

Fisiologia Bacteriana: crescimento e nutrição

Cristiane Guzzo

Departamento de Microbiologia - ICBII-USP

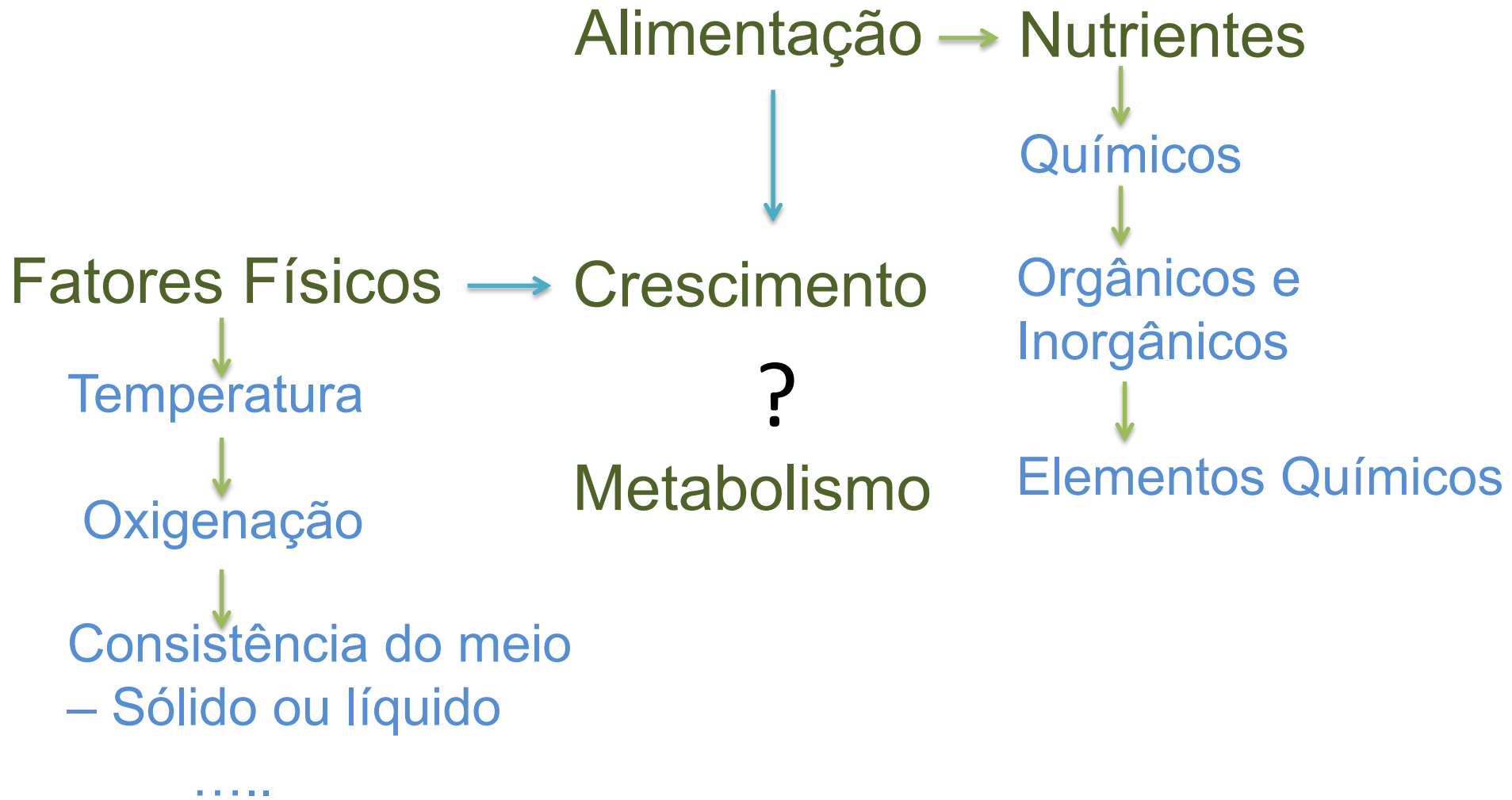
10/08/2023



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

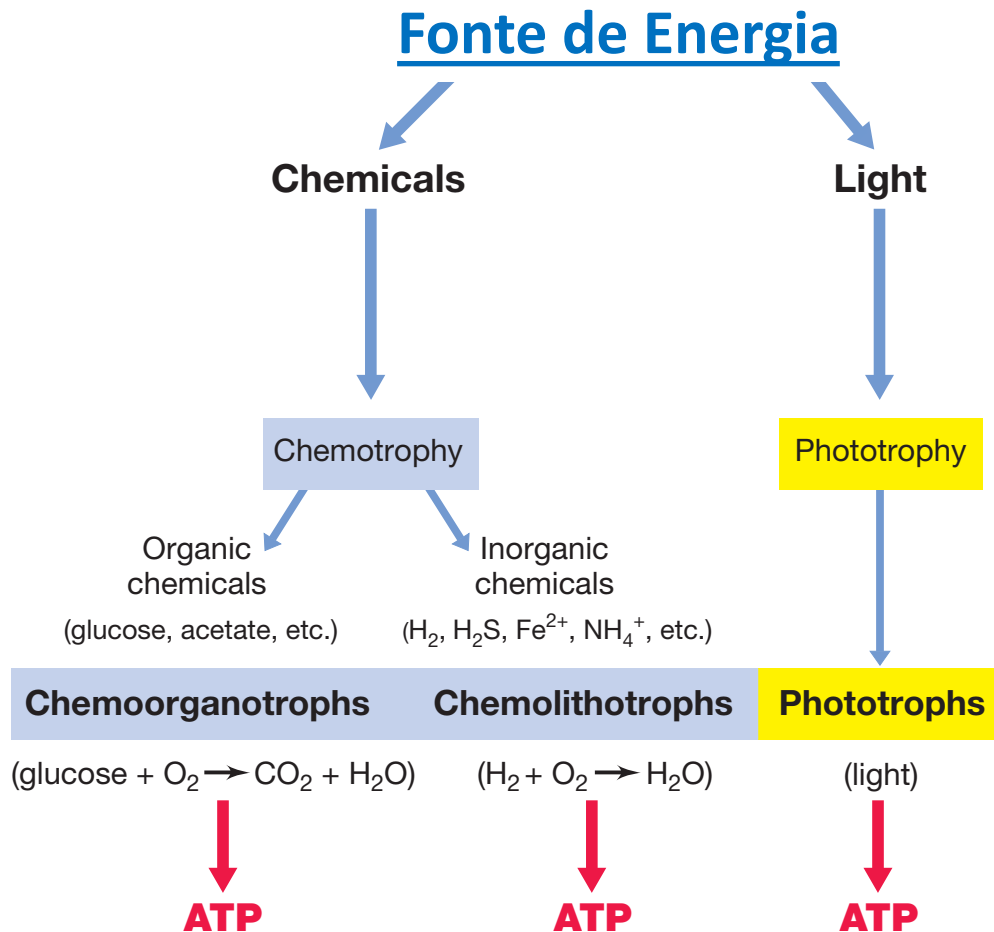
Quais são os fatores que afetam o crescimento microbiano?



Diversidade Metabólica

Capacidade Biossintética:

quanto o organismo consegue sintetizar fatores importantes para o seu crescimento



