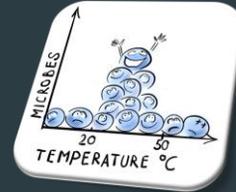


## Nutrição, Crescimento e Metabolismo de Microrganismos

Profa. Dra. Marta Mitsui Kushida

### 1) CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO



<https://thumb.dreamstime.com/temperatura-diagrama-bacteriano-do-crescimento-147506336.jpg>

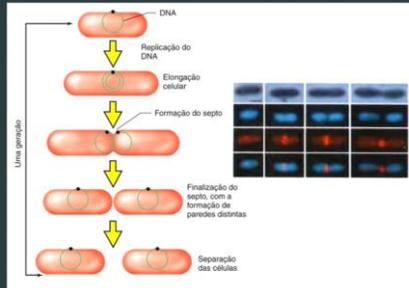
### CRESCIMENTO MICROBIANO

#### ▶ CARACTERÍSTICAS:

- ▶ Aumento do número de células e não do tamanho celular.
- ▶ Fissão Binária
- ▶ Tempo de Geração
- ▶ Outro microrganismos podem ainda se dividir por brotamento, fragmentação, formação de exósporos, etc.

*Trubski & Aberham, 2005; Torisona et al., 2016; Murray et al., 2006*

### FISSÃO BINÁRIA



### TEMPO DE GERAÇÃO

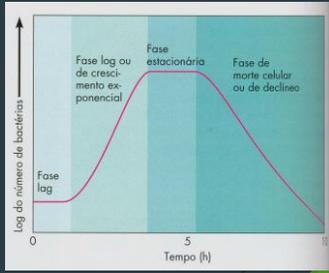
- Tempo necessário para uma célula se dividir (população dobra de tamanho)
  - sofre variações e depende das condições ambientais (temperatura)
  - maioria: tempo de geração de 1 a 3 horas; algumas: mais de 24 horas



Microrganismo	Tempo de geração
<i>Escherichia coli</i>	20 minutos
<i>Bacillus subtilis</i>	28 minutos
<i>Staphylococcus aureus</i>	30 minutos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35 minutos
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13 horas e 20 minutos

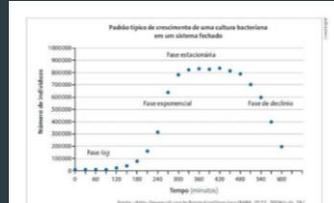
O crescimento bacteriano é representado graficamente por curvas em escalas logarítmicas (exponencial)

• Curva de crescimento



Tortora et al., 2016

Obtenção da curva: contagem da população em intervalos de tempo após inoculo de pequeno número de bactérias em meio líquido



Fonte: <http://www.courses.lamar.edu/biol/2010spring/101/101%20microbiology/101%20microbiology.pdf>, acessado em 20/04/2023

**CRESCIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS**

• Fases de crescimento - Fase Lag

- período em que ocorre pouca ou ausência de divisão celular ("latência")
- bactérias não se reproduzem imediatamente quando são colocadas em um novo meio de cultura
- células estão passando por intensa atividade metabólica (síntese de enzimas e moléculas variadas)



Tortora et al., 2016; Murray et al., 2009

**CRESCIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS**

• Fases de crescimento - Fase Log

- período de crescimento ou aumento logarítmico (fase de crescimento exponencial)
- reprodução celular extremamente ativa; tempo de geração atinge um valor constante; intensa atividade metabólica
- micro-organismos são particularmente sensíveis às mudanças ambientais (radiações e compostos antimicrobianos)



Tortora et al., 2016; Murray et al., 2009

**CRESCIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS**

• Fases de crescimento - Fase Estacionária

- velocidade de crescimento diminui gradualmente
- número de morte celular é equivalente ao número de células novas ⇒ população se torna estável
- atividade metabólica de cada célula também decresce
- causas: término de nutrientes, acúmulo de produtos de degradação, mudanças de pH



