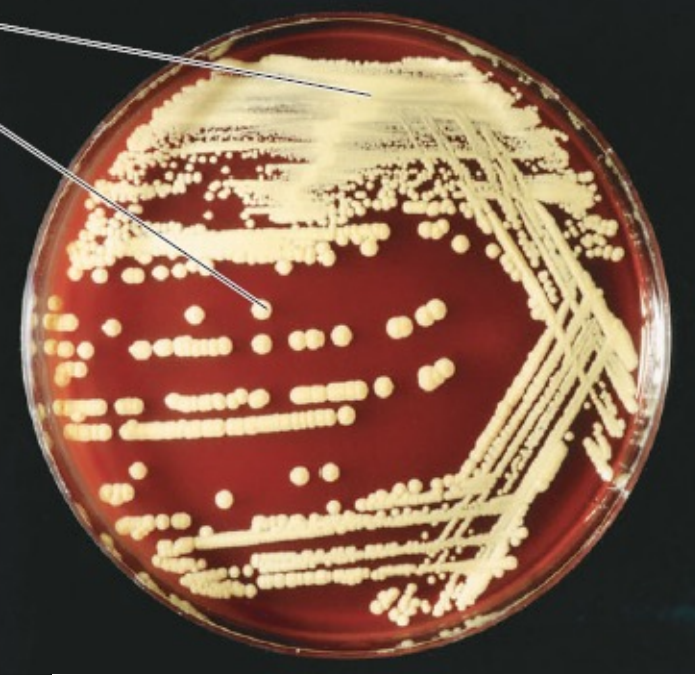


# Fisiologia Bacteriana: crescimento e nutrição

Cristiane Guzzo

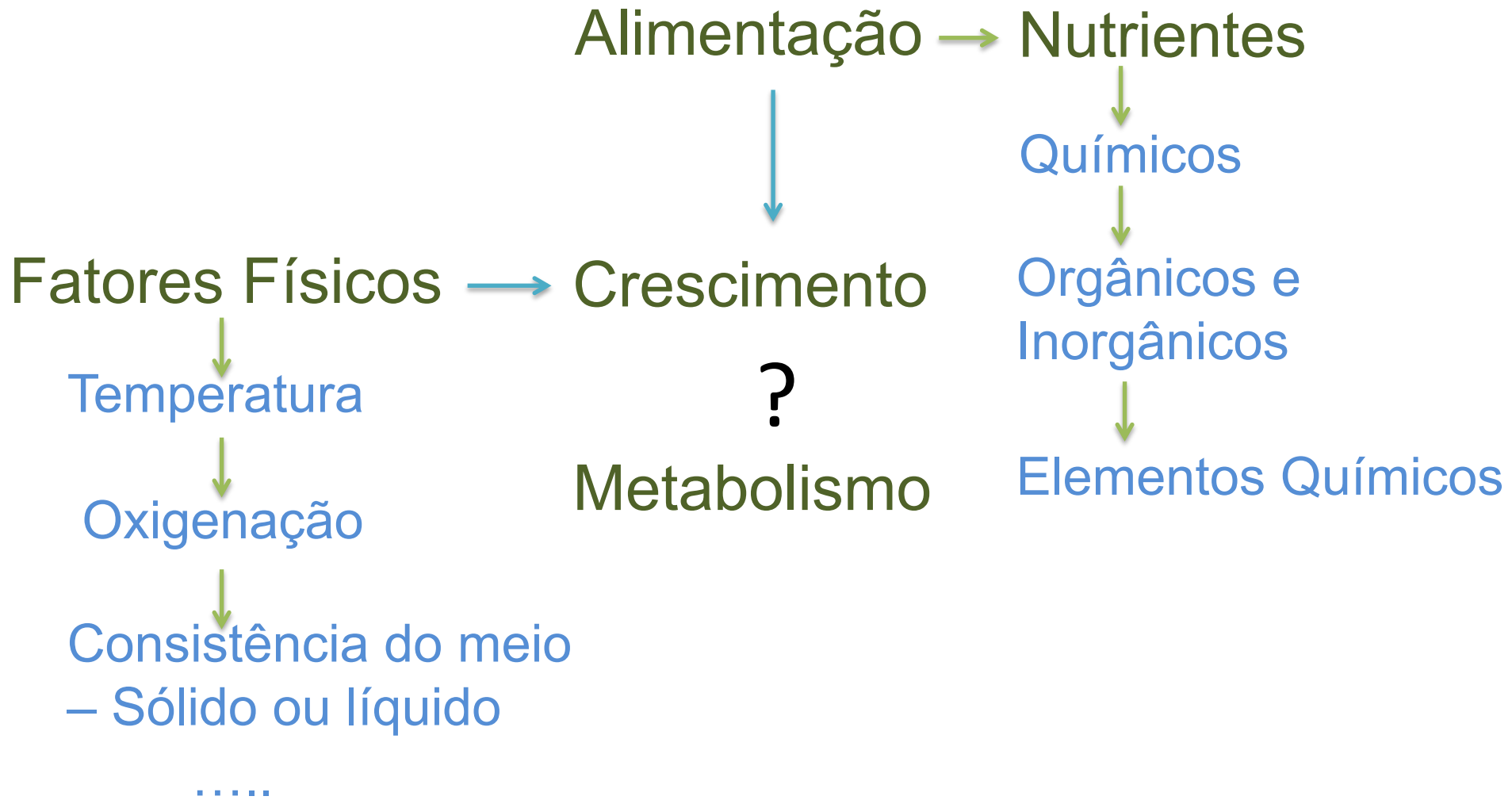
Departamento de Microbiologia - ICBII-USP



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

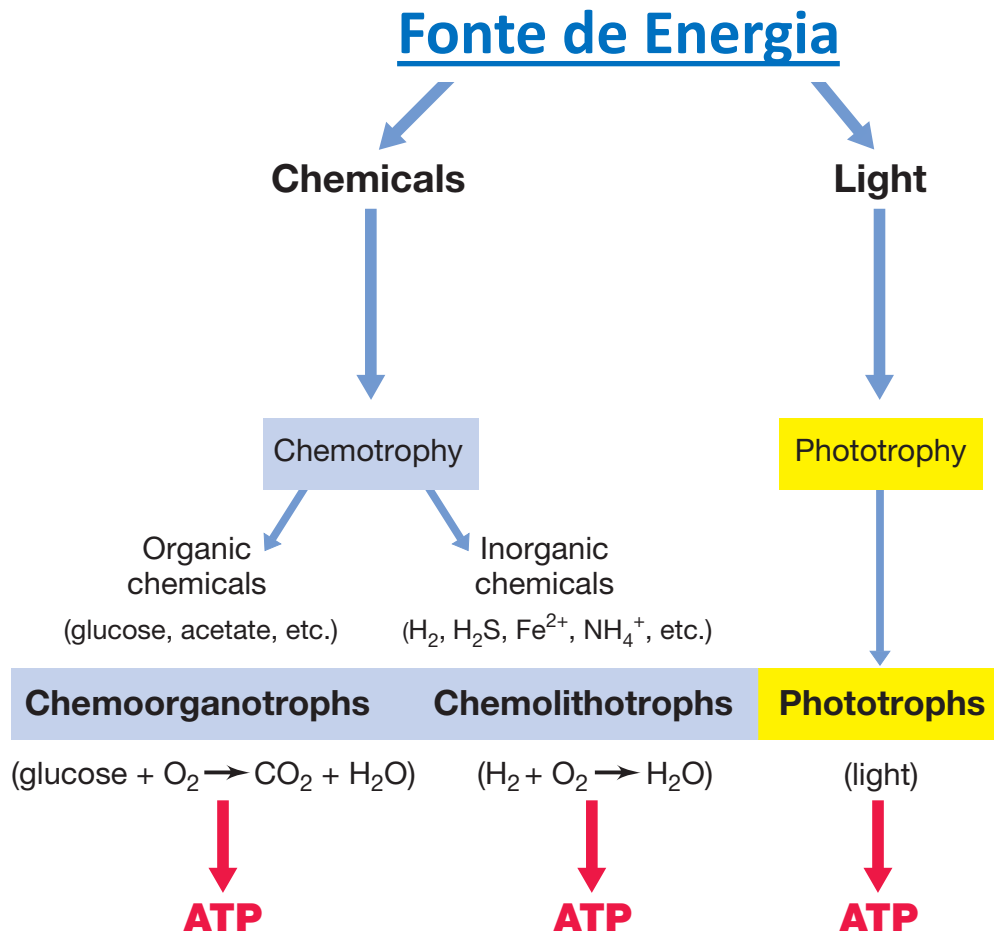
# Quais são os fatores que afetam o crescimento microbiano?



