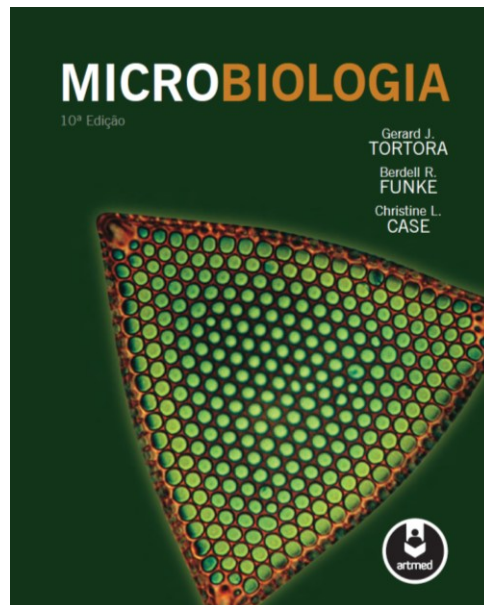


# Microbiologia: da Teoria a prática

## LOT2053

Profa. Tatiane da Franca Silva

1



3

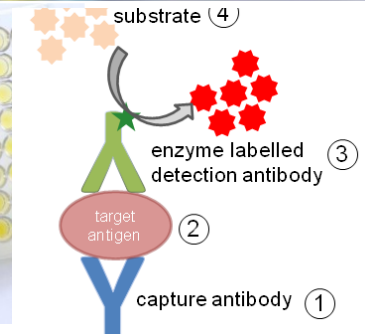
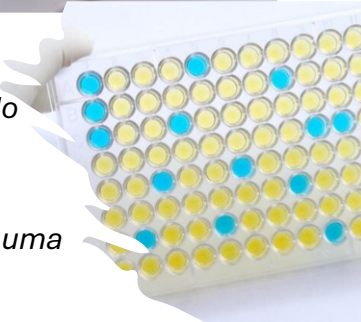
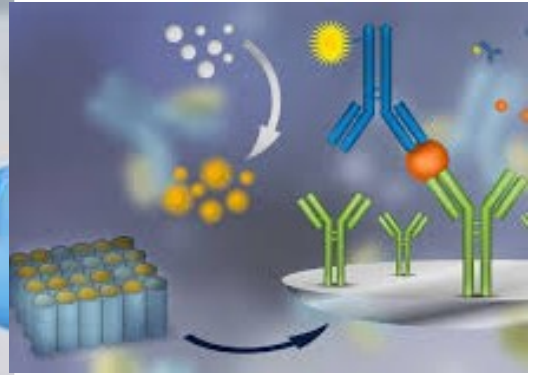
# SOROLOGIA

❑ **ELISA** (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

❑ Ferramenta para o diagnóstico de patógenos

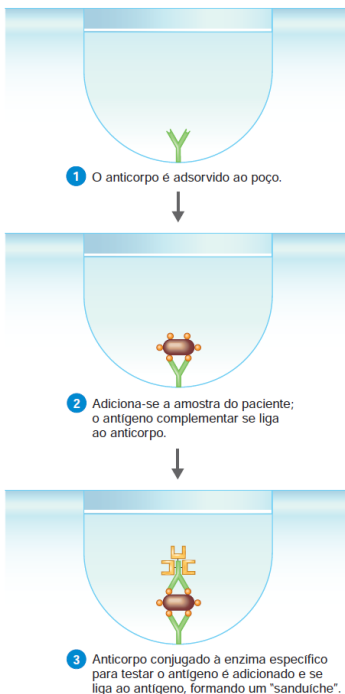
❑ Anticorpo Primário : fixação do antígeno;

❑ Anticorpo secundário ligado a uma enzima



4

## ELISA: DETECÇÃO DO MICRORGANISMO



Fonte: Tortora et al., 2012

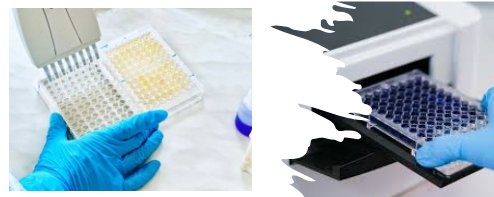
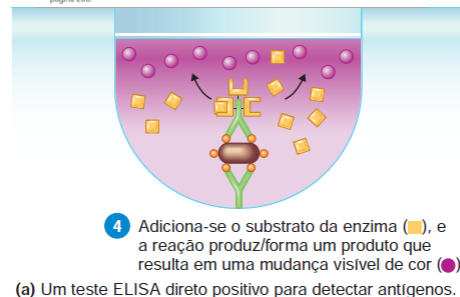


Figura 18.14 O método ELISA. Os componentes geralmente estão em pequenos poços de uma placa de microtitulação. Para uma ilustração de um técnico conduzindo um teste ELISA em uma placa de microtitulação e o uso de um computador para ler os resultados, veja a Figura 18.11, página 288.



5

# ELISA: DETECÇÃO DO ANTICORPO NO SORO

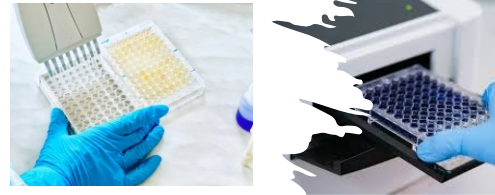
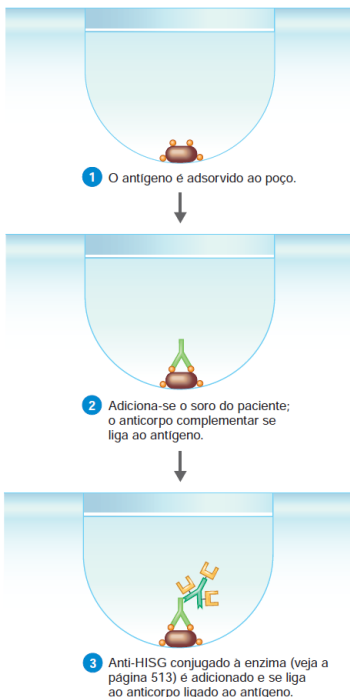
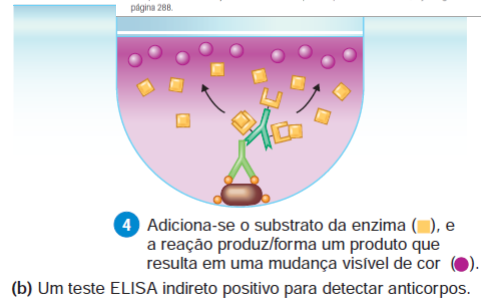


Figura 18.14 O método ELISA. Os componentes geralmente estão em pequenos poços de uma placa de microtitulação. Para uma ilustração de um técnico conduzindo um teste ELISA em uma placa de microtitulação e o uso de um computador para ler os resultados, veja a Figura 18.11, página 288.



