



Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de Lorena
Departamento de Biotecnologia



Microbiologia Experimental

Prof: Tatiane da Franca Silva
tatianedafra@usp.br

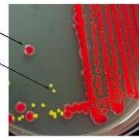
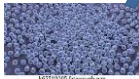
1



2

Conceito de Colônia Pura

Colônia visível vem de um único esporo, célula vegetativa ou de um grupo dos mesmos microrganismos



3



4

Biologia Molecular



- Estudos com o RNA ribossomal (16S e 18S)
- Identificação de Espécies – DNA Barcode
- Moléculas marcadoras

5

Metagenômica



- Estudo dos microrganismos e suas comunidades no contexto de seu habitat natural.
- Mais de 10.000 genomas microbianos podem ser sequenciados em um único experimento.

6

BIODIVERSIDADE

A desconhecida biodiversidade da Terra

Para cada espécie de ser vivo conhecida no planeta, há 100 mil por serem identificadas, de acordo com a projeção de um grupo da Universidade de Indiana, Estados Unidos. Segundo esse trabalho, a Terra deve abrigar 1 trilhão de espécies de microrganismos, das quais 99,999% permanecem desconhecidas. O levantamento se baseou em informações de bancos de dados.



Grande Fonte Prismática, no Parque Nacional de Yellowstone: águas ricas em microrganismos ainda não identificados

7

Capacidade de cultivar um microrganismo específico

Atender as exigências nutricionais e condições físicas ideais

Devem ser fornecidos:

- ❖ Fonte Carbono (C): glicose, amido, sacarose, dextrose,...
- ❖ Nitrogênio (N)
- ❖ Fonte de Enxofre e fósforo
- ❖ Elementos Minerais : Ca, Fe,...
- ❖ Vitaminas
- ❖ H₂O



9

Condições físicas ideais:

pH

Temperatura

Aeração,.....

The slide contains three main diagrams: 1) A pH scale from 0 to 14, with 'Acidobacterias' in the acidic range (pH 0-6) and 'Neutrobacterias' in the neutral range (pH 7-8). 2) A graph of temperature (°C) vs. growth rate for Psychrofilo, Mesófilo, Termófilo, and Hypertermófilo. 3) A diagram showing aeration levels from 'Baixa' to 'Alta' with corresponding microbial growth patterns in test tubes.

10

Classificação do Meio de cultura

Quanto a consistência:

Meio Líquido

Meio Sólido (Agente Solidificante)

Meio Semi-Sólido

The slide shows three types of culture media: 1) 'Meio Líquido' represented by a test tube with a yellow liquid. 2) 'Meio Sólido (Agente Solidificante)' represented by a petri dish with a yellow agar surface and a plant stem. 3) 'Meio Semi-Sólido' represented by a test tube with a yellow semi-solid medium.

11

Classificação do Meio de cultura

Quanto a composição

Sintéticos : quimicamente definidos

Naturais ou Complexos: com composição química não definida, como extratos de vegetais, de animais e de microrganismos.

Quanto a Seletividade

Seletivos: para um determinado microrganismos

Não Seletivo: ampla gama de microrganismos

Diferencial: evidencia propriedade

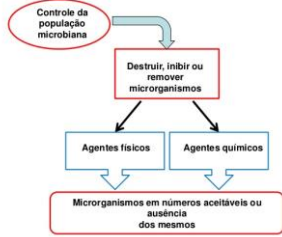
The slide includes a petri dish image showing bacterial growth on a differential medium. Labels include 'bactéria aeróbica', 'bactéria anaeróbica', and 'patógeno'.