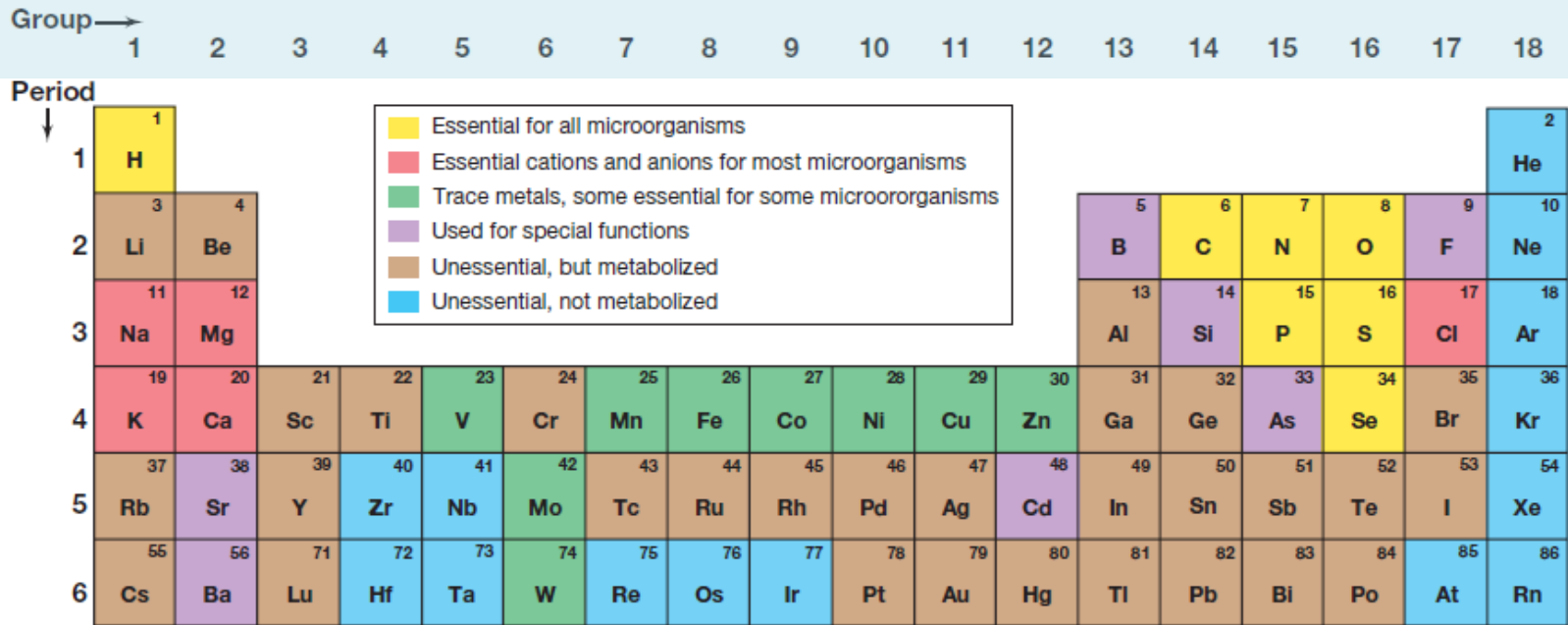
Fonte de Carbono

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.

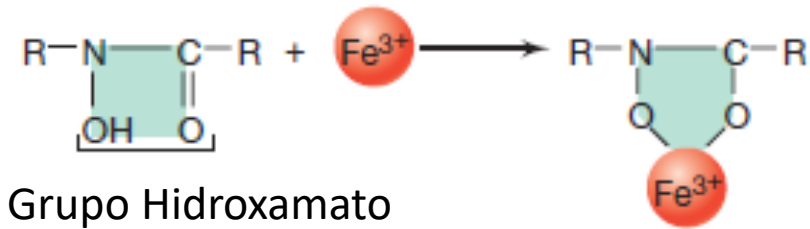
^bNeeded in greater amounts than other trace metals.

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



(a)

- Captação do Ferro – via Quelantes (Sideróforos)– internaliza o ferro extracelular

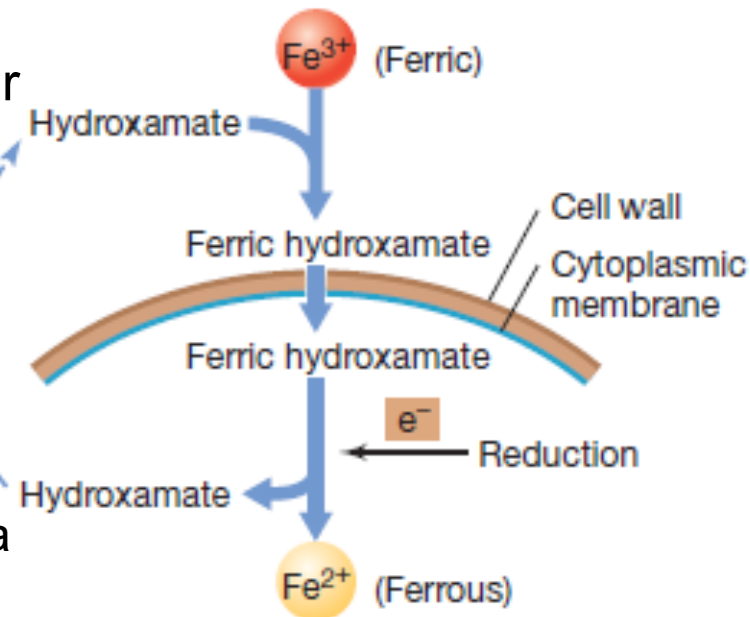
- Compostos derivados do ácido Hidroxamato

- 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 captar ferro do mar.

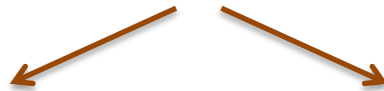


Classificação dos meios de Cultura utilizados em Laboratório

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

As fontes de C, N, P são desconhecidas.

Meio Seletivo ou Diferenciais

3. Meio Seletivo

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

4. Meio Diferenciado

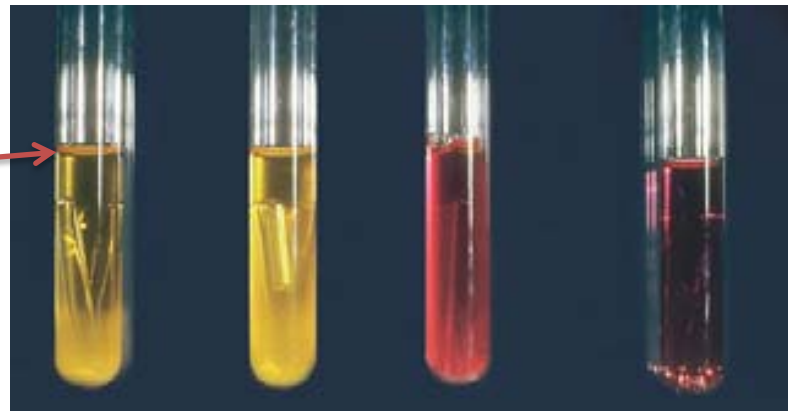
Adiciona um indicador (corante, por exemplo), diferenciar reações químicas que ocorrem durante o crescimento .

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. -

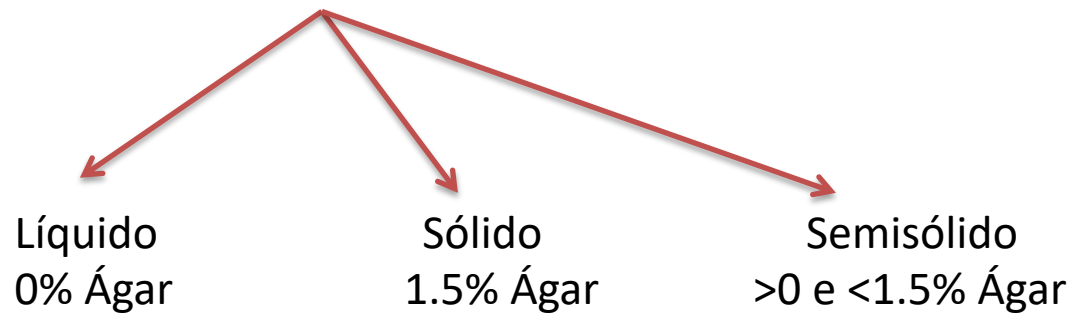
Não inoculado

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

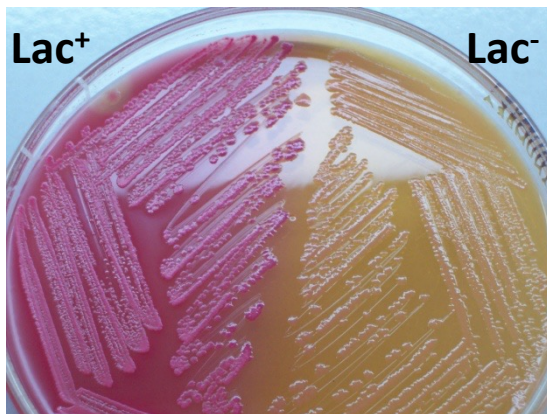
Cultivo de Microrganismos em Laboratório

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



Diferentes Meios de Cultura usado em laboratório

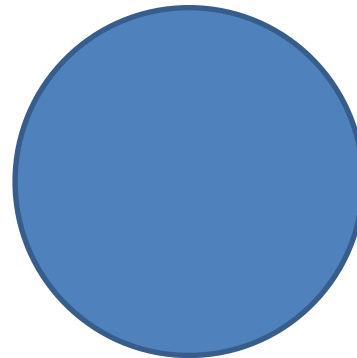
Ágar MacConkey



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

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

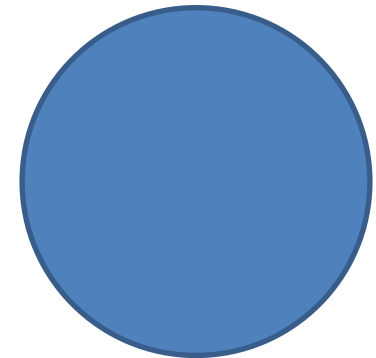
Ágar Staphylococcus 110 Stone Gelatin Ágar