Tortora et al., 2016; Murray et al., 2009

**CRESCIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS**

• Fases de crescimento - Fase de Morte Celular ou de Declínio

- número de células mortas excede o de células novas, até que a população tenha se reduzido a pequena fração da fase anterior



Tortora et al., 2016; Murray et al., 2009

## MÉTODOS PARA QUANTIFICAR O CRESCIMENTO MICROBIANO

- ▶ DIRETOS
- ▶ INDIRETOS

### Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano

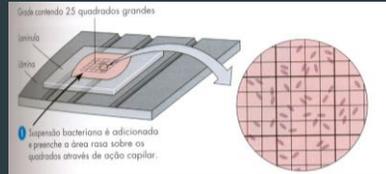
- ▶ **Contadores eletrônicos de células:** contagem em meio aquoso



*Trabulsi & Alterthum, 2005*

### Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano

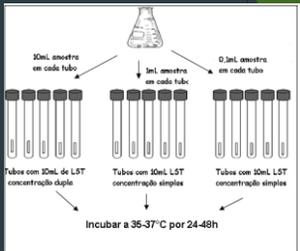
- ▶ **Câmara de contagem (câmara de Neubauer):**



*Trabulsi & Alterthum, 2005; Tortosa et al., 2016*

### Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano

- ▶ **Método do número mais provável (MNP):** técnica estatística ⇨ quanto maior o nº de bactérias em uma amostra, maior será o nº de diluições necessárias para eliminar totalmente o crescimento em tubos



*Trabulsi & Alterthum, 2005; Tortosa et al., 2016*

### Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano

Volume de Inoculo em Cada Grupo de Cinco Tubos	Tubos Contendo Meio Nutriente (Grupo com Cinco Tubos)	Número de Tubos Positivos em Cada Grupo
10 mL		5
1 mL		3
0,1 mL		1

Combinções de Tubos Positivos	Índice de NMP/100 mL	Limites com 95% de Confiança	
		Inferior	Superior
4:0:0	22	9	58
4:0:1	26	12	65
4:0:2	27	12	67
4:0:3	33	15	77
4:0:4	34	16	80
5:0:0	23	9	66
5:0:1	30	10	110
5:0:2	40	20	140
5:1:0	30	10	120
5:1:1	50	20	150
5:1:2	60	30	180
5:2:0	80	20	170
5:2:1	70	30	210
5:2:2	90	40	250
5:2:3	80	30	230
5:3:0	110	40	280
5:3:1	140	60	300

*Trabulsi & Alterthum, 2005; Tortosa et al., 2016*

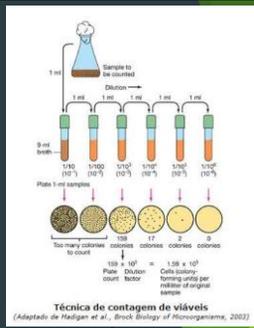
### Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano

- **Plaqueamento em meio sólido (contagem em placa):**

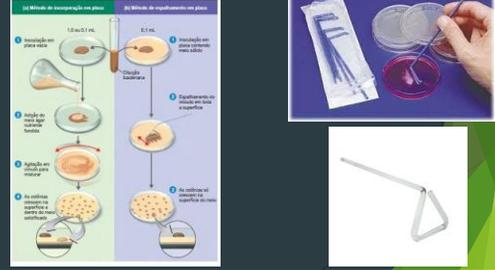
- ▶ amostras de diluições seriadas da cultura semeadas em meios sólidos para desenvolvimento de colônias (unidades formadoras de colônias - UFC)
- ▶ obtenção do número de bactérias viáveis (UFC)/mL na suspensão original



Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano



Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano



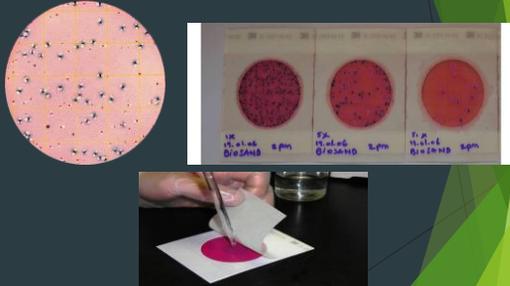
Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano



Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano

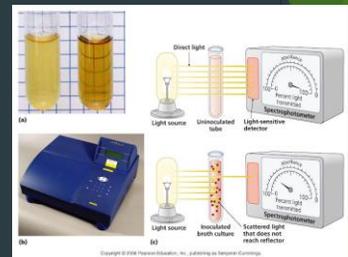


Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano



Métodos indiretos para quantificar o crescimento microbiano

Turbidimetria (espectrofotômetro)

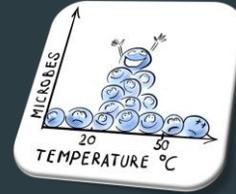


### Métodos indiretos para quantificar o crescimento microbiano

- **Atividade metabólica:** quantidade de produto metabólico (ácido ou CO<sub>2</sub>) tem relação direta com número de células bacterianas presentes
- **Peso Seco:** análise de crescimento de fungos filamentosos e bactérias
  - fungo é removido do meio de cultura por filtração
  - seco em dessecador para posterior pesagem

*Trabalho 4, Afonso, 2005*

## 2) FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO MICROBIANO



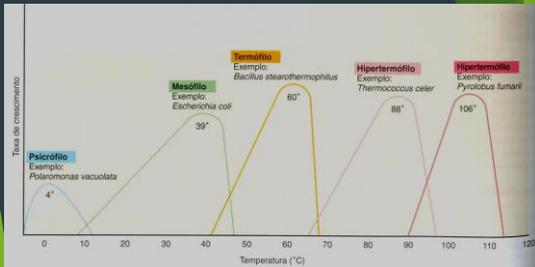
*https://thumbs.dreamstime.com/fo-temperatura-e-diagrama-bacteriano-do-crescimento-147506336.jpg*

### FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO MICROBIANO

- **fatores físicos:** temperatura, pH e pressão osmótica
- **fatores químicos:** oxigênio, carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oligoelementos
- **fatores orgânicos (ou de crescimento):** vitaminas, aminoácidos e bases nitrogenadas

## FATORES FÍSICOS

### TEMPERATURA ⇒ 4 grupos



*Madigan et al., 2016*

### TEMPERATURA

- A maioria cresce dentro de variações limitadas (30°C)

- T mínima
- T ótima
- T máxima



*Tortora et al., 2016*

### TEMPERATURA

- *Polaromonas vacuolata* (T ótima = 4°C, gelo oceânico)



- enzimas com mais  $\alpha$ -hélices, aa polares (menos aa hidrofóbicos); membrana com ác. graxos insaturados

### TEMPERATURA

- **Hipertermófilos**



- muitas chaperoninas (ex.: termosoma), redução de glicina (menor flexibilidade das proteínas), proteínas hidrofóbicas, redução da fluidez de membrana

### a) TEMPERATURA

- E se não fossem os termófilos e hipertermófilos!!!

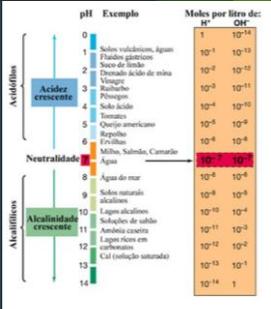
- *Thermus aquaticus*: Taq DNA polimerase
- *Thermococcus litoralis*: Vent<sub>2</sub>
- *Pyrococcus*: Deep Vent<sub>R</sub>



...Não haveria PCR: reação em cadeia pela polimerase!!!

