

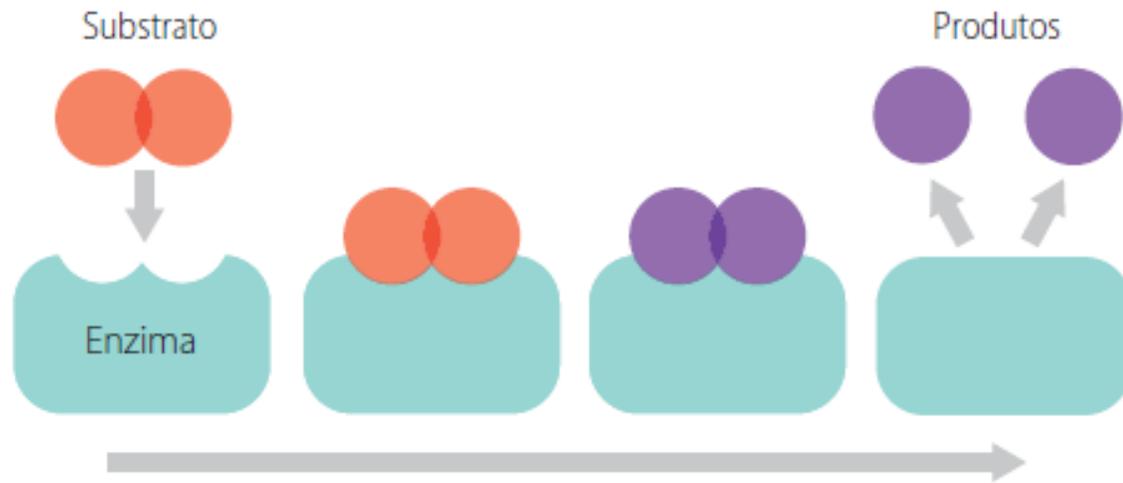
Princípios de Microbiologia (LFN0325)

metabolismo microbiano

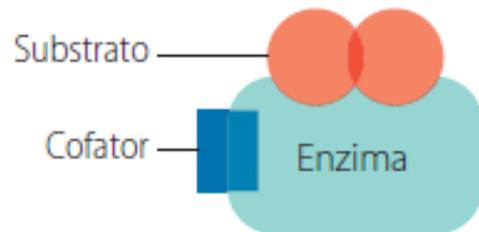
metabolismo microbiano

- consiste na **acumulação** e na **degradação** de **nutrientes** por uma célula
- as **reações metabólicas** fornecem **energia** e geram **substâncias** que sustentam a vida

As **enzimas** catalisam reações para moléculas específicas, chamadas de **substratos**. Durante as reações enzimáticas, os substratos são transformados em novas substâncias, denominadas **produtos**.



As enzimas, as quais são geralmente proteínas, podem precisar de outras moléculas não proteicas, chamadas de cofatores, para realizar suas funções. Cofatores inorgânicos incluem íons metálicos. Cofatores orgânicos, ou coenzimas, incluem os carreadores de elétrons FAD, NAD⁺ e NADP⁺.



metabolismo microbiano

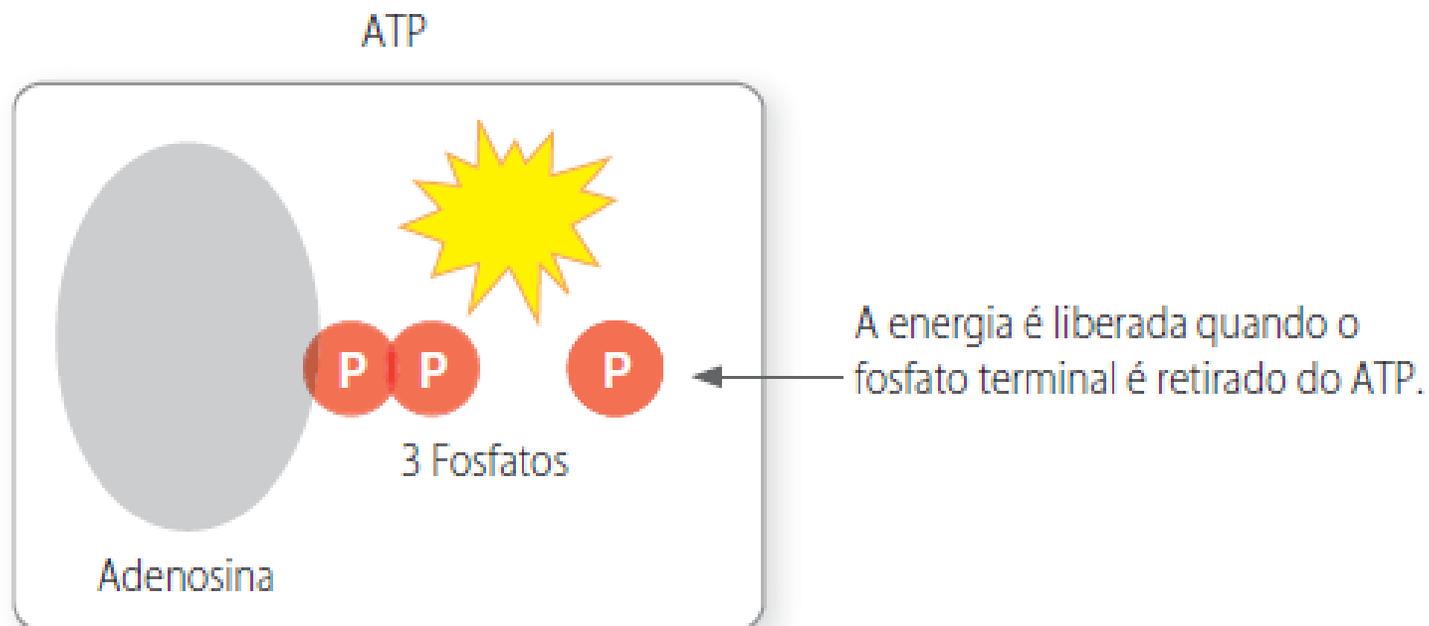
há dois componentes
essenciais para o
metabolismo



há dois componentes essenciais para o metabolismo

metabolismo microbiano

Se uma reação resultar em excesso de energia, uma parte dessa energia pode ser capturada na forma de ligações de ATP. Assim, uma célula pode quebrar essas mesmas ligações e utilizar a energia liberada para abastecer outras reações.



metabolismo microbiano

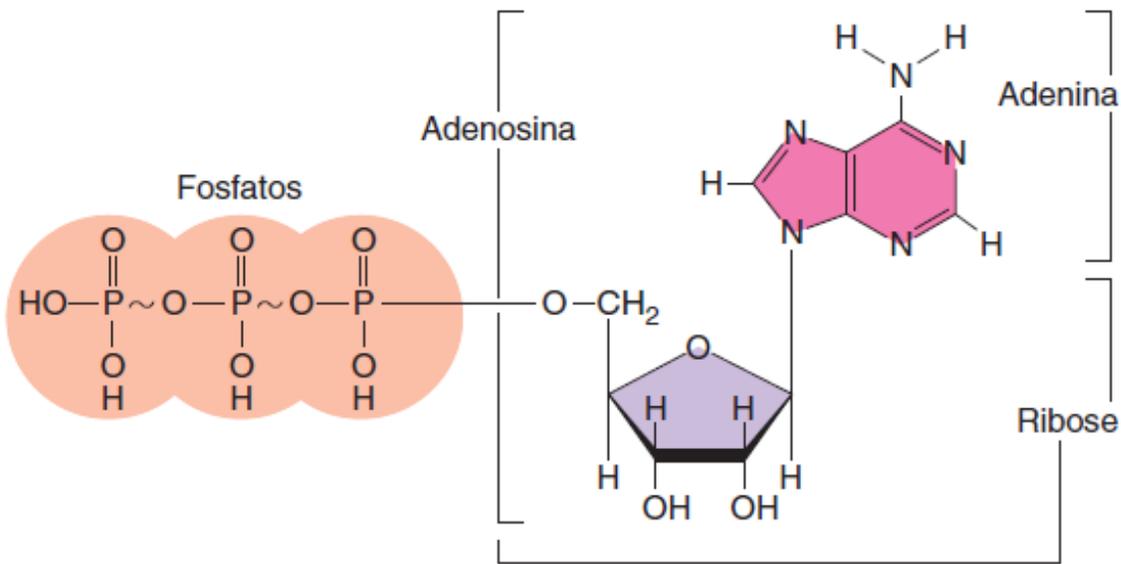
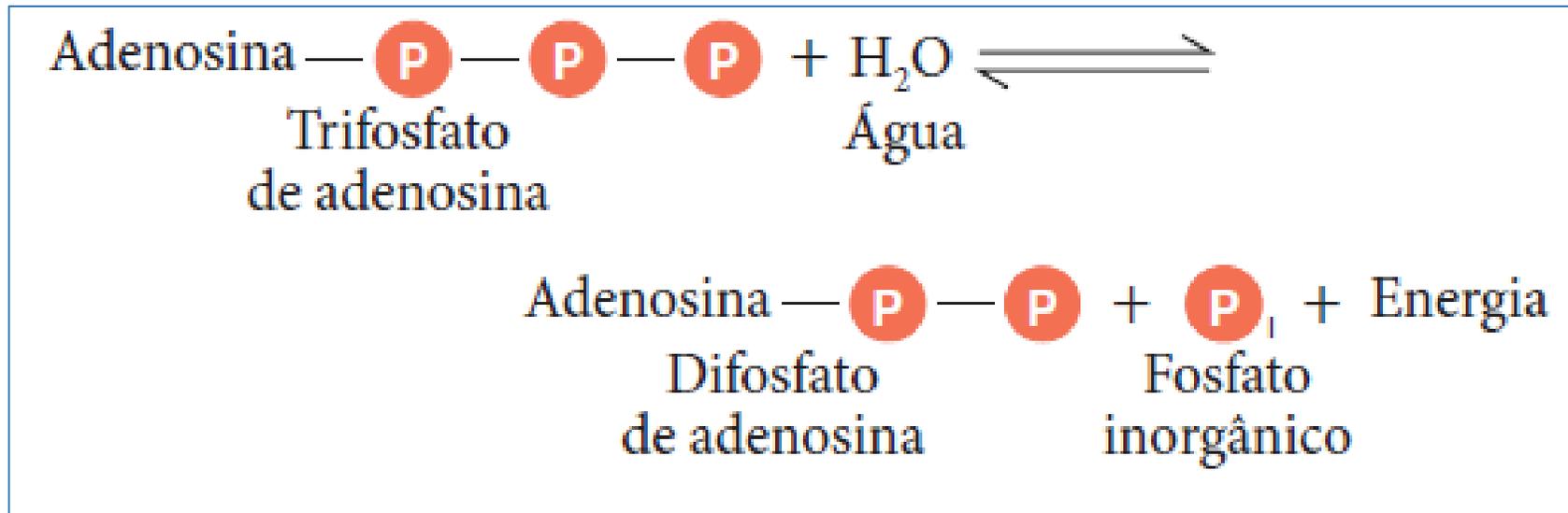
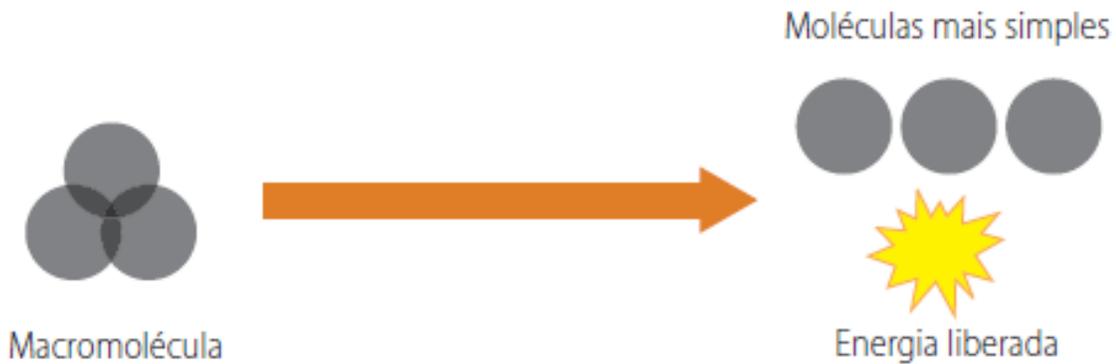


Figura 2.18 A estrutura do ATP. As ligações fosfato ricas em energia são indicadas por linhas onduladas. Quando o ATP se degrada em ADP e fosfato inorgânico, uma grande quantidade de energia é liberada para uso em outras reações químicas.



As vias **catabólicas** quebram as macromoléculas em seus componentes mais simples, liberando energia no processo.



As vias **anabólicas** constroem macromoléculas por meio da combinação de moléculas mais simples, utilizando energia no processo.

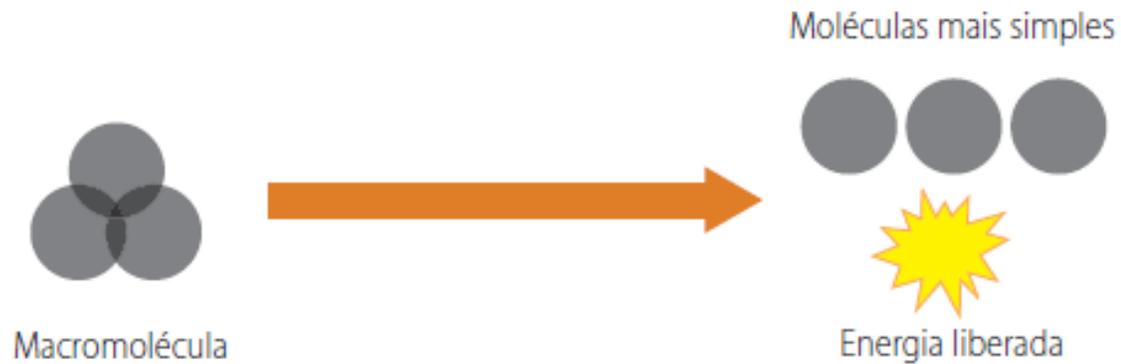


metabolismo microbiano

reações
catabólicas e
anabólicas



As vias **catabólicas** quebram as macromoléculas em seus componentes mais simples, liberando energia no processo.

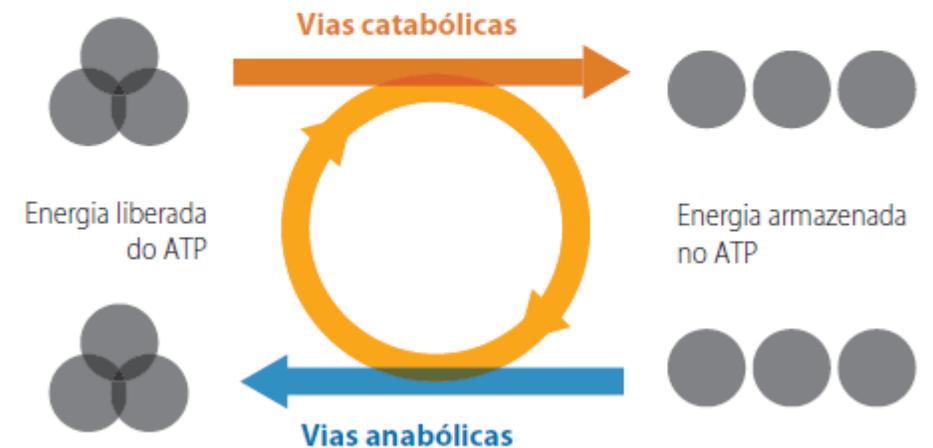


As vias **anabólicas** constroem macromoléculas por meio da combinação de moléculas mais simples, utilizando energia no processo.



metabolismo microbiano

Em outras palavras, as vias catabólicas e anabólicas são associadas pela **energia**. As reações catabólicas fornecem a energia necessária para as reações anabólicas.



metabolismo microbiano

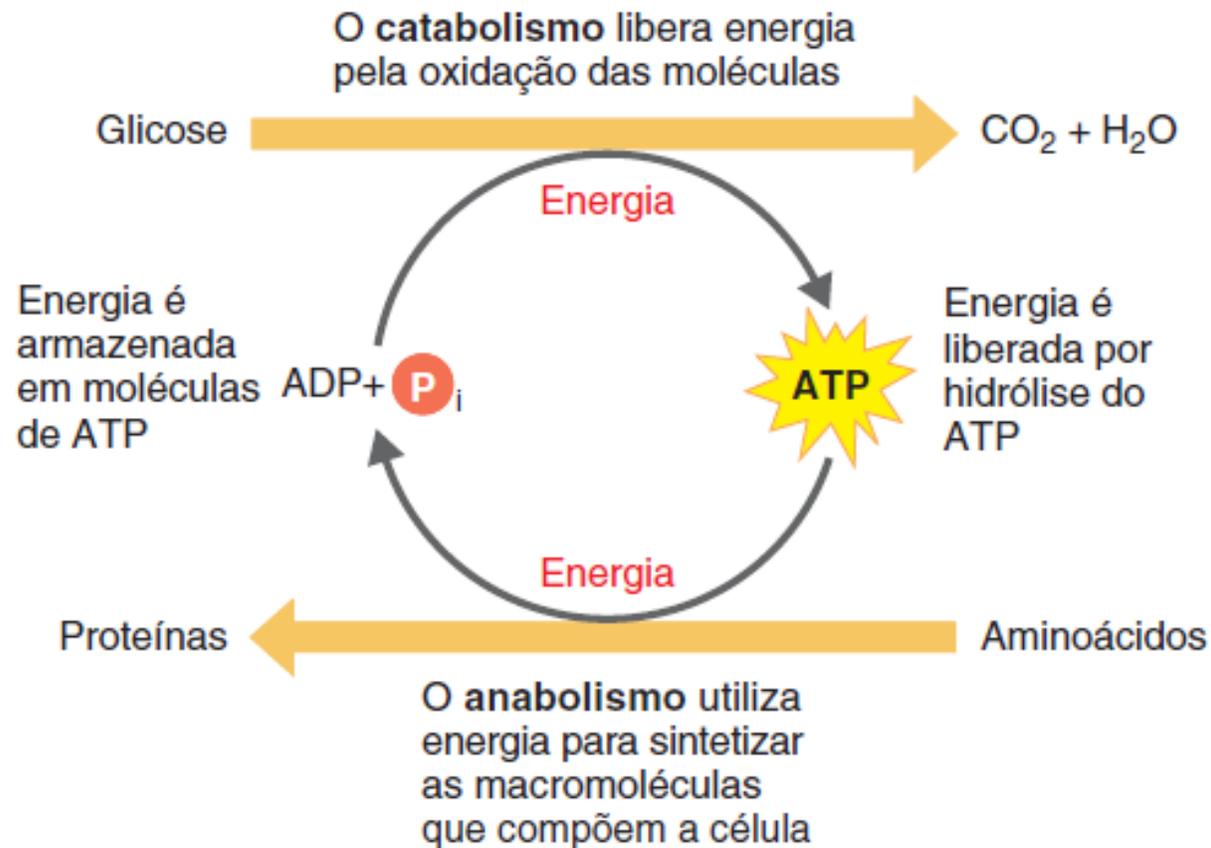


Figura 5.1 O papel do ATP no acoplamento das reações anabólicas e catabólicas. Quando moléculas complexas são quebradas (catabolismo), parte da energia é transferida e captada no ATP, e o restante é liberado como calor. Quando moléculas simples são combinadas para formar moléculas complexas (anabolismo), o ATP fornece a energia para a síntese, e outra vez parte da energia é liberada como calor.