Fonte: Tortora et al., 2012

(b) Um teste ELISA indireto positivo para detectar anticorpos.

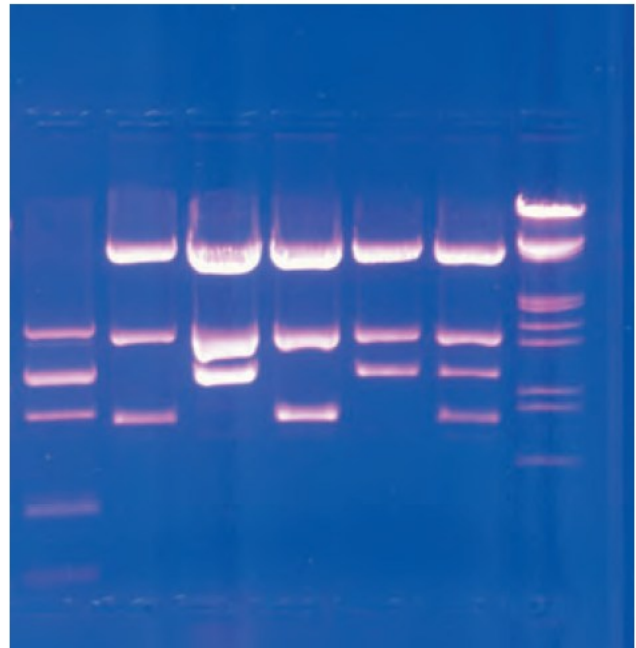
6

## FINGERPRINT

- ❑ Padrão de digestão do material genético específico para cada microorganismos

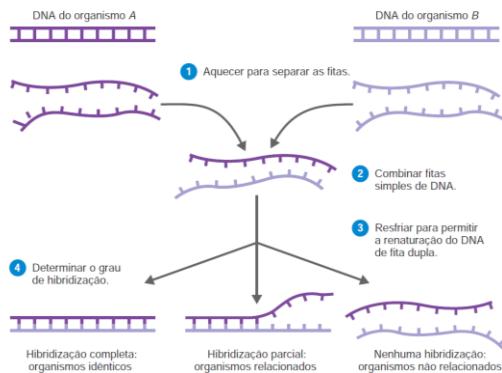


Fonte: Tortora et al., 2012

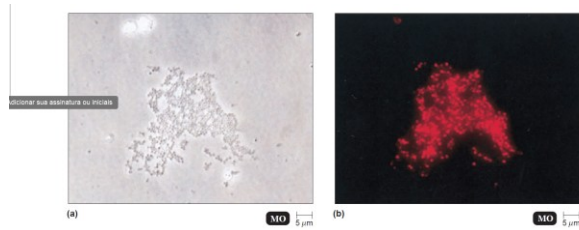


8

# IDENTIFICAÇÃO BASEADA NA HIBRIDAÇÃO DE DNA



## □ Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)



**Figura 10.18 FISH, ou hibridização fluorescente *in situ*.** Uma sonda de DNA ou RNA ligada a um corante fluorescente é utilizada para identificar cromossomos. As bactérias vistas com microscópio de contraste de fase (a) são identificadas por uma sonda marcada com fluoresceína que hibridiza com uma sequência específica de DNA de *Staphylococcus aureus* (b).

Fonte: Tortora et al., 2012

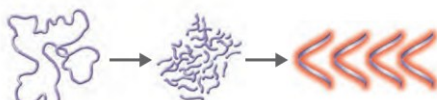
9

## CHIPS DE DNA

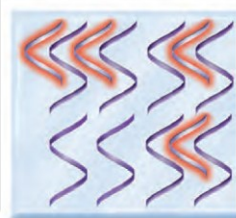
- Identificação dos Microrganismos por através da presença de um gene
- Sondas de DNA em um CHIP
- Hibridização com o DNA do patógeno



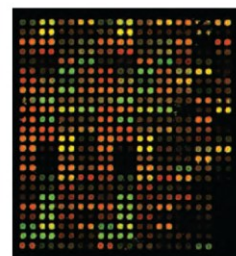
(a) Um chip de DNA pode ser fabricado para conter centenas de milhares de sequências de DNA de fitas simples sintéticas. Considere que cada sequência de DNA é exclusiva para um gene diferente.



(b) DNA desconhecido de um paciente é separado em fitas simples, cortado enzimaticamente e marcado com um corante fluorescente.



(c) O DNA desconhecido é inserido no chip e se hibridiza com o DNA no chip.



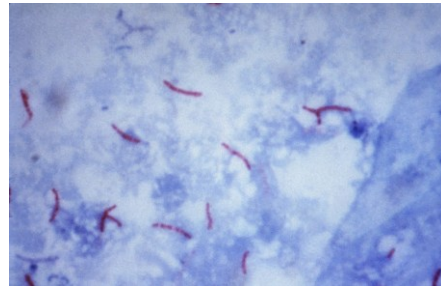
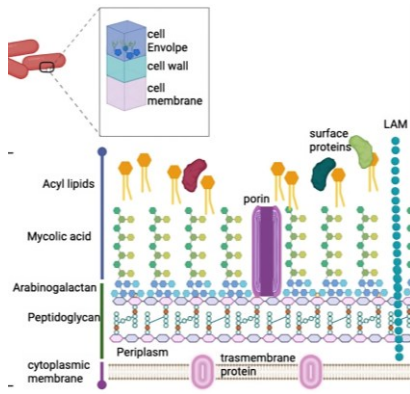
(d) O DNA marcado vai se ligar somente com o DNA complementar no chip. O DNA ligado vai ser detectado pela sua fluorescência e analisado por um computador. A luz vermelha é um gene expresso em células normais, a luz verde é um gene mutado expresso em células tumorais e a luz amarela, em ambas as células.

