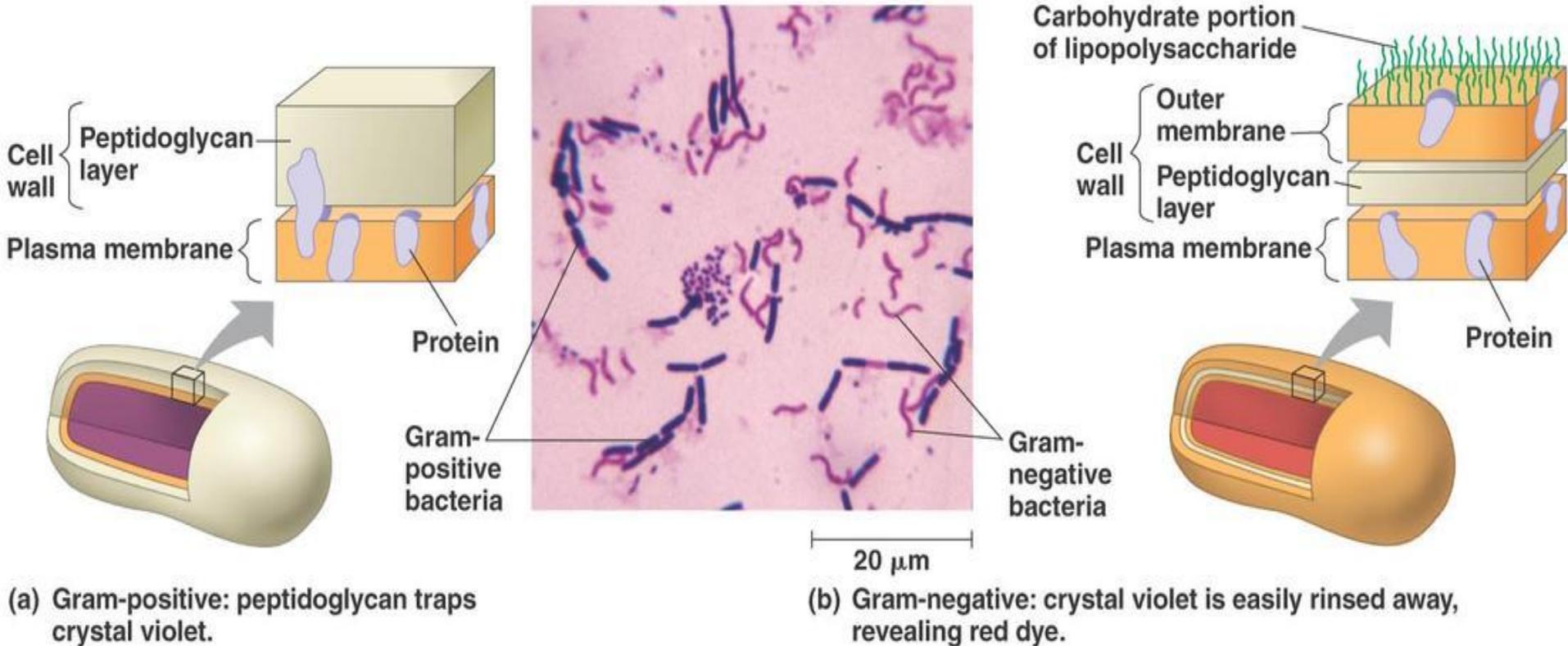


Álcool- Acetona

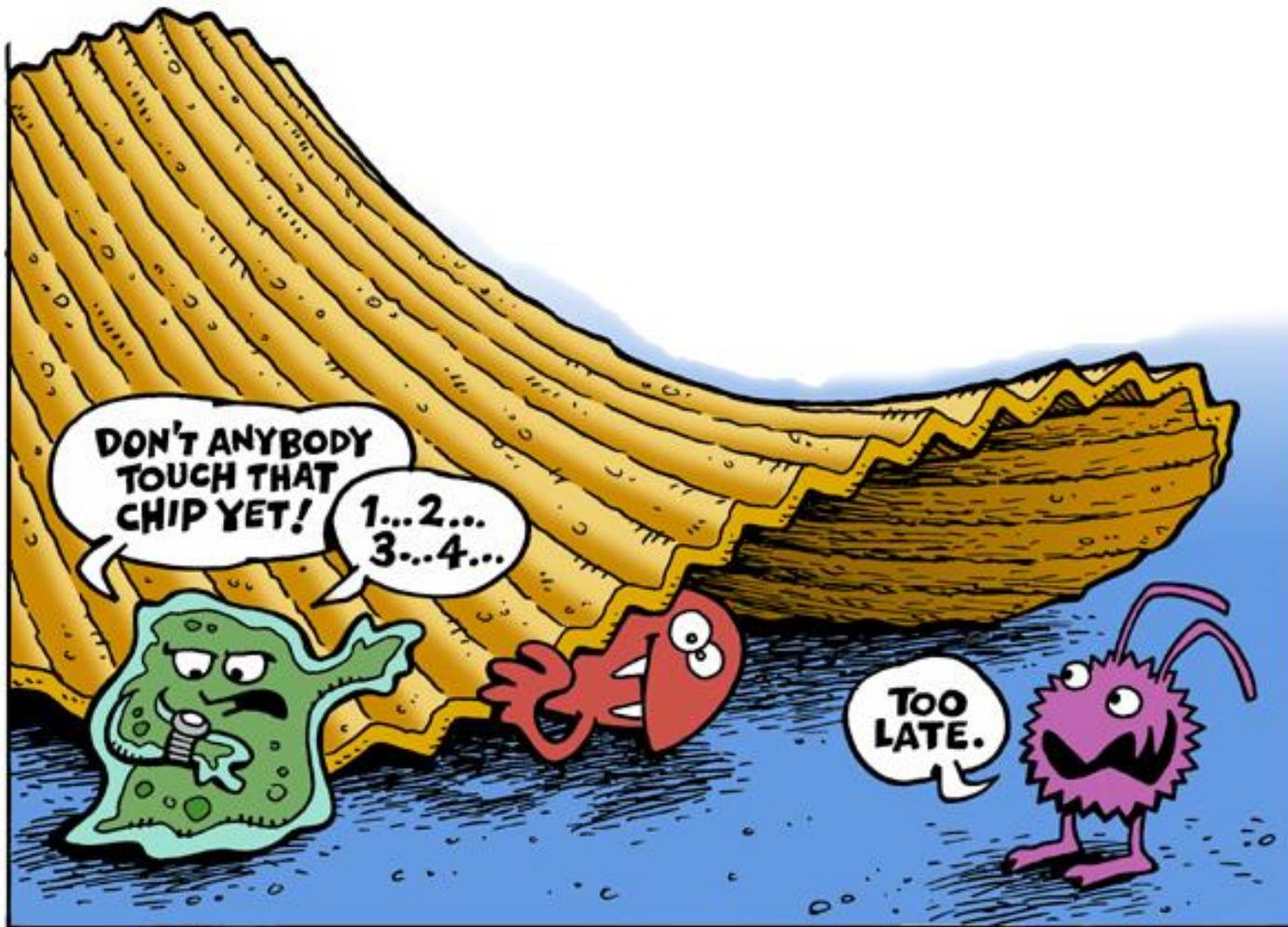


Fucsina

Gram Positivos X Gram negativos



<https://www.youtube.com/watch?v=mF3jAU6Dy4I>



DON'T ANYBODY
TOUCH THAT
CHIP YET!

1...2...
3...4...

TOO
LATE.