P Como o ATP fornece energia para as reações de síntese?



metabolismo microbiano

Tabela 5.2 Vitaminas selecionadas e suas funções coenzimáticas

Vitamina	Função
Vitamina B₁ (tiamina)	Parte da coenzima cocarboxilase; tem muitas funções, incluindo o metabolismo do ácido pirúvico
Vitamina B₂ (riboflavina)	Coenzima em flavoproteínas; ativa na transferência de elétrons
Niacina (ácido nicotínico)	Parte da molécula de NAD*; ativa na transferência de elétrons
Vitamina B₆ (piridoxina)	Coenzima no metabolismo de aminoácidos
Vitamina B₁₂ (cianocobalamina)	Coenzima (metil-cianocobalamina) envolvida na transferência de grupos metil; ativa no metabolismo de aminoácidos
Ácido pantotênico	Parte da molécula da coenzima A; envolvida no metabolismo do ácido pirúvico e dos lipídeos
Biotina	Envolvida nas reações de fixação do dióxido de carbono e na síntese de ácidos graxos
Ácido fólico	Coenzima utilizada na síntese de purinas e pirimidinas
Vitamina E	Necessária para a síntese celular e macromolecular
Vitamina K	Coenzima utilizada no transporte de elétrons

*NAD, nicotinamida adenina dinucleotídeo.



metabolismo microbiano

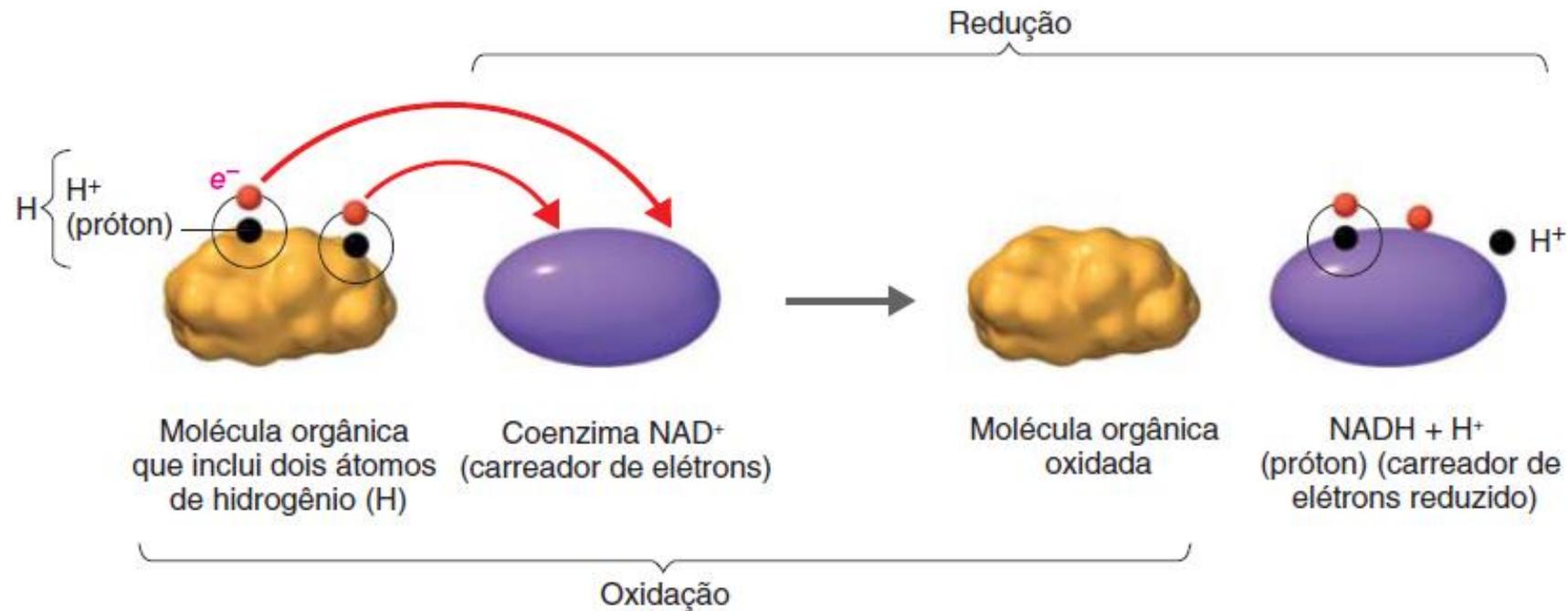


Figura 5.10 Oxidação biológica representativa. Dois elétrons e dois prótons (juntos equivalem a dois átomos de hidrogênio) são transferidos de uma molécula de substrato orgânico para uma coenzima, NAD⁺. O NAD⁺ na verdade, recebe um átomo de hidrogênio e dois elétrons, e um próton é liberado no meio. NAD⁺ é reduzida a NADH, molécula mais rica em energia.

metabolismo microbiano

*as **coenzimas** podem auxiliar a enzima aceitando átomos removidos do substrato ou doando átomos requeridos pelo substrato*

ou seja, atuam como **carreadores de elétrons**

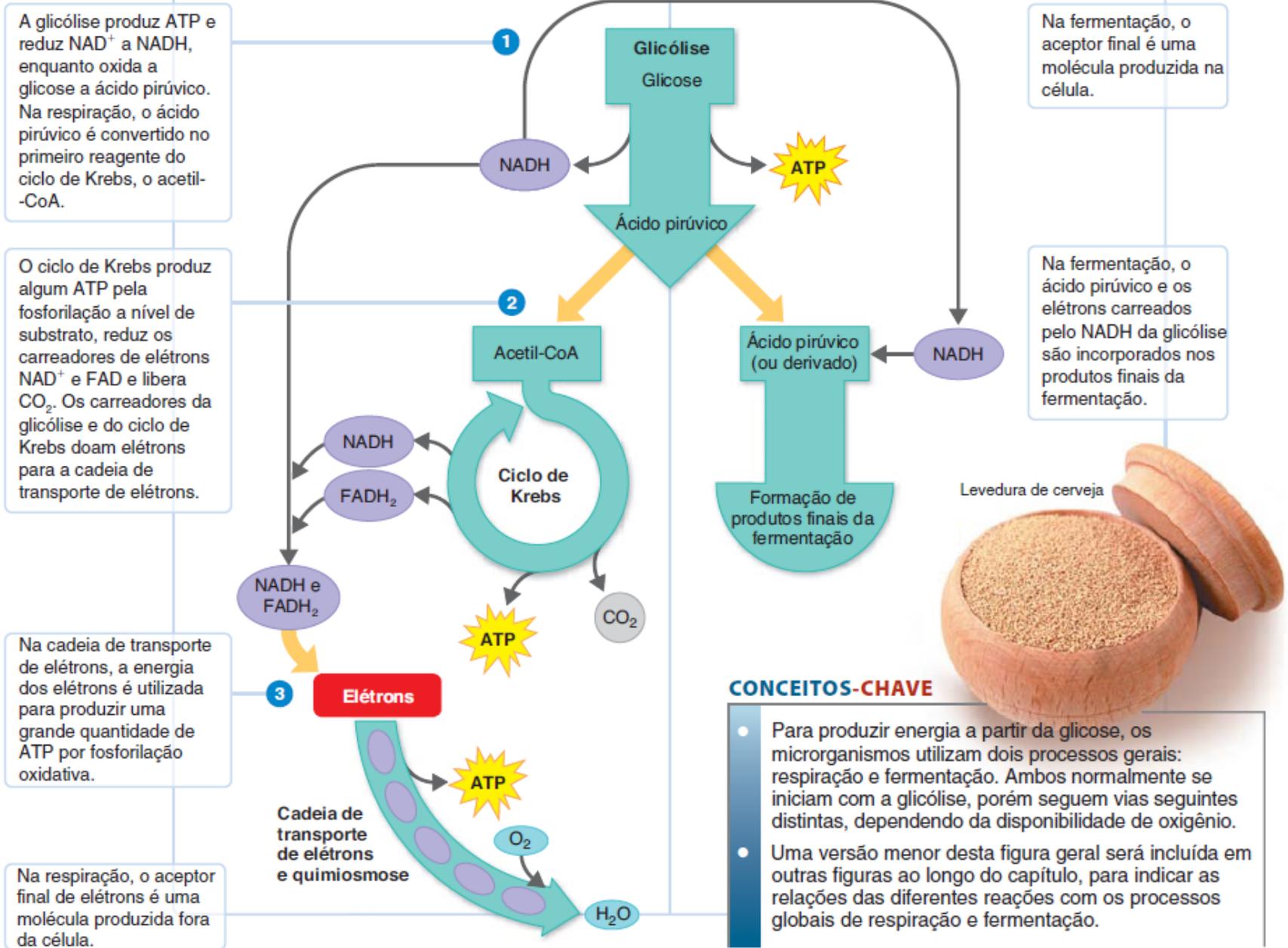
exemplos de **coenzimas** importantes

- nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺)
- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺)
- flavina mononucleotídeo (FMN)
- flavina adenina dinucleotídeo (FAD)
- coenzima A (CoA)



respiração

fermentação



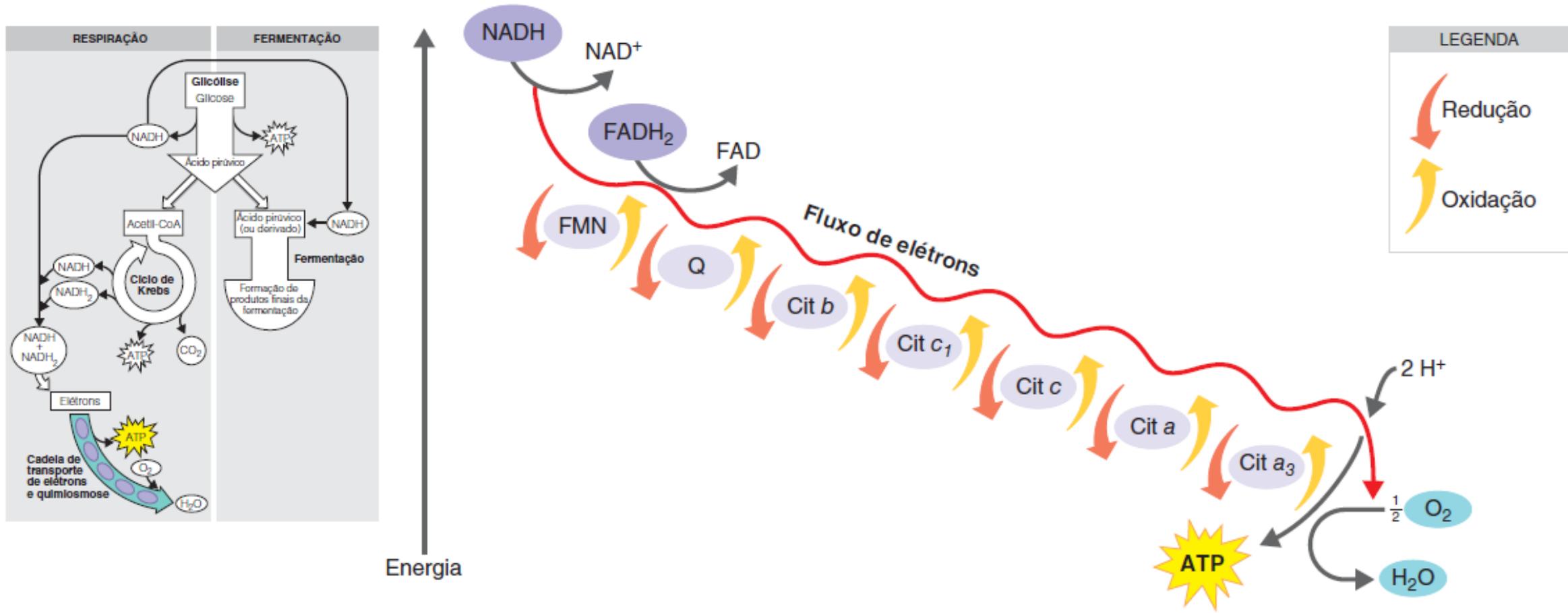


Figura 5.14 Cadeia de transporte de elétrons (sistema). O diagrama no detalhe indica a relação da cadeia de transporte de elétrons com o processo geral da respiração. Na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial apresentada, os elétrons são transferidos ao longo da cadeia passo a passo, de forma gradual, assim a energia é liberada em quantidades administráveis (ver Figura 5.16 para aprender onde o ATP é formado).

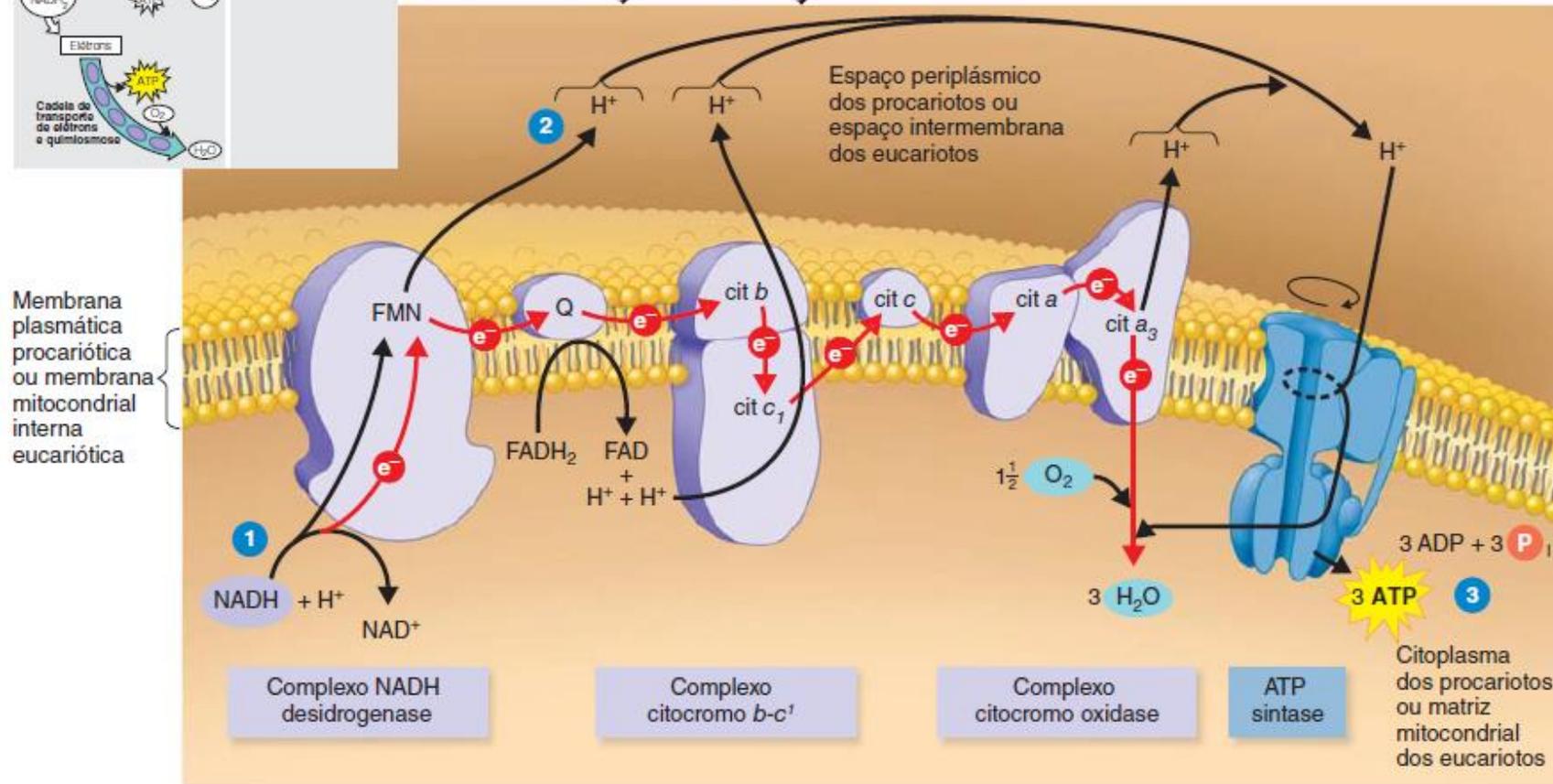
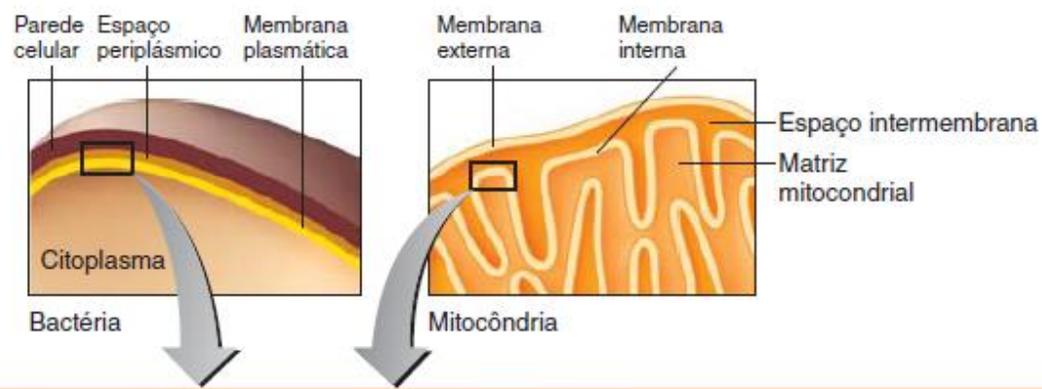
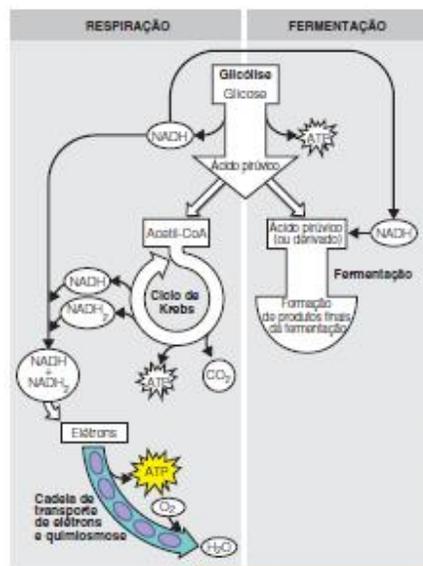


Figura 5.16 Transporte de elétrons e a geração quimiosmótica de ATP. Os carreadores de elétrons são organizados em três complexos, e os prótons (H^+) são bombeados através da membrana em três pontos. Na célula procariótica, os prótons são bombeados através da membrana plasmática a partir do lado citoplasmático. Na célula eucariótica, eles são bombeados a partir do lado da matriz da membrana mitocondrial para o lado oposto. O fluxo de elétrons é indicado com setas vermelhas.

Figura 5.17 Resumo da respiração aeróbia em procariotos. A glicose é completamente quebrada em dióxido de carbono e água, e ATP é gerado. Esse processo tem três fases principais: a glicólise, o ciclo de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons. A etapa preparatória está entre a glicólise e o ciclo de Krebs. O evento essencial na respiração aeróbia é que os elétrons são extraídos dos intermediários da glicólise e do ciclo de Krebs por NAD^+ ou FAD e carreados por NADH ou FADH_2 até a cadeia de transporte de elétrons. NADH também é produzida durante a conversão de ácido pirúvico em acetil-CoA. A maioria do ATP gerado pela respiração aeróbia é produzida pelo mecanismo de quimiosmose durante a fase da cadeia de transporte de elétrons; isso é chamado de fosforilação oxidativa.