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 na **Respiração**

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

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

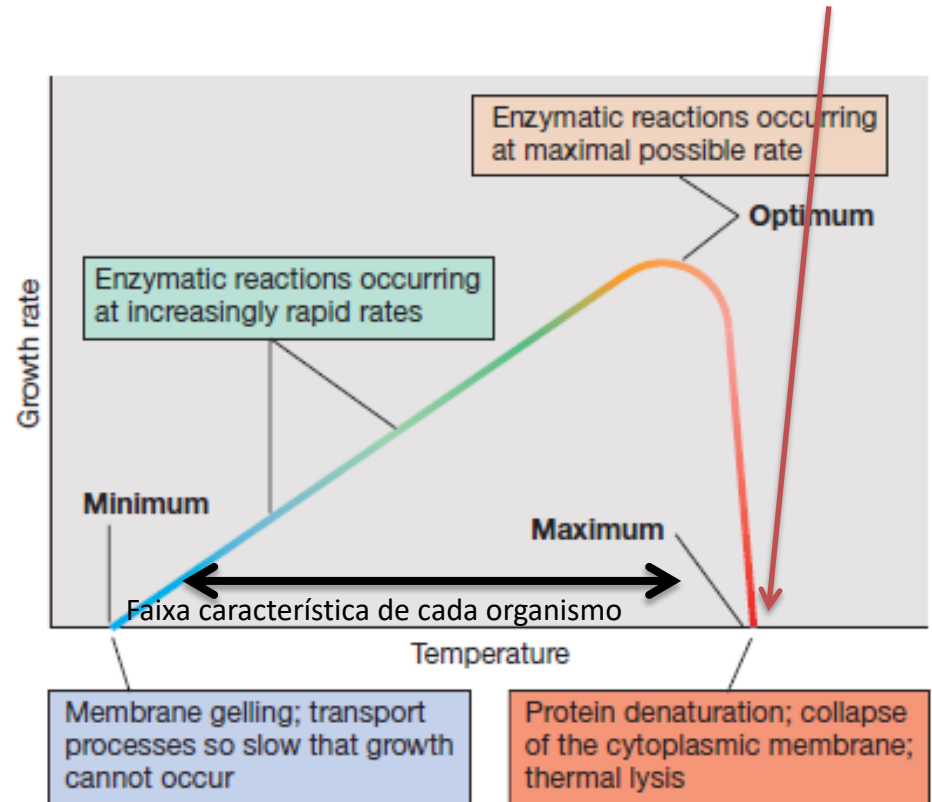
- **Ótima**

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

- **Máxima**

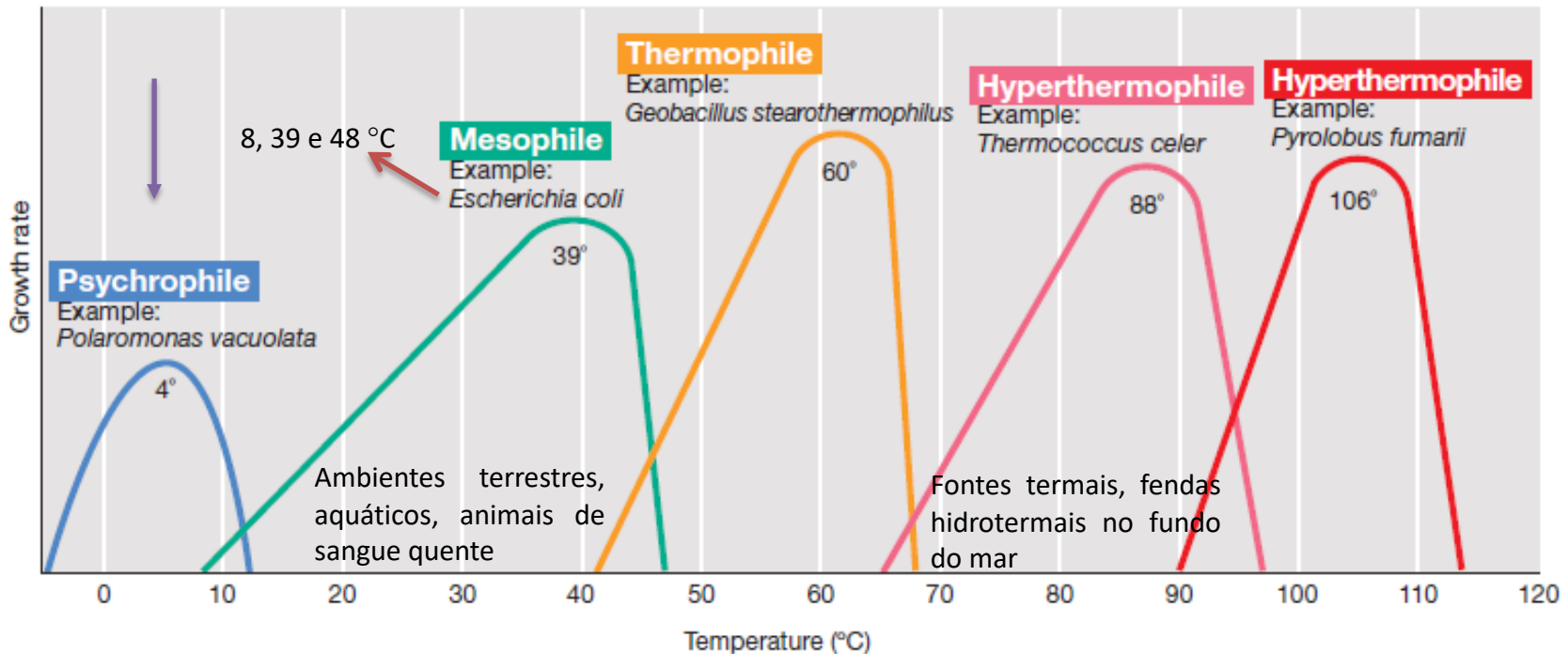
- Faixa normal de variação de temperatura é 25-40 °C
- Não conseguem crescer em todas as faixas

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).

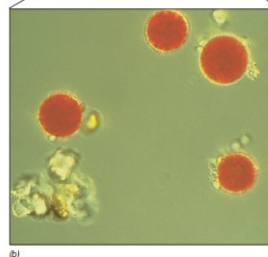
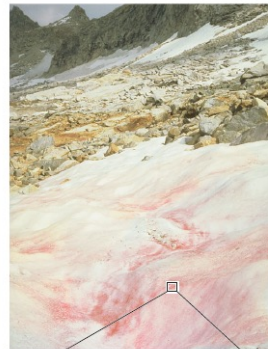
- Ambientes frios na Terra

 - 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

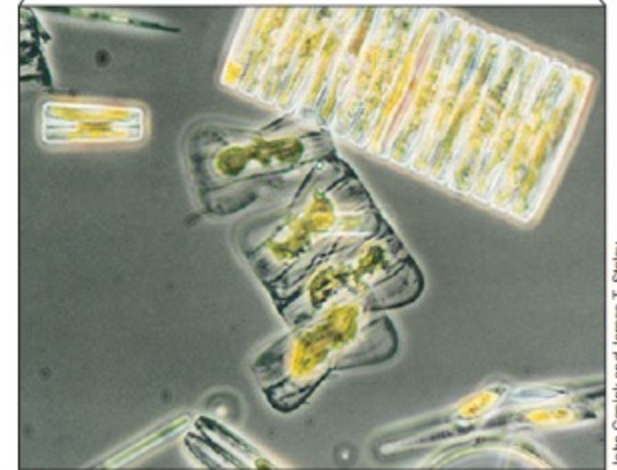


Antártida



(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



(a)



(b)

Figure 5.22 Growth of hyperthermophiles in boiling water.

Fontes termais
ferventes
150-500°C

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

Efeito do pH



moles per liter of:

H ⁺	OH ⁻
1	10 ⁻¹⁴
10 ⁻¹	10 ⁻¹³
10 ⁻²	10 ⁻¹²
10 ⁻³	10 ⁻¹¹
10 ⁻⁴	10 ⁻¹⁰
10 ⁻⁵	10 ⁻⁹
10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
10 ⁻⁸	10 ⁻⁶
10 ⁻⁹	10 ⁻⁵
10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁴
10 ⁻¹¹	10 ⁻³
10 ⁻¹²	10 ⁻²
10 ⁻¹³	10 ⁻¹
10 ⁻¹⁴	1

- Faixa de pH vari
- pH ótimo
- Maioria crescem (dos ambientes)
- Poucos em pH <
- Acidofílicos
 - Maior quantidade menor, como
 - Estabilidade dependente
 - Obrigatórios, neutro
 - *Acidithiobacillus*
 - Vários gé

- *Picrophilus oshimae* - pH ótimo 0.7 e em pH 4 lise celular.
- pH intracelular 4.5
- Habita solos quentes, ácidos com atividade vulcânica

Alcalifílicos
pH > 8

Increasing alkalinity



10	Alkaline lakes Soap solutions
11	Household ammonia Extremely alkaline
12	soda lakes
13	Lime (saturated solution)
14	

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

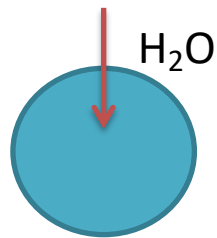
Physiological class (optima range)	Approximate pH optimum for growth	Example organism ^a
Neutrophile (pH >5.5 and <8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidophile (pH <5.5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alkaliphile (pH ≥ 8)	8	<i>Chloroflexus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

^a *Picrophilus* and *Natronobacterium* are Archaea; all others are Bacteria.