### b) pH

- maioria cresce dentro de variações pequenas próximas à neutralidade (6,5 a 7,5)
- preservação de alimentos em conserva
- fungos: melhor crescimento a pH=5
- bactérias cultivadas em laboratório ⇒ produção de ácidos ⇒ interferência no próprio crescimento
- neutralização e manutenção do pH via tampões (sais de fosfato, peptonas)



Madigan et al., 2016

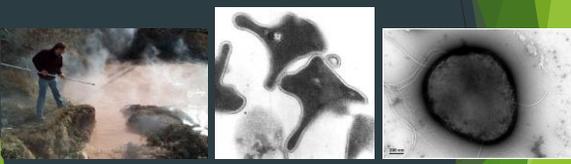
### b) pH

Microrganismo	pH mínimo	pH ótimo	pH máximo
Bactérias	4,5	6,5-7,5	9,0
Bolores	1,5-3,5	4,5-6,8	8-11
Leveduras	1,5-3,5	4,0-6,5	8,0-8,5

Tolerância a valores baixos de pH  
bolores > leveduras > bactérias

### b) pH

- **Acidófilos**: pH ≤ 6 (*Sulfolobus* sp, solos vulcânicos)



## b) pH

- Alcalifílicos:  $\text{pH} \geq 9$
- Bacillus firmus* (lagos e solos com carbonato de sódio)

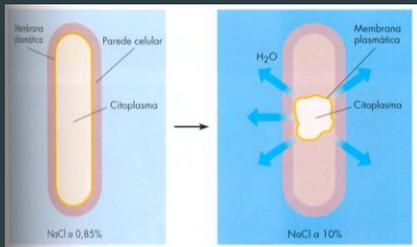


## c) PRESSÃO OSMÓTICA

- meio hipertônico  $\Rightarrow$  perda por osmose (plasmólise)
  - preservação de alimentos (peixes, mel, leite condensado)
  - halofílicos extremos: bactérias do Mar Morto (30% de sal)
- cultivo bacteriano: concentrações baixas (1,5%) de ágar para evitar inibição do crescimento

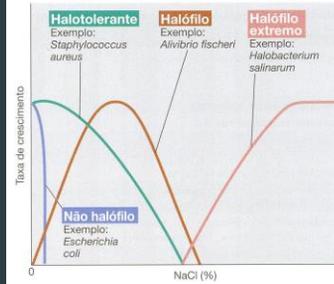
Toranzo et al., 2016

## c) PRESSÃO OSMÓTICA: PLASMÓLISE



Toranzo et al., 2016

## c) PRESSÃO OSMÓTICA



Madigan et al., 2016

## FATORES QUÍMICOS

## • Carbono

- síntese de todos os compostos orgânicos necessários (elemento estrutural básico)
- químio-heterotróficos e foto-heterotróficos  $\Rightarrow$  carbono obtido de materiais orgânicos (proteínas, carboidratos e lipídeos)
- químioautotróficos e fotoautotróficos  $\Rightarrow$  carbono obtido do dióxido de carbono

Murray et al., 2006; Toranzo et al., 2016

- **Nitrogênio**
  - síntese de proteínas, DNA, RNA, ATP
  - fontes: decomposição de proteínas, compostos inorgânicos (sais de amônio) e nitratos
  - fixadoras: retiram N<sub>2</sub> da atmosfera e convertem a nitrogênio orgânico ⇒ fixação de nitrogênio ⇒ gêneros *Azotobacter* e *Rhizobium* (simbiose com leguminosas - feijão, soja, ervilha)

Tortora et al., 2016

- **Enxofre**
  - síntese de aminoácidos e vitaminas (tiamina e biotina)
  - fontes: ion sulfato, sulfito de hidrogênio e aminoácidos
- **Fósforo**
  - síntese de ácidos nucleicos, fosfolípidos da membrana celular, ATP
  - fontes: ion fosfato

Tortora et al., 2016

- **Potássio, magnésio e cálcio**
  - co-fatores para reações enzimáticas
- **Oligoelementos (elementos-traço)**
  - ferro (mais importante, componente de citocromos - transporte de elétrons) → sideróforos: agentes ligantes
  - cobre, manganês e zinco
  - co-fatores na atividade de algumas enzimas
  - fonte: água e em constituintes de meios de cultura