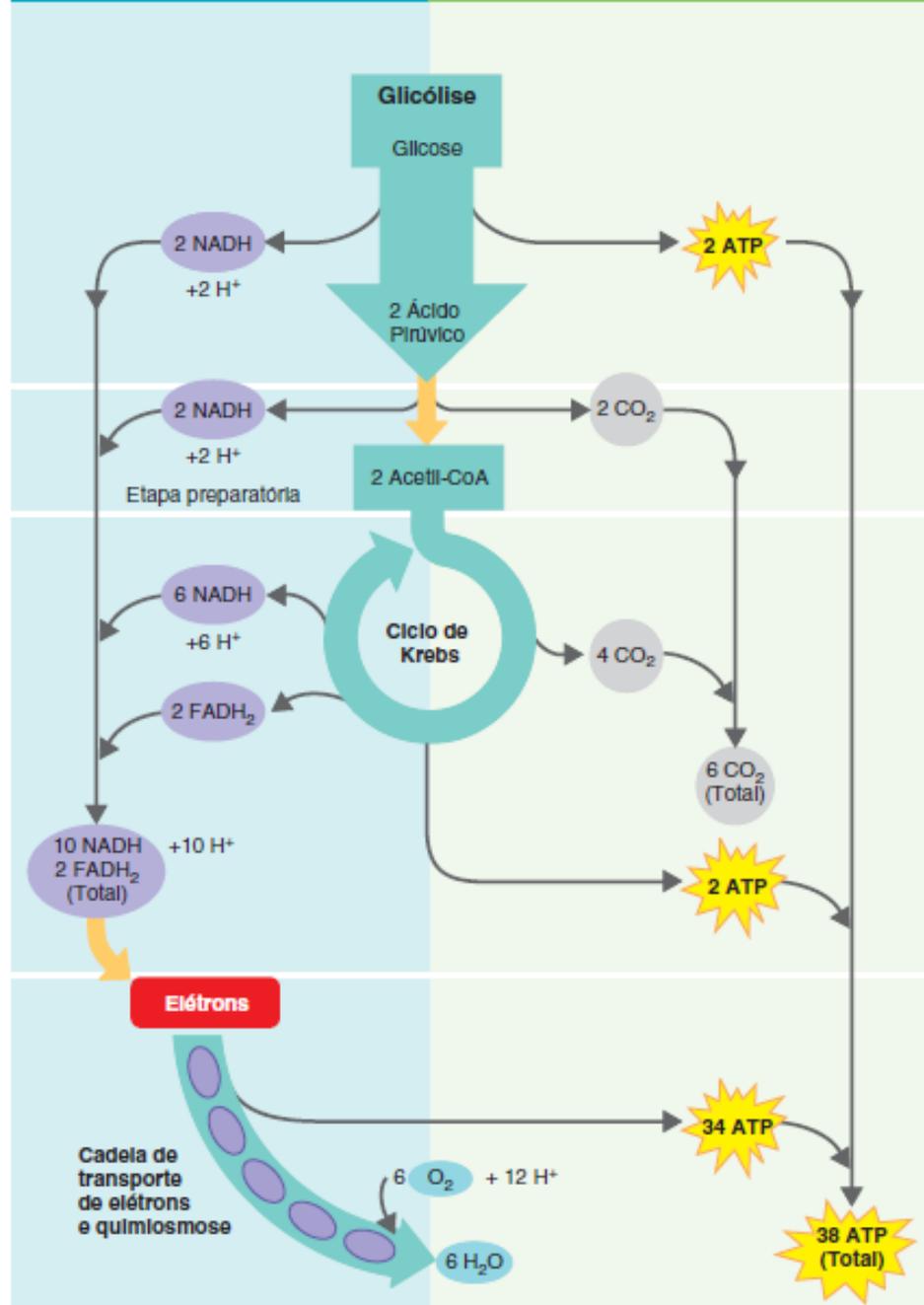
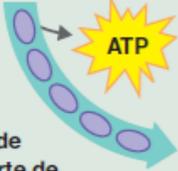


Tabela 5.3 Produção de ATP durante a respiração aeróbia procariótica de uma molécula de glicose

Fonte		Rendimento em ATP (método)	
Glicólise			
1. Oxidação da glicose a ácido pirúvico		2 ATP (fosforilação a nível de substrato)	 Cadeia de transporte de elétrons e quimiosmose
2. Produção de 2 NADH		6 ATP (fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons)	
Etapa preparatória			
1. Formação de acetil-CoA produz 2 NADH		6 ATP (fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons)	
Ciclo de Krebs			
1. Oxidação do succinil-CoA a ácido succínico		2 GTP (equivalente ao ATP; fosforilação a nível de substrato)	
2. Produção de 6 NADH		18 ATP (fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons)	
3. Produção de 2 FADH		4 ATP (fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons)	
		Total: 38 ATP	

fermentação

- **libera energia** a partir de **açúcares** ou outras **moléculas orgânicas**, como aminoácidos, ácidos orgânicos, purinas e pirimidinas
- **não requer oxigênio** (mas pode ocorrer na sua presença)
- **não requer** a utilização do **ciclo de Krebs** ou de uma **cadeia de transporte de elétrons**
- utiliza uma **molécula orgânica sintetizada** na célula como **acceptor final de elétrons**

Figura 5.18 Fermentação. O diagrama indica a relação da fermentação com os processos globais de produção de energia. **(a)** Uma visão geral da fermentação. O primeiro passo é a glicólise, a conversão da glicose em ácido pirúvico. No segundo passo, as coenzimas reduzidas da glicólise ou suas alternativas (NADH, NADPH) doam seus elétrons e íons hidrogênio ao ácido pirúvico ou a um derivado para formar um produto final da fermentação. **(b)** Produtos finais de várias fermentações microbianas.

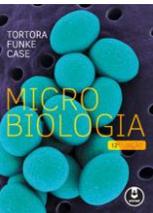
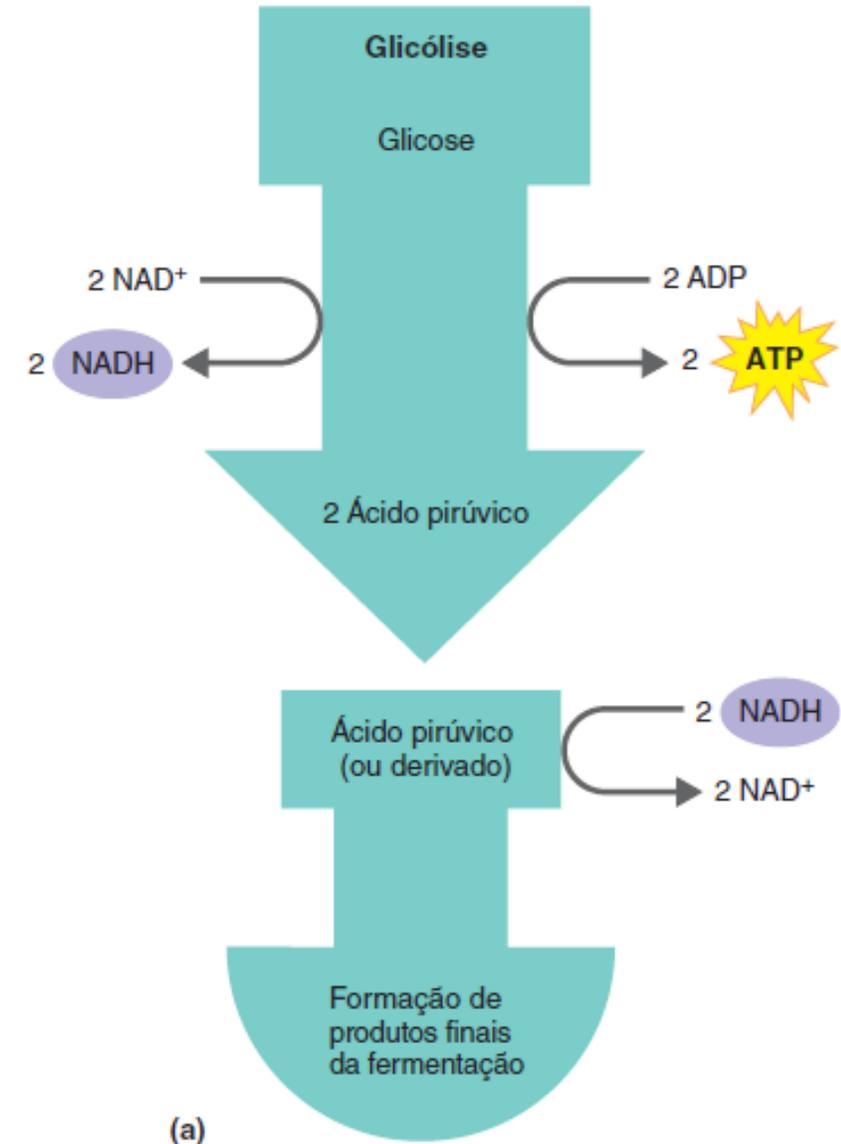
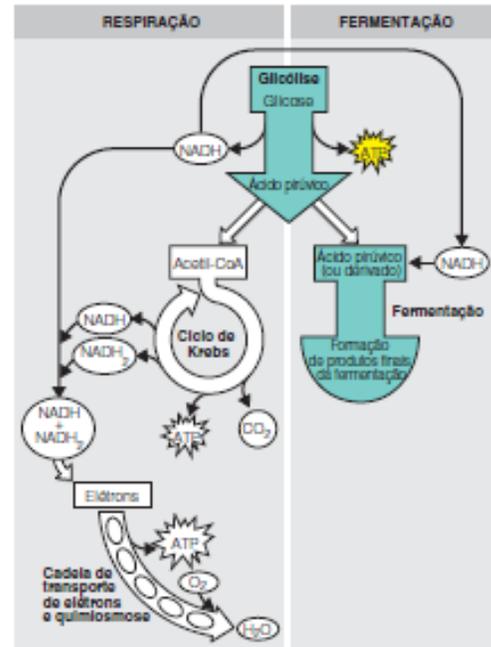
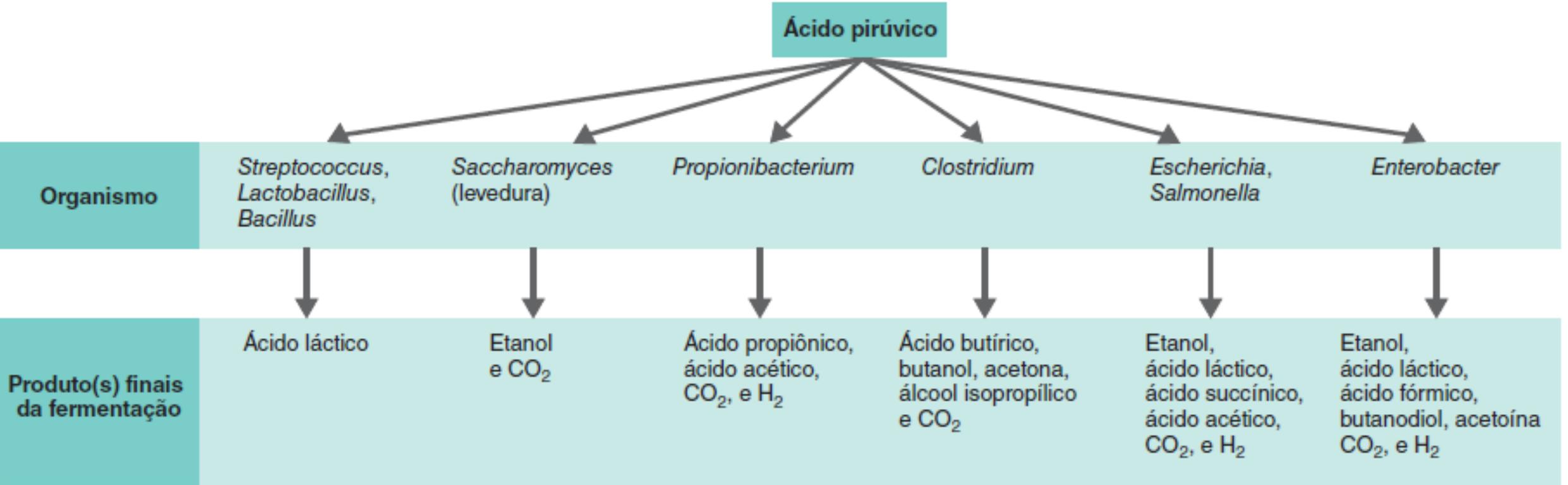


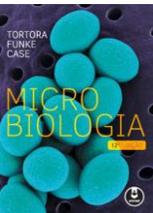
Figura 5.18 Fermentação. O diagrama indica a relação da fermentação com os processos globais de produção de energia. **(a)** Uma visão geral da fermentação. O primeiro passo é a glicólise, a conversão da glicose em ácido pirúvico. No segundo passo, as coenzimas reduzidas da glicólise ou suas alternativas (NADH, NADPH) doam seus elétrons e íons hidrogênio ao ácido pirúvico ou a um derivado para formar um produto final da fermentação. **(b)** Produtos finais de várias fermentações microbianas.



(b)

Tabela 5.5 Respiração aeróbia, respiração anaeróbia e fermentação

Processo de produção de energia	Condições de crescimento	Aceptor final de hidrogênio (elétrons)	Tipo de fosforilação utilizada para gerar ATP	Moléculas de ATP produzidas por molécula de glicose
Respiração aeróbia	Aeróbio	Oxigênio molecular (O_2)	A nível de substrato e oxidativa	36 (eucariotos) 38 (procariotos)
Respiração anaeróbia	Anaeróbio	Geralmente uma substância inorgânica (como NO_3^- , SO_4^{2-} ou CO_3^{2-}), mas não o oxigênio molecular (O_2)	A nível de substrato e oxidativa	Variável (menos de 38, porém mais de 2)
Fermentação	Aerobiose ou anaerobiose	Uma molécula orgânica	A nível de substrato	2



Fatores físicos e químicos no crescimento de microrganismos

fatores físicos

temperatura

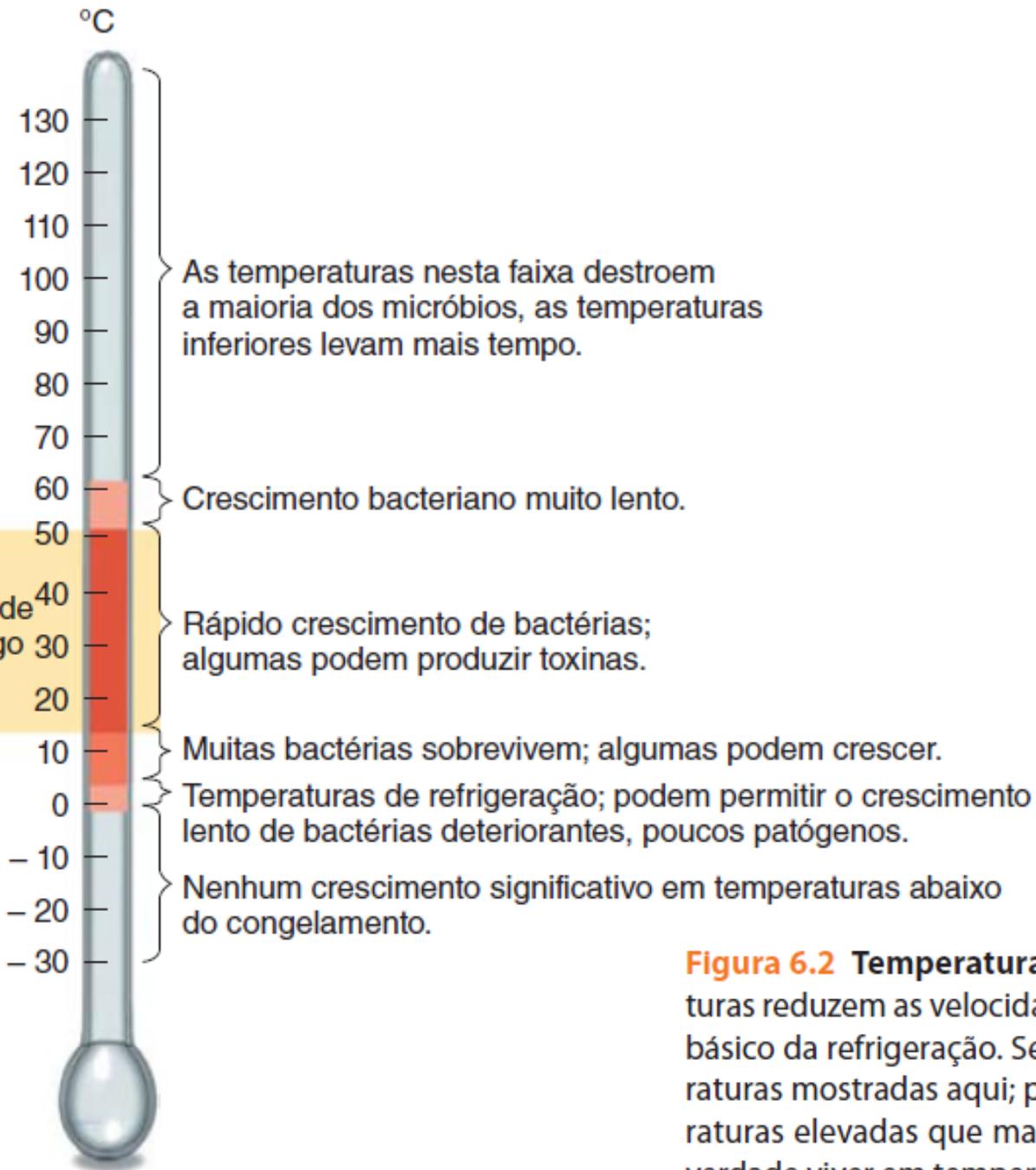


Figura 6.2 Temperaturas de preservação de alimentos. As baixas temperaturas reduzem as velocidades de reprodução microbiana, sendo esse o princípio básico da refrigeração. Sempre há alguma exceção para as respostas às temperaturas mostradas aqui; por exemplo, certas bactérias crescem bem em temperaturas elevadas que matariam a maioria das bactérias, e algumas podem, na verdade viver em temperaturas bem abaixo do nível de congelamento.