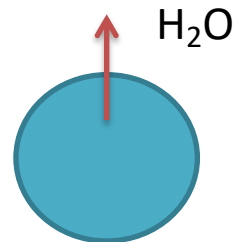
Efeito Osmótico

- 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 +

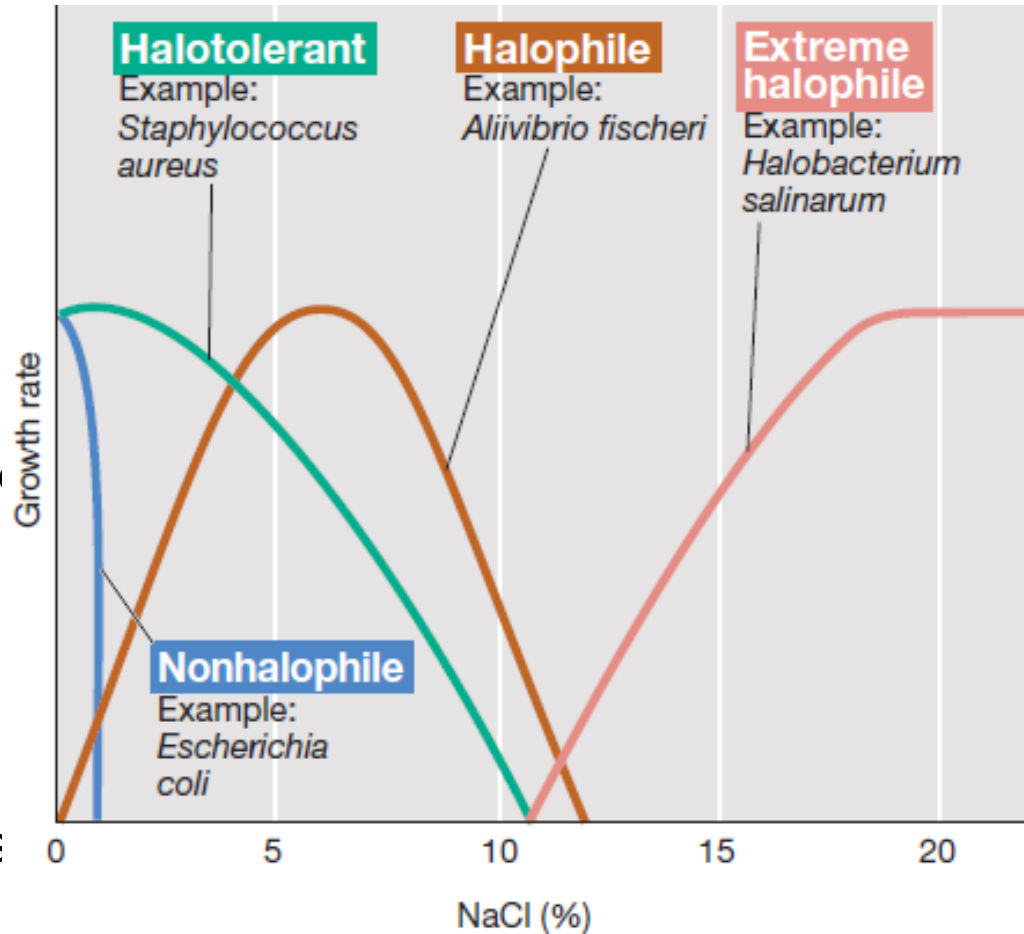


Pode causar morte celular-desidratação



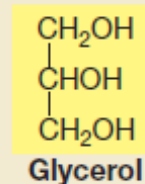
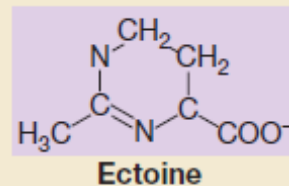
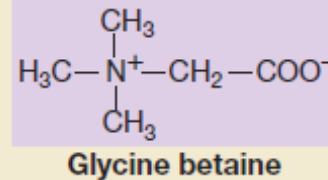
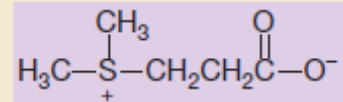
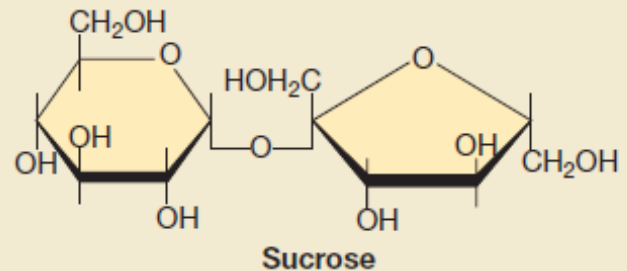
Efeito Osmótico

- **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



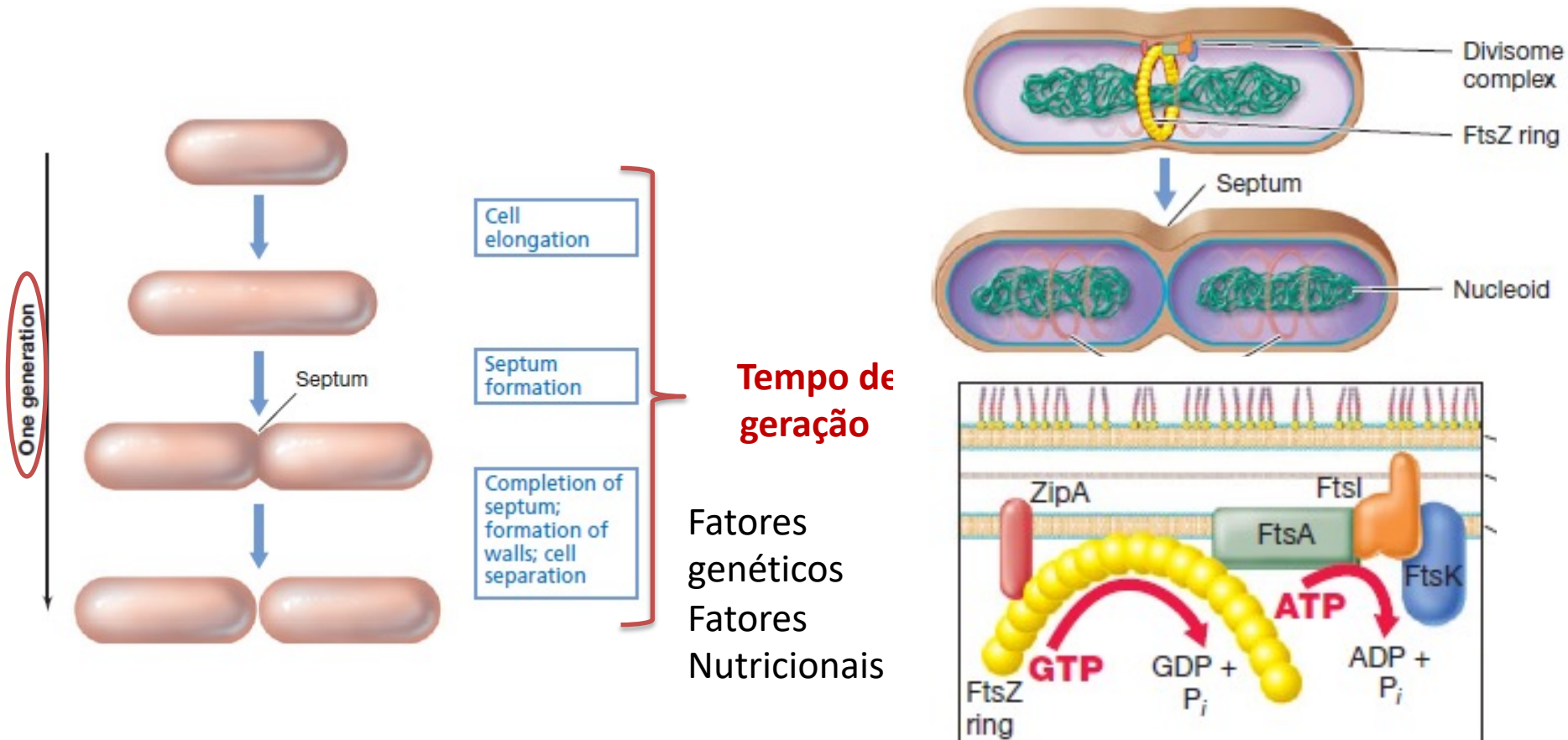
Bactérias não cultiváveis & Metagenômica