10

# GRAM VARIÁVEIS

## ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTES (TÉCNICA DE ZIEHL-NEESEN)

- ❑ *Mycobactérias* presença de ácido Micótico
- ❑ técnica de coloração de bactérias mais agressiva que a técnica de Gram



Fonte: Tortora et al., 2012

11

# PROCARIOTOS

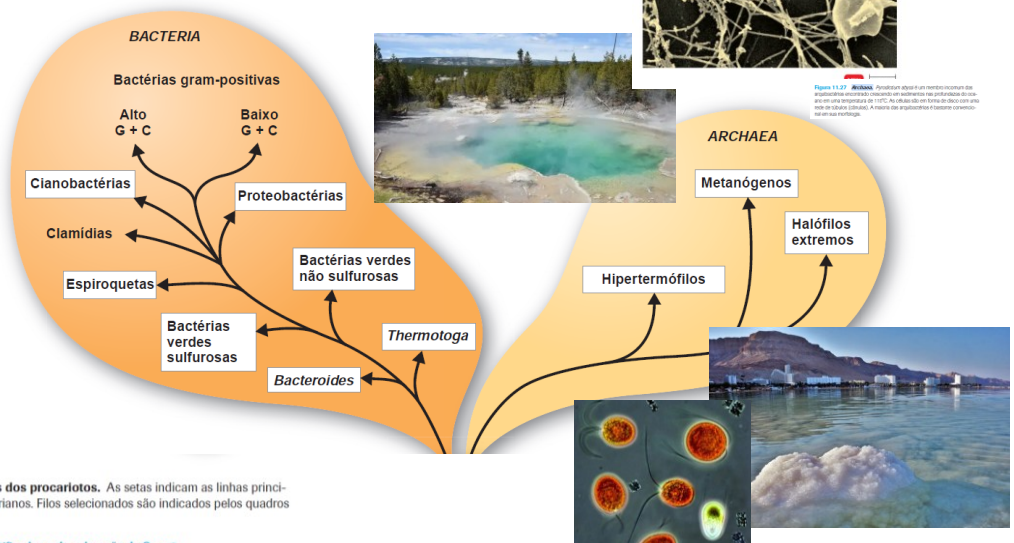
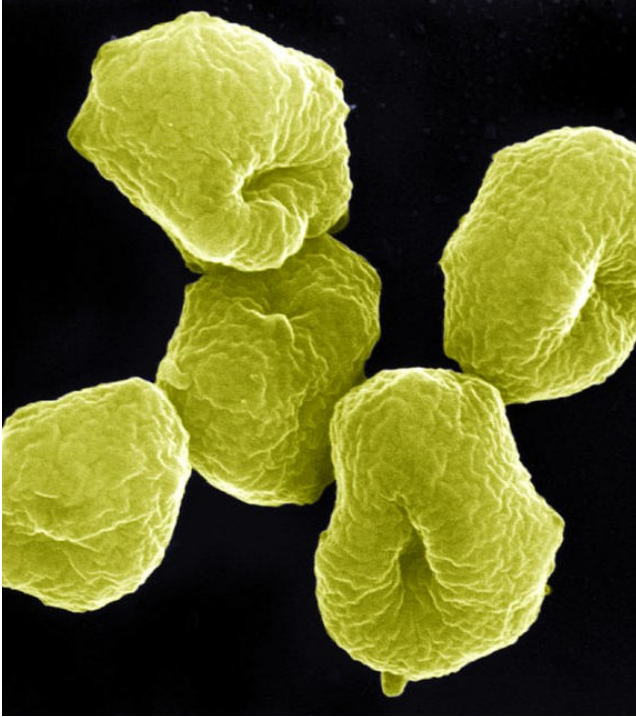


Figura 10.6 Relações filogenéticas dos procariotos. As setas indicam as linhas principais de descendência dos grupos bacterianos. Filos selecionados são indicados pelos quadros brancos.

P Membros de qual filo podem ser identificados pela coloração de Gram?

Fonte: Tortora et al., 2012

12



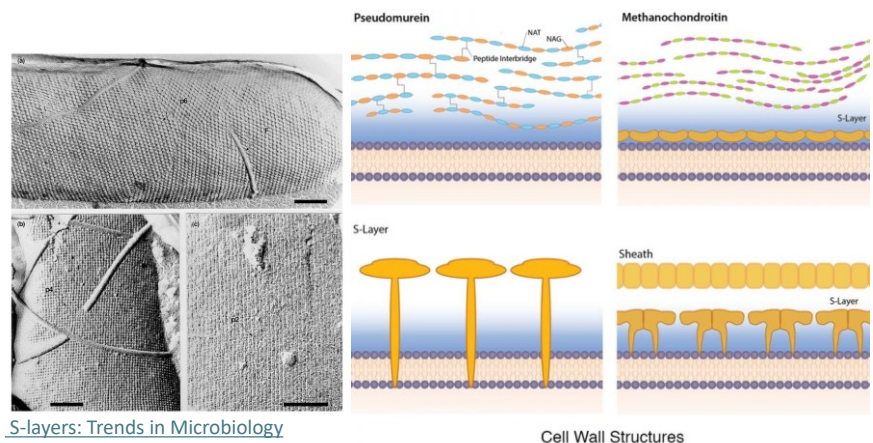
## DOMÍNIO ARCHAEA

- ☐ Morfologia convencional (bastonetes, cocos, etc..) e incomum
- ☐ Alguns com parede (não peptidoglicano) outras sem parede
- ☐ Tipicamente extremófilos  
Ex: gênero *Sulfolobus*, pH 2 e a temp > 70C.

13

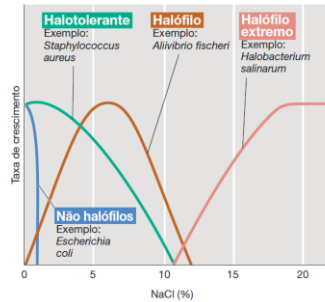
## DOMÍNIO ARCHAEA: PAREDE

- ☐ Camada de proteína cristalina (S-layer)
- ☐ Polissacarídeos
- ☐ Glicoproteínas
- ☐ Pseudopeptidoglicano (pseudomureína):
- ☐ Sem parede



**Figure 4.54. Archaeal cell wall structural diversity.** Structures include pseudomurein, methanochondroitin, S-layers and a proteinaceous sheath [Credit: Linda Bruslind]

14



**Figura 5.26** Efeito da concentração de NaCl no crescimento de microrganismos com diferentes tolerâncias ou necessidades de sal. A concentração de NaCl ótima para microrganismos marinhos, como *Vibrio fischeri*, é de cerca de 3%; para halófilos extremos, é entre 15 e 30%, dependendo do organismo.