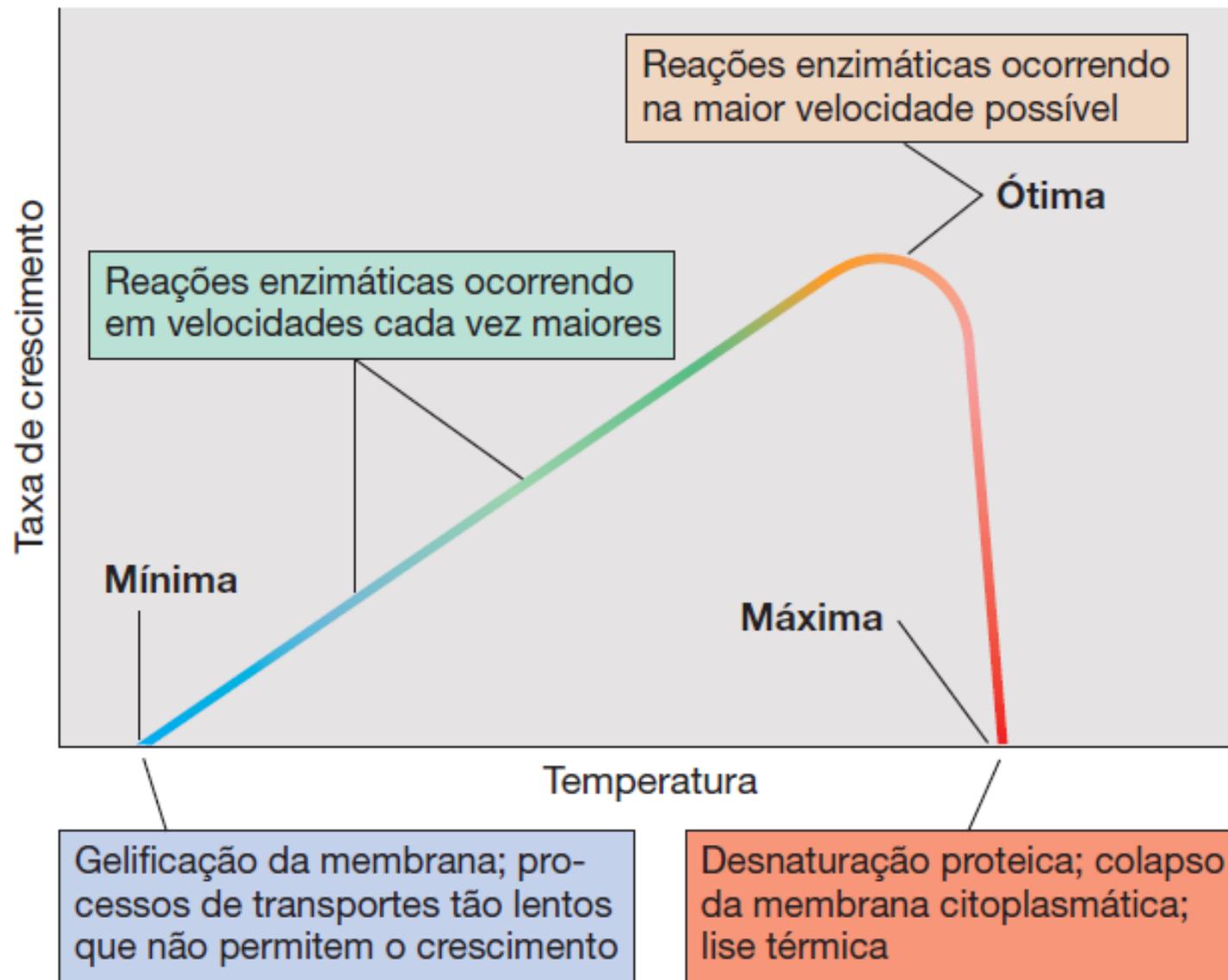


Figura 5.19 As temperaturas cardiais: mínima, ótima e máxima. Os valores reais podem variar significativamente em diferentes organismos (ver Figura 5.20).

temperatura

fatores físicos

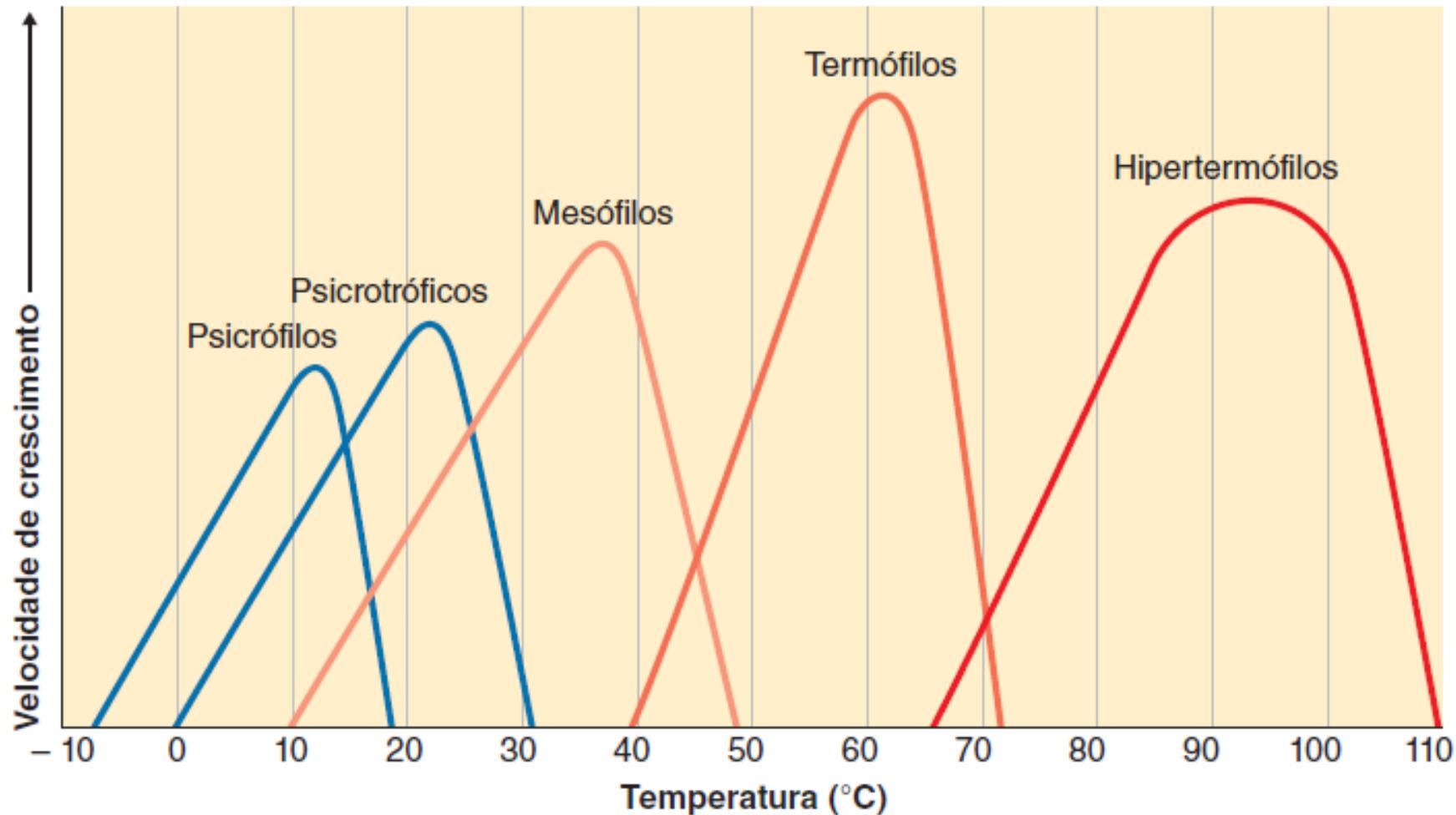


Figura 6.1 Velocidades de crescimento características de diferentes tipos de microrganismos em resposta à temperatura. O pico da curva representa o crescimento ótimo (reprodução mais rápida). Observe que a velocidade de crescimento decresce rápido para temperaturas apenas um pouco acima do ótimo. Nos extremos da faixa de temperatura, a velocidade de reprodução é muito menor que a velocidade na temperatura ótima.



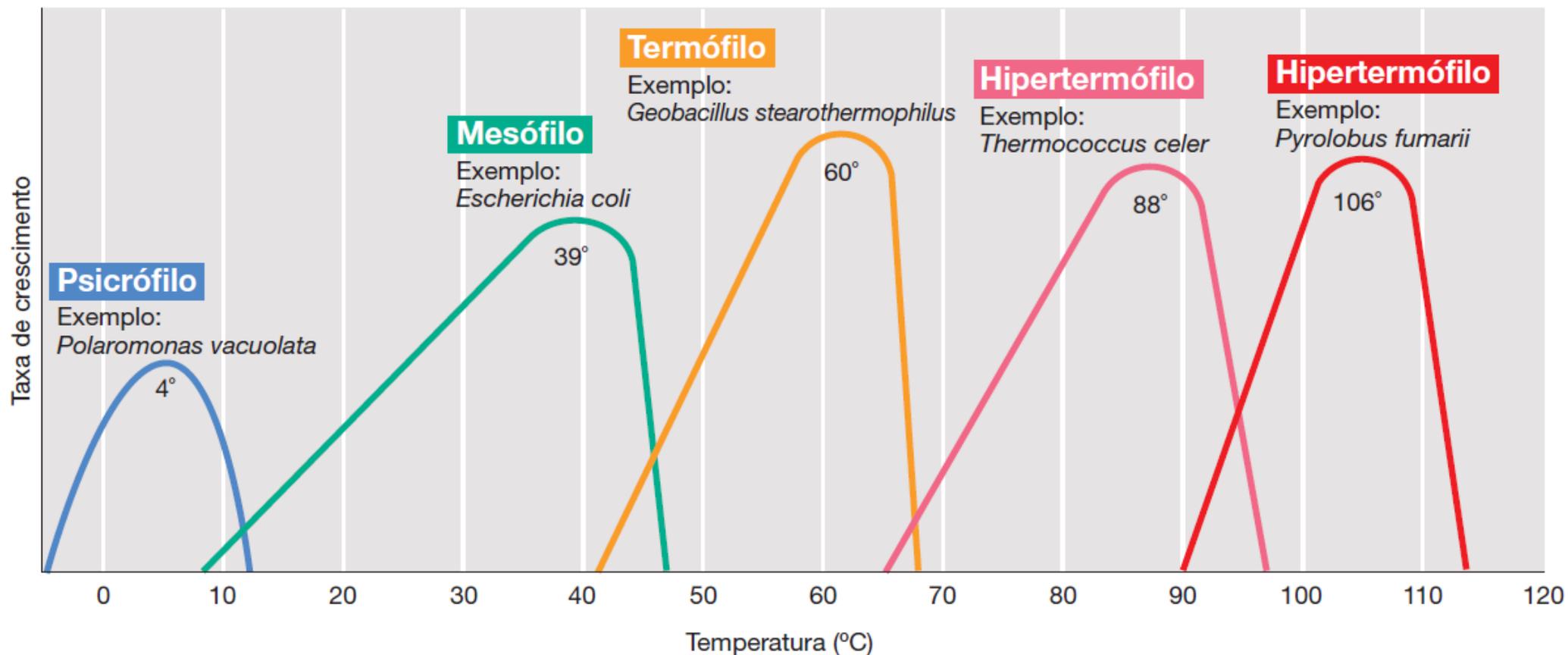


Figura 5.20 Relações entre temperatura e crescimento de microrganismos de diferentes classes térmicas. A temperatura ótima de cada tipo de organismo é apresentada no gráfico.

pH

fatores físicos

- **muitas bactérias crescem em pH 6,5 a 7,5**
- **muitos fungos crescem em pH 5,0**
- há exceções
- **neutrófilos**
- **acidófilos**
- **alcalófilos (ou alcalifílicos)**

Tabela 5.2 Relações dos microrganismos e pH

<i>Classe fisiológica (faixa ótima)</i>	<i>pH aproximado para crescimento ótimo</i>	<i>Exemplo de organismo^a</i>
Neutrófilos (pH > 5,5 e < 8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidófilos (pH < 5,5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alcalifílicos (pH ≥ 8)	8	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
	9	<i>Bacillus firmus</i>
	10	<i>Natronobacterium gregoryi</i>

^a*Picrophilus* e *Natronobacterium* são do domínio *Archaea*; todos os outros são do domínio *Bacteria*.

pressão osmótica

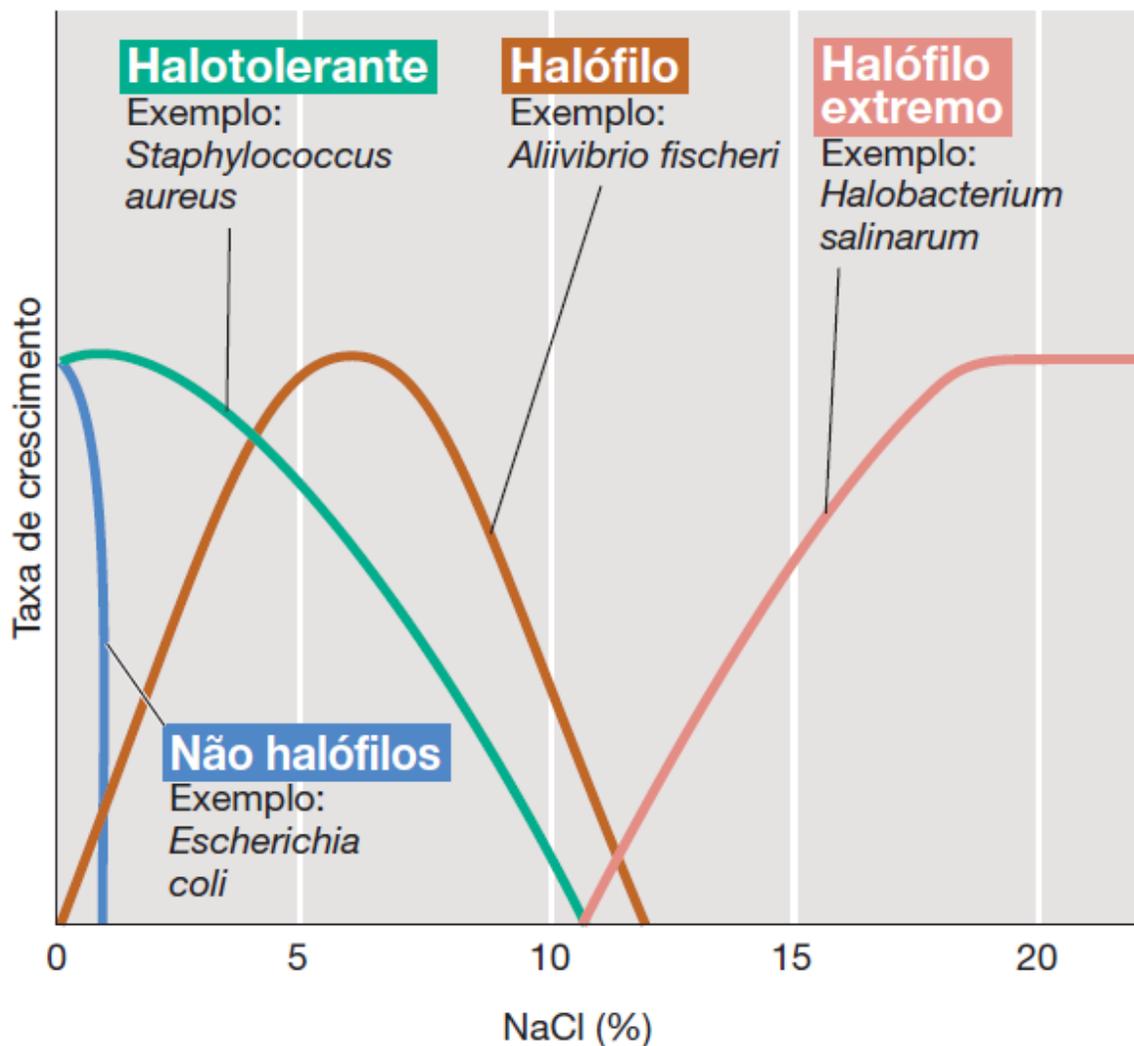


Figura 5.26 Efeito da concentração de NaCl no crescimento de microrganismos com diferentes tolerâncias ou necessidades de sal. A concentração de NaCl ótima para microrganismos marinhos, como *Aliivibrio fischeri*, é de cerca de 3%; para halófilos extremos, é entre 15 e 30%, dependendo do organismo.

osmófilos

crecem em ambientes ricos em açúcares

xerófilos

crecem em ambientes com baixa disponibilidade de água

cultivo de microrganismos

- aplicações do conhecimento
- fatores físicos (**temperatura, pH e pressão osmótica**)

temperatura e pH influenciam fortemente a ação de enzimas e o metabolismo microbiano

pressão osmótica influencia a movimentação de água, nutrientes e outras moléculas para o interior/exterior da célula

nutrientes

fatores químicos

- **macronutrientes**
- **micronutrientes e elementos-traço**
- **fatores de crescimento**

macronutrientes

fatores químicos

carbono

- presente em todos compostos orgânicos
- metade peso seco células
- absorvido de compostos orgânicos (heterotróficos) ou CO_2 (autotróficos)

macronutrientes

fatores químicos

nitrogênio, enxofre e fósforo

- proteínas (N e S)
- ATP e fosfolipídeos
- DNA e RNA (N e P)

nitrogênio, enxofre e fósforo

- absorção N: proteínas, amônio (NH_4^+), amônia (NH_3), nitratos (NO_3^-) ou N_2 (nitrogênio gasoso)
- absorção S: alguns aminoácidos e sulfato (SO_4^-)
- absorção P: fosfato (PO_4^{3-})

macronutrientes

fatores químicos

cálcio, magnésio e potássio

- cofatores para reações enzimáticas

micronutrientes

- cofatores enzimáticos
- Fe, Cu, Zn, Mo e outros

nutrientes

fatores químicos

- macronutrientes
- micronutrientes e elementos-traço
- **fatores de crescimento**

compostos orgânicos essenciais não sintetizados pelos microrganismos

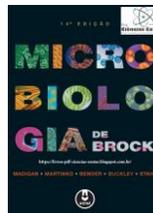
exemplos: vitaminas e alguns aminoácidos

Tabela 3.1 Micronutrientes requeridos pelos microrganismos^a

I. Elementos-traço		II. Fatores de crescimento	
Elemento	Função	Fator de crescimento	Função
Boro (B)	Autoindutor de <i>quorum sensing</i> (comunicação célula-célula) em bactérias; também encontrado em alguns antibióticos policetídeos	PABA (ácido <i>p</i> -aminobenzoico)	Precursor do ácido fólico
Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ ; transcaboxilase (apenas em bactérias do ácido propiônico)	Ácido fólico	Metabolismo de um carbono; transferência de grupos metil
Cobre (Cu)	Na respiração, citocromo <i>c</i> oxidase; na fotossíntese, plastocianina, presente em alguns superóxido dismutases	Biotina	Biossíntese de ácidos graxos; algumas reações de fixação de CO ₂
Ferro (Fe) ^b	Citocromos; catalases; peroxidases; proteínas de ferro e enxofre; oxigenases; todas as nitrogenases	B ₁₂ (Cobalamina)	Metabolismo de um carbono; síntese de desoxirribose
Manganês (Mn)	Ativador de muitas enzimas; componente de algumas superóxido dismutases e da enzima que quebra a molécula de água em fototrófos oxigênicos (fotossistema II)	B ₁ (Tiamina)	Reações de descarboxilação
Molibdênio (Mo)	Certas enzimas contendo flavina; algumas nitrogenases, nitrato redutases, sulfito oxidases, DMSO-TMAO redutases; algumas formato-desidrogenases	B ₆ (Piridoxal)	Transformações de aminoácidos e cetoácidos
Níquel (Ni)	Maioria das hidrogenases; coenzima F ₄₃₀ dos metanógenos; monóxido de carbono desidrogenase; urease	Ácido nicotínico (Niacina)	Precursor de NAD ⁺
Selênio (Se)	Formato desidrogenases; algumas hidrogenases; o aminoácido selenocisteína	Riboflavina	Precursor de FMN, FAD
Tungstênio (W)	Algumas formato-desidrogenases; oxotransferases dos hipertermófilos	Ácido pantotênico	Precursor da coenzima A
Vanádio (V)	Vanádio nitrogenase; bromoperoxidase	Ácido lipoico	Descarboxilação de piruvato e α -cetogluturato
Zinco (Zn)	Anidrase carbônica; polimerases de ácido nucleico; muitas proteínas de ligação ao DNA	Vitamina K	Transporte de elétrons

^aNem todos os elementos-traço ou fatores de crescimento são requeridos por todos os organismos.

^bO ferro é normalmente requerido em quantidades maiores do que os outros metais-traço apresentados.



fatores químicos

Tabela 5.2 Vitaminas selecionadas e suas funções coenzimáticas

Vitamina	Função
Vitamina B₁ (tiamina)	Parte da coenzima cocarboxilase; tem muitas funções, incluindo o metabolismo do ácido pirúvico
Vitamina B₂ (riboflavina)	Coenzima em flavoproteínas; ativa na transferência de elétrons
Niacina (ácido nicotínico)	Parte da molécula de NAD*; ativa na transferência de elétrons
Vitamina B₆ (piridoxina)	Coenzima no metabolismo de aminoácidos
Vitamina B₁₂ (cianocobalamina)	Coenzima (metil-cianocobalamina) envolvida na transferência de grupos metil; ativa no metabolismo de aminoácidos
Ácido pantotênico	Parte da molécula da coenzima A; envolvida no metabolismo do ácido pirúvico e dos lipídeos
Biotina	Envolvida nas reações de fixação do dióxido de carbono e na síntese de ácidos graxos
Ácido fólico	Coenzima utilizada na síntese de purinas e pirimidinas
Vitamina E	Necessária para a síntese celular e macromolecular
Vitamina K	Coenzima utilizada no transporte de elétrons

*NAD, nicotinamida adenina dinucleotídeo.



oxigênio

- aeróbios vs. anaeróbios
- formas tóxicas de O_2

formas tóxicas	representação	agente neutralizante
radical superóxido (ânion superóxido)	O_2^-	superóxido dismutase
ânion peróxido	O_2^{2-}	catalase peroxidase
ozônio	O_3	-
radical hidroxila	OH^-	-

oxigênio

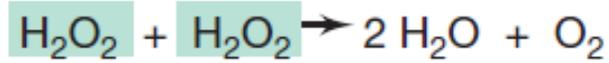
Reagentes	Produtos
$O_2 + e^- \rightarrow$	O_2^- (superóxido)
$O_2^- + e^- + 2 H^+ \rightarrow$	H_2O_2 (peróxido de hidrogênio)
$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow$	$H_2O + OH^\bullet$ (radical hidroxila)
$OH^\bullet + e^- + H^+ \rightarrow$	H_2O (água)

Resultado:

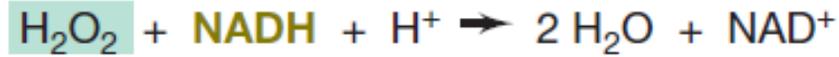


Figura 5.29 Redução de quatro elétrons de O_2 a H_2O pela adição sequencial de elétrons. Todos os intermediários formados são reativos e tóxicos às células; exceto a água.