12

| Meio de Cultura- Líquido | |
|--------------------------|---------------------|
| 1. Bactérias | |
| Extrato de carne | 3,0 |
| Peptona | 10,0 |
| Cloreto de sódio | 5,0 g/ L., pH = 7,0 |
| 2. Leveduras | |
| Extrato de levedura | 3,0 |
| Extrato de malte | 3,0 |
| Peptona | 5,0 |
| Glicose | 10,0 g/L pH= 4,5 |

13

CONTROLE DE POPULAÇÕES MICORBIANA

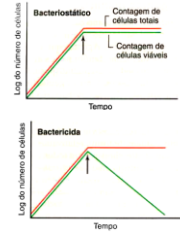


14

AGENTES ANTIMICROBIANOS QUÍMICOS

Capaz de matar ou inibir o crescimento do microorganismo

- ✓ Atuação "státicos" (crescimento). Ex: Bacteristático
- ✓ Atuação "cida" (morte). Ex Bactericida
- ✓ Atuação "lítica" (morte por lise). Ex: Bacteriolítico



15

Grupos de Agentes Químicos utilizados no Controle de Microorganismos

a) **Detergentes:** extremidade Hidrofílica e Hidrofóbica. Causam ruptura das membranas celulares



c) **Álcoois:** Dissolvem lipídios de membrana e desnatura proteínas.

Etilíco a 60-85%: mata células vegetativas



16

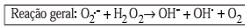
e) **Halogênios:** Fortes Agente Oxidantes. Reage com as proteínas.

iodo, cloro, bromo

Exemplo: Iodo combina-se com a tirosina, inativando proteínas

17

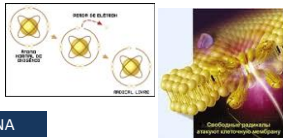
g) **Peróxido de Hidrogênio:** liberam radicais livres de hidroxila dentro da célula



Radicais Livres

Alterações/ Lesões

Proteínas Lipídios DNA



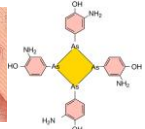
18

Agentes Antimicrobianos in vivo

❖ Sintéticos:

Ex: **Salvarsan** – Composto com Arsênio. Utilizado no tratamento da Sífilis. Muito tóxico.

Paul Erlich - Prêmio Nobel 1908



Fonte: Madigan et al., 2004. Microbiologia de Brock

19

Antibióticos β –lactâmicos

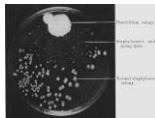
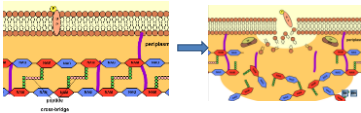
❖ Inibe a Biossíntese da parede (transpeptidação)

- Penicilina – Gram positiva

-Penicilina Semi-sintética (Ex: Ampicilina): Gram negativa

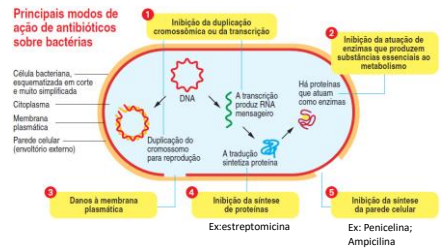


Sir Alexander Fleming



20

❖ Antibióticos- Produzido por microrganismos
Toxicidade Seletiva



21

Antibióticos

- **Espectro de ação:** * Largo espectro (ex: Tetraciclina)
 * Baixo espectro (ex: Vancomicina)

| Eucariotos | Bactéria | Bactéria parasitas obrigatórias | Vírus |
|---|--|---------------------------------|---|
| Fungos | Micobactérias Bactéria gram-negativas Bactéria gram-positivas | Clamídias Riquétsias | Vírus de RNA Vírus de DNA |
| Azóis Alílamas Colohexímda Polítenas Polítenas Análogos de ácidos nucleósíds | Tobramicina Penicilinas Sulfonamidas Cefalosporinas Quinolonas Estreptomicina Isoniazida Polimixinas Vancomicina | Tetraciclina Vancomicina | Inibidores não nucleosídicos de transcriptase reversa Inibidores de protease Análogos nucleosídicos Interferon |