# Diversidade Metabólica

## Capacidade Biossintética:

quanto o organismo consegue sintetizar fatores importantes para o seu crescimento



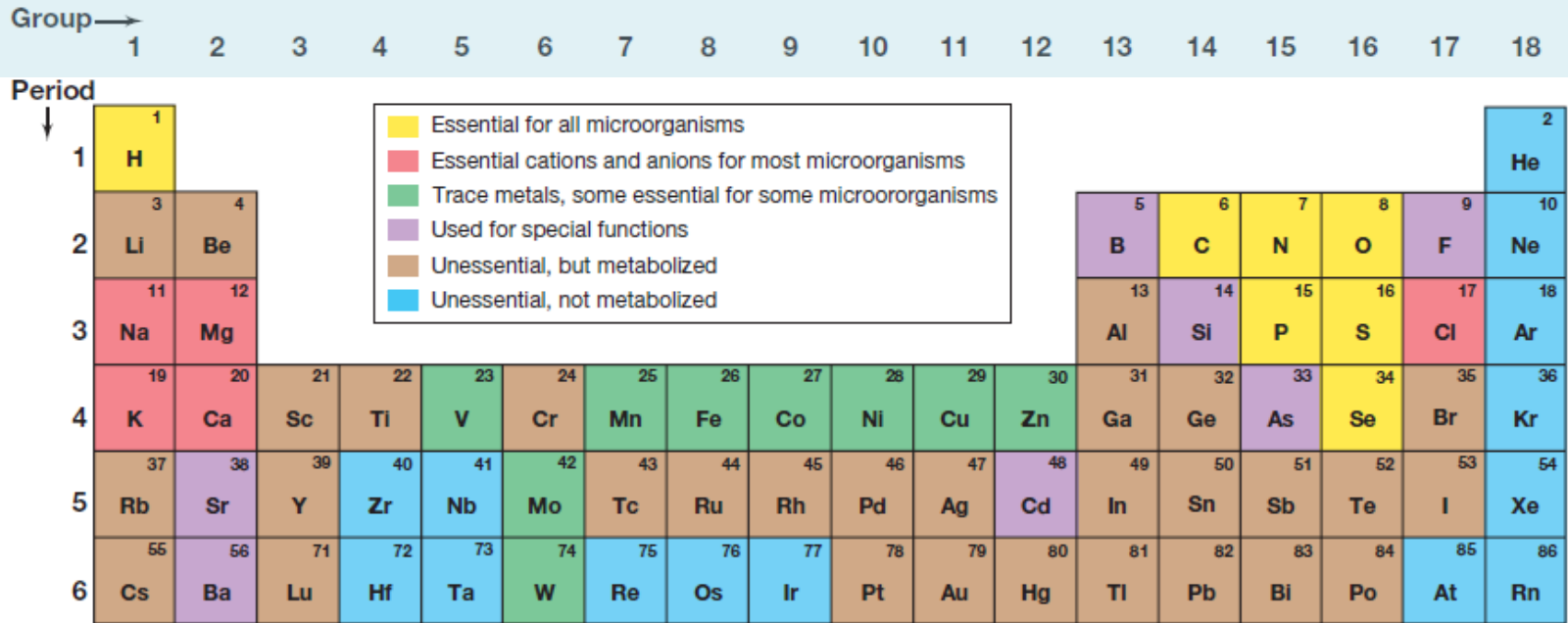
## Fonte de Carbono

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<sup>a</sup>*

<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 <sub>12</sub> ; transcobalamin (only in propionic acid bacteria)
Copper (Cu)	In respiration, cytochrome c oxidase; in photosynthesis, plastocyanin, some superoxide dismutases
Iron (Fe) <sup>b</sup>	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 <sub>430</sub> 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

<sup>a</sup>Not every micronutrient listed is required by all cells; some metals listed are found in enzymes or cofactors present in only specific microorganisms.

<sup>b</sup>Needed in greater amounts than other trace metals.

# Geralmente os microelementos estão em baixa concentração no ambiente – como obtê-los?

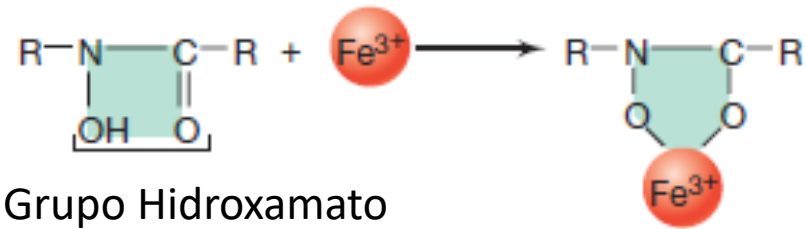
- Vamos olhar para o Ferro!

- Condições anóxicas está na forma  $Fe^{+2}$

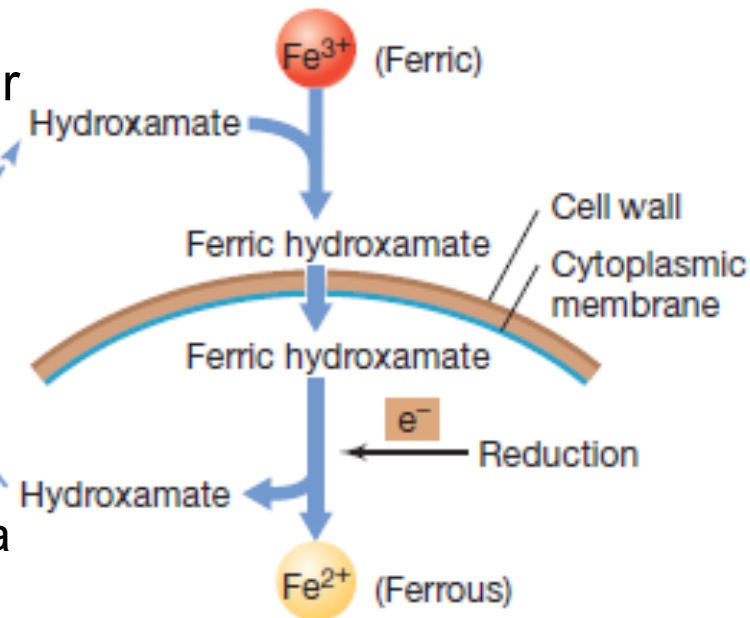
- Condições óxicas está na forma de  $Fe^{+3}$ , Grupo Hidroxamato insolúvel e se depositam em minerais

- 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.



(a)



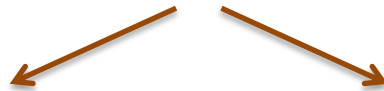
# Classificação dos meios de Cultura utilizados em Laboratório



# 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

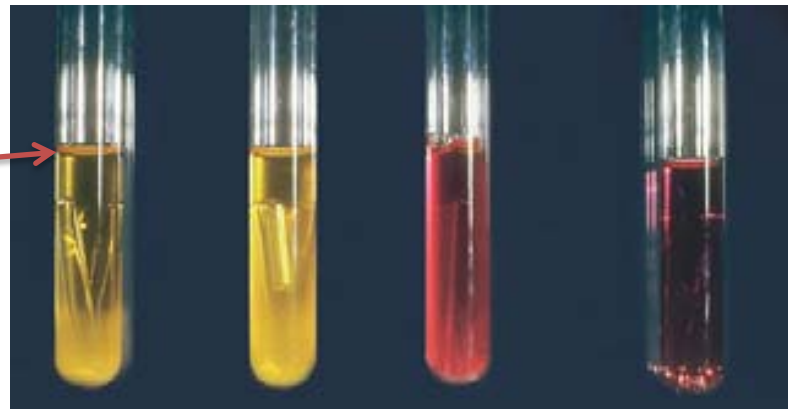
Adiciona um indicador (corante, por exemplo), diferenciar reações químicas que ocorrem durante o crescimento .