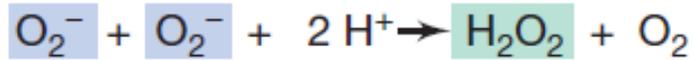
fatores químicos



(a) Catalase



(b) Peroxidase



(c) Superóxido dismutase



(d) Superóxido dismutase/catalase em conjunto



(e) Superóxido redutase

Figura 5.30 Enzimas que destroem espécies tóxicas de oxigênio.

(a) Catalases e (b) peroxidases são proteínas contendo porfirina, embora algumas flavoproteínas possam também consumir espécies tóxicas de oxigênio.

(c) As superóxido dismutases são proteínas contendo metal, como, por exemplo, cobre e zinco, manganês ou ferro.

(d) Reação combinada de superóxido dismutase e catalase. (e) A superóxido redutase catalisa a redução de um elétron de O_2^- a H_2O_2 .

Tabela 5.5 Relações dos microrganismos com o oxigênio

Grupo	Relação com O₂	Tipo de metabolismo	Exemplo^a	Hábitat^b
Aeróbios				
Obrigatórios	Exigido	Respiração aeróbia	<i>Micrococcus luteus</i> (B)	Pele, poeira
Facultativos	Não exigido, mas com melhor crescimento em O ₂	Respiração aeróbia, respiração anaeróbia, fermentação	<i>Escherichia coli</i> (B)	Intestino grosso de mamíferos
Microaerófilos	Exigido, mas em níveis inferiores aos atmosféricos	Respiração aeróbia	<i>Spirillum volutans</i> (B)	Água de lagos
Anaeróbios				
Aerotolerantes	Não exigido, sem melhor crescimento na presença de O ₂	Fermentação	<i>Streptococcus pyogenes</i> (B)	Trato superior
Obrigatórios	Nocivo ou letal	Fermentação ou respiração anaeróbia	<i>Methanobacterium formicicum</i> (A)	Lodo de esgoto, sedimentos de lagos anóxicos

^aAs letras entre parênteses indicam o *status* filogenético (B, *Bacteria*; A, *Archaea*). São conhecidos representantes de cada domínio de procariotos em todas as categorias. A maioria dos eucariotos é aeróbia obrigatória, embora sejam conhecidos aeróbios facultativos (p. ex., leveduras) e anaeróbios obrigatórios (p. ex., certos protozoários e fungos).

^bSão listados os habitats típicos de cada exemplo de organismo; muitos outros poderiam ser listados.

Tabela 6.1 O efeito do oxigênio no crescimento de vários tipos de bactérias

	a. Aeróbios obrigatórios	b. Anaeróbios facultativos	c. Anaeróbios obrigatórios	d. Anaeróbios aerotolerantes	e. Microaerófilos
Efeito do oxigênio no crescimento	Somente crescimento aeróbio; o oxigênio é requerido.	Crescimento aeróbio e anaeróbio; crescimento maior na presença de oxigênio.	Apenas crescimento anaeróbio; o crescimento cessa na presença de oxigênio.	Apenas crescimento anaeróbio; o crescimento continua na presença de oxigênio.	Crescimento somente aeróbio; oxigênio requerido em baixa concentração.
Crescimento bacteriano em tubo com meio de cultura sólido					
Explicações para os padrões de crescimento	Crescimento somente onde altas concentrações de oxigênio estão difundidas no meio.	Crescimento ocorre preferencialmente onde mais oxigênio está presente, embora possa ocorrer em toda extensão do tubo.	Crescimento somente onde não há oxigênio.	Crescimento homogêneo ao longo da extensão do tubo; o oxigênio não tem efeito.	Crescimento onde há uma baixa concentração de oxigênio difundido no meio.
Explicações para os efeitos do oxigênio	A presença das enzimas catalase e superóxido dismutase (SOD) permite que as formas tóxicas do oxigênio sejam neutralizadas; pode utilizar oxigênio.	A presença das enzimas catalase e SOD permite que as formas tóxicas do oxigênio sejam neutralizadas; pode utilizar oxigênio.	Ausência das enzimas que neutralizam as formas tóxicas do oxigênio; não tolera oxigênio.	A presença de uma enzima, SOD, permite que as formas tóxicas do oxigênio sejam parcialmente neutralizadas; tolera oxigênio.	Produção de quantidades letais de formas tóxicas do oxigênio se expostos ao oxigênio atmosférico normal.

fatores químicos

- **macronutrientes**

C, N, P, S, H, Na, Ca, Mg, Cl, K

- **micronutrientes e elementos-traço**

Fe, Mn, Co, Cu, Zn, Mo, Ni

- **fatores de crescimento**

- **oxigênio**

- **água**

meios de cultura

cultivo de microrganismos

físicos

temperatura

pH

pressão osmótica

químicos

nutrientes

oxigênio

água

cultivo de microrganismos

físicos

temperatura

pH

pressão osmótica

químicos

nutrientes

oxigênio

água

meio de cultura

preparado de nutrientes para o crescimento de microrganismos em laboratório

Tabela 6.5 Meio de cultura

Tipo	Finalidade
Quimicamente definido	Crescimento de quimioautotróficos e fotoautotróficos; ensaios microbiológicos.
Complexo	Crescimento da maioria dos organismos quimio-heterotróficos.
Redutor	Crescimento de anaeróbios obrigatórios.
Seletivo	Supressão de microrganismos indesejados; favorecimento dos microrganismos de interesse.
Diferencial	Diferenciação das colônias dos microrganismos de interesse em relação aos outros.
Enriquecimento	Similar ao meio seletivo, mas elaborado para aumentar o número de microrganismos de interesse até níveis detectáveis.

tipos de meio de cultura

- **sólido ou líquido**
- **complexo ou quimicamente definido**
- **enriquecido**
- **seletivo**
- **diferencial**



Tabela 6.3 Meio de cultura definido para *Leuconostoc mesenteroides*

Carbono e energia
Glicose, 25 g
Sais
NH ₄ Cl, 3 g
K ₂ HPO ₄ *, 0,6 g
KH ₂ PO ₄ *, 0,6 g
MgSO ₄ , 0,1 g
Aminoácidos, 100 a 200 µg cada
Alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina
Purinas e pirimidinas, 10 mg de cada
Adenina, guanina, uracila, xantina
Vitaminas, 0,01 a 1 mg cada
Ácido nicotínico, ácido <i>p</i> -aminobenzoico, biotina, folato, pantotenato, piridoxal, piridoxamina, piridoxina, riboflavina, tiamina
Elementos Traços, 2 a 10 µg cada
Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo
Tampão, pH 7
Acetato de sódio, 25 g
Água destilada, 1.000 ml

*Também serve como tampão

Tabela 6.2 Meio quimicamente definido para o crescimento de um quimio-heterotrófico típico, como *Escherichia coli*

Componentes	Quantidades
Glicose	5 g
Fosfato de amônio, monobásico (NH ₄ H ₂ PO ₄)	1 g
Cloreto de sódio (NaCl)	5 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,2 g
Fosfato de potássio, dibásico (K ₂ HPO ₄)	1 g
Água	1 litro

Tabela 6.4 Composição do ágar nutriente, meio complexo para o crescimento de bactérias heterotróficas

Componentes	Quantidades
Peptona (proteína parcialmente digerida)	5 g
Extrato de carne	3 g
Cloreto de sódio	8 g
Ágar	15 g
Água	1 litro

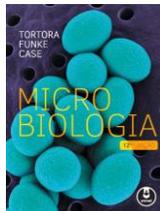
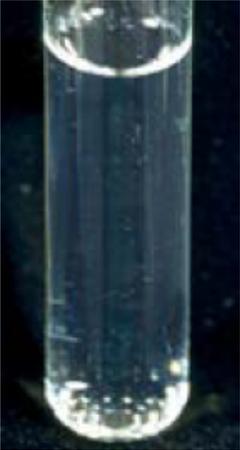


Tabela 3.2 Exemplos de meios de cultura para microrganismos com requerimentos nutricionais simples e exigentes^a

Meio de cultura definido para <i>Escherichia coli</i>	Meio de cultura definido para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Meio de cultura complexo para <i>E. coli</i> ou <i>L. mesenteroides</i>	Meio de cultura definido para <i>Thiobacillus thioeparus</i>
<p>K_2HPO_4 7 g KH_2PO_4 2 g $(NH_4)_2SO_4$ 1 g $MgSO_4$ 0,1 g $CaCl_2$ 0,02 g Glicose 4–10 g Elementos-traço (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2–10 μg cada Água destilada 1.000 mL pH 7</p>  <p>(a)</p>	<p>K_2HPO_4 0,6 g KH_2PO_4 0,6 g NH_4Cl 3 g $MgSO_4$ 0,1 g Glicose 25 g Acetato de sódio 25 g Aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina) 100–200 μg cada Purinas e pirimidinas (adenina, guanina, uracila, xantina) 10 mg cada Vitaminas (biotina, folato, ácido nicotínico, piridoxal, piridoxamina, piridoxina, riboflavina, tiamina, pantotenato, ácido <i>p</i>-aminobenzoico) 0,01–1 mg cada Elementos-traço (como na primeira coluna) 2–10 μg cada Água destilada 1.000 mL pH 7</p>	<p>Glicose 15 g Extrato de levedura 5 g Peptona 5 g KH_2PO_4 2 g Água destilada 1.000 mL pH 7</p>  <p>(b)</p>	<p>KH_2PO_4 0,5 g NH_4Cl 0,5 g $MgSO_4$ 0,1 g $CaCl_2$ 0,05 g KCl 0,5 g $Na_2S_2O_3$ 2 g Elementos-traço (como na primeira coluna) Água destilada 1.000 mL pH 7 Fonte de carbono: CO_2 do ar</p>

^aAs fotos são tubos do (a) meio definido descrito e do (b) meio complexo descrito. Observe como o meio complexo é colorido devido aos vários extratos orgânicos e restos digestivos que ele contém. Créditos da foto: Cheryl L. Broadie e John Vercillo, Southern Illinois University em Carbondale.

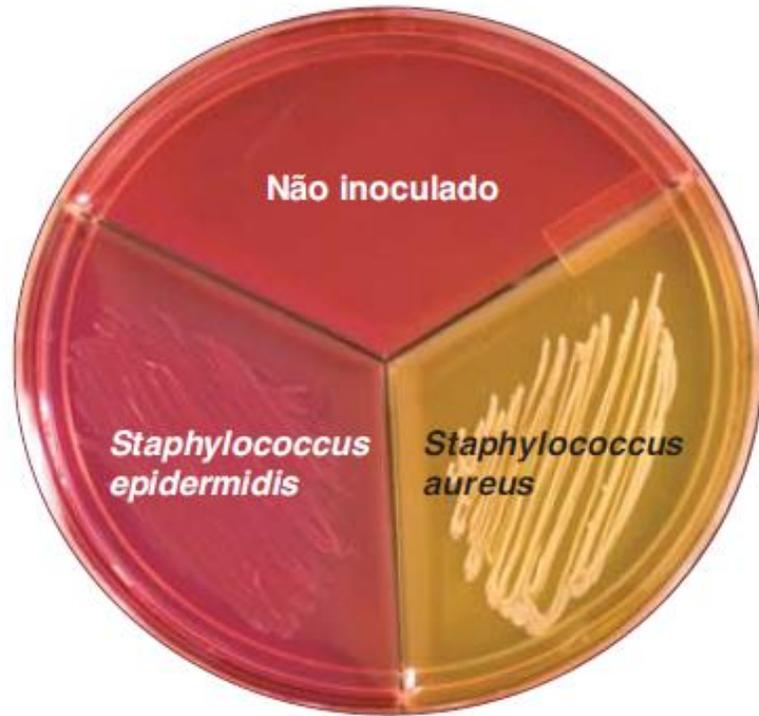


Figura 6.10 Meio diferencial. Este meio é o ágar hipertônico manitol, e as bactérias capazes de fermentar o manitol em ácido (*Staphylococcus aureus*) causam a mudança de coloração do meio para amarelo. Isso **diferencia** entre as bactérias que fermentam o manitol e aquelas que não o fazem. Na verdade, este meio também é **seletivo**, uma vez que a alta concentração de sal impede o crescimento da maioria das bactérias, mas não de *Staphylococcus* sp.

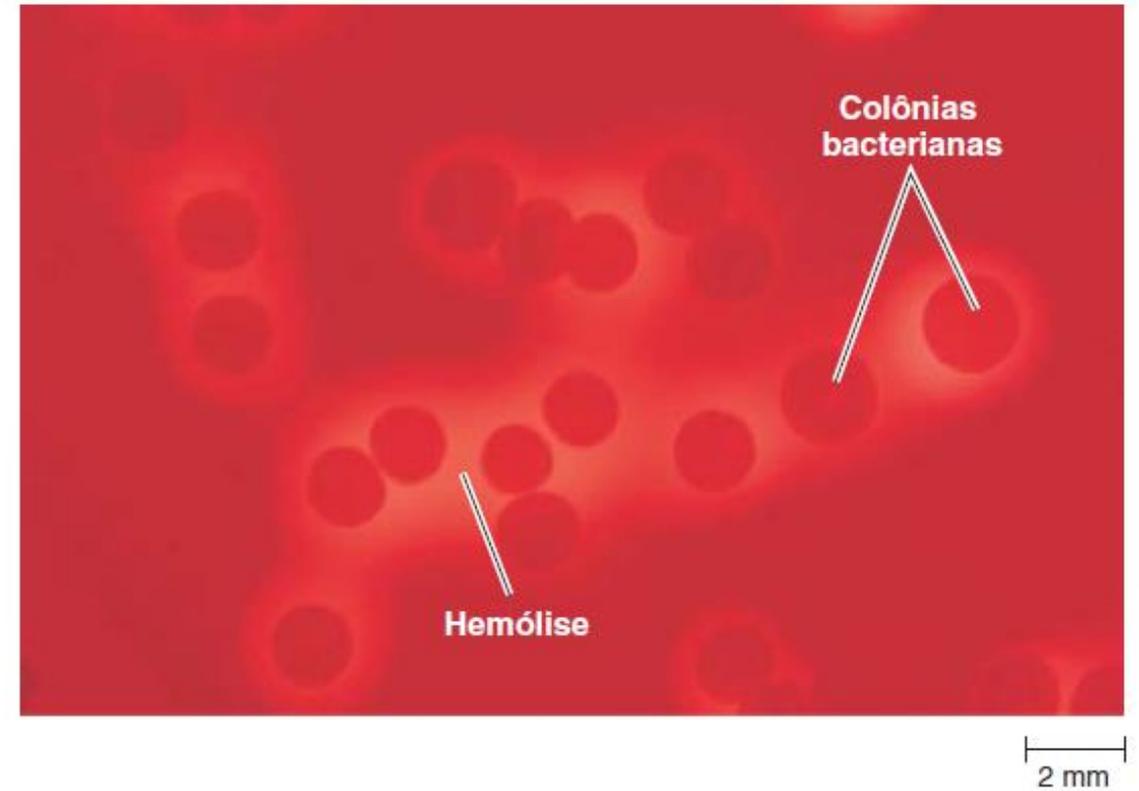


Figura 6.9 Ágar-sangue, meio diferencial contendo hemácias. As bactérias provocaram a lise das hemácias (β -hemólise), produzindo zonas claras ao redor das colônias.



James A. Shapiro, University of Chicago

(a)



James A. Shapiro, University of Chicago

(b)



James A. Shapiro, University of Chicago

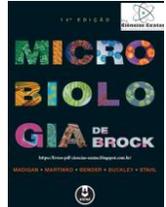
(c)



James A. Shapiro, University of Chicago

(d)

Figura 3.2 Colônias bacterianas. Colônias são massas visíveis de células originadas de sucessivas divisões de uma ou poucas células, podendo conter mais de um bilhão (10^9) de células individuais. (a) *Serratia marcescens*, cultivada em ágar MacConkey. (b) Ampliação das colônias apresentadas em (a). (c) *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em ágar tripticase soja. (d) *Shigella flexneri* cultivada em ágar MacConkey.



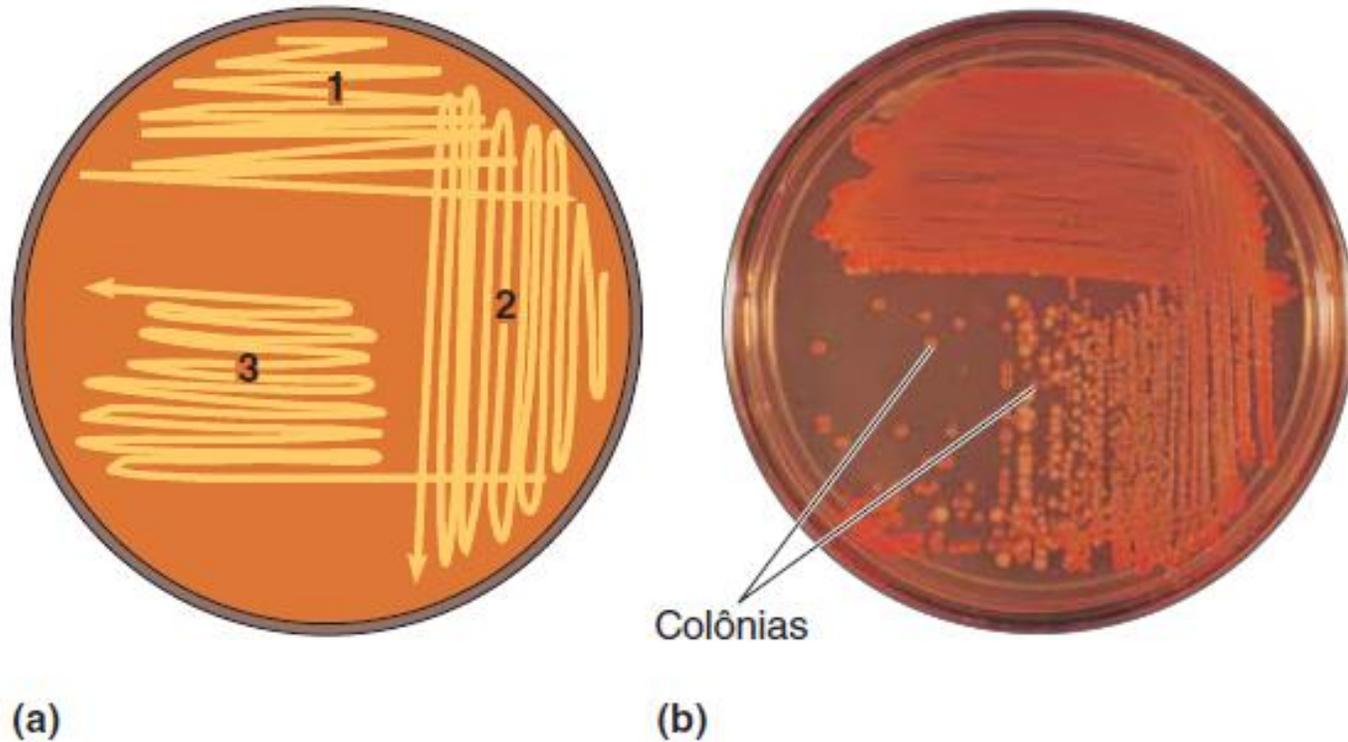
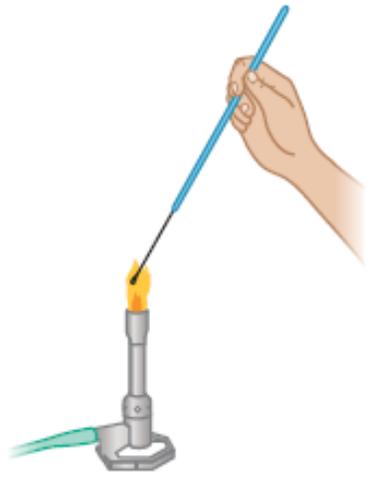
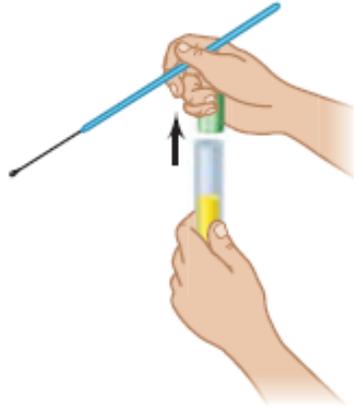


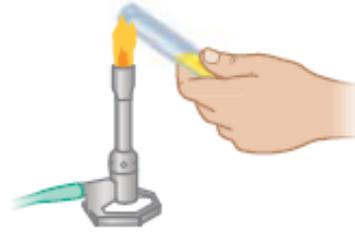
Figura 6.11 Método de esgotamento utilizado para isolar culturas puras de bactérias. (a) As setas indicam a direção do esgotamento. A série de estrias 1 é feita com a cultura bacteriana original. A alça de inoculação é esterilizada após cada série de estrias. Nas séries 2 e 3, a alça retira bactérias da série anterior, reduzindo cada vez mais o número de células. Há inúmeras variações dessa técnica. (b) Na série 3 deste exemplo, observe que foram obtidas colônias de bactérias bem isoladas de dois tipos diferentes, vermelho e amarelo.