Tortora et al., 2016

**Tabela 1.2 Micronutrientes (elementos traço) requeridos pelas células argenteas\***

Elemento	Função celular
Boro (B)	Presente em um subproduto da acetona aeróbia em leveduras, também encontrado em algas, protozoos e embriões
Cálcio (Ca)	Requerido para manutenção do metabolismo de vários organismos e também presente em "ácido carboxílico"
Cobalto (Co)	Verme de 2 <sup>o</sup> e 3 <sup>o</sup> requerido por bactérias que sintetizam ácido propiónico
Cádmio (Cd)	Regulador, catalisador e cofator, especialmente em bacterias, algas e plantas superiores (epitaxial)
Ferro (Fe)	Citocromos, catalisador, proteínas, proteínas, cofatores, base e enzimas, especialmente em microorganismos
Manganês (Mn)	Ativado de muitas enzimas, presente em muitas espécies de plantas e na maioria das células e tecidos em organismos superiores (epitaxial)
Molibdênio (Mo)	Cofator em muitas enzimas, especialmente em plantas, animais marinhos, sulfite oxidase, DMSO (DMSO) oxidase, algumas formas de desnitrogenação
Níquel (Ni)	Membro das hidrogenases, coenzima F <sub>430</sub> de hidrogenases, monóxido de carbono desidrogenase, gás sulfídrico
Selênio (Se)	Ferredoxina, desidrogenase, algumas hidrogenases, monóxido de carbono desidrogenase, monóxido de carbono desidrogenase
Sódio (Na)	Algumas bacterias, hidrogenases, coenzima F <sub>430</sub> de hidrogenases
Zinco (Zn)	Ativado de muitas enzimas, especialmente em plantas, animais marinhos, sulfite oxidase, DMSO (DMSO) oxidase e outras proteínas de ligação a DNA

Madigan et al., 2016

**TABELA 6.1 Efeito do Oxigênio sobre o Crescimento de Vários Tipos de Bactérias**

	a. Aeróbicas obrigatórias	b. Anaeróbicas facultativas	c. Anaeróbicas obrigatórias	d. Anaeróbicas aerotolerantes	e. Microaerófilas
<b>Efeito do oxigênio sobre o crescimento</b>	Somente crescimento aeróbico; necessidade de oxigênio.	Crescimento aeróbico e anaeróbico; aumento do crescimento na presença de oxigênio.	Somente crescimento anaeróbico; não há crescimento na presença de oxigênio.	Somente crescimento anaeróbico mas contínuo na presença de oxigênio.	Somente crescimento aeróbico; necessidade de oxigênio em baixas concentrações.
<b>Tubo de ensaio com crescimento bacteriano em meio sólido</b>					
<b>Explicação para os padrões de crescimento</b>	Crescimento somente após a difusão de altas concentrações de oxigênio para o meio de cultura.	Melhor crescimento nos regimes de maior concentração de oxigênio, mas ocorre em todo o meio.	Ausência das enzimas catalase e SOD permite a neutralização das formas tóxicas de oxigênio; não tolera oxigênio.	Crescimento em todo o meio de cultura; o oxigênio não tem efeito.	Crescimento ocorre onde uma baixa concentração de oxigênio está dissolvida no meio.
<b>Explicações para os efeitos do oxigênio</b>	Presença das enzimas catalase e superóxido dismutase (SOD) permite a neutralização das formas tóxicas de oxigênio; pode usar oxigênio.	Presença das enzimas catalase e SOD permite a neutralização das formas tóxicas de oxigênio; pode usar oxigênio.	Ausência das enzimas catalase e SOD permite a neutralização das formas tóxicas de oxigênio; não tolera oxigênio.	Presença de uma enzima (SOD) permite a neutralização parcial das formas tóxicas de oxigênio; tolera oxigênio.	Produção de quantidades letais das formas tóxicas de oxigênio quando exposto à atmosfera normal de oxigênio.