22

Teste de Eficácia de Susceptibilidade aos Agentes Químicos

❖ Métodos Padronizados

Concentração Mínima Inibitória (CIM):

- Diluição em tubo ou placa
- Teste E

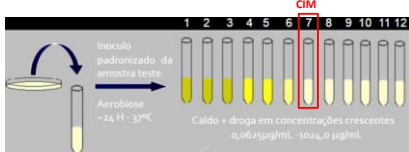


Método de Difusão de Discos em Agar

23

Teste da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

❖ Diluição em Tubo



24

Teste da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

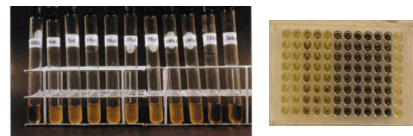
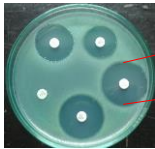


FIGURA 1. Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre a bactéria *Streptococcus mitis* (Sm) 5µl (28,62 µg/ml); 10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml); 70µl (400,63 µg/ml); 140µl (801,27µg/ml); 180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06 µg/ml). (Sm) = Controle

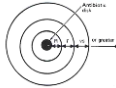
25

Método de Difusão de Disco em Ágar

- ❖ Discos com concentração conhecida do agente
- ❖ Ausência de halo – Resistência
- ❖ Presença de halo – Sensibilidade ou Resistência

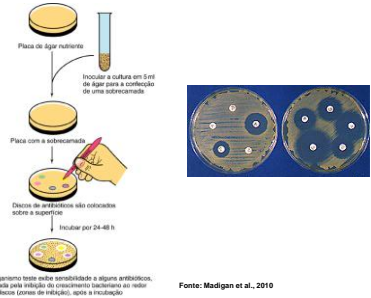


Halo de leitura em mm



26

Teste de Difusão em Discos – Diferentes Agentes Químicos



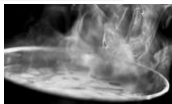
27

CONTROLE ANTIMICROBIANO POR AGENTES FÍSICOS

Calor Úmido

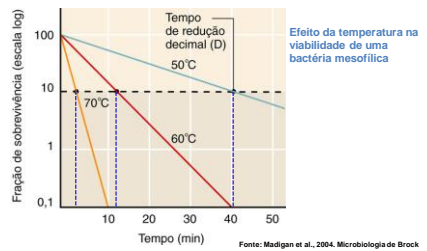
* desnaturação de proteínas

- a) Água fervente (100 °C)
 - células vegetativas x esporos
- b) Sob pressão (autoclavagem) – 121 °C a 1,1 kg cm⁻²
 - rápido aquecimento
 - grande penetração



28

Medida da Controle pelo Calor



29

CONTROLE ANTIMICROBIANO POR AGENTES FÍSICOS

Calor Seco

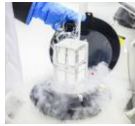
* Oxidação dos constituintes orgânicos

a) incineração: eliminação de contaminantes e cadáveres, esterilização da alça de platina



Baixas Temperaturas

- * preservação de alimentos, drogas
- * inibição das reações metabólicas
- * formação de cristais de gelo (congelamento)
- * redução da água disponível

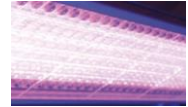


30

Radiações

a) ionizante: raios gama, raios-X, feixes de elétrons:

- * ionização das moléculas
ex. $H_2O \rightarrow OH^*$ (hidroxil) + e^- + H^*
Poderoso oxidante
- * alto poder de penetração



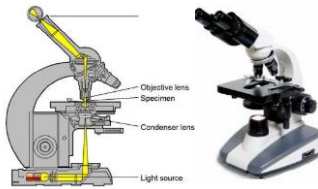
b) não ionizante:

- * luz ultravioleta: 136 a 400 nm (** 260 nm)
- * excita os elétrons produzindo vários tipos de reação:
DNA (mais afetado) - dímeros de pirimidina
- * baixo poder de penetração