A alça é aquecida para esterilização



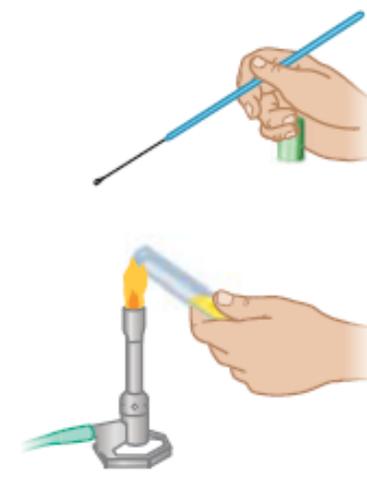
O tubo é destampado



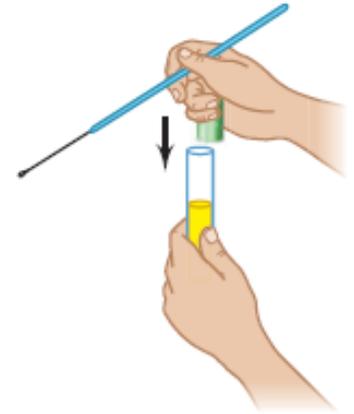
A ponta do tubo é passada pela chama para esterilização



Apenas a porção estéril da alça entra no tubo



O tubo é novamente flambado



O tubo é fechado; a alça é novamente esterilizada

Figura 3.3 Transferência asséptica. Após o tubo ser vedado no final, a alça é novamente esterilizada antes de ser dispensada.

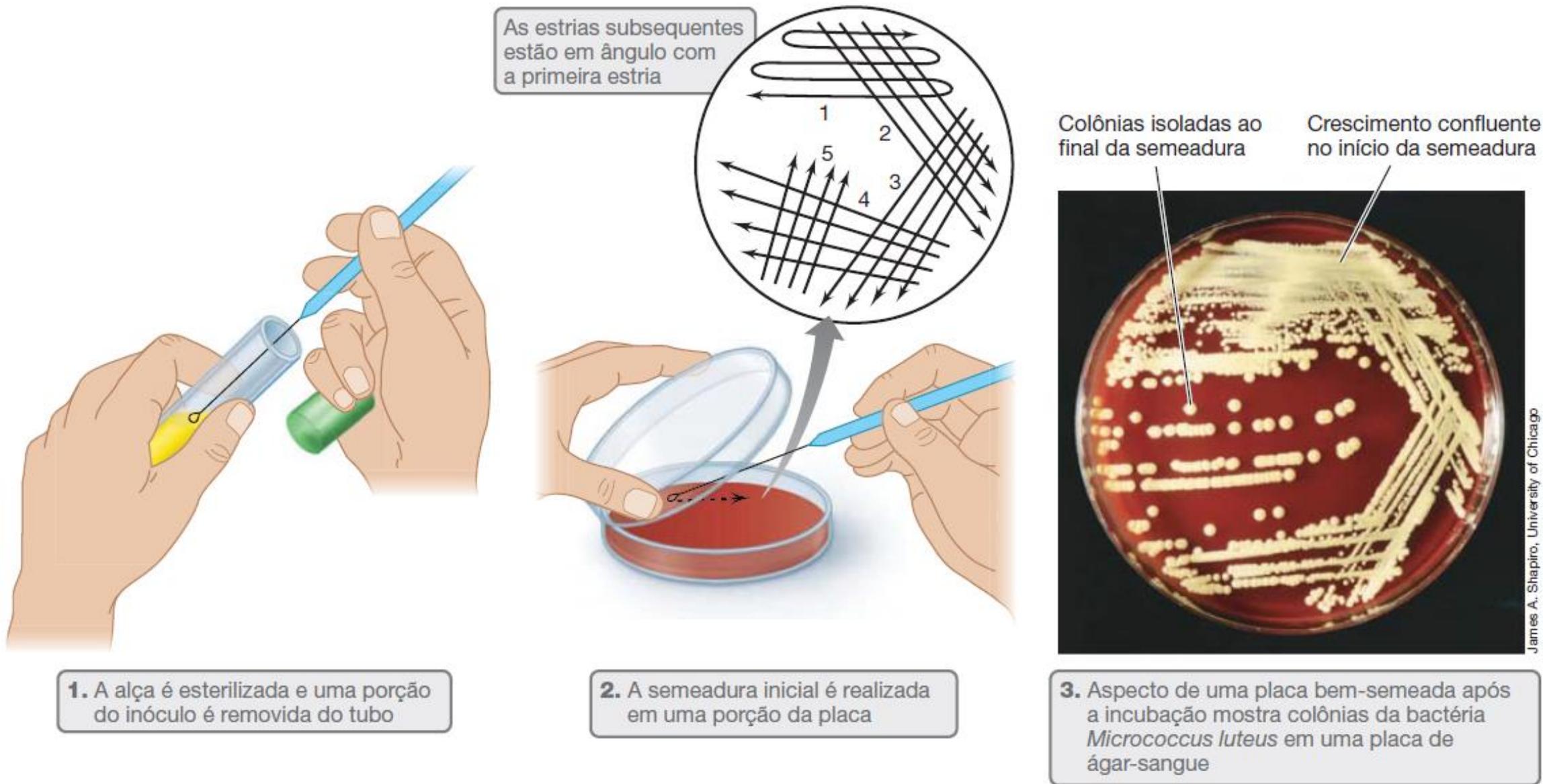
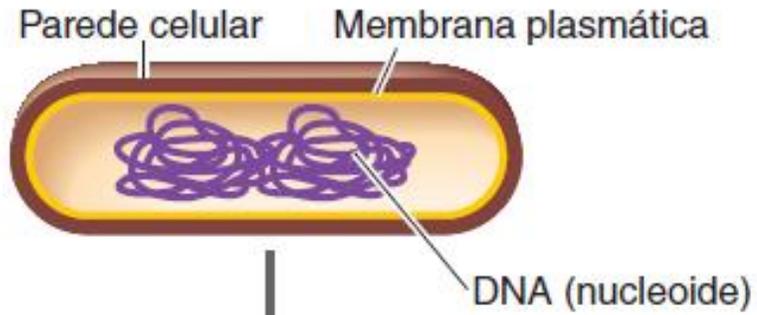


Figura 3.4 Técnica de sementeira por esgotamento, para a obtenção de culturas puras. A cobertura da placa deve ser aberta apenas o suficiente para permitir a manipulação para o estriamento.

quantificando o crescimento de microrganismos

1 A célula se alonga e o DNA é replicado.



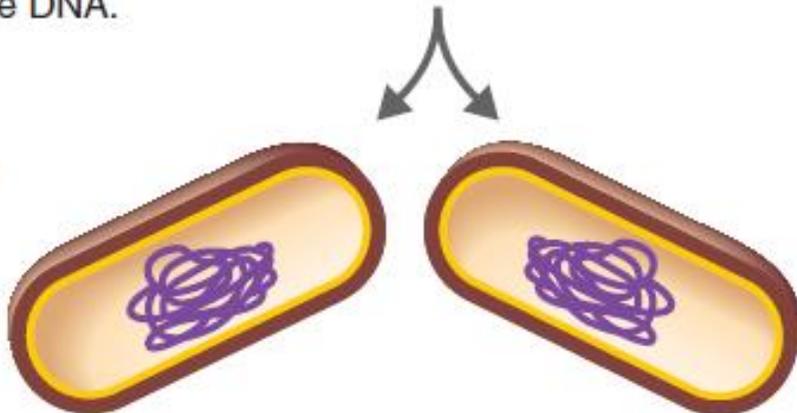
2 A parede celular e a membrana plasmática iniciam a constricção.



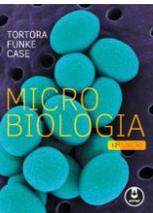
3 Paredes intermediárias se formam, separando completamente as duas cópias de DNA.



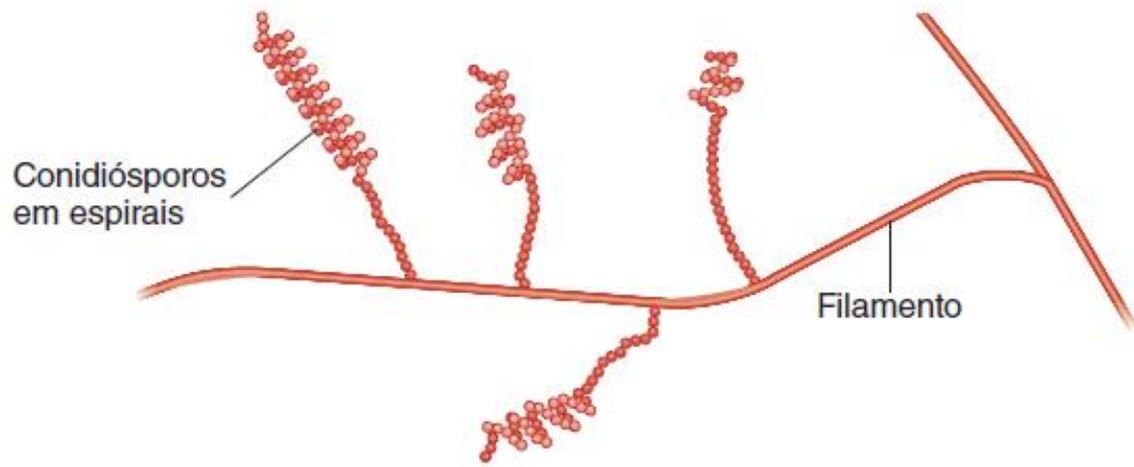
4 As células se separam.



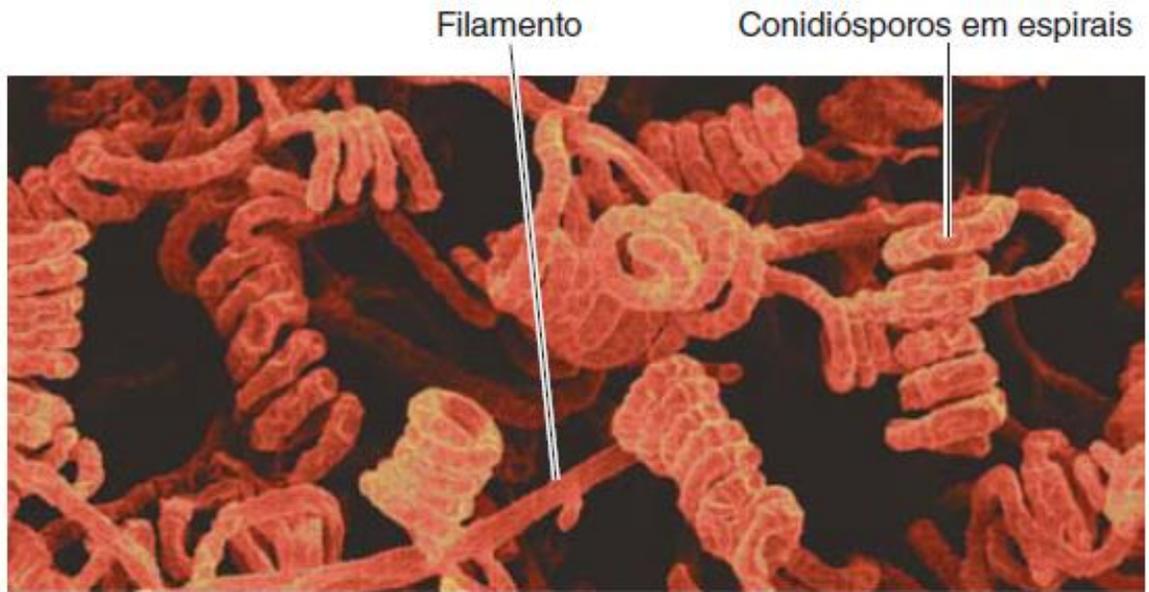
microrganismos crescem em populações



(a) Um diagrama da sequência da divisão celular.



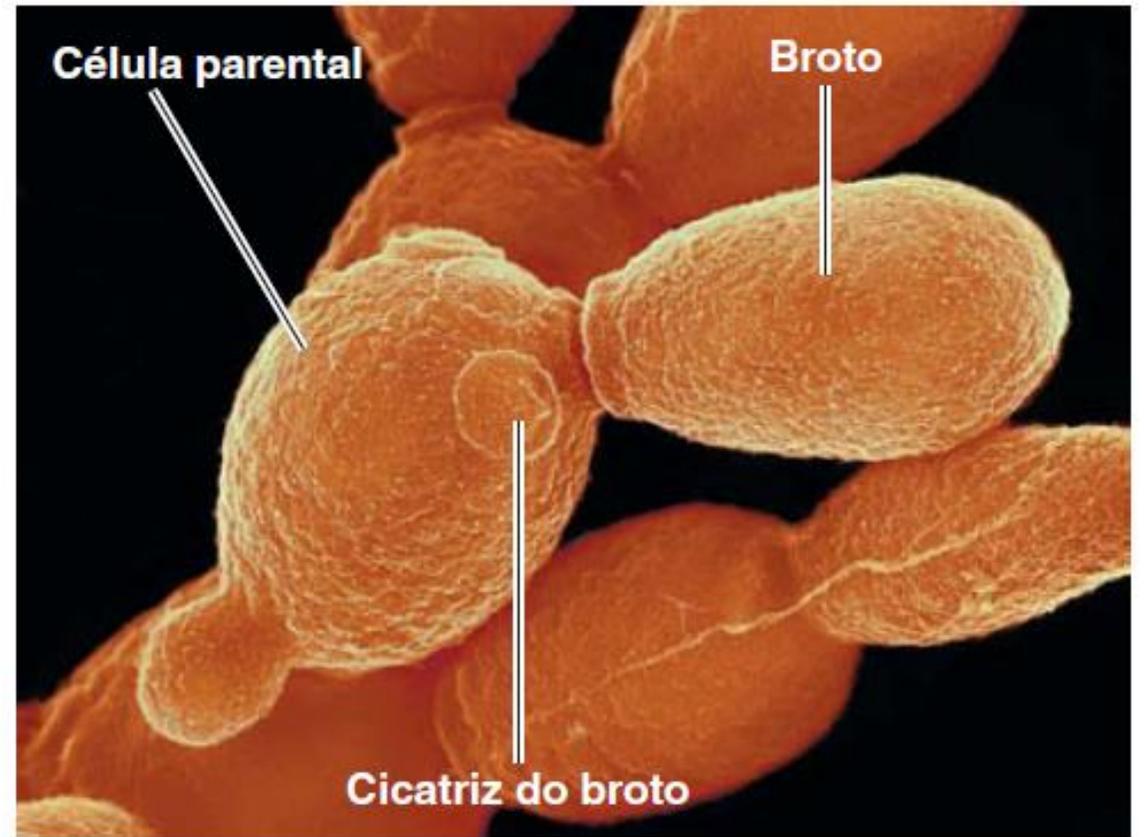
(a) Desenho de um estreptomiceto típico, mostrando o seu crescimento filamentoso e ramificado, com conidiósporos assexuados reprodutivos na ponta dos filamentos.



(b) Espirais de conidiósporos sustentados pelos filamentos do estreptomiceto.

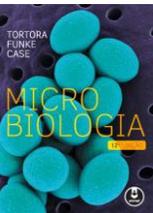
SEM 5 μm

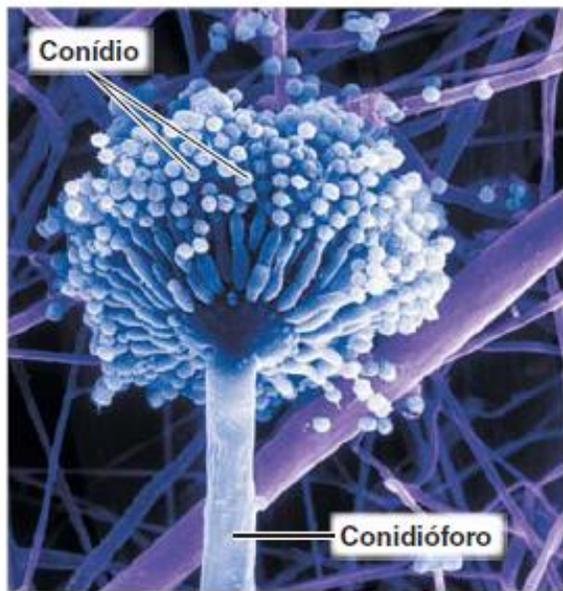
Figura 11.25 *Streptomyces*.



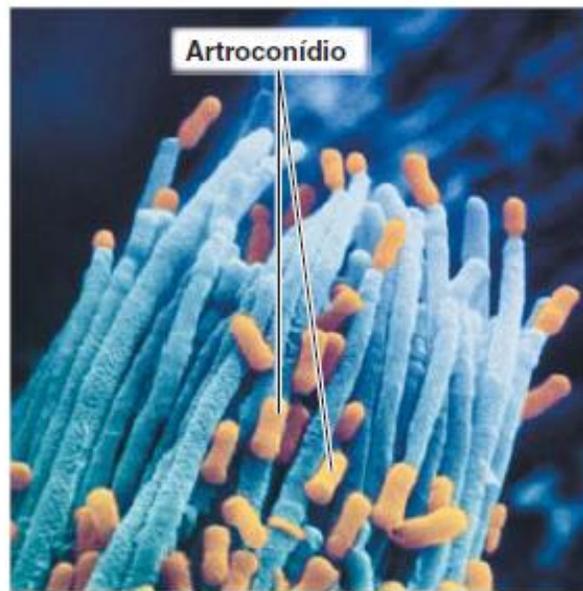
SEM 4 μm

Figura 12.4 Levedura de brotamento. Micrografia de *Saccharomyces cerevisiae* em diversos estágios do brotamento.