Tortora et al., 2016

# FATORES ORGÂNICOS

- compostos orgânicos essenciais que o micro-organismo não sintetiza
- retirados do meio ambiente
- algumas bactérias (*Streptococcus*, *Lactobacillus*): certas vitaminas, devido à ausência de enzimas que participam de biossíntese de compostos
- aminoácidos, purinas e pirimidinas



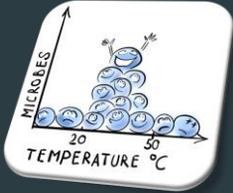
*Morvan et al., 2006; Travençolo et al., 2016*

**Tabela 5.3 Fatores de crescimento: vitaminas e suas funções**

Vitamina	Função
Ácido p-aminobenzoico	Precursores de ácido fólico
Ácido fólico	Metilação de um carbono; transferência de grupos metil
Biotina	Biossíntese de ácidos graxos, β-oxidação; algumas reações de fixação de CO <sub>2</sub>
Coloalmina (B <sub>12</sub> )	Redução e transferência de hidrogênio; metilado em carbonos; síntese de nucleotídeos
Ácido lipóico	Transferência de grupos acil na desoxilação de piruvato e α-cetoglutarato
Ácido nicotínico (niacina)	Precursores de NAD <sup>+</sup> (ver Figura 5.11); transferência de elétrons nas reações de oxidação-redução
Ácido pantotênico	Precursores de coenzima A; ativação de acetil e de outros derivados de acil
Riboflavina	Precursores de FMN (ver Figura 5.16); FAD em reações de oxidação-redução; transporte de elétrons
Tiamina (B <sub>1</sub> )	α-cetoglutarato; transferência de elétrons
Vitamina B <sub>6</sub> (grupo piridoxil-carbonyl)	Transferências de aminocácidos e carboxílicos
Grupo da vitamina B <sub>12</sub> (cobalamina)	Transporte de elétrons; síntese de estigmidina
Hidroximetilglutamil-CoA	Compostos que se ligam ao ferro; solubilização e transporte de ferro para o centro de catalisação

*Madigan et al., 2010*

### 3) MEIOS DE CULTURA



<https://thumbs.dreamstime.com/b/temperatura-e-diagrama-bacteriano-do-crescimento-14750638.jpg>



### DEFINIÇÕES

- **Meio de cultivo:** material nutriente preparado no laboratório para o crescimento de micro-organismos
- grande variedade de meios de cultura disponíveis com todos os componentes necessários (exceto: água + esterilidade)



*Trubalski & Albertum, 2005*

### MEIOS DE CULTIVO



## DEFINIÇÕES

- **Inóculo:** micro-organismos colocados em meio de cultura para iniciar o crescimento



*Trabalho & Alterthum, 2005*



## DEFINIÇÕES

- **Cultura:** micro-organismos que crescem e se multiplicam nos meios de cultura
- espécies que crescem em qualquer meio; outras em meios especiais e as incapazes de crescer em meio já desenvolvido



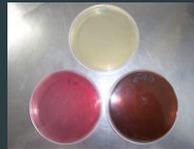
*Trabalho & Alterthum, 2005*

## • Estado físico

- **soluções aquosas (caldos)** ⇒ maior facilidade de crescimento (número inicial pequeno)
- **meios sólidos** ⇒ obtenção de “cultura pura” ⇒ identificação e caracterização bacterianas
  - ↳ formação de colônias individualizadas ⇒ transferência para novo meio
- agente solidificante mais usado: **ágar** ⇒ polissacarídeo de algas ⇒ liquefeito a 100°C e sólido a 40°C
- tubos de ensaio ou placa de Petri



*Trabalho & Alterthum, 2005; Tortora et al., 2016; Murray et al., 2009*



placas

tubos

## • Tipos de meio

- **definido** ⇒ composição química exata conhecida (qualidade e quantidade)
- **complexo** ⇒ nutrientes como digestos de produtos animais ou vegetais como caseína (proteína do leite), carne, soja extrato de levedura
  - ↳ composição química pode conter pequenas variações em diferentes culturas do produto
  - ↳ **caldo:** meio fornecido na forma líquida
  - ↳ **meio sólido:** ágar é adicionado

