

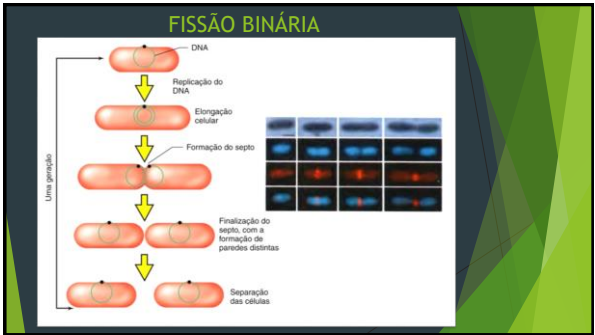
Nutrição, Crescimento e Metabolismo de Microrganismos

Profa. Dra. Marta Mitsui Kushida

1) CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

<https://thumbs.dreamstime.com/stock-temperatura-e-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 & Abernham, 2005; Torisona et al., 2016; Murray et al., 2006*

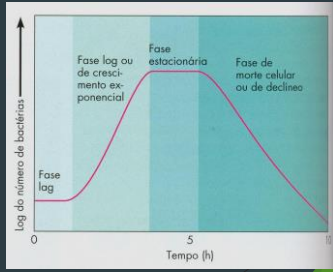


- ### TEMPO DE GERAÇÃO
- Tempo necessário para uma célula se dividir (população dobra de tamanho)
 - sofre variações e depende das condições ambientais (temperatura)
 - maioria: tempo de geração de 1 a 3 horas; algumas: mais de 24 horas
-

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

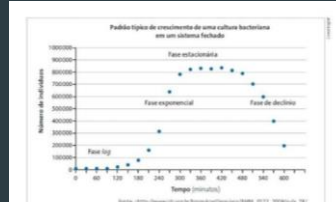
O crescimento bacteriano é representado graficamente por curvas em escalas logarítmicas (exponencial)

• 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/biology/1001/1001_2008/lecture_10/1001_2008_lecture_10_slides.html

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

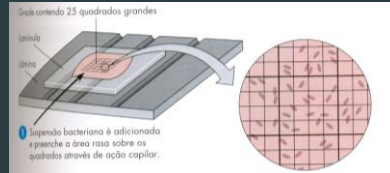
- ▶ **Contadores eletrônicos de células:** contagem em meio aquoso



Trabulsi & Alterthum, 2005

Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano

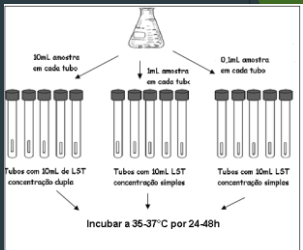
- ▶ **Câmara de contagem (câmara de Neubauer):**



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

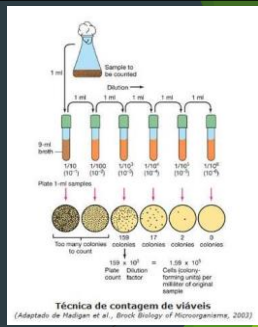
Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano

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

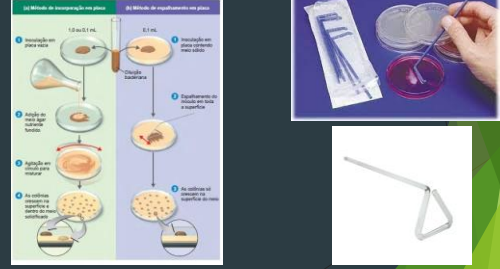
- ▶ amostras de diluições seriadas da cultura semeadas em meios sólidos para desenvolvimento de colônias (unidades formadoras de colônias - UFC)
- ▶ obtenção do número de bactérias viáveis (UFC)/mL na suspensão original



Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano



Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano



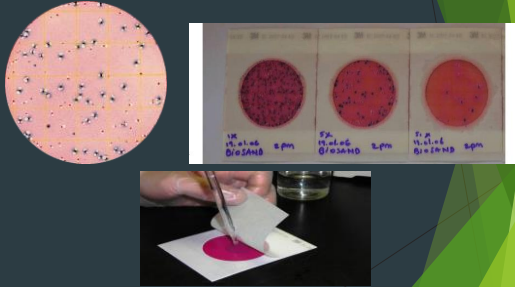
Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano



Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano

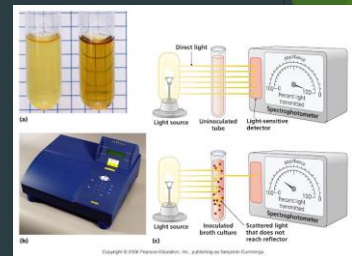


Métodos diretos para quantificar o crescimento microbiano



Métodos indiretos para quantificar o crescimento microbiano

Turbidimetria (espectrofotômetro)



Métodos indiretos para quantificar o crescimento microbiano

- **Atividade metabólica:** quantidade de produto metabólico (ácido ou CO₂) 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

Trochu & Afonso, 2005

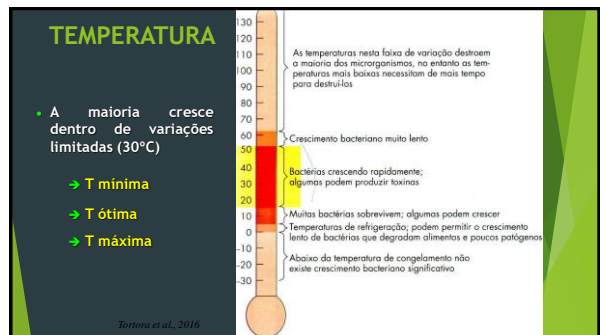
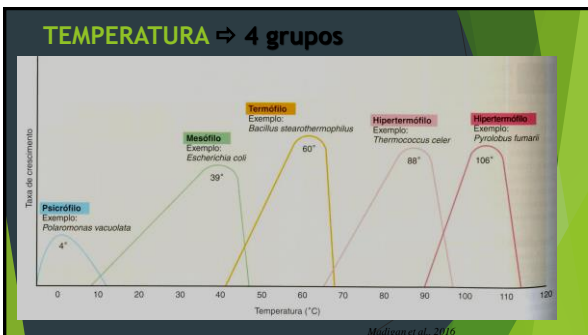
2) FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO MICROBIANO

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

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



- enzimas com mais α -hélices, aa polares (menos aa hidrofóbicos); membrana com $\acute{a}c.$ 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!!!

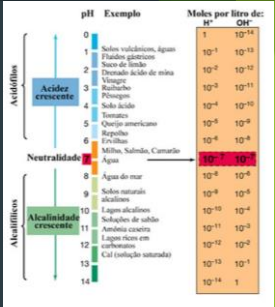
- *Thermus aquaticus*: Taq DNA polimerase
- *Thermococcus litoralis*: Vent₂
- *Pyrococcus*: Deep Vent_R



...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

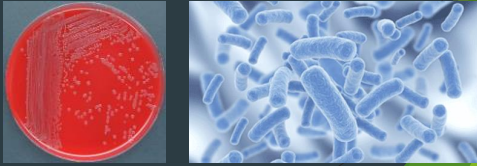
b) pH

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




b) pH

- Alcalifílicos: pH ≥ 9
- *Bacillus firmus* (lagos e solos com carbonato de sódio)

