

