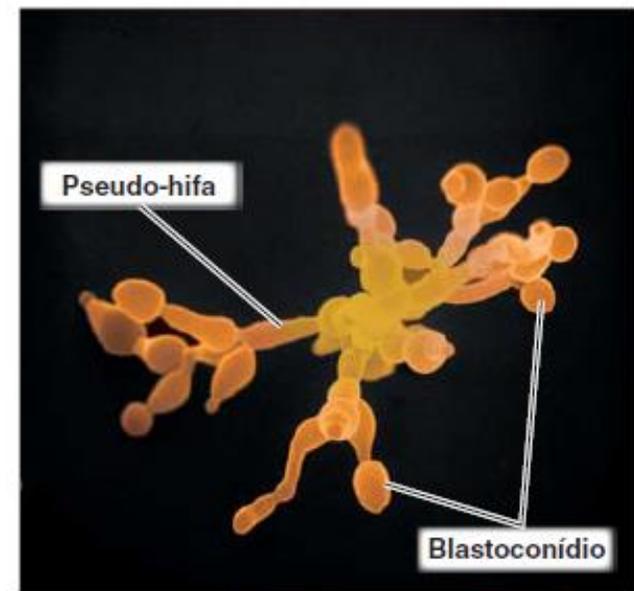




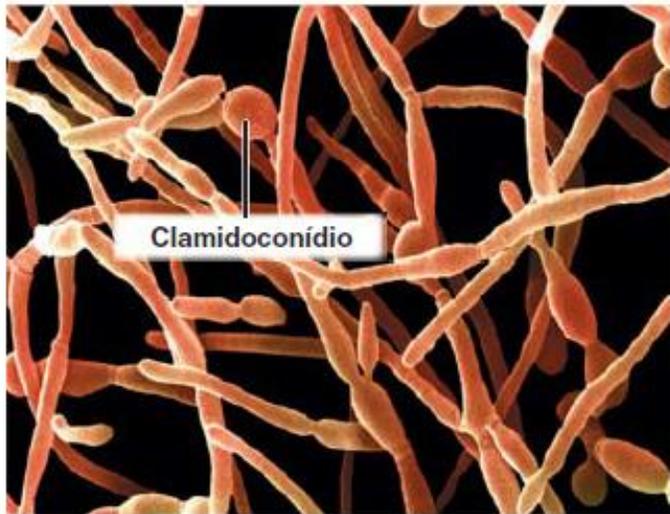
(a) Os conídios estão organizados em cadeias na extremidade de um conidióforo de *Aspergillus niger*. SEM 12 μm



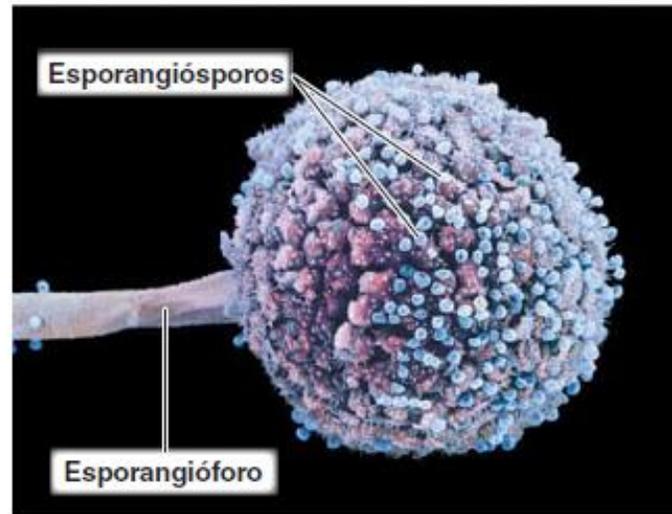
(b) A fragmentação da hifa resulta na formação de arthroconídios em *Ceratocystis ulmi*. SEM 2,5 μm



(c) Os blastoconídios são formados a partir de brotos de uma célula parental de *Candida albicans*. SEM 13 μm



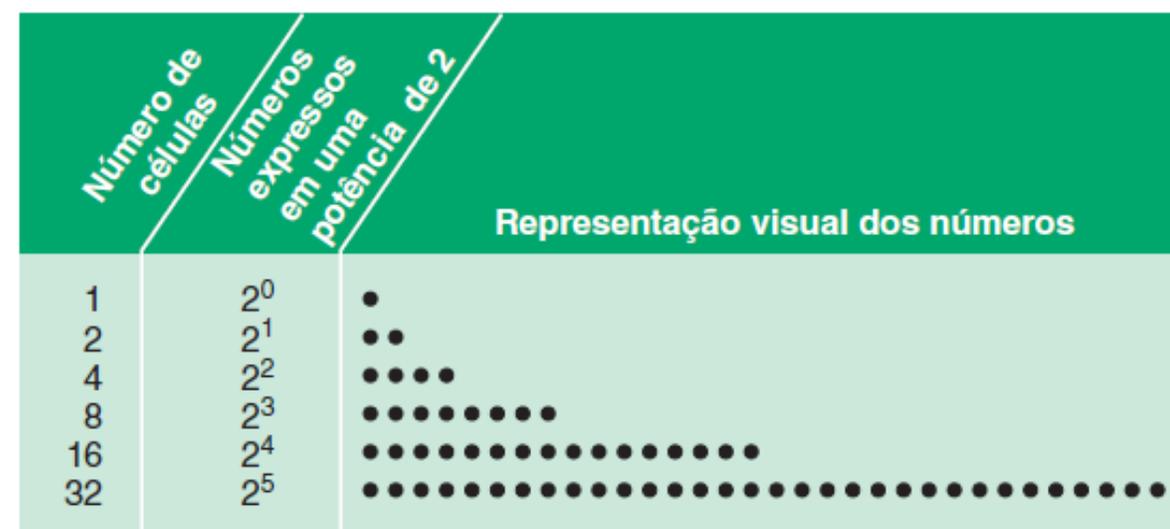
(d) Os clamidoconídios são células de paredes espessas no interior das hifas de *Candida albicans*. SEM 5 μm



(e) Os esporangiosporos são formados no interior do esporângio de *Rhizopus stolonifer*. SEM 5 μm

Figura 12.6 Esporos assexuados característicos.

Número de gerações	Número de células	Log ₁₀ 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



(a) Representação visual do aumento do número de bactérias ao longo de cinco gerações. O número de bactérias dobra em cada geração. O número sobrescrito indica a geração; ou seja, 2⁵ = 5 gerações.

(b) A conversão do número de células em uma população na expressão logarítmica deste número. Para chegar aos números da coluna central, use a função y^x em sua calculadora. Digite 2 na calculadora, pressione y^x ; digite 5; então pressione o sinal de =. A calculadora mostrará o número 32. Portanto, a população de bactérias da quinta geração totalizará 32 células. Para chegar aos números da coluna à direita, utilize a função log da sua calculadora. Digite o número 32; então pressione a função log. A calculadora mostrará, arredondado, que o \log_{10} de 32 é 1,51.

Figura 6.13 Divisão celular.

alguns conceitos importantes
tempo de geração e notações aritmética e logarítmica

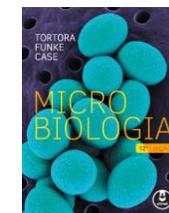
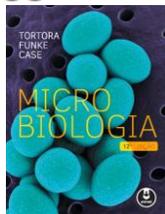
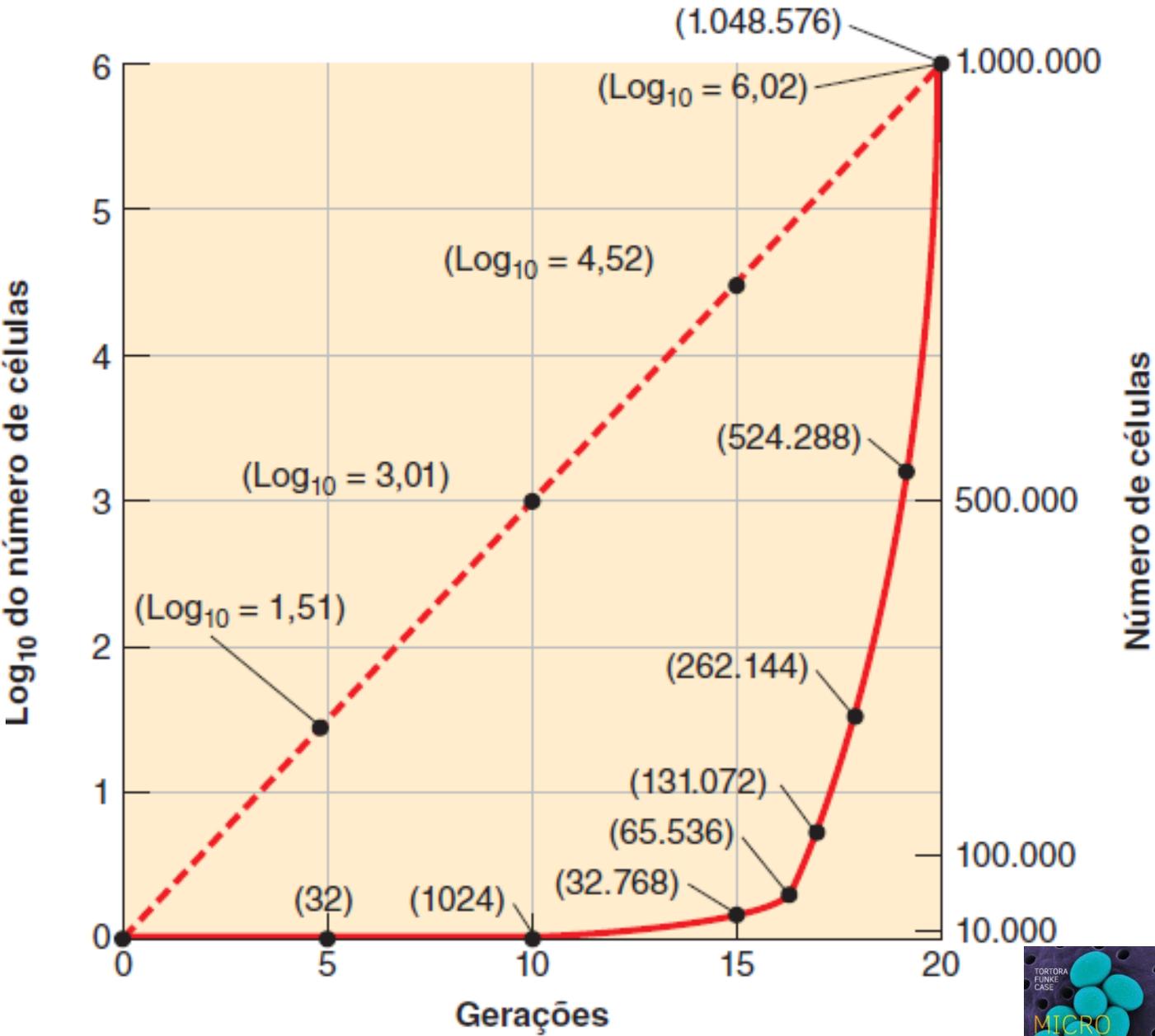
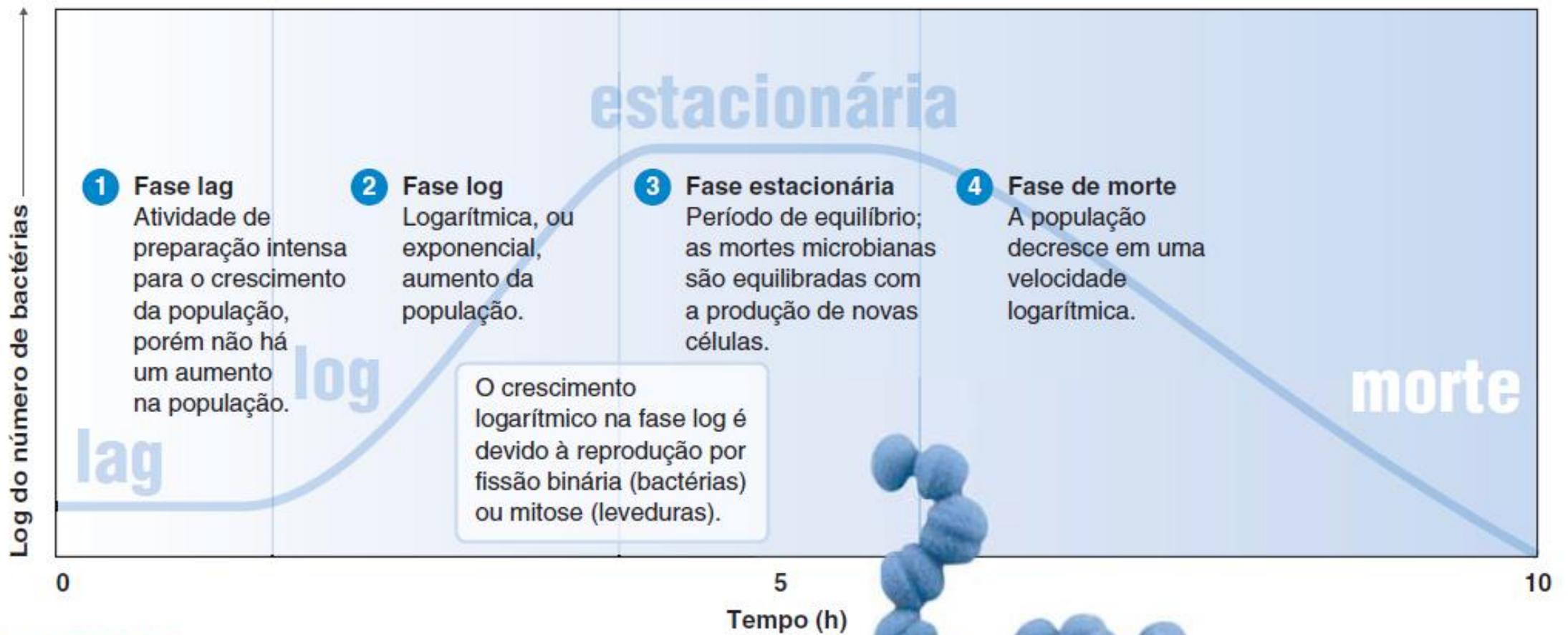


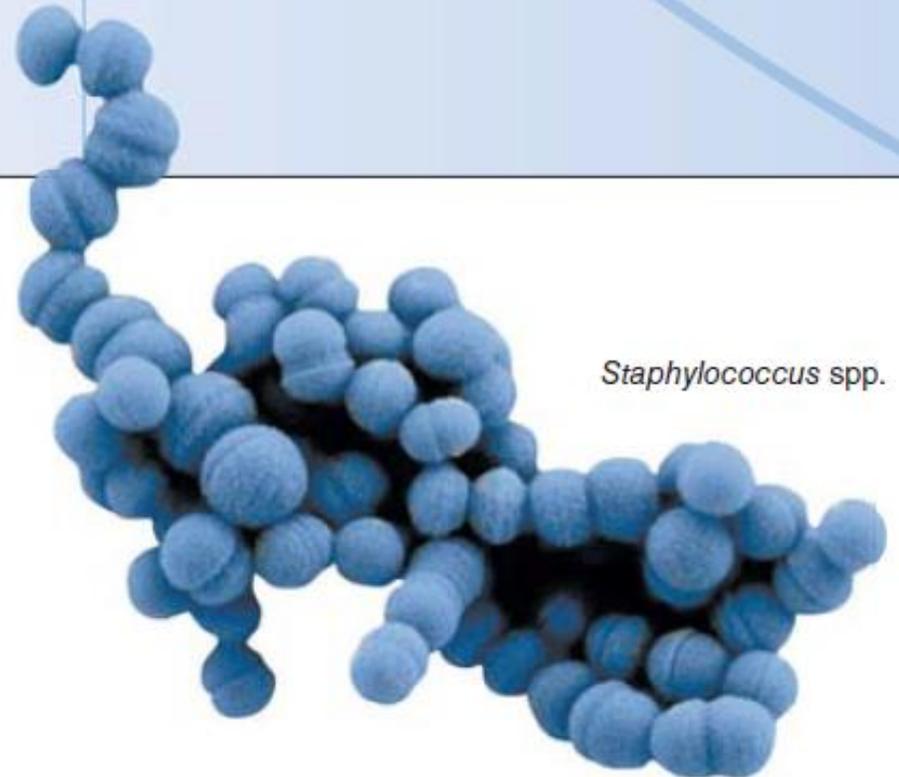
Figura 6.14 Curva de crescimento para uma população crescendo exponencialmente, representada logarítmica (linha pontilhada) e aritmeticamente (linha cheia). Para fins de demonstração, este gráfico foi desenhado de forma que as curvas aritméticas e logarítmicas se cruzassem em 1 milhão de células. Essa figura demonstra por que, em vista do grande número das populações bacterianas, é necessária a mudança gráfica da representação aritmética para a logarítmica. Por exemplo, observe que, até a décima geração, a curva da representação aritmética ainda não se ergueu de maneira perceptível da linha de base, ao passo que a curva logarítmica para a décima geração (3,01) já está no meio do gráfico.





CONCEITOS-CHAVE

- As populações bacterianas seguem uma série sequencial de fases de crescimento: fases lag, log, estacionária e de morte.
- O conhecimento da curva de crescimento bacteriano é crucial para a compreensão da dinâmica e controle das populações no curso de doenças infecciosas, na preservação e na deterioração de alimentos, bem como em processos microbiológicos industriais, como na produção de etanol.



como medir populações de microrganismos?