*Trabalho & Alterthum, 2005; Tortora et al., 2016; Murray et al., 2009*

## • Exemplo de composição de meio definido

Componente	Quantidade
Glicose	5,0 g
Fosfato de amônia monobásico ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )	1,0 g
Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ )	5,0 g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,2 g
Fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	1,0 g
Água	1 litro

*Tortora et al., 2016*

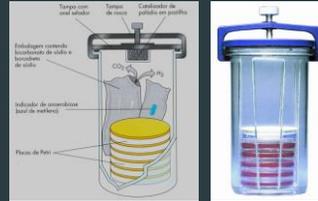
- Exemplo de composição de meio complexo

TABELA 6.4	
Composição do Meio Agar Nutriente, um Meio Complexo para o Crescimento de Bactérias Heterotróficas	
Componente	Quantidade
Peptona (proteína parcialmente digerida)	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Cloreto de sódio	8,0 g
Agar	15,0 g
Água	1 litro

Tortora et al., 2016

- Tipos de meio

→ **meios redutores** → contêm reagentes (ex.: tioglicolato de sódio) que eliminam o oxigênio dissolvido ⇒ cultivo de bactérias anaeróbicas (jarras de anaerobiose)



Tortora et al., 2016; Murray et al., 2006

- Tipos de meio

→ **meio seletivo** ⇒ favorecem o crescimento da bactéria de interesse, impedindo o crescimento de outras

- corantes básicos inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas; azida sódica inibe as Gram-negativas

- ágar Sabouraud dextrose ⇒ pH = 5,6 ⇒ fungos

→ **meios de enriquecimento** ⇒ estimulam o crescimento do micro-organismo de interesse que está em pequeno número

Trabulsi &amp; Alterthum, 2005; Tortora et al., 2016; Murray et al., 2006

- Tipos de meio

→ **meio diferencial** ⇒ utilizado para fácil identificação da bactéria de interesse quando existem outras bactérias crescendo na mesma placa. Ex.: ágar sangue na identificação de *Streptococcus pyogenes*



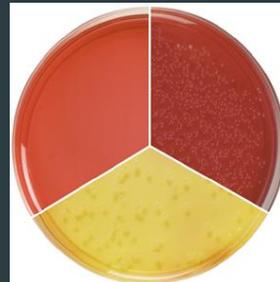
Trabulsi &amp; Alterthum, 2005; Tortora et al., 2016; Murray et al., 2006

- Tipos de meio diferenciais

(a) *Staphylococcus aureus* em meio tellurito-glicólico.(b) *Escherichia coli* em meio esofina azul de metileno (EMB). As colônias pretas no centro são cercadas por um halo metálico brilhante característico.

Tortora et al., 2016

- meio seletivo e diferencial (Ágar manitol salgado)



Tortora et al., 2016

### CONSERVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

- Para estocagem e preservação por longos períodos:
  - **congelamento em baixas temperaturas** ⇨ culturas com crioprotetor (glicerol, DMSO) congeladas de -50 °C a -90 °C ou em nitrogênio líquido (-196 °C)
  - **liofilização** ⇨ suspensão microbiana rapidamente congelada (-54 °C a -72 °C) ✦ secagem do material por sublimação da água ✦ ampolas fechadas hermeticamente (conservação à TA)



Tortora et al., 2016; Murray et al., 2006

### Referências

- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M., et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016, 1032p.
- MAZA, L. M.; PEZZLO, M. T.; BARON, E. J. Atlas de Diagnóstico em Microbiologia. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 1999, 216p.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFLALLER, M. A. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 979p.
- PELCZAR, M., REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia. Vol. 1. São Paulo: McGraw-Hill, 1980, 574p.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016, 964p.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, 718p.