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. -

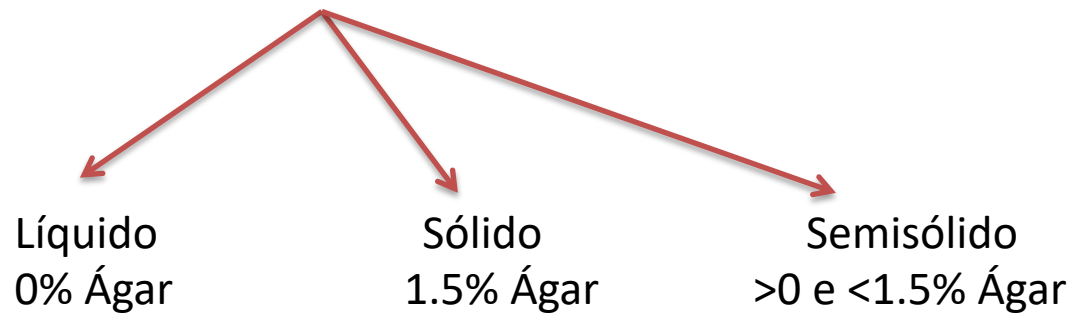
Não inoculado

# 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

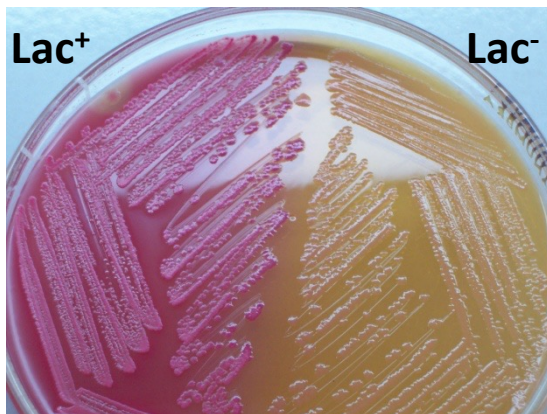
# Cultivo de Microrganismos em Laboratório

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



# Diferentes Meios de Cultura usado em laboratório

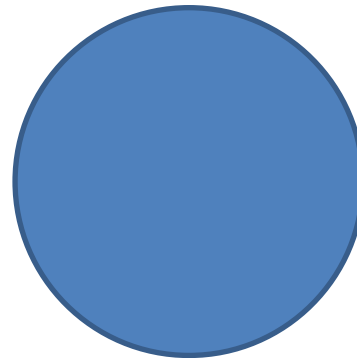
## Ágar MacConkey



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

[http://en.wikipedia.org/wiki/MacConkey\\_agar](http://en.wikipedia.org/wiki/MacConkey_agar)

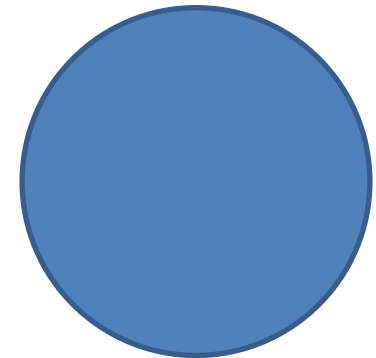
## Ágar Staphylococcus 110 Stone Gelatin Ágar



Isolar e diferenciar *Staphy.*  
Alta concentração sal - 7.5%  
Manitose<sup>+</sup>  
Formação de pigmento  
Atividade Gelatinase

[https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/229730.pdf](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 <sub>2</sub>	Type of metabolism	Example <sup>a</sup>	Habitat <sup>b</sup>
<b>Aerobes</b>				
Obligate	Required	Aerobic respiration	<i>Micrococcus luteus</i> (B)	Skin, dust
Facultative	Not required, but growth better with O <sub>2</sub>	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
<b>Anaerobes</b>				
Aerotolerant	Not required, and growth no better when O <sub>2</sub> 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 anóxidos

Capazes de respirar usando O<sub>2</sub>

Respiração sem O<sub>2</sub>



# 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

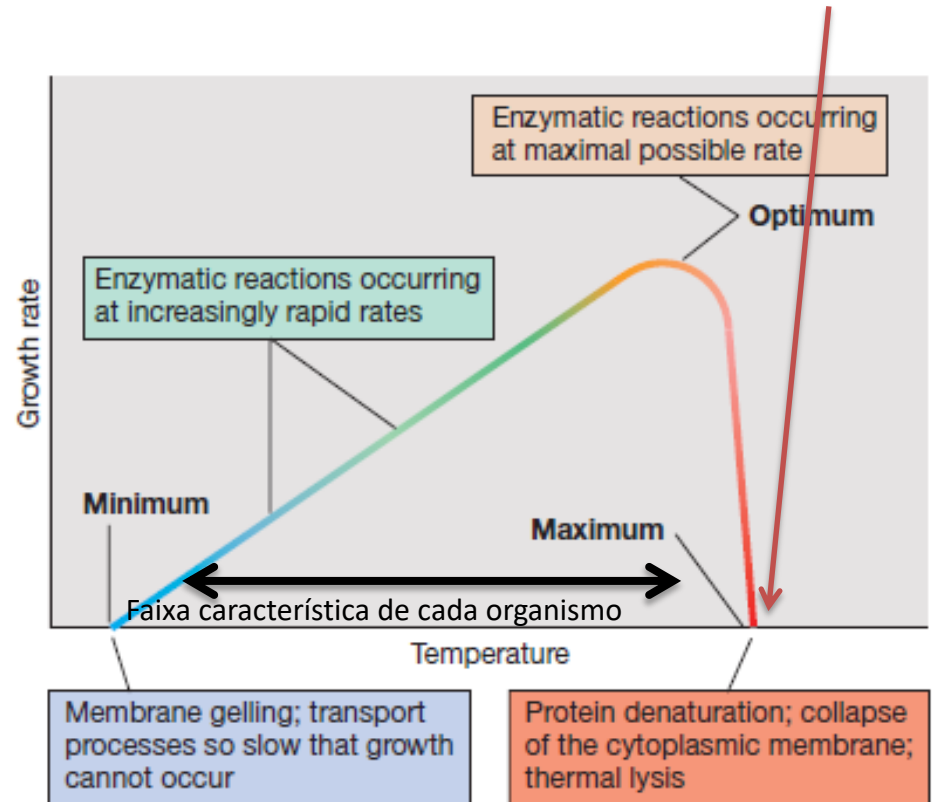
- **Ótima**

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

- **Máxima**

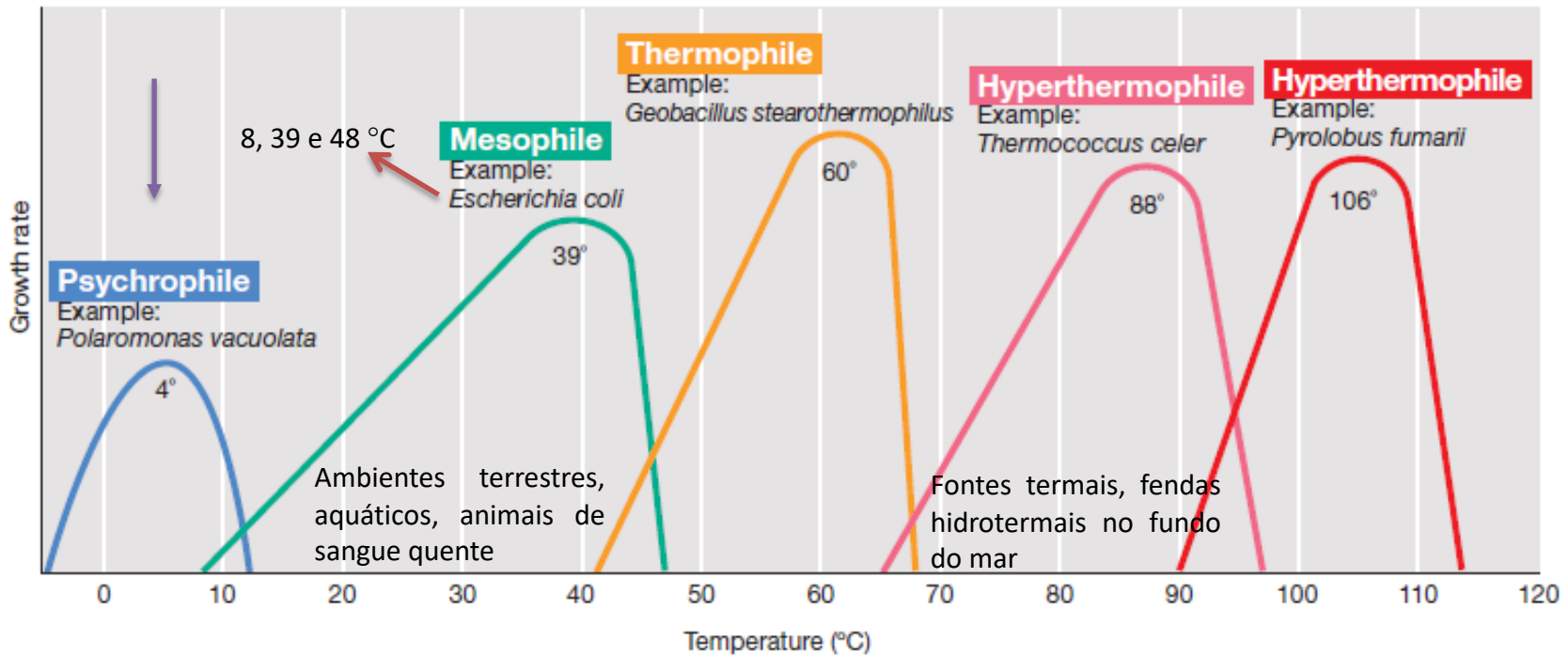
- Faixa normal de variação de temperatura é 25-40 °C
- Não conseguem crescer em todas as faixas

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).