- 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

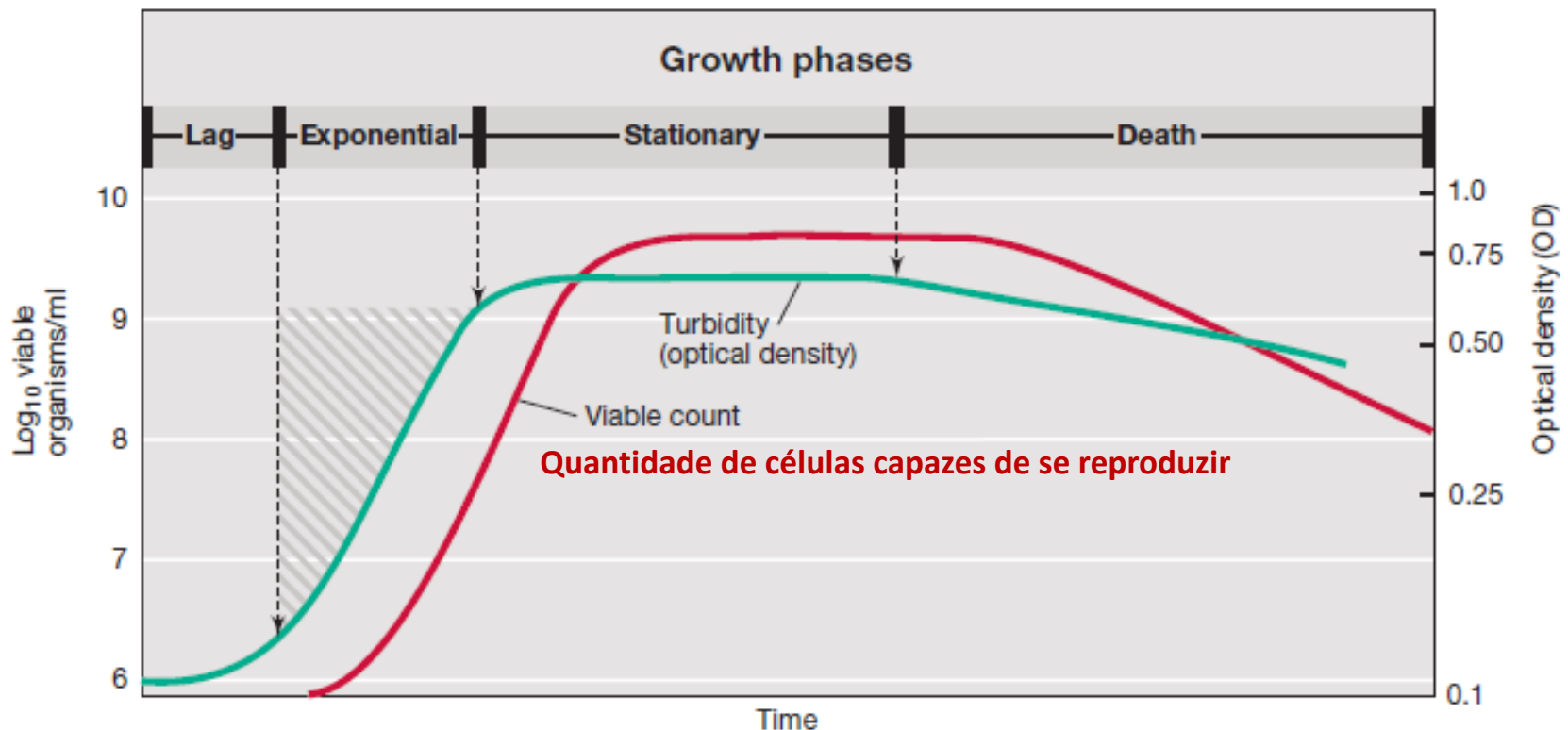
- O processo de divisão celular envolve um conjunto de proteínas conhecidas como Fts (*Filamentous temperature Sensitive*) (Todos os Procaríotos e *Archae*, organelas - mitocôndrias e cloroplastos).



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?

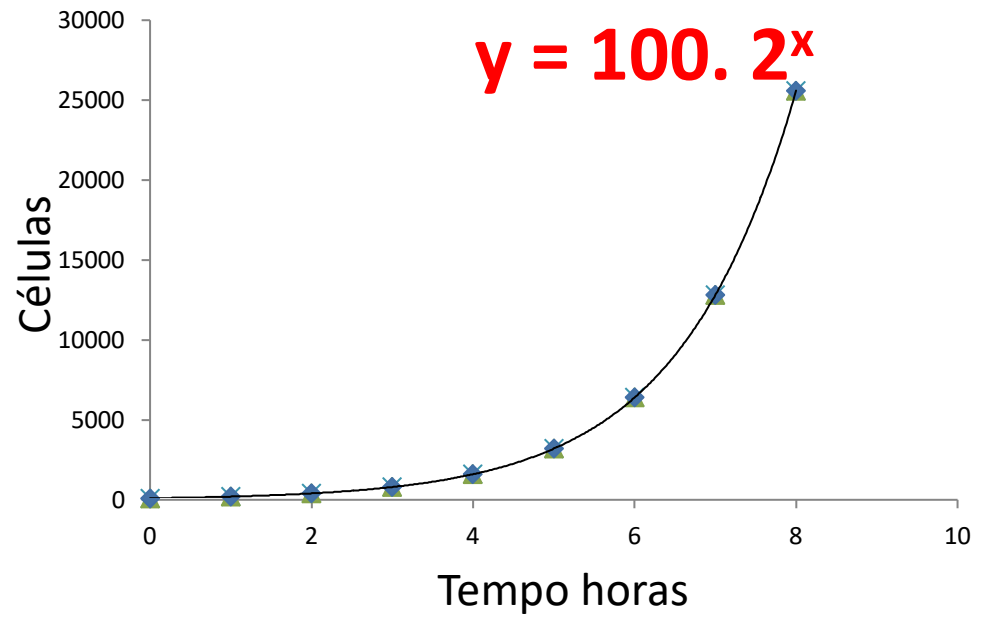
Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256 (2^8)
0.5	2	4.5	512 (2^9)
1	4	5	1,024 (2^{10})
1.5	8	5.5	2,048 (2^{11})
2	16	6	4,096 (2^{12})
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576 (2^{19})

Taxa de duplicação (tempo de geração $g = 30$ min)
Na primeira 30 min aumentou 1 célula

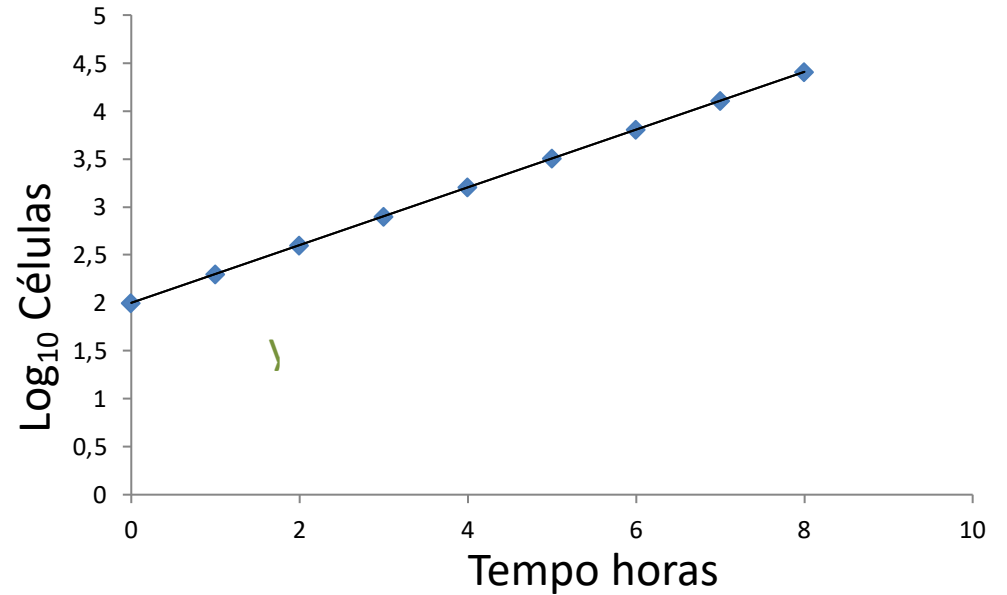
Depois de 5 horas
Em 30 min cresce 2.048 células