Fonte: Mandigan et al., 2016



## DOMÍNIO ARCHAEA: HALÓFILOS EXTREMOS

❑ Gêneros principais: *Halobacterium*, *Haloferax*, *Natronobacterium*

✓ Maioria aeróbio restrito

✓ Presença de vesículas com gás

✓ Parede de glicoproteína com carga negativa

✓ Necessitam de Na<sup>+</sup> célula para estabilização da parede

15

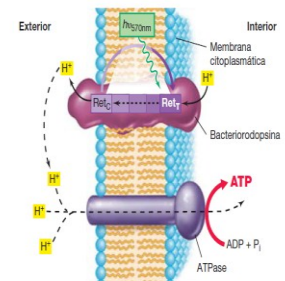
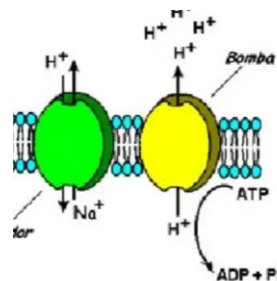
## DOMÍNIO ARCHAEA: HALÓFILOS EXTREMOS

- bombeiam grandes quantidades
- de K<sup>+</sup> para o citoplasma.
- remoção de Na<sup>+</sup> efetuada pelo antiportador Na/H<sup>+</sup> dirigido pela luz

**Tabela 16.2** Concentração de íons nas células de *Halobacterium salinarum*<sup>a</sup>

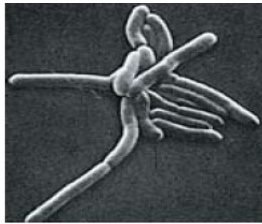
| Íon              | Concentração no meio (M) | Concentração nas células (M) |
|------------------|--------------------------|------------------------------|
| Na <sup>+</sup>  | 4,0                      | 1,4                          |
| K <sup>+</sup>   | 0,032                    | 4,6                          |
| Mg <sup>2+</sup> | 0,13                     | 0,12                         |
| Cl <sup>-</sup>  | 4,0                      | 3,6                          |

<sup>a</sup>Nadine de Rinnhim, Rinnhim, Arts 85: 50R-50R (10R2)

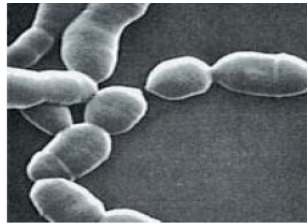


Fonte: Mandigan et al., 2016

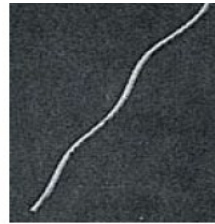
16



(a)



(b)



(c)

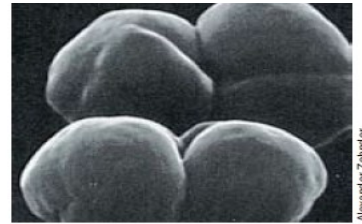


Figura 16.5 Micrografias eletrônicas de varredura de células de diversos arqueas metanogênicos. (a) *Methanobacterium* (uma célula tem diâmetro aproximado de 1 µm). (b) *Methanocaldococcus* (uma célula tem diâmetro aproximado de 0,5 µm). (c) *Methanosarcina* (uma célula tem diâmetro aproximado de 1,2 µm). (d) *Methanospirillum* (uma célula tem diâmetro aproximado de 1,2 µm).

- ✓ Gêneros : *Methanobacterium*,  
*Methanocaldococcus*,  
*Methanosarcina*
- ✓ Anaeróbicos obrigatórios
- ✓ diversidade química de paredes celulares
- ✓ Maioria mesofílica e não halofílica

## DOMÍNIO ARCHAEA: METANOGÊNICAS

17

## DOMÍNIO ARCHAEA: METANOGÊNICAS

- ✓ Habitats naturais diversificado
- ✓ Diversos substratos podem ser convertidos em Metano

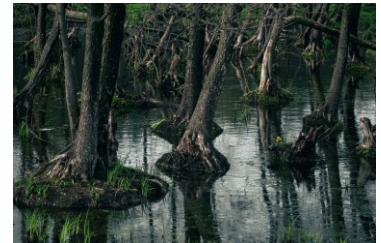
**Tabela 16.5** Substratos convertidos a metano por várias arqueias metanogênicas

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I. Substratos do tipo $\text{CO}_2$<br>Dióxido de carbono, $\text{CO}_2$ (com elétrons derivados do $\text{H}_2$ , certos alcoóis ou piruvato)<br>Formato, $\text{HCOO}^-$<br>Monóxido de carbono, $\text{CO}$                                                                                    |                                                                                                              |
| II. Substratos metilados<br>Metanol, $\text{CH}_3\text{OH}$<br>Metil-amina, $\text{CH}_3\text{NH}_2^+$<br>Dimetil-amina, $(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+$<br>Trimetil-amina, $(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+$<br>Metil-mercaptano, $\text{CH}_3\text{SH}$<br>Dimetil-sulfeto, $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ | III. Substratos acetotróficos<br>Acetato, $\text{CH}_3\text{COO}^-$<br>Piruvato, $\text{CH}_3\text{COCOO}^-$ |

Fonte: Mandigan et al., 2016



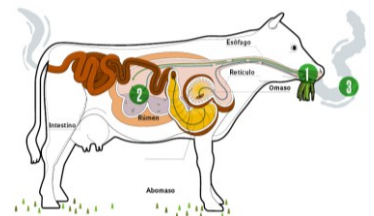
Intestino de cupins



Sedimentos anóxicos



Lagos

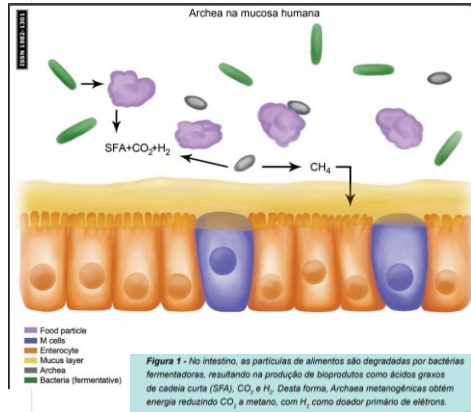


Trato digestivo dos animais

18

## DOMÍNIO ARCHAEA: METANOGENÉTICAS

- Interações microbianas
- Outros microrganismos fermentam compostos orgânicos como carboidratos e proteínas.
- Processos de fermentação geram  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  que são utilizados para a produção de Metano