31

Microscópio óptico

✓ Mais simples. Morfologia celular



Colônia de Microalgas



100µm



1µm

Richettsia
bactéria

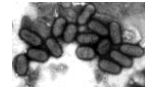
32

Microscópio Eletrônico

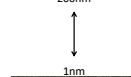
✓ Utiliza feixe de elétrons ao invés da Luz



Poxvirus



200nm

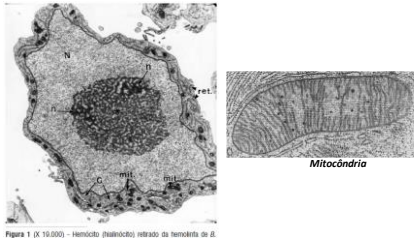


1nm

DNA

34

Microscópio Eletrônico de Transmissão



35

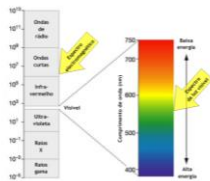
Microscópio Eletrônico de Varredura



36

Coloração em Microscopia

- ✓ **Uso de corantes**
- ✓ **Cromóforo:** Molécula ou parte de uma molécula capaz de absorver a energia da luz e refletir em comprimentos de onda do visível.



37

Tipos de coloração utilizadas em microscopia óptica



38

Coloração Simples

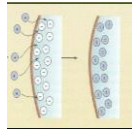
Utiliza um único corante

1. Positiva

→ corante de carga positiva que se liga a carga negativa da superfície das células e do Material Genético.



Ex: Azul de Metileno



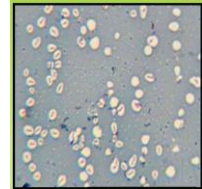
39

Coloração Simples

2. Negativa

→ corante com carga negativa que é repelido pela superfície das células.

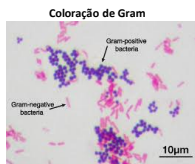
Bactéria encapsulada



40

Coloração Diferencial

→ Uso de dois corantes contrastes. Geram coloração diferentes entre grupos distintos ou estruturas



Coloração de Gram



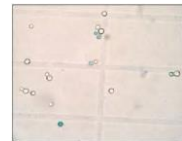
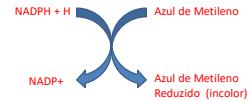
Visualização de estruturas

41

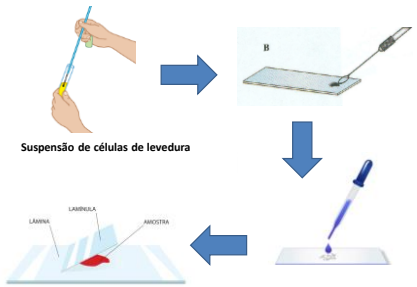
Coloração Vital

❖ Verifica a viabilidade das células, através da ocorrência de reações bioquímicas. **Baixa toxicidade**

Exemplo: Solução de Azul de Metileno 0,01%



42

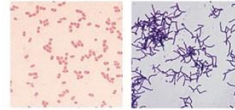
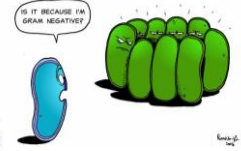


43

Coloração de Gram



Hans Chistian Joachim Gram (1884)