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

G = 1H



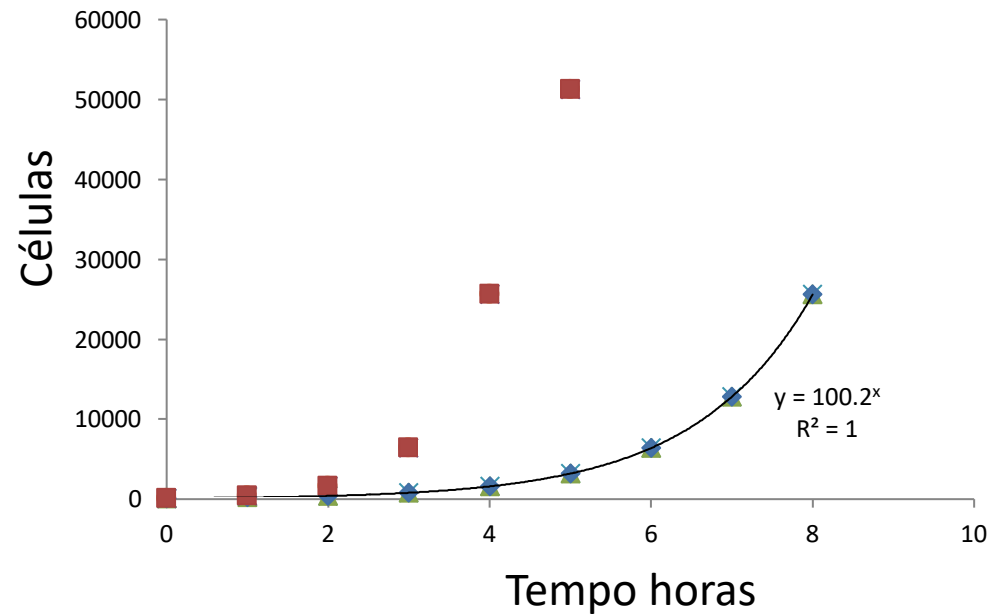
tempo	log(10)
0	2
1	2,301029996
2	2,602059991
3	2,903089987
4	3,204119983
5	3,505149978
6	3,806179974
7	4,10720997
8	4,408239965



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



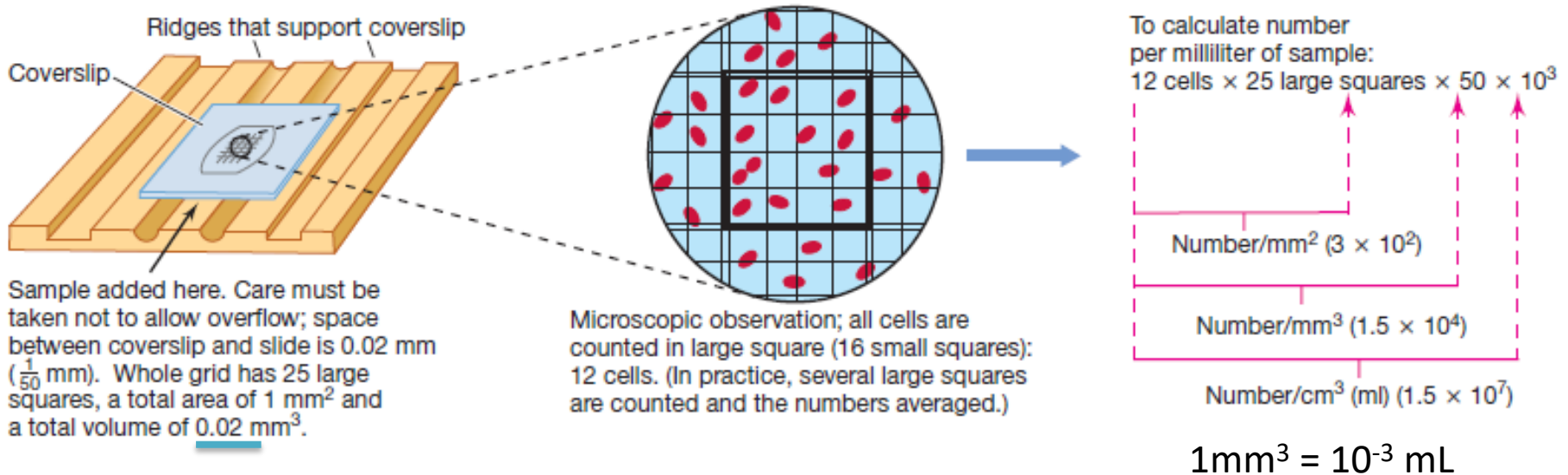
$$N_{\text{total}} = N_{\text{inicial}} \cdot 2^{(\text{tempo total}/\text{tempo de geração})}$$

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



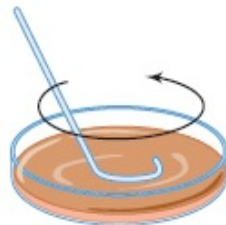
Métodos de contagem de células viáveis/ ou Contagem em Placa

- 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.

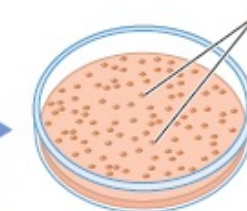
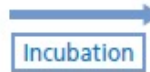
Spread-plate method