Fonte: Microbiologia em Foco

19

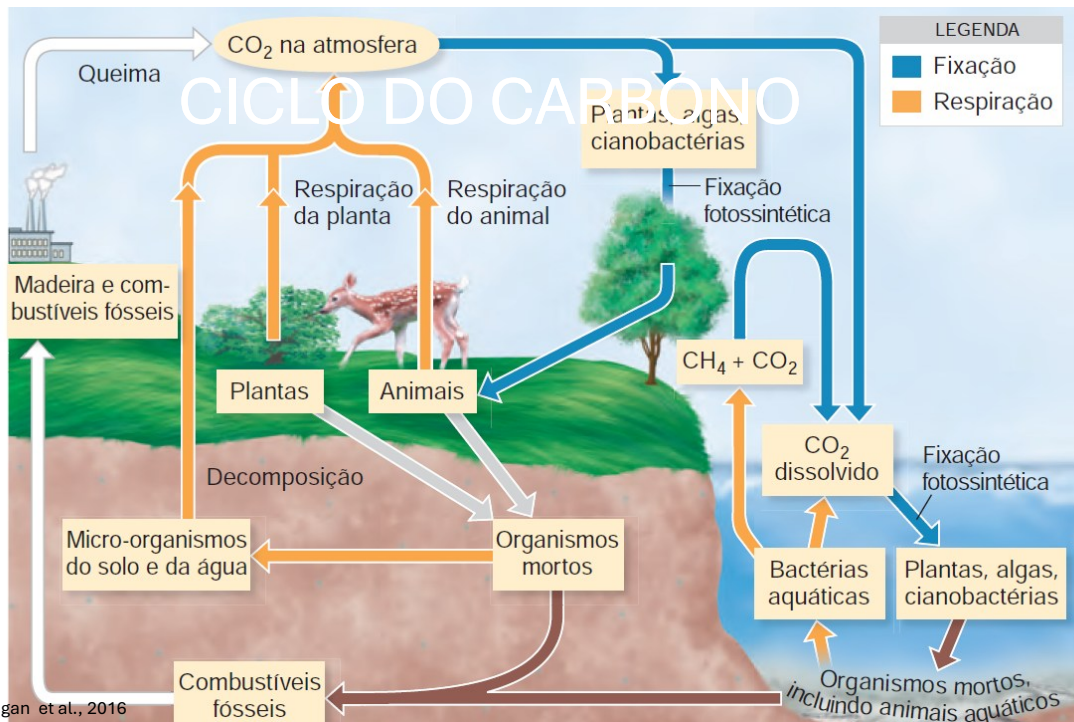


Usinas de biodegradação: biodigestão de lodo de esgoto

DOMÍNIO ARCHAEA:  
METANOGENÉTICAS

Figura 16.6 Micrografias eletrônicas de transmissão de imagens finas de arqueas metanogênicas. (a) Methanobrevibacterium ruminantium. Uma célula tem diâmetro de 0,7 µm. (b) Methanococcus barophilus, apresentando a

20



Fonte: Mandigan et al., 2016

21

## DOMÍNIO ARCHAEA: HIPERTERMÓFILOS

- ❑ Gêneros: Thermoplasma, Picrophilus, Ferroplasma

- ✓ Qual o limite de temperatura para a vida?

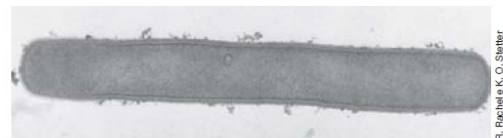
O atual recordista: *Methanopyrus* 122 °C

- ✓ ATP é degradado a 150°C.

Adaptações:

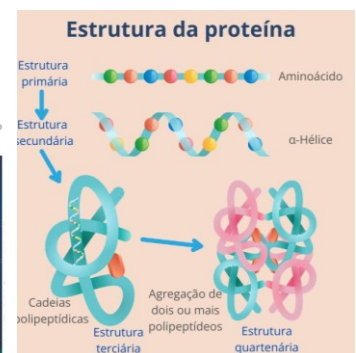
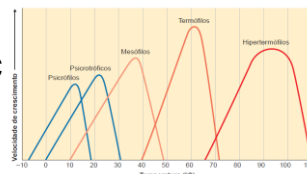
- ✓ Dobramento confere termoestabilidade a proteínas

Fontes geotermiais



*Methanopyrus*

R. Rachel & C. Shetter



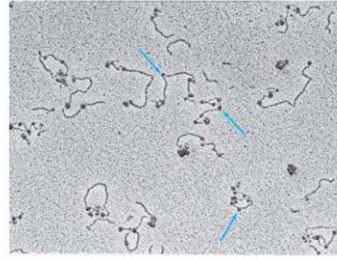
22

# DOMÍNIO ARCHAEA: HIPERTERMÓFILOS

## Adaptações

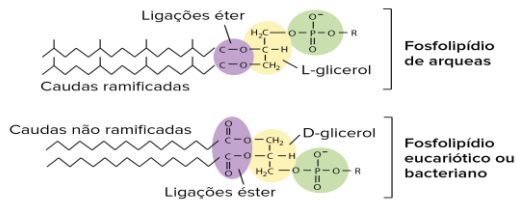
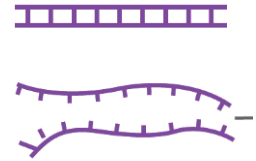
✓ Estabilidade do DNA: solutos, girase reversa e proteínas de ligação do DNA

✓ Lipídeos incomuns

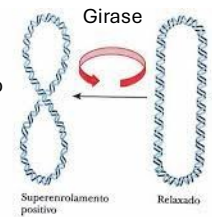


**Figura 16.27** Histonas de arqueas e nucleossomos. Micrografia eletrônica de um DNA plasmidial linearizado, enrolado ao redor de cópias da histona Hmf do organismo metanogênico hipertermofílico *Methanothermobacter fervidus*, formando estruturas semelhantes aos nucleossomos, grosseiramente esféricas, coradas em escuro (setas). Comparar esta micrografia com a ilustração de histonas e nucleossomos de eucariotos, apresentada na Figura 2.61b.