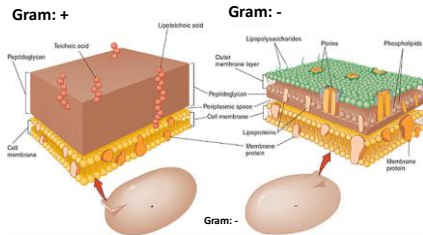
Gram-negativo

Gram-positivo

44

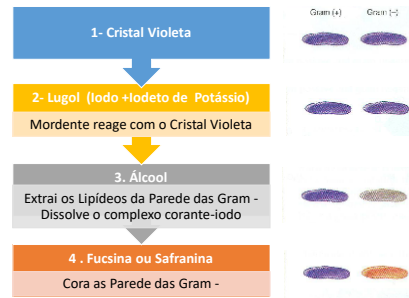
Coloração de Gram

❖ Baseada nos tipos de parede

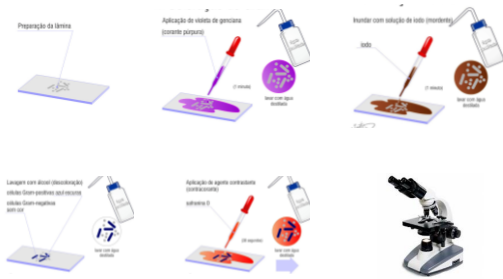


45

Procedimento



46

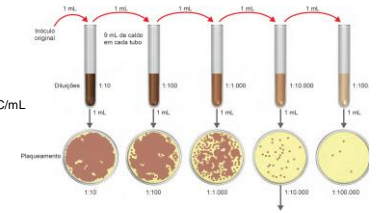


47

Contagem em placa

- ✓ Unidade Formadora de Colônia - UFC
- ✓ UFC= Número de colônias X fator de diluição/ volume do inóculo.

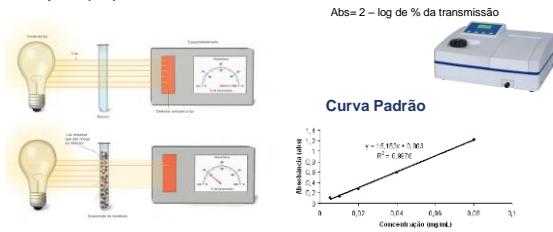
Exemplo:
32 X 10.000/ 1mL = 320.000 UFC/mL



48

Turbidimetria

- ✓ Quantificado através dos valores de Absorbância (Abs) ou Densidade Óptica (DO).



49

Contagem Microscópica Direta

- ✓ Câmara de Neubauer
- Volume da Câmara = 10⁻⁴ mL
- Nº de células /mL= média dos quadrantes X 10⁴

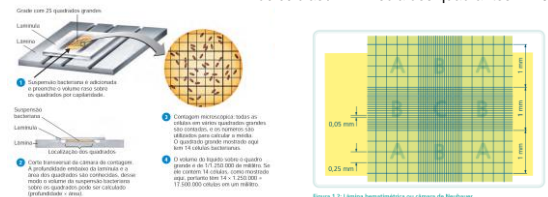


Figura 1.3. Lâmina hemocitométrica ou câmara de Neubauer

50

Contagem Microscópica Direta

✓ Câmara de Neubauer

Volume da Câmara = 10^{-4} mL

1- N° de células /mL = média dos quadrantes X 10^4

2- N° de células /mL = n X 5 X 10^4

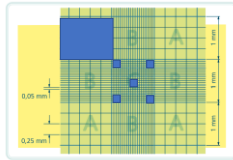
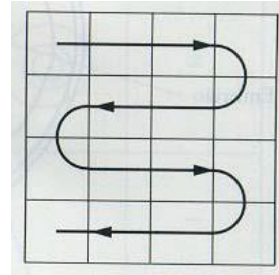


Figura 1.2: Lâmina hemocitométrica na câmara de Neubauer com 770x



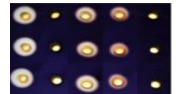
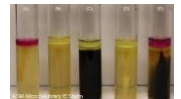
51

52

Provas Bioquímicas

✓ Permite identificar características metabólicas dos microorganismos

- ✓ Aplicações:
 - ❑ "Screening" de microorganismos com características de interesse
 - ❑ Caracterização de novos microorganismos
 - ❑ Fácil Identificação de grupos de microorganismos de amostras desconhecidas