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

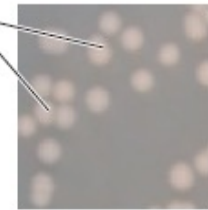


Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader



Typical spread-plate results

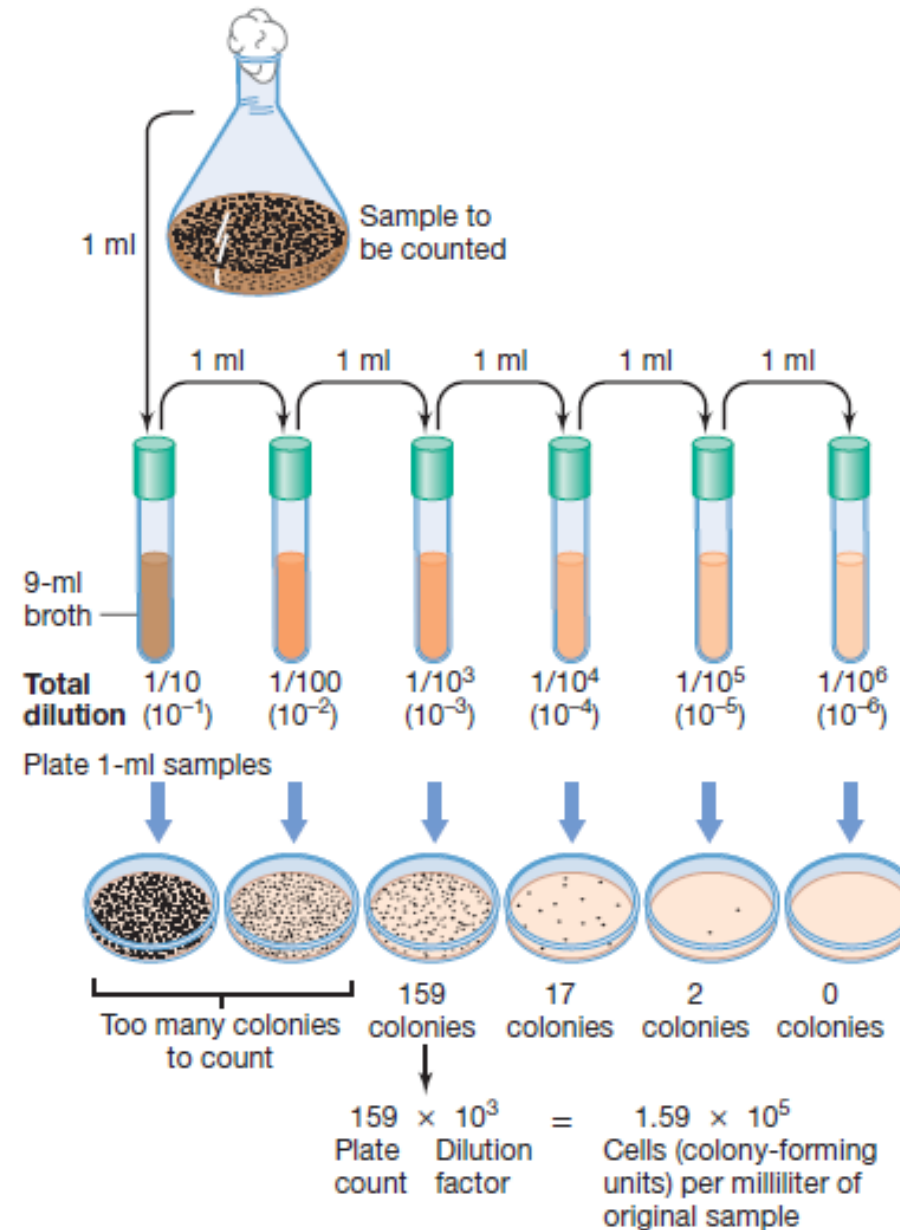
Surface colonies



Deborah C. Jung

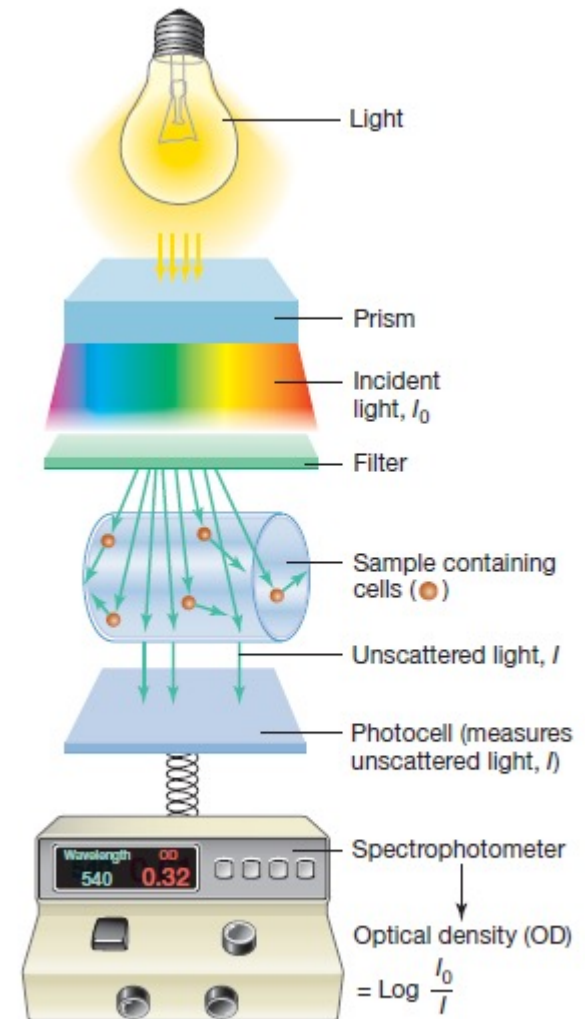
Diluição antes do Plaqueamento

- 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



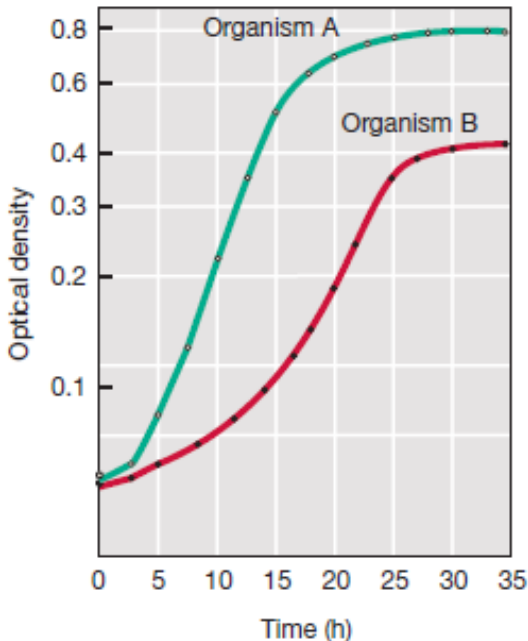
D.O – medida de turbidez

- 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

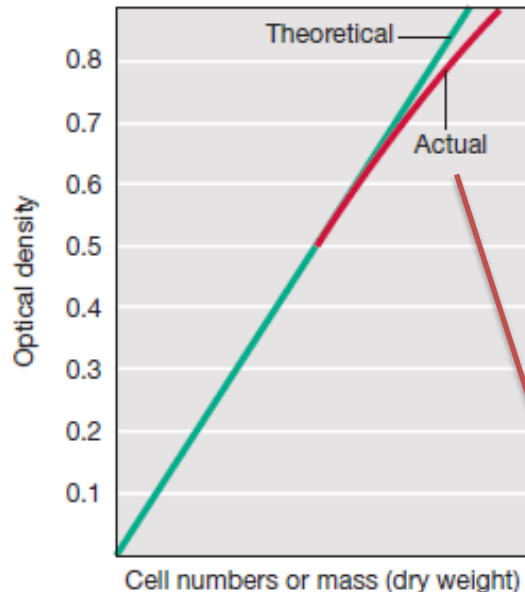


(b)

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

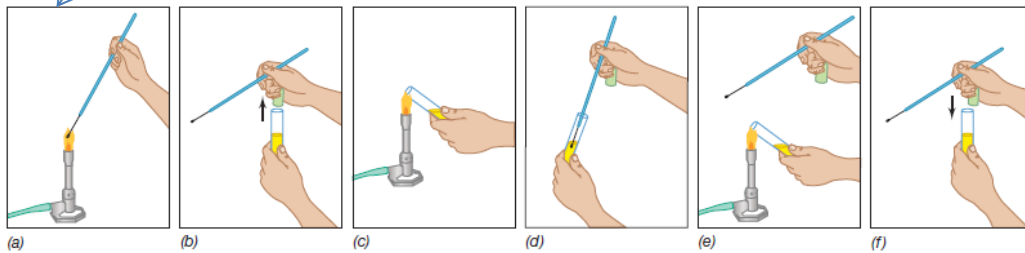


D.O é subestimada em quantidade de células elevadas

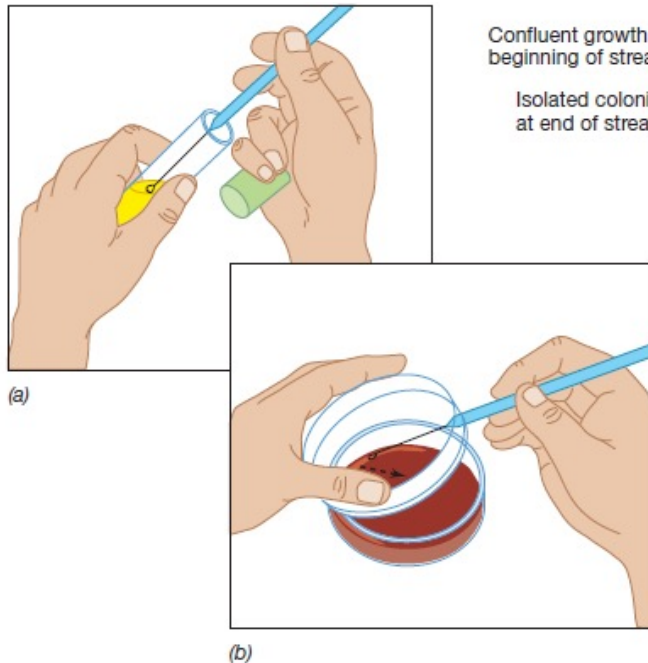
Muitas células – a luz dispersa por uma célula pode ser dispersada por outra, dando a impressão de que não teve dispersão

Obtenção de culturas puras por sementeira por esgotamento

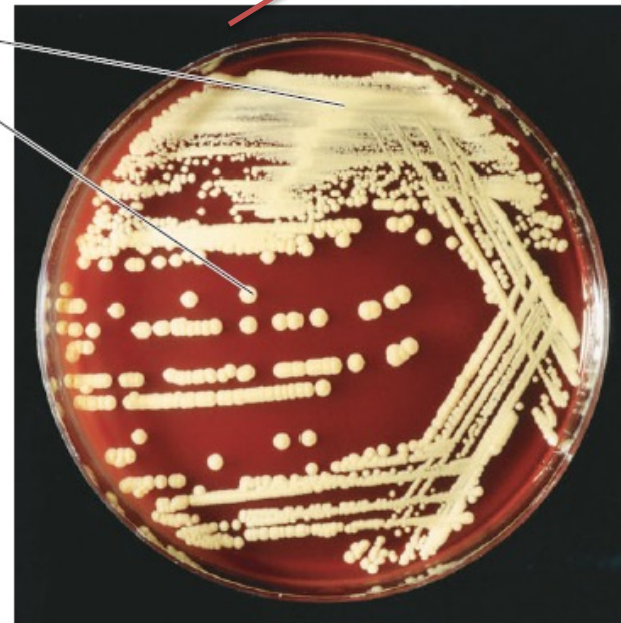
- Obtenção de amostras puras (contém apenas um tipo de microrganismo).
- Verificar a pureza da amostra
- Método de assepsia (impedir contaminações)