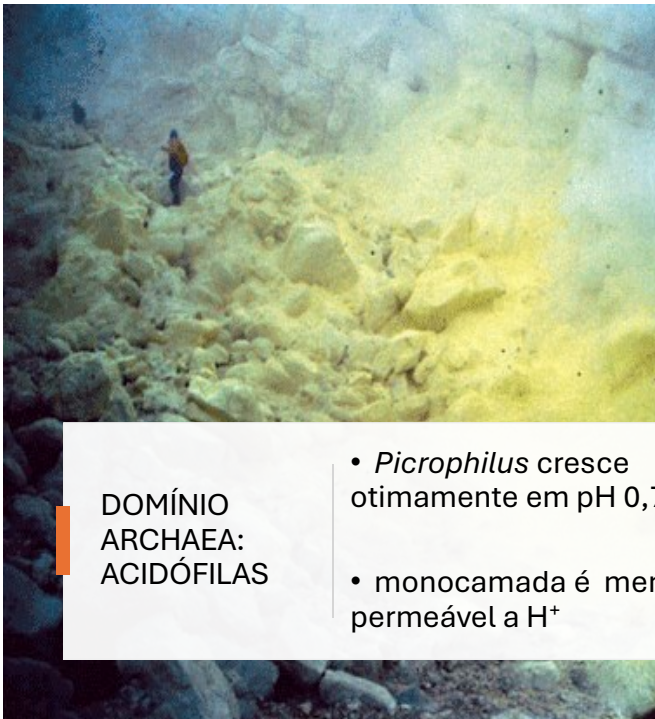
DNA Desnatura a altas temperaturas



superenovelamento  
s positivos no DNA

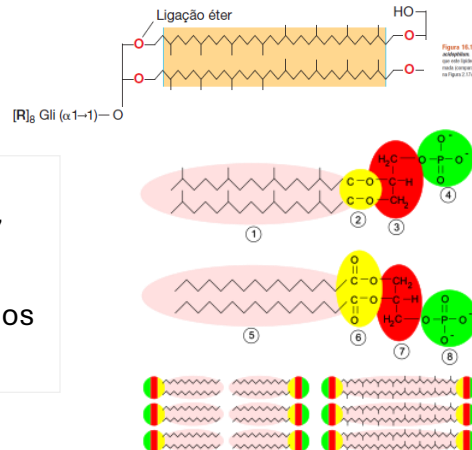
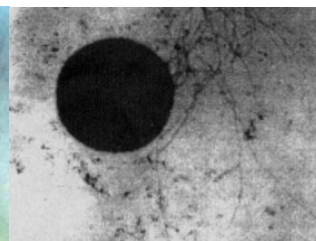


23



DOMÍNIO  
ARCHAEA:  
ACIDÓFILAS

- *Picrophilus* cresce otimamente em pH 0,7
- monocamada é menos permeável a  $H^+$



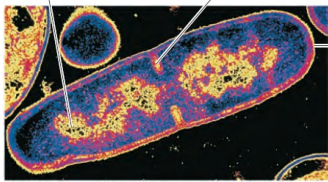
24

# CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

25

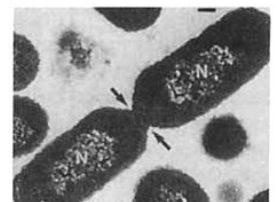
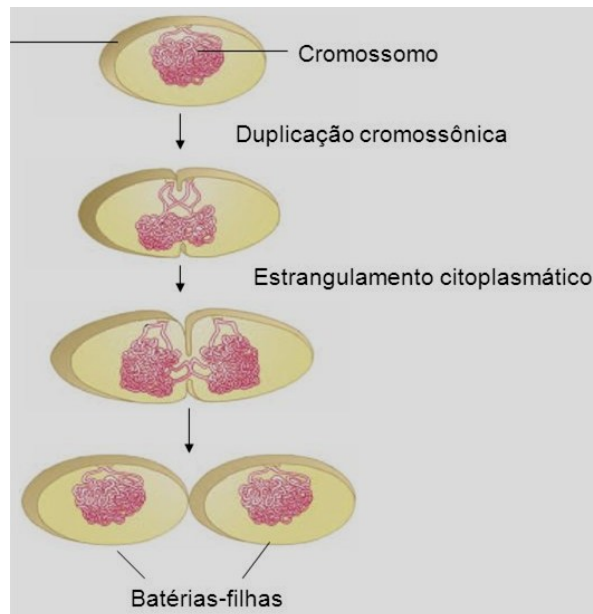
## CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

- ✓ Divisão bacteriana
- ✓ Fissão binária



(b) Secção ultrafina da célula de *Bacillus licheniformis* iniciando sua divisão.

Figura 6.12 Fissão binária em bactéria.



26

# MEDIDAS DO CRESCIMENTO MICROBIANO



27

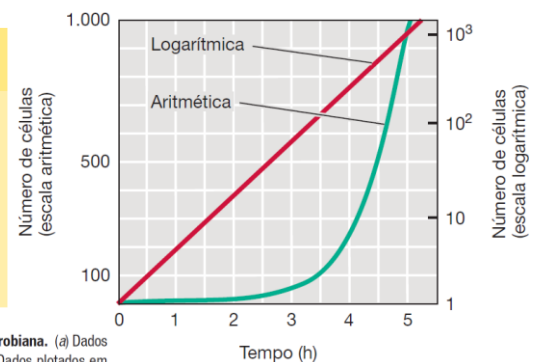
## CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS: TEMPO DE GERAÇÃO

✓ Tempo necessário para uma célula se dividir e sua população Duplicar

Ex: Tempo de geração de 30 minutos



| Tempo (h) | Número total de células | Tempo (h) | Número total de células |
|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|
| 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 ( $2^{20}$ )  |



**Figura 5.9** Taxa de crescimento de uma cultura microbiana. (a) Dados de uma população que se duplica a cada 30 minutos. (b) Dados plotados em escalas aritmética (ordenada à esquerda) e logarítmica (ordenada à direita).