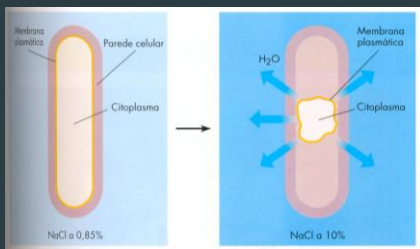


c) PRESSÃO OSMÓTICA

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

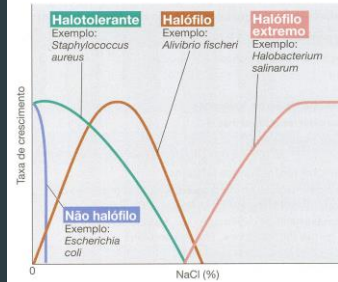
Toranzo et al., 2016

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)
- quimio-heterotróficos e foto-heterotróficos ⇨ carbono obtido de materiais orgânicos (proteínas, carboidratos e lipídeos)
- quimioautotróficos e fotoautotróficos ⇨ 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 N₂ 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 sintase em bactérias; também encontrado em alguns produtos antibióticos
Cálcio (Ca)	Requerido para manutenção do metabolismo de vários nutrientes essenciais, especialmente para a síntese de ácidos graxos
Cobalto (Co)	Verme de B ₁₂ (cobalamina) bacteriana que sintetiza ácido propiónico
Cádmio (Cd)	Regulador, citocromo c oxidase, fosfolipase, plasmolipase, alguns superóxido dismutases
Ferro (Fe)	Citocromos, catalases, peroxidases, proteínas contendo ferro e enzimas, especialmente as nitrogenases
Manganês (Mn)	Ativado de muitas enzimas; presente em várias superóxido dismutases e na enzima que cliva e liga as histidinas argininas (histidinas)
Molibdênio (Mo)	Cofator essencial para as enzimas nitrogenase, nitrito redutase, sulfite oxidase, DMSO (DMSO) redutase, algumas formos desidrogenases
Níquel (Ni)	Membro das hidrogenases, oxigenase F ₄₃₀ de metanogênese, monooxigenase de sulfato, dióxido de carbono
Selenio (Se)	Ferredoxinas, algumas hidrogenases, nitrito redutase
Sódio (Na)	Alguns sistemas hidrogenases, citocromo c oxidase
Zinco (Zn)	Ácido ascórbico, álcool desidrogenase, BNA e DNA polimerase 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
Efeito do oxigênio sobre o crescimento	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.
Tubo de ensaio com crescimento bacteriano em meio sólido					
Explicação para os padrões de crescimento	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.
Explicações para os efeitos do oxigênio	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 ₂
Coloalmina (B ₁₂)	Redução e transaminação de lipídios; metilação em carbonos; síntese de nucleotídeos
Ácido lipóico	Transferência de grupos acil na desvolatilização de piruvato e α-cetoglutarato
Ácido nicotínico (niacina)	Precursores de NAD ⁺ (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 5.10); FAD em reações de oxidação-redução; transporte de elétrons
Tiamina (B ₁)	α-cetoglutarato; transaminação
Vitamina B ₆ (grupo piridoxil)	Transformações de aminoácidos e carboidratos
Grupo da vitamina B ₁₂ (cobalamina)	Transporte de elétrons; síntese de nucleotídeos
Hidroximetilglutimidil	Compostos que se ligam ao ferro; solubilização e transporte de ferro para o centro de catalise

Madigan et al., 2016

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)



Trabalzi & Alferham, 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



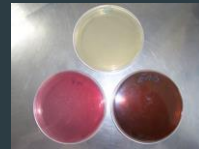
Trabalho & Alterthum, 2005

• 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 (NaCl)	5,0 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	1,0 g
Água	1 litro

Tortora et al., 2016

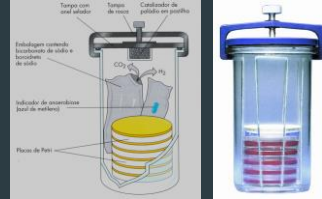
- Exemplo de composição de meio complexo

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

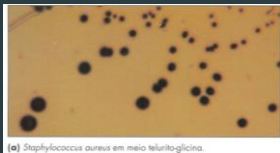
- Tipos de meio

→ **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*



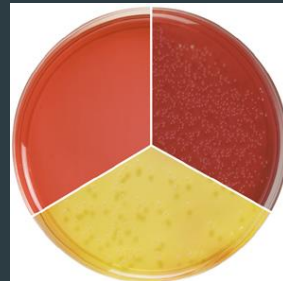
Trabulsi & Alterthum, 2005; Tortora et al., 2016; Murray et al., 2006

- 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.