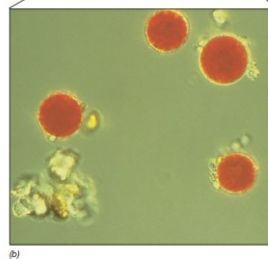
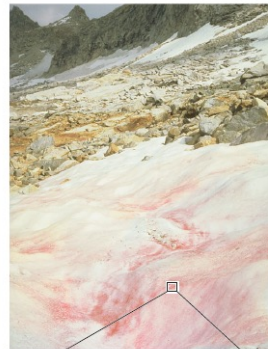
- Ambientes frios na Terra

- 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*

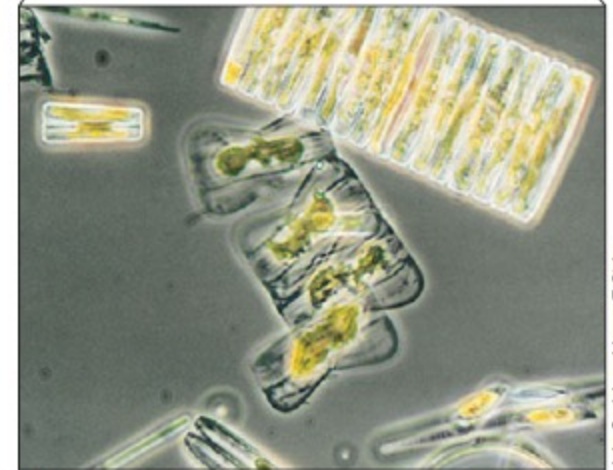


Antártida



(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)

Fontes termais  
ferventes  
150-500°C

Figure 5.22 Growth of hyperthermophiles in boiling water.

# 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)
<b>Macroorganisms</b>	
<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
<b>Microorganisms</b>	
<i>Eukaryotic microorganisms</i>	
Protozoa	56
Algae	55–60
Fungi	60–62
<b>Prokaryotes</b>	
<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:

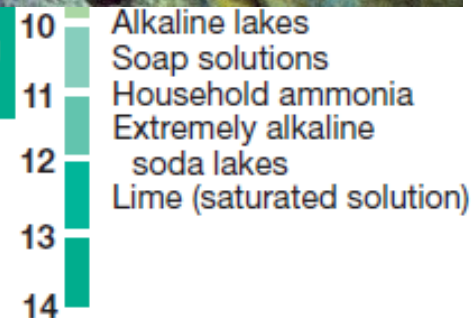
H <sup>+</sup>	OH <sup>-</sup>
1	10 <sup>-14</sup>
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-13</sup>
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-12</sup>
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-11</sup>
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-10</sup>
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-9</sup>
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>
<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-5</sup>
10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-4</sup>
10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-3</sup>
10 <sup>-12</sup>	10 <sup>-2</sup>
10 <sup>-13</sup>	10 <sup>-1</sup>
10 <sup>-14</sup>	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



# 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

<i>Physiological class (optima range)</i>	<i>Approximate pH optimum for growth</i>	<i>Example organism<sup>a</sup></i>
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>

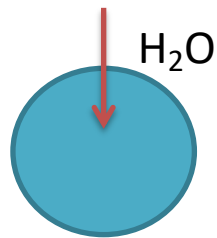
<sup>a</sup> *Picrophilus* and *Natronobacterium* are Archaea; all others are Bacteria.



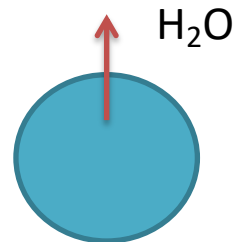
# Efeito Osmótico

- 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 +

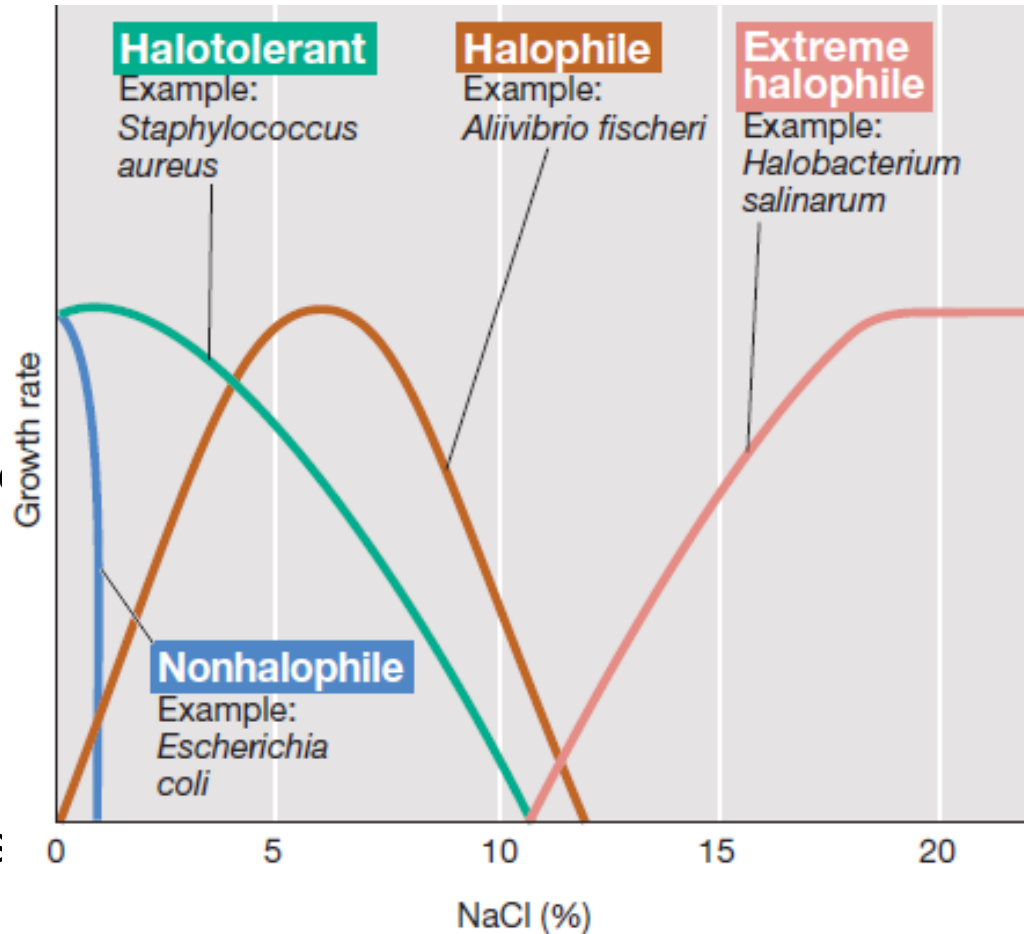


Pode causar morte celular-desidratação



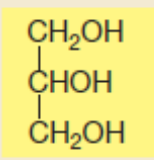
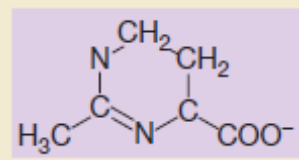
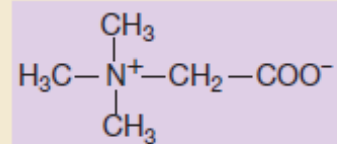
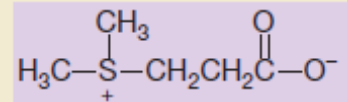
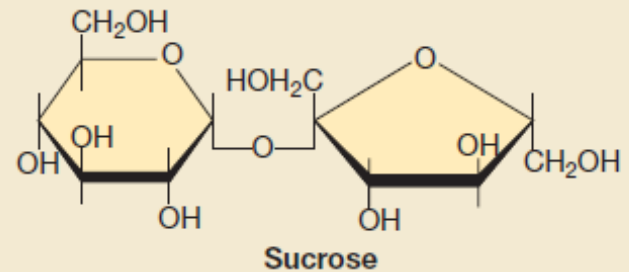
# Efeito Osmótico