53

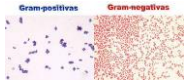
54

Identificação de Microrganismos

Crítérios Morfológicos



Métodos baseados em coloração diferencial



Métodos baseados em Provas bioquímicas



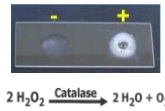
Métodos genéticos e moleculares



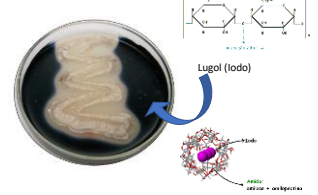
55

Provas Bioquímicas → Metabolismo → PRESENÇA DE ENZIMAS

CATALASE



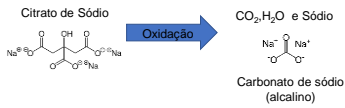
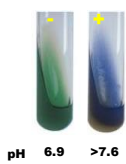
AMILASE



56

Provas Bioquímicas → Metabolismo → PRESENÇA DE ENZIMAS

CITRATO



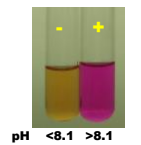
✓ Azul de bromotimol no meio - indicador de pH

57

Provas Bioquímicas → Metabolismo → PRESENÇA DE ENZIMAS

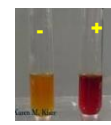
Outras provas podem ser utilizadas....

UREIA



Urease
Hidrolise da ureia

VERMELHO DE METILA



produção de ácidos
(lático, acético)

TSI: Glicose, lactose, sacarose



58

Provas Bioquímicas – Identificação das amostras A e B

| | Escherichia | Streptobacillus | Staphylococcus | Klesibiella | Bacillus |
|------------|-------------|-----------------|----------------|-------------|----------|
| Morfologia | bacilo | bacilo | coco | bacilo | bacilo |
| Catalase | + | - | + | + | - |
| Amilase | - | - | - | + | + |
| Citrato | - | - | + | + | - |
| Gram | - | + | + | - | + |

59

Utilização de métodos para avaliar a presença de microorganismos em amostras de leite e água



60

Testes **quantitativos** e **qualitativos** da população de microbiana

“É menos prejudicial beber um copo de água com muitas bactérias saprófitas do que um copo com apenas uma bactéria patogênica por mL”



61

Análise Microbiológica do Leite

Leite: excelente meio para o crescimento bacteriano!!!

Composição :

- água (87,5%)
- gordura (3,6%)
- proteínas (3,6%)
- lactose (4,5%)
- pH 6.5- 6.8
- Rico em vitaminas e sais minerais



62

✓ Leite já sai da mama com bactérias (100 a 10.000/ml)

✓ Azedo 7.000.000 bactérias/ml)

Leite de boa qualidade é aquele com a menor carga bacteriana possível o que garantirá uma matéria-prima de qualidade para a indústria e para o consumidor.



63

MICROORGANISMOS DETERIORANTES E PATOGENICOS NO LEITE

- Alteração de características
- Aumento da acidez
- Menor vida de prateleira
- Gosto amargo

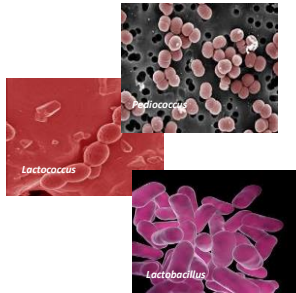


64

MICROORGANISMOS BENÉFICOS PRESENTES NO LEITE

Bactérias lácticas

- Gram +
- Não patogênicas
- Produzem ácido láctico

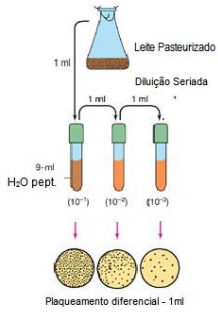


65



Métodos de determinação da carga microbiana mais utilizados em amostras de leite

66



Contagem em placa (UFC/mL)