28

## CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS: TEMPO DE GERAÇÃO

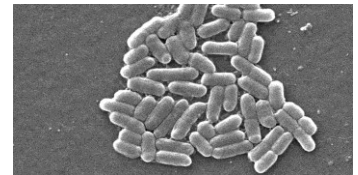
$$N = N_0 2^n$$

$n$  = numero de gerações

Tempo de geração ( $g$ ) =  $t$  (tempo de duração)/ $n$

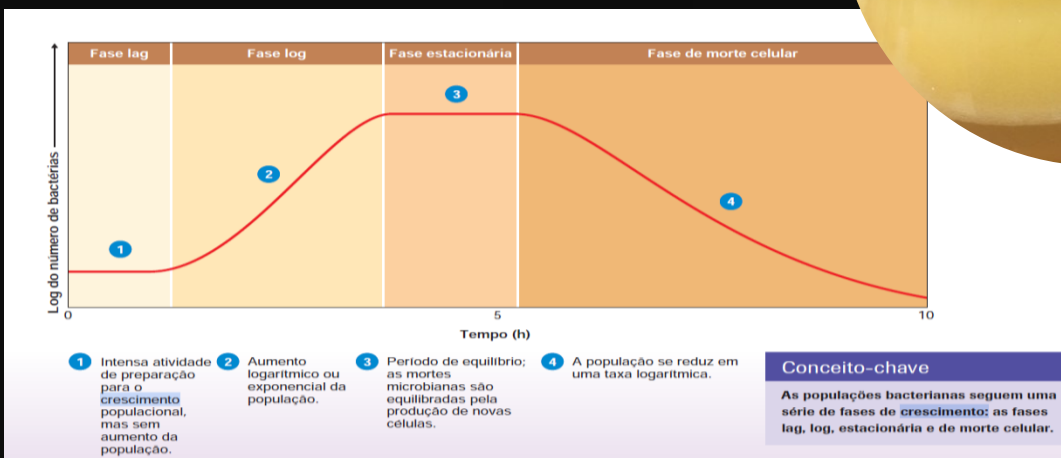
| Número de gerações | Número de células    | Log <sub>10</sub> do número de células |
|--------------------|----------------------|----------------------------------------|
| 0                  | $2^0 = 1$            | 0                                      |
| 5                  | $2^5 = 32$           | 1,51                                   |
| 10                 | $2^{10} = 1.024$     | 3,01                                   |
| 15                 | $2^{15} = 32.768$    | 4,52                                   |
| 16                 | $2^{16} = 65.536$    | 4,82                                   |
| 17                 | $2^{17} = 131.072$   | 5,12                                   |
| 18                 | $2^{18} = 262.144$   | 5,42                                   |
| 19                 | $2^{19} = 524.288$   | 5,72                                   |
| 20                 | $2^{20} = 1.048.576$ | 6,02                                   |

Em um período de 8 horas uma população de células em crescimento exponencial aumenta de  $5 \times 10^6$  células/mL para  $5 \times 10^8$  células/mL, calcule o valor do tempo de geração.



29

## FASES DO CRESCIMENTO BACTERIANO



31

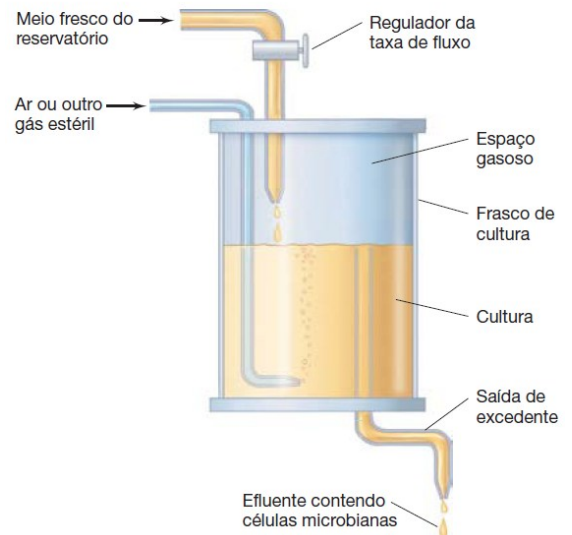
## CULTURA CONTÍNUA

- Sistema aberto
- Cultura em equilíbrio



### Quimioestado

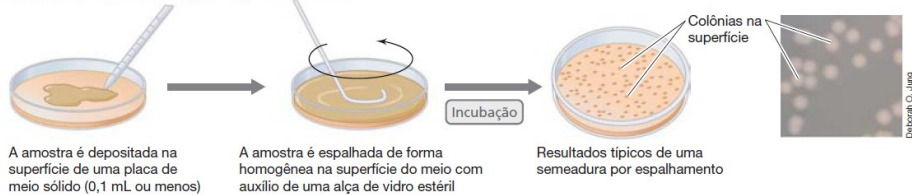
C



32

## CONTAGEM EM PLACA: CÉLULAS VIÁVEIS

### Método de semeadura por espalhamento



### Método de semeadura em profundidade\*

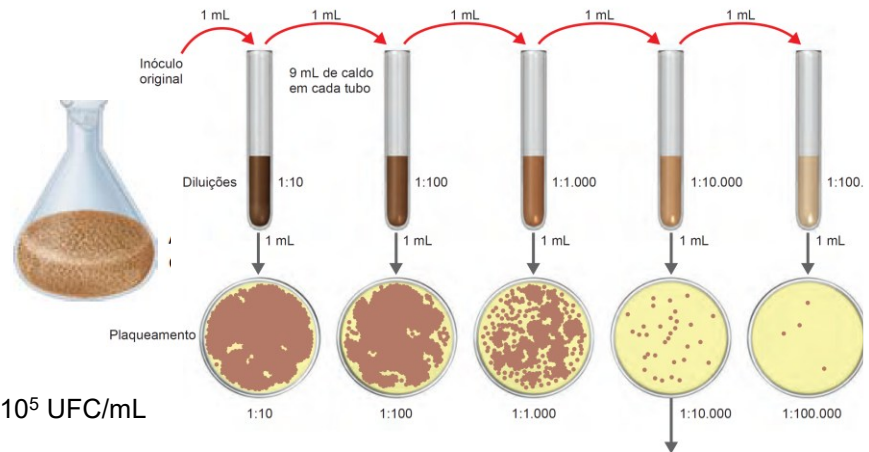


**Figura 5.16** Dois métodos de contagem de células viáveis. No método de semeadura em profundidade, as colônias formam-se no interior, assim como na superfície, do meio sólido. Na quarta coluna é apresentada uma fotografia de colônias de *Escherichia coli* formadas por células depositadas em placas pelo método de semeadura por espalhamento (superior) ou pelo método de semeadura em profundidade (inferior).