- **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



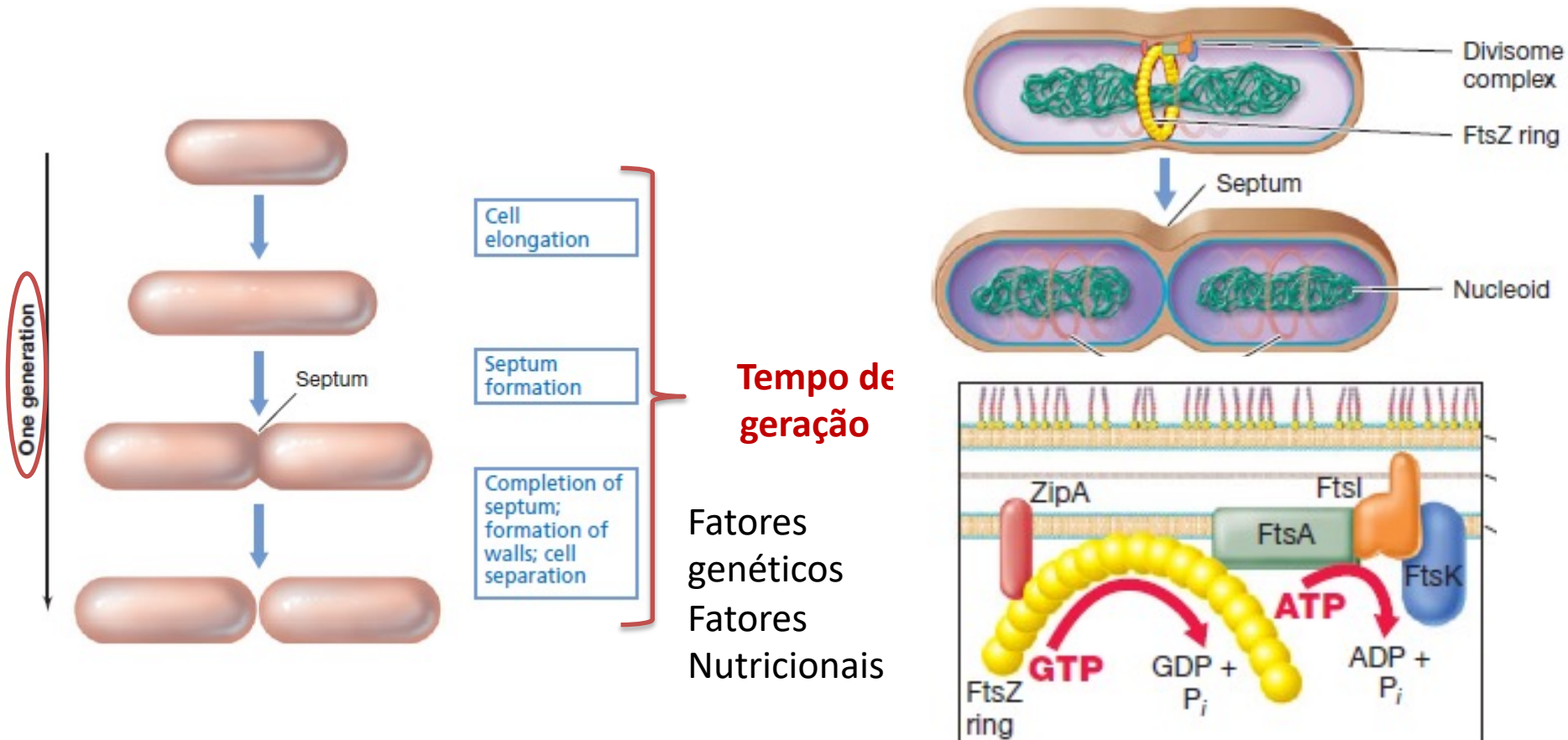
# Bactérias não cultiváveis & Metagenômica

- 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

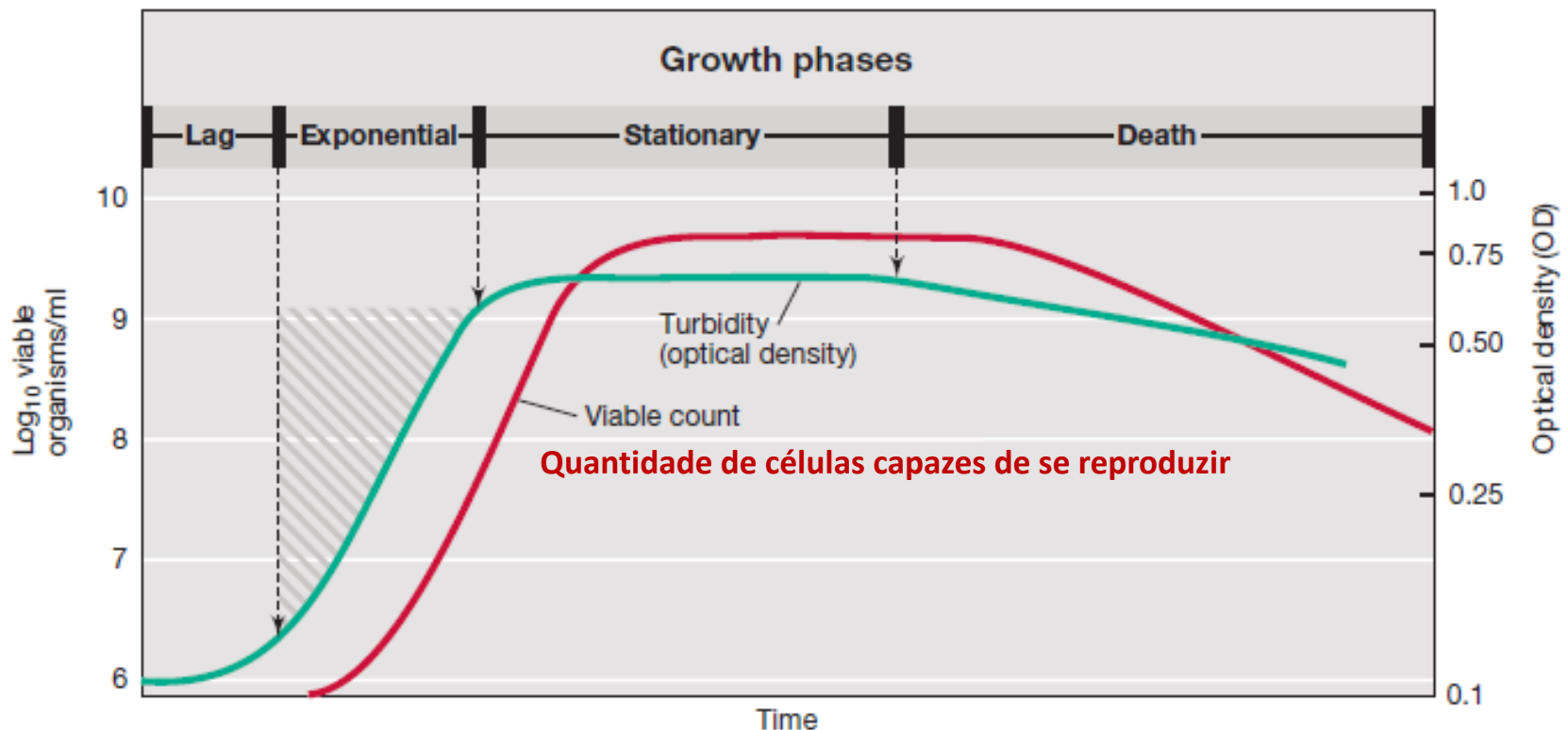
- O processo de divisão celular envolve um conjunto de proteínas conhecidas como Fts (*Filamentous temperature Sensitive*) (Todos os Procaríotos e *Archae*, organelas - mitocôndrias e cloroplastos).



# 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?

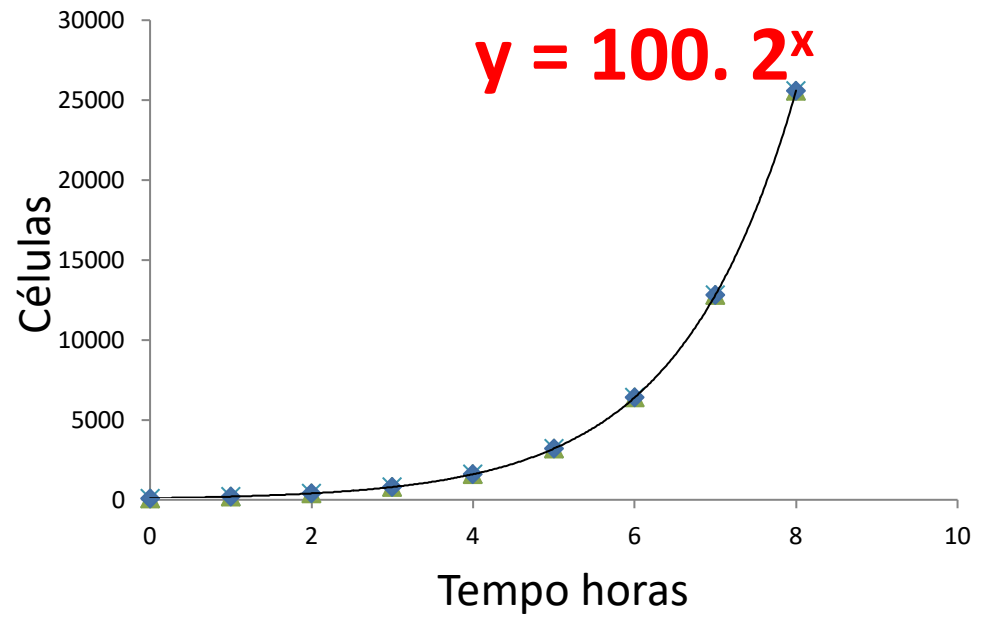
Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256 ( $2^8$ )
0.5	2	4.5	512 ( $2^9$ )
1	4	5	1,024 ( $2^{10}$ )
1.5	8	5.5	2,048 ( $2^{11}$ )
2	16	6	4,096 ( $2^{12}$ )
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576 ( $2^{19}$ )