- Avaliar a pureza da amostra
- A quantidade de diferentes microrganismos
- Obtém **colônias** Isoladas



Confluent growth at beginning of streak
Isolated colonies at end of streak



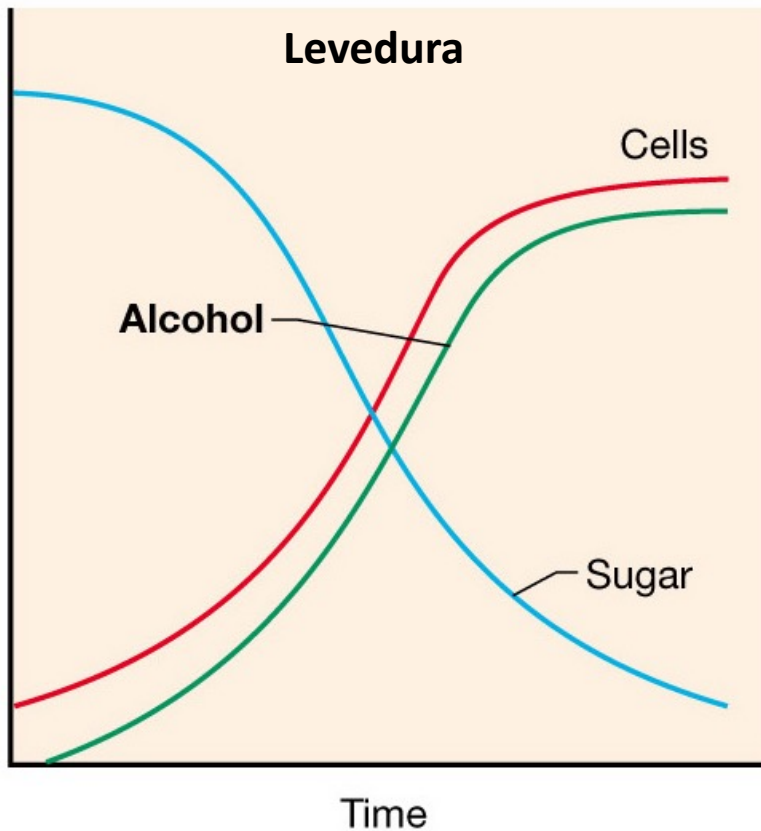
James A. Shapiro, University of Chicago

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

Metabólitos Primário e Secundário

Crescimento Primário

Metabólico constantemente sintetizado

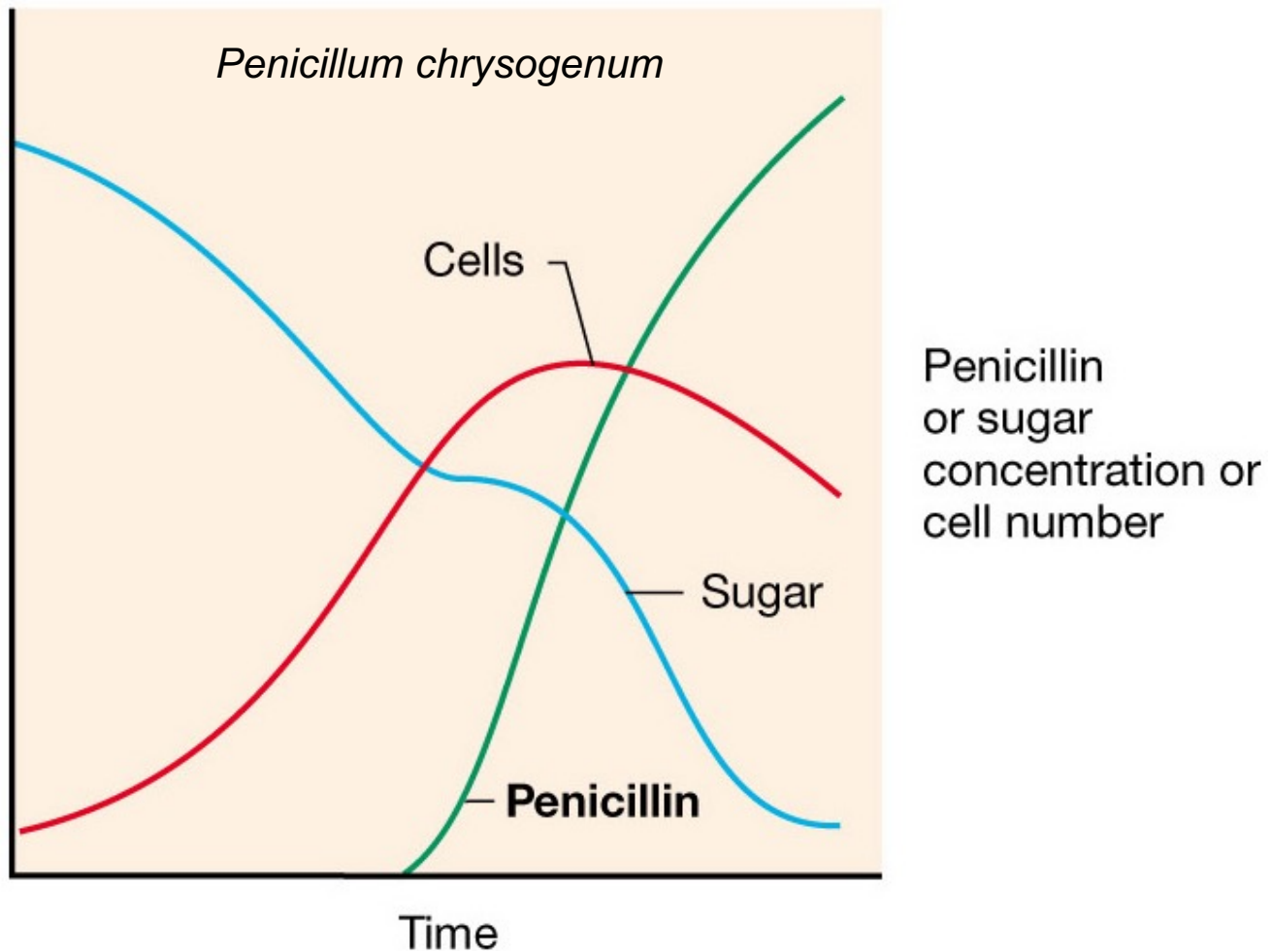


- Geralmente não são produzidos em grandes quantidades
- Faz parte do metabolismo

Alcohol or sugar
concentration or
cell number

Metabólito Secundário

Crescimento Secundário
Metabólico sintetizado próximo ao final da fase exponencial-fase estacionária



Pergunta

1. 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?
2. Podemos crescer em laboratório qualquer microrganismo? Justifique sua resposta.
3. Um ambiente com baixa concentração de oxigênio, pH ácido, altas temperaturas, 3% de sal são classificados de que forma, e qual domínio da vida você acha que ele pertence?
4. Durante a análise da curva de crescimento microbiano, a fase exponencial é frequentemente usada para determinar a taxa de replicação das bactérias. Como a taxa de replicação é calculada a partir dos dados da fase exponencial da curva de crescimento? Quais fatores podem influenciar essa taxa?
5. Os metabólitos secundários são produtos químicos produzidos pelas bactérias que não estão diretamente envolvidos no crescimento, mas muitas vezes desempenham papéis importantes na defesa ou na comunicação celular. Como os metabólitos primários e secundários diferem em relação ao seu papel e à regulação durante o crescimento bacteriano?

- Uma equipe de pesquisa está investigando a eficácia de um novo antibiótico em uma cultura de células. Eles realizaram uma série de experimentos para determinar a diferença entre células viáveis e células totais, usando conceitos de diluição em série, contagem de células e densidade óptica.

Questão 1: Diluição em Série e Contagem de Células

Os pesquisadores coletaram uma amostra da cultura de células e realizaram uma diluição em série para determinar a concentração de células viáveis. A amostra original tinha uma concentração desconhecida.

a) Explique como a diluição em série é realizada e por que é uma técnica importante na contagem de células. b) Descreva o processo que os pesquisadores devem seguir para contar as células em uma câmara de Neubauer após a diluição em série. Como eles podem calcular a concentração de células viáveis na amostra original? c) Quais desafios podem surgir ao realizar a contagem de células usando esse método e como os pesquisadores podem minimizar erros?

Questão 2: Densidade Óptica e Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade das células após a exposição ao fármaco, os pesquisadores mediram a densidade óptica em um espectrofotômetro em diferentes comprimentos de onda.

a) Explique o conceito de densidade óptica e como ele está relacionado à viabilidade celular. Como a densidade óptica pode refletir a presença de células viáveis e não viáveis? b) Como os resultados da densidade óptica podem ser interpretados erroneamente em certos cenários?