33

## Contagem em placa

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



**Exemplo:**

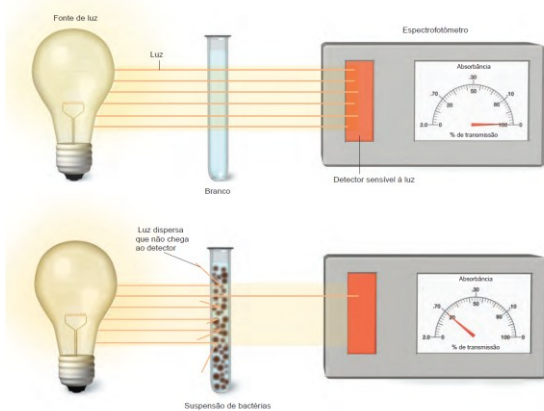
$$32 \times 10.000 / 1\text{mL} = 3,2 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$$

34

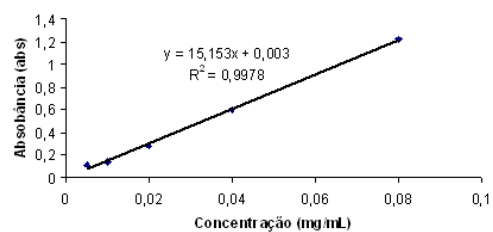
## Espectrofotometria

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

$$\text{Abs} = 2 - \log \text{ de } \% \text{ da transmissão}$$



### Curva Padrão



35

## Contagem Microscópica Direta

### ✓ Câmara de Neubauer

Volume da Câmara =  $10^{-4}$  mL

Nº de células /mL = média dos quadrantes  $\times 10^4$

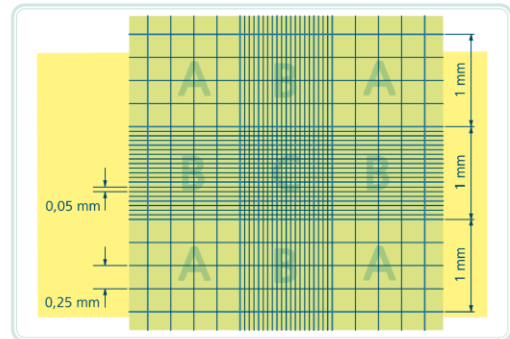
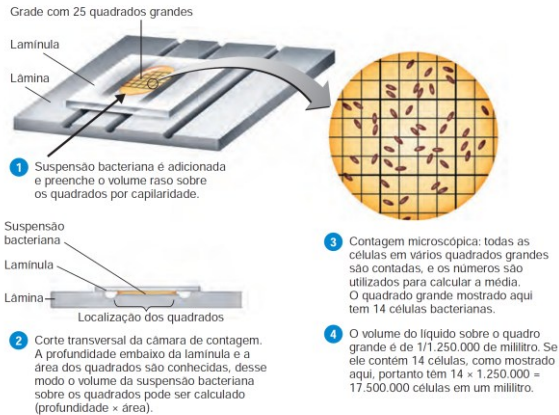


Figura 1.2: Lâmina hematimétrica ou câmara de Neubauer  
Fonte: ITICM

36

## Contagem Microscópica Direta

### ✓ Câmara de Neubauer

Volume da Câmara =  $10^{-4}$  mL

1- Nº de células /mL = média dos quadrantes  $\times 10^4$

2- Nº de células /mL =  $n \times 5 \times 10^4$

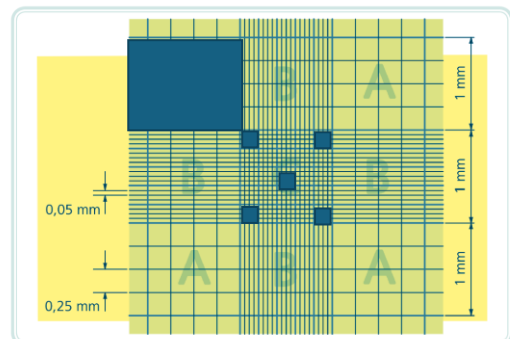
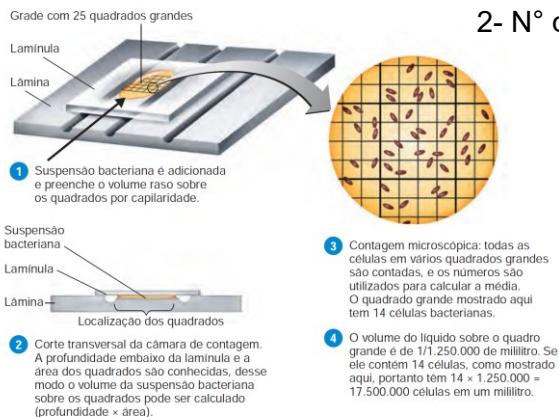


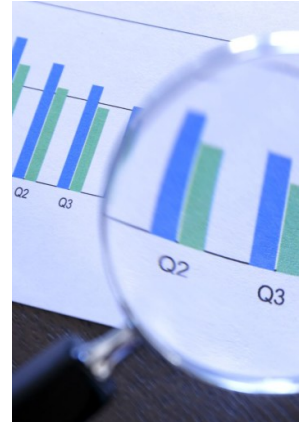
Figura 1.2: Lâmina hematimétrica ou câmara de Neubauer  
Fonte: ITICM

37

## Orientações para preparo dos Relatórios Microbiologia

### • Máximo de 10 páginas

- **Introdução/ Revisão bibliográfica:** delimitação do assunto tratado. Apresenta a fundamentação teórica (revisão bibliográfica) que subsidiará o tema do trabalho.
- **Objetivos:** Objetivo geral claro do trabalho.
- **Metodologia**
- **Resultados/Discussão:** descrição dos resultados com apresentação de Figuras e Tabelas. Resultados são discutidos com base na literatura, era esperado?
- **Conclusão:** Parte final do texto, onde o conteúdo corresponde aos objetivos ou hipóteses propostos para o desenvolvimento do trabalho



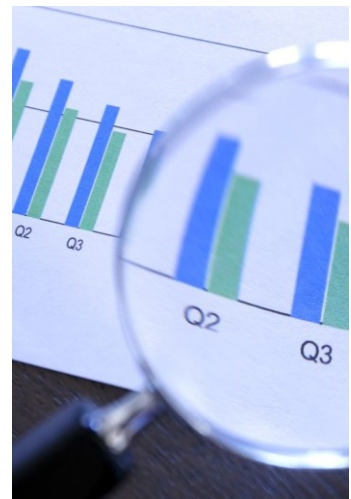
40

## Orientações para preparo dos Relatório Microbiologia Experimental

- ❖ Normas da ABNT
- ❖ **Citações:** dão credibilidade ao trabalho.
- ❖ **Formatação:** ajuda o leitor a compreender o seu trabalho.  
Exemplos:  
    Textos justificados.  
    Figuras numeradas

**Figuras devem ser citadas no texto antes que apareçam!**

“



41