métodos de contagem **direta**

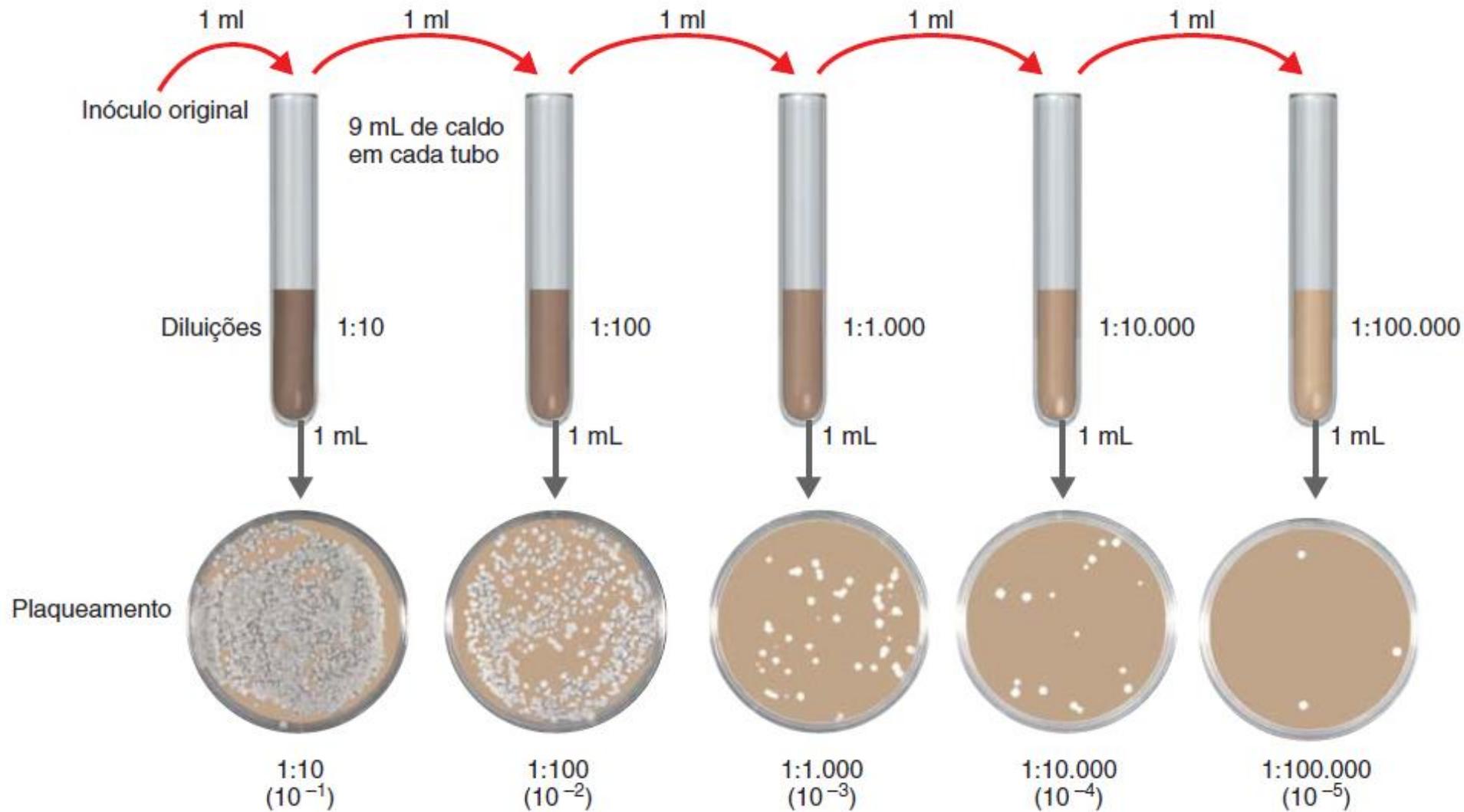
contagem em placas

- diluição seriada
- filtração

número mais provável (NMP)

contagem direta em microscópio



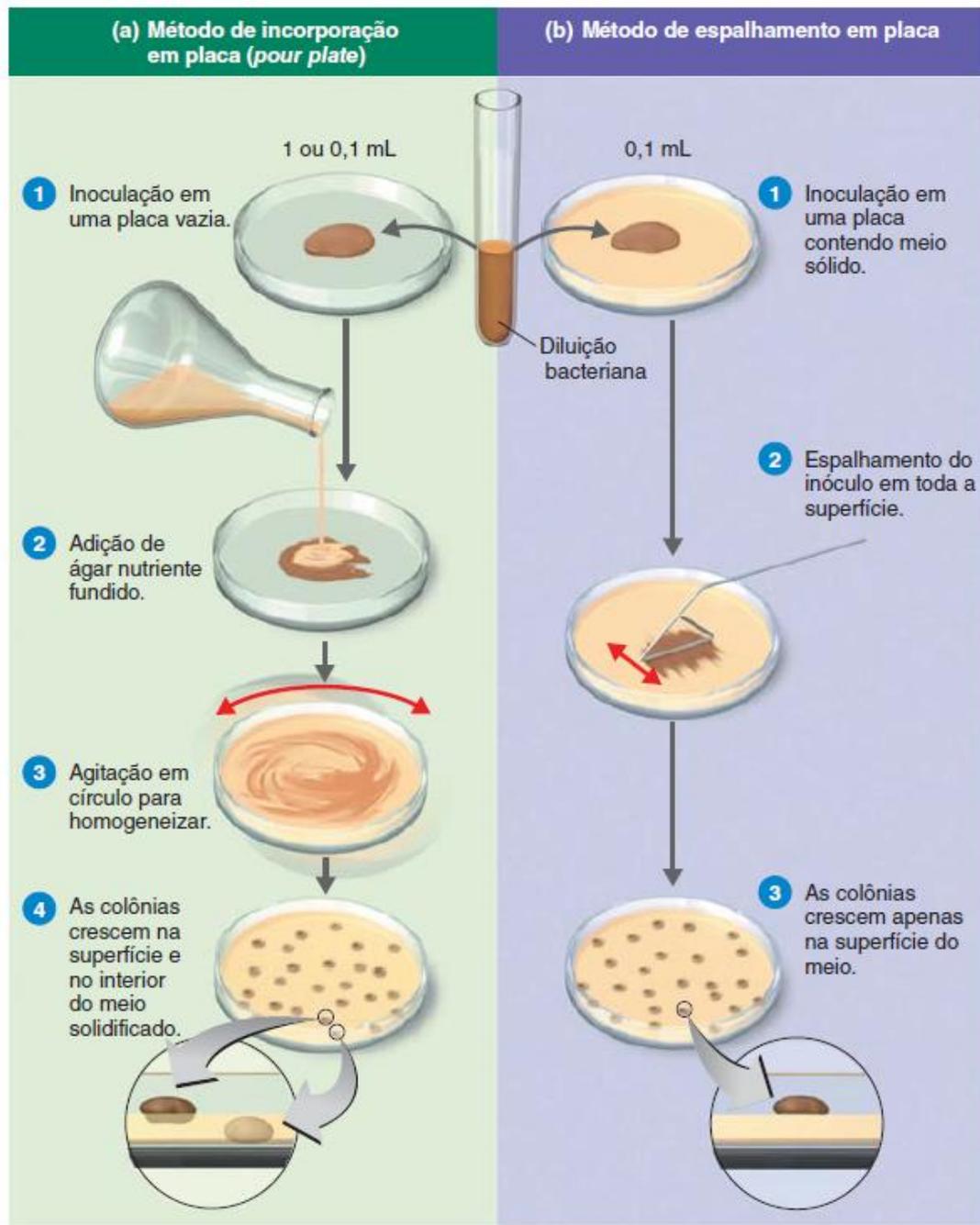


Cálculo: número de colônias na placa \times recíproca da diluição da amostra = número de bactérias/mL.

(Por exemplo, se existirem 54 colônias em uma placa de diluição 1:1.000, então a contagem é $54 \times 1.000 = 54.000$ bactérias/mL na amostra.)

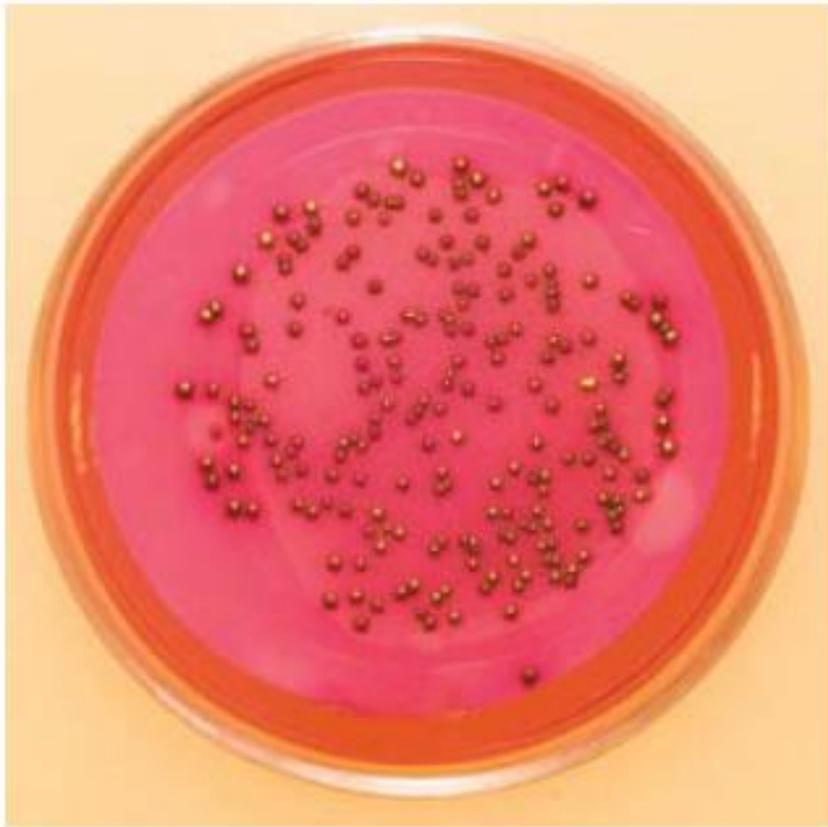
Figura 6.16 Diluições seriadas e contagens em placas. Nas diluições seriadas, o inóculo original é diluído em uma série de tubos de diluições. Nesse exemplo, cada tubo de diluição subsequente tem apenas um décimo do número de células microbianas do tubo anterior. Posteriormente, amostras de todas as diluições são utilizadas para inocular placas de Petri, nas quais as colônias crescem e podem ser contadas. Essa contagem é, então, utilizada para estimar o número de bactérias na amostra original.



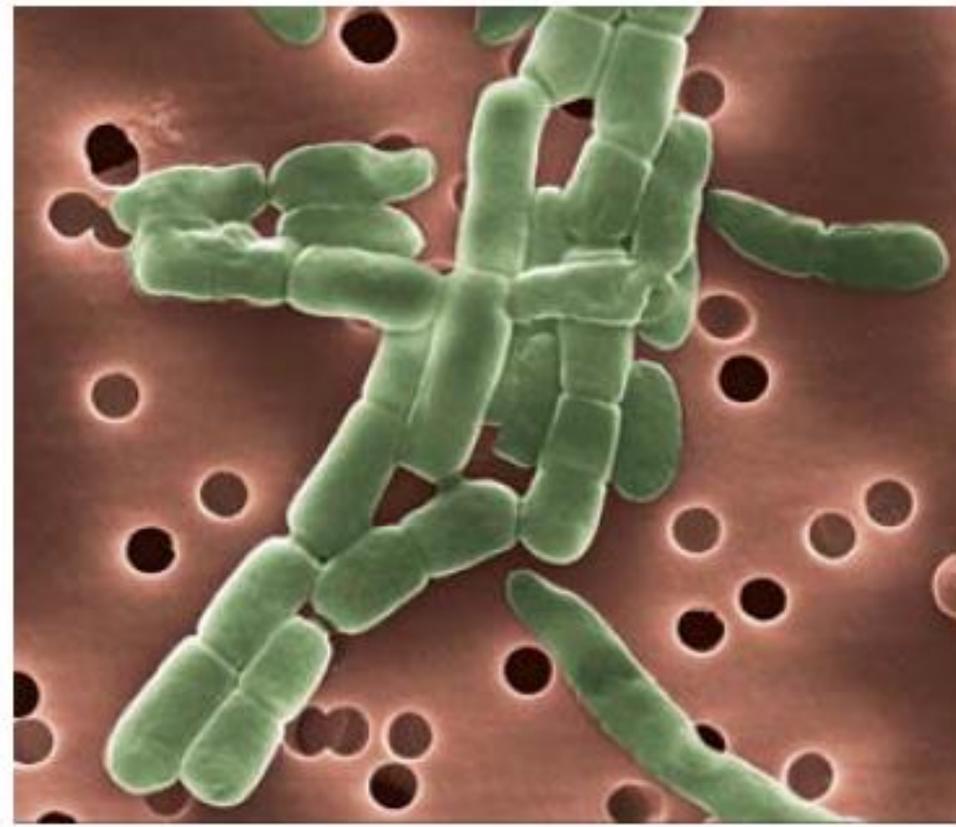


contagem em placas

Figura 6.17 Métodos de preparação das placas para contagem. (a) Método de incorporação em placa. (b) Método de espalhamento em placa.



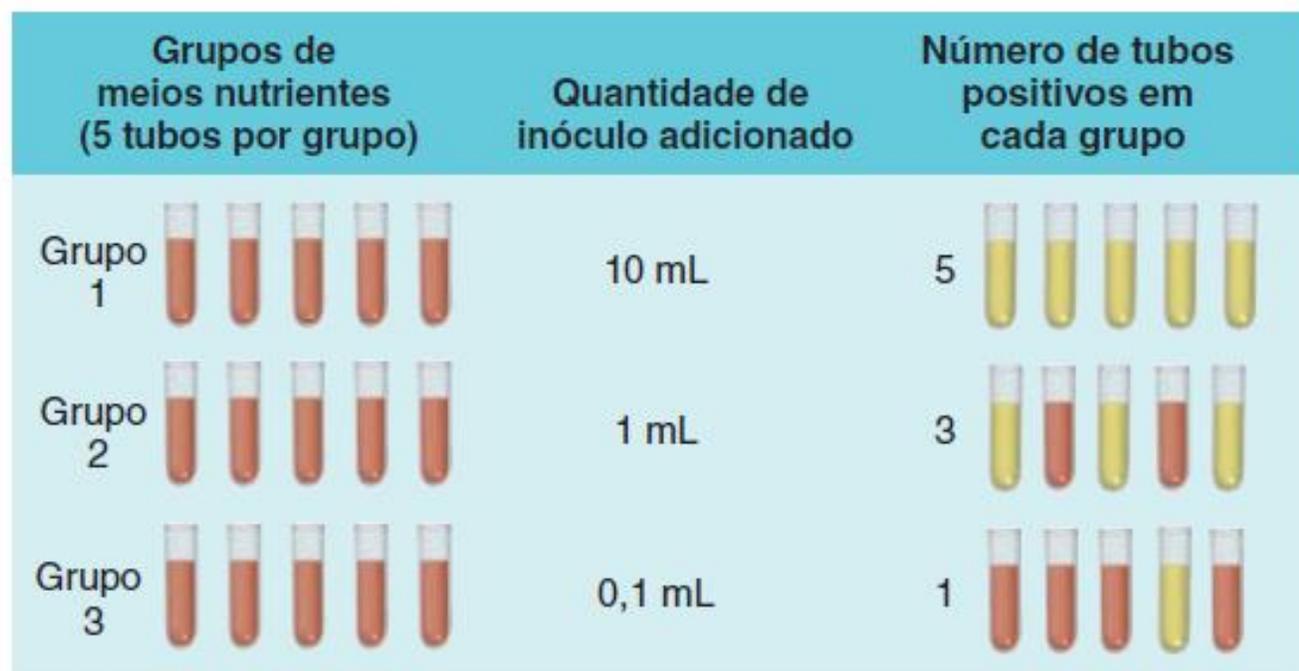
(b) Um filtro de membrana contendo bactérias em sua superfície, como descrito na parte (a), foi colocado em um ágar Endo. Este meio é seletivo para bactérias gram-positivas; fermentadores de lactose, como os coliformes, formam colônias características. Existem 214 colônias visíveis, de forma que podemos registrar a existência de 214 bactérias por 100 mL na amostra de água.



(a) A população bacteriana em corpos de água pode ser determinada passando-se uma amostra por um filtro de membrana. Aqui, as bactérias presentes em uma amostra de água de 100 mL foram retidas na superfície do filtro de membrana. Essas bactérias formam colônias visíveis quando colocadas na superfície de um meio adequado.

Figura 6.18 Contagem de bactérias por filtração.

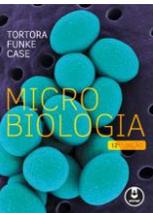
Combinação de positivos	Índice de MPN /100 mL	Limites com confiabilidade de 95%	
		Inferior	Superior
4-2-0	22	6.8	50
4-2-1	26	9.8	70
4-3-0	27	9.9	70
4-3-1	33	10	70
4-4-0	34	14	100
5-0-0	23		70
5-0-1	31	10	70
5-0-2	43	14	100
5-1-0	33	10	100
5-1-1	46	14	120
5-1-2	63	22	150
5-2-0	49	15	150
5-2-1	70	22	170
5-2-2	94	34	230
5-3-0	79	22	220
5-3-1	110	34	250
5-3-2	140	52	400



(a) Série de diluições do método do número mais provável (MPN).

(b) Tabela do MPN. A tabela do MPN nos permite calcular para uma amostra os números microbianos que estatisticamente são os mais prováveis de terem levado aos resultados obtidos. O número de tubos positivos (amarelos) é anotado para cada grupo: no exemplo sombreado, 5, 3 e 1. Se levarmos esta combinação para a tabela do MPN, concluiremos que o índice do MPN para 100 mL é 110. Estatisticamente, isso significa que 95% das amostras de água que apresentaram esse resultado contêm 34 a 250 bactérias, com 110 sendo o número mais provável.

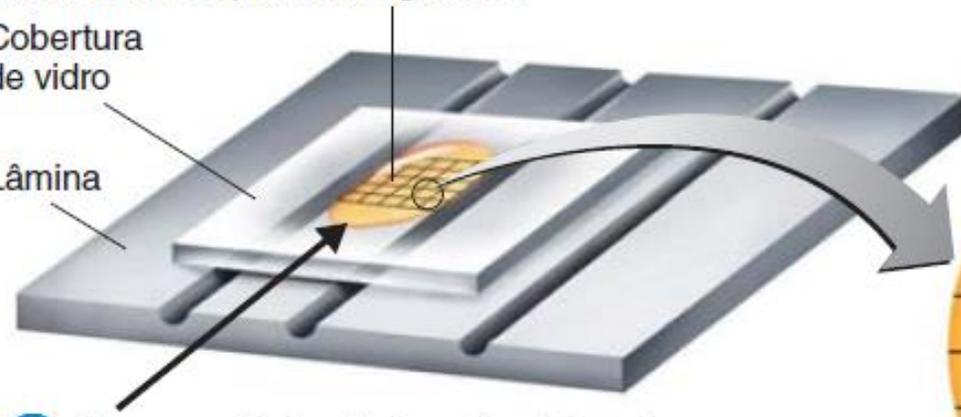
Figura 6.19 Método do número mais provável (MNP).



Grade com 25 quadrados grandes

Cobertura de vidro

Lâmina



- 1 A suspensão bacteriana é adicionada aqui e preenche o volume superficial dos quadrados por ação da capilaridade.

Suspensão bacteriana

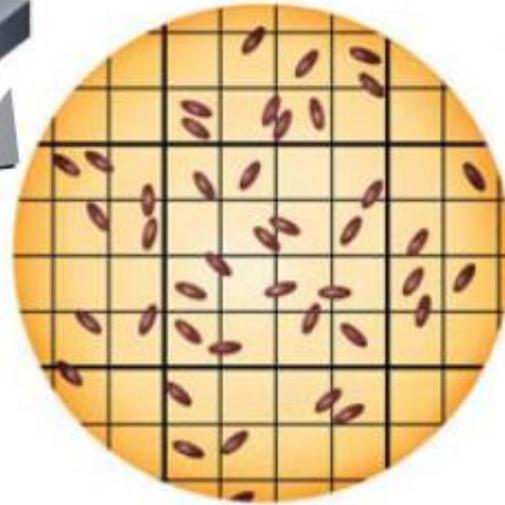
Cobertura de vidro

Lâmina



Localização dos quadrados

- 2 Seção transversal de um contador de células. A profundidade abaixo da cobertura de vidro e a área dos quadrados são conhecidas, de modo que o volume da suspensão bacteriana sobre os quadrados pode ser calculado (profundidade x área).



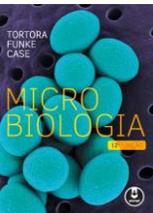
- 3 Contagem microscópica: todas as células dispostas nos diversos quadrados grandes são contadas, e os números são calculados. O quadrado maior mostrado aqui possui 14 células bacterianas.
- 4 O volume de fluido sobre o quadrado maior é $1/1250.000$ de um mililitro. Se ele contém 14 células, como mostrado aqui, então existem $14 \times 1.250.000 = 17.500.000$ células em um mililitro.

Figura 6.20 Contagem microscópica direta de bactérias, utilizando um contador de células de Petroff-Hausser. O número médio de células no quadrado grande multiplicado pelo fator 1.250.000 fornece o número de bactérias por mililitro.

P Esse tipo de contagem, apesar das suas desvantagens óbvias, frequentemente é utilizado para estimar a população bacteriana em laticínios. Por quê?

câmaras de contagem

- Neubauer
- hemocitômetro
- Buerker
- Fuchs-Rosenthal
- Thoma
- Nageotte
- Malassez



como medir populações de microrganismos?

métodos de contagem **indireta**

turbidimetria

- espectrofotômetro
- colorímetro

atividade metabólica

peso seco



densidade ótica
absorbância
transmitância
comprimento onda (nm)

Figura 6.21 Determinação do número de bactérias por turbidimetria. A quantidade de luz que chega ao detector fotossensível no espectrofotômetro é inversamente proporcional ao número de bactérias sob condições padronizadas. Quanto menos luz é transmitida, mais bactérias estão presentes na amostra. A turbidez da amostra pode ser expressa na forma de 20% de transmissão ou de 0,7 de absorbância. As leituras de absorbância têm base logarítmica e, às vezes, são úteis para a realização de um gráfico.

P Por que a turbidimetria apresenta maior utilidade na determinação da contaminação de líquidos por grandes números de bactérias do que por pequenos números?