- **Vantagens**
 - Indicador direto da qualidade do leite
- **Desvantagens**
 - Alto custo
 - Maior tempo

67



Teste da Redutase ou Tempo de Redução do Azul de Metileno (TRAM)

Utilização de Azul de Metileno

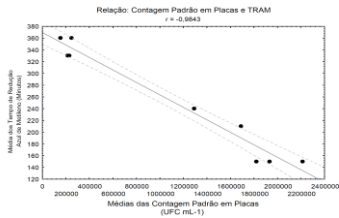
Teste Indireto

- **Vantagens**
 - Baixo custo
 - Simplicidade
 - Rapidez
- **Desvantagens**
 - Não detecta bactérias Psicrotróficas (menos redutoras do que outros contaminantes comuns do leite)

68

Correlação entre contagem em placa e Tempo de Redução do Azul de Metileno

Quanto maior o tempo para redução do Azul de Metileno, menor a atividade microbiana e melhor a qualidade do leite.



Da Rosa et al., 2007

69

Tabela: Relação entre o tempo da reação de redução do corante, concentração estimada de bactérias e qualidade do leite

| TEMPO PARA DESCORAR | UFC / mL | QUALIDADE DO LEITE |
|---------------------|---|--------------------|
| < 20 minutos | > 2,0 x 10 ⁷ | PÉSSIMA |
| 20 minutos a 2 h. | 4,0 X 10 ⁶ a 2,0 x 10 ⁷ | MÁ |
| 2 a 5,5 horas | 5 x 10 ⁵ a 4x 10 ⁶ | REGULAR |
| >5,5 horas | <5,0 x 10 ⁵ | BOA |

70



DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

Publicado em 30/10/2018 | Edição: 230 | Seção: 1 | Página: 6

Órgão: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Gabinete do Ministro

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018

REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITE CRU REFRIGERADO

Art. 27. O **leite cru destinado a fabricação de leite tipo A** e seus derivados deve apresentar médias geométricas trimestrais de Contagem Padrão em Placas de no máximo 10.000 UFC/mL, dez mil unidades formadoras de colônia por mililitro e de Contagem de Células Somáticas de no máximo 400.000 CS/mL (quatrocentas mil células por mililitro).

> 5,5 horas para a Redução do Azul de Metileno

71

REGULAMENTO TÉCNICO DE PRODUÇÃO, IDENTIDADE E QUALIDADE DO LEITE TIPO B

Composição e Requisitos Físicos, Químicos e Microbiológicos do Leite Cru Tipo B

| Item de Composição | Requisito | Método de Análise |
|---|--------------------|-------------------|
| Gordura (g/100 g) | min. 3,0 | IDF 1 C 1987 |
| Acidez, em g de ácido lático/100 mL | 0,14 a 0,18 | LANARAMA, 1981 |
| Densidade Relativa, 15/15°C, g/mL (4) | 1,028 a 1,034 | LANARAMA, 1981 |
| Índice Crioscópico máx | 0,530°H (-0,512°C) | IDF 108 A 1969 |
| Índice de Refração do Soro Cúprico a 20°C | Min. 375 Zeiss | CLADDA/SDA/MAFA |
| Sólidos Não-Gordurosos(g/100g): | min. 8,4 | IDF 21 B 1927 |
| Proteína Total (g/100 g) | min. 2,9 | IDF 20 B 1993 |
| Redutase (TRAM) | min. 3:30h | CLADDA/ MA |
| Estabilidade ao Alizarol 72% (v/v) | Estável | CLADDA/ MA |
| Contagem Padrão em Placas (UFC/mL) | máx. 5x105 | S.D.A/MA, 1993 |
| Contagem de Células Somáticas(CS/mL): | máx. 6x105 | IDF 148 A 1995 |

Nota nº (4): Densidade Relativa: dispensada quando os teores de Sólidos Totais (ST) e Sólidos Não Gordurosos (SNG) forem determinados eletronicamente.

72