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

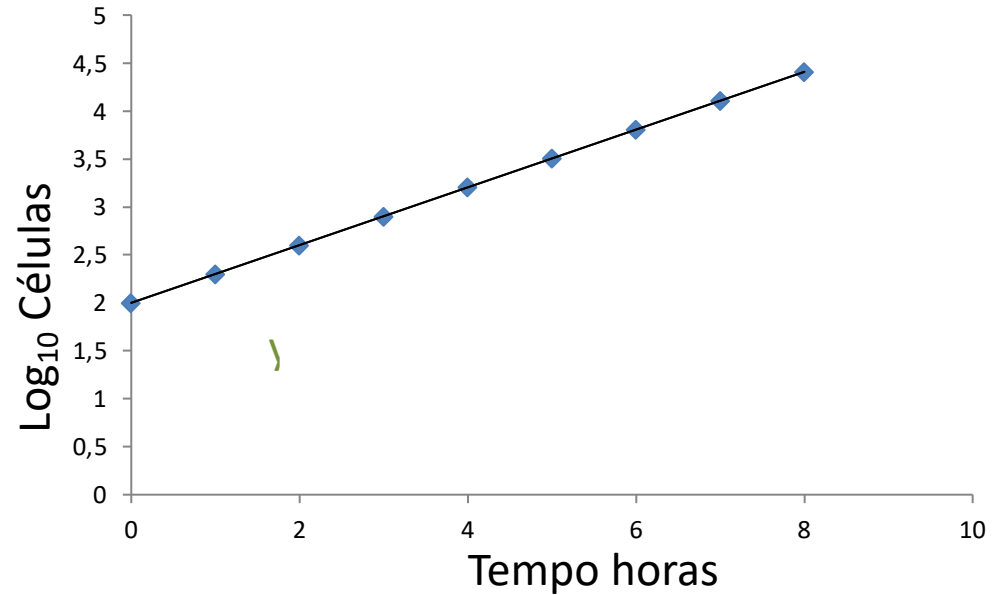
Depois de 5 horas  
**Em 30 min cresce 2.048 células**

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

G = 1H



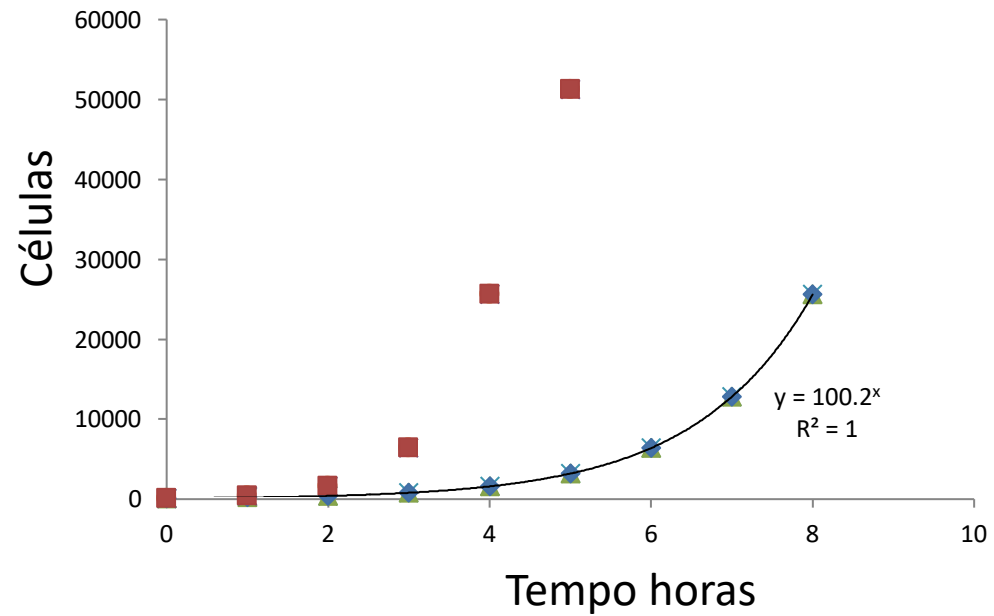
tempo	log(10)
0	2
1	2,301029996
2	2,602059991
3	2,903089987
4	3,204119983
5	3,505149978
6	3,806179974
7	4,10720997
8	4,408239965



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



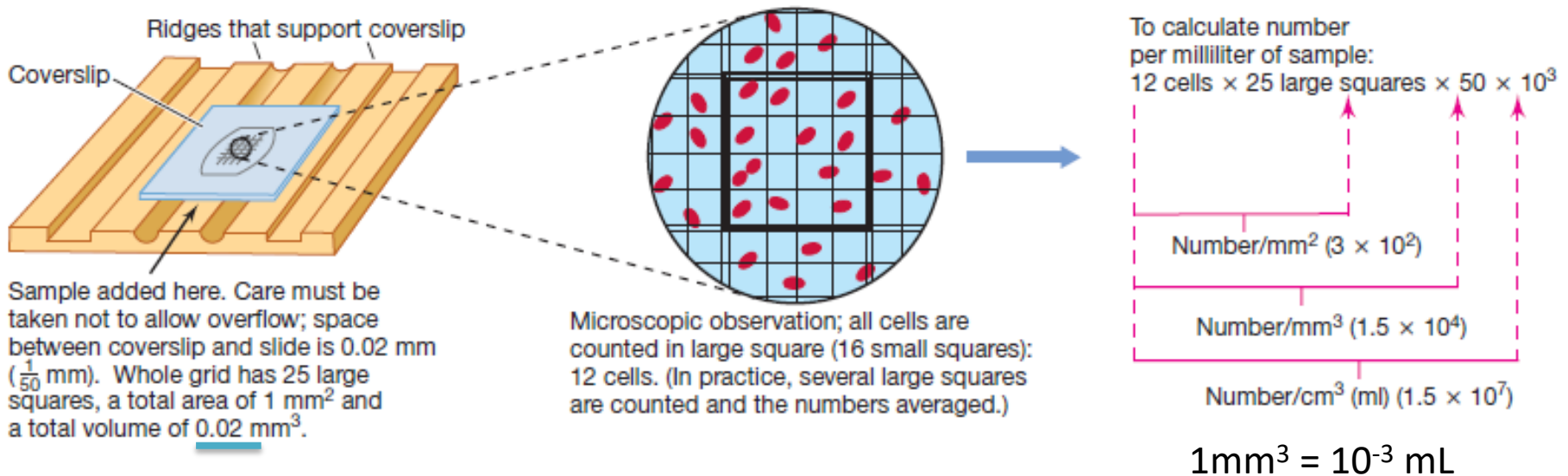
$$N_{\text{total}} = N_{\text{inicial}} \cdot 2^{(\text{tempo total}/\text{tempo de geração})}$$

# 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 .....



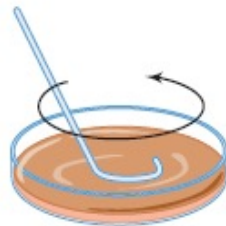
# Métodos de contagem de células viáveis/ ou Contagem em Placa

- 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  $\alpha$  n. células. Cada colônia veio de uma única célula - UFC.

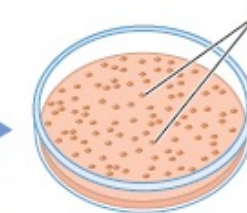
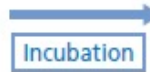
## Spread-plate method



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

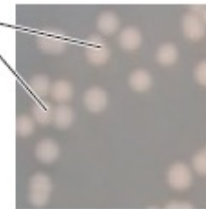


Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader



Typical spread-plate results

Surface colonies

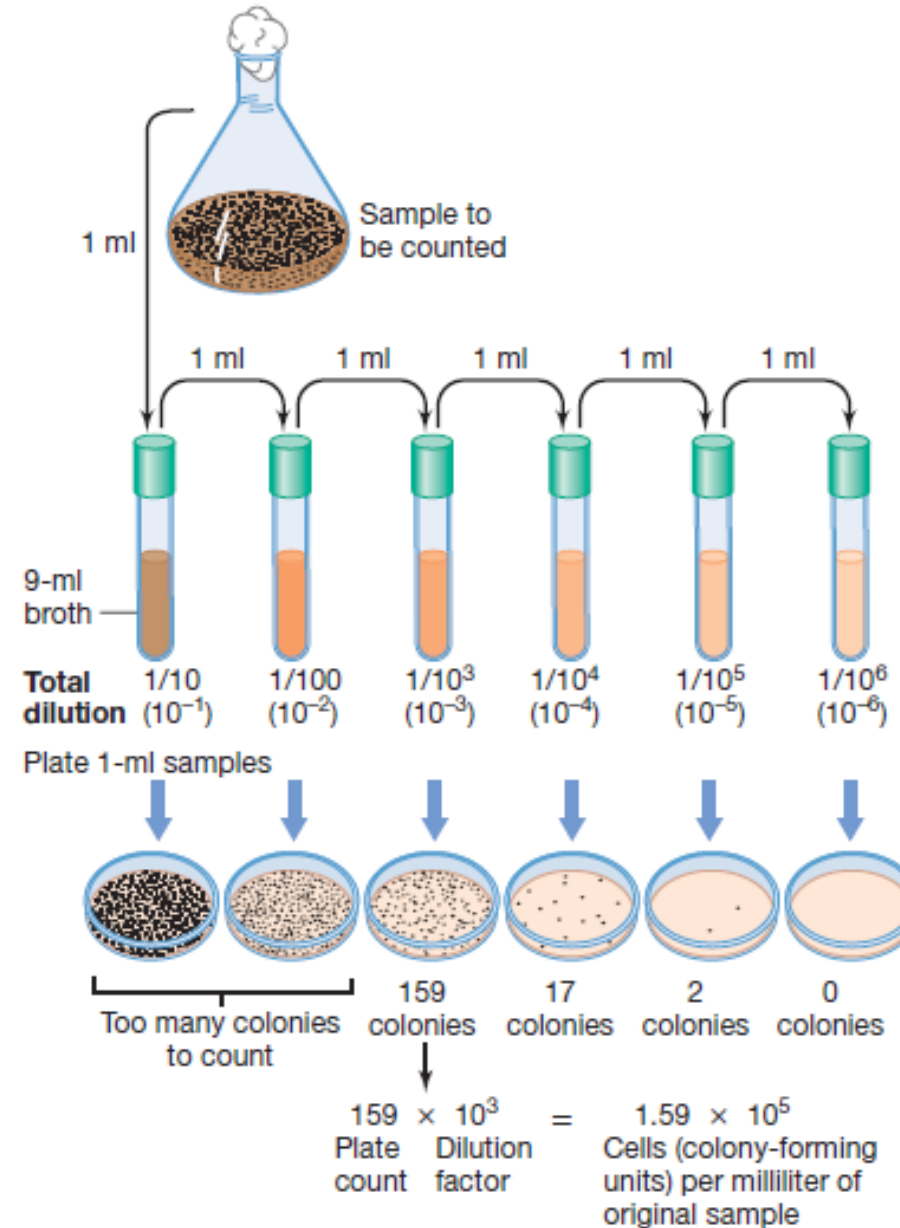


De borath C. Jung



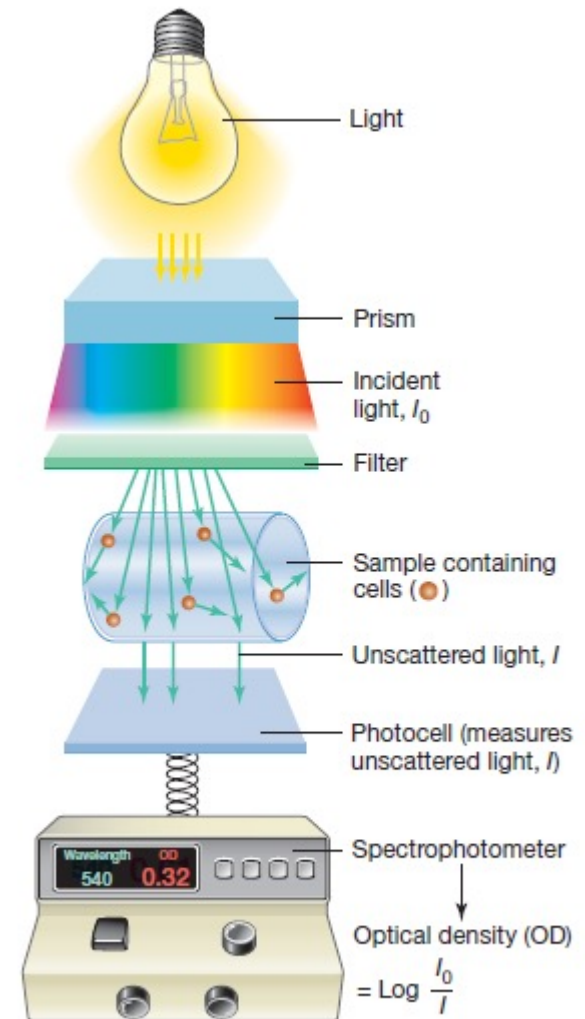
# Diluição antes do Plaqueamento

- 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



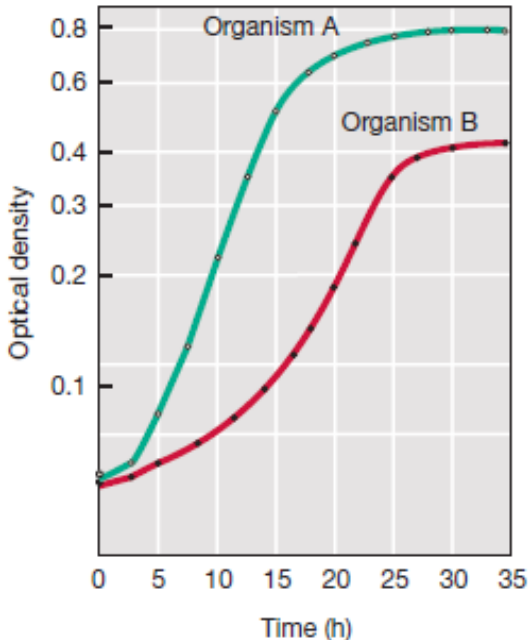
# D.O – medida de turbidez

- Tomar cuidado com:
  - Caminho ótico
  - Comprimento de onda
    - 480nm
    - 540nm
    - 600nm -  $OD_{600}$  of 1.0 =  $8 \times 10^8$  cells/mL
    - 660nm



(a)

# Medida da quantidade de células por D.O

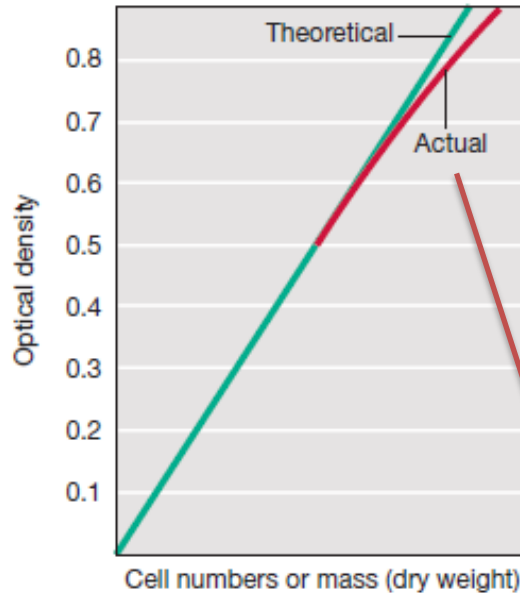


(b)

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

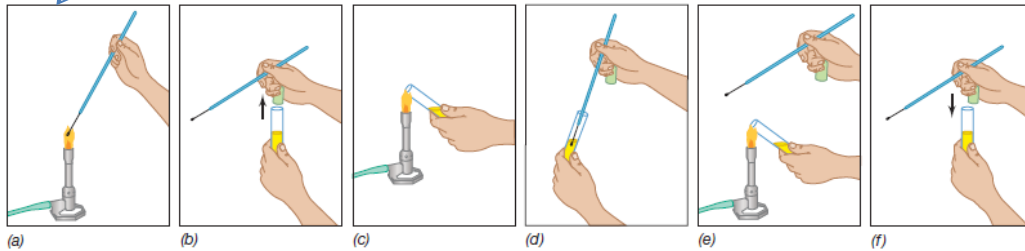


D.O é subestimada em quantidade de células elevadas

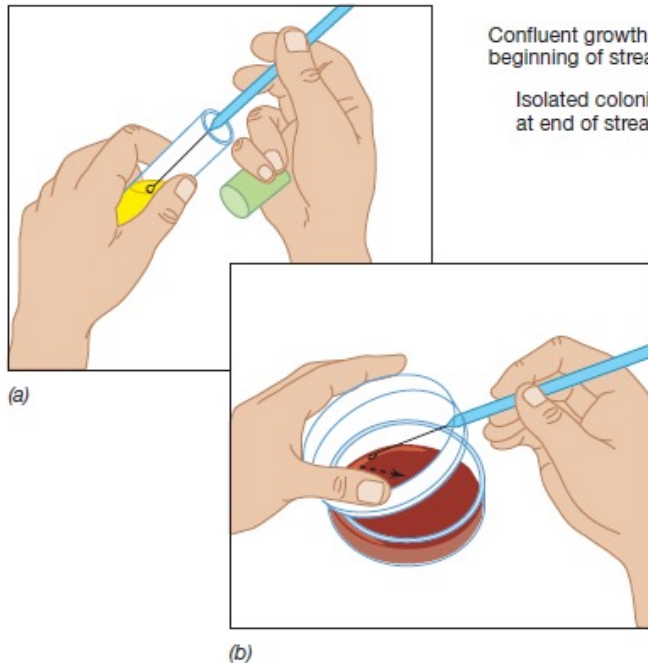
Muitas células – a luz dispersa por uma célula pode ser dispersada por outra, dando a impressão de que não teve dispersão

# Obtenção de culturas puras por semeadura por esgotamento

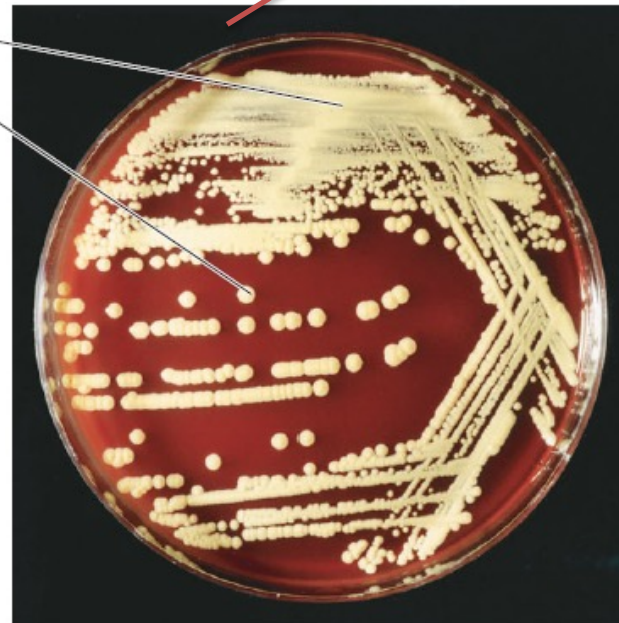
- Obtenção de amostras puras (contém apenas um tipo de microrganismo).
- Verificar a pureza da amostra
- Método de assepsia (impedir contaminações)



- 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



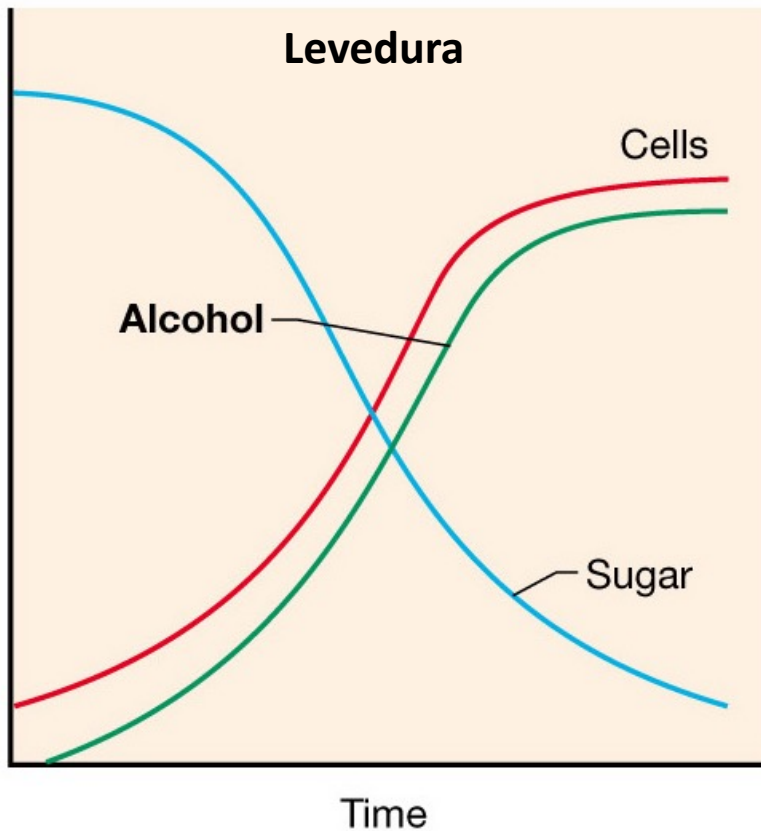
James A. Shapiro, University of Chicago

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

# Metabólitos Primário e Secundário

## Crescimento Primário

Metabólico constantemente sintetizado

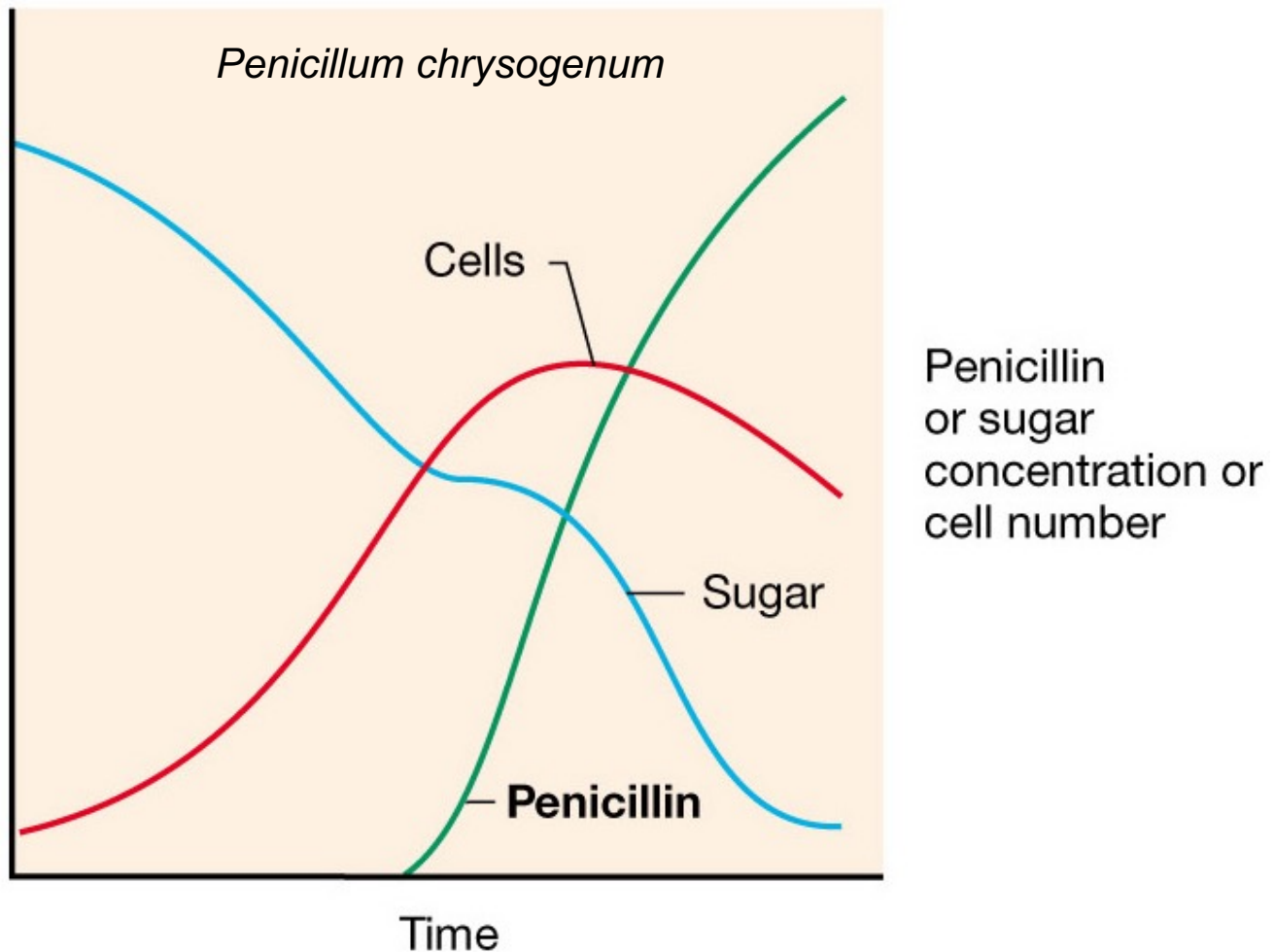


- Geralmente não são produzidos em grandes quantidades
- Faz parte do metabolismo

Alcohol or sugar  
concentration or  
cell number

# Metabólito Secundário

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



# Pergunta

- 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?
- Podemos crescer em laboratório qualquer microrganismo, justifique sua resposta.
- Um ambiente com baixa concentração de oxigênio, pH ácido, altas temperaturas, 3% de sal são classificados de que forma, e qual domínio você acha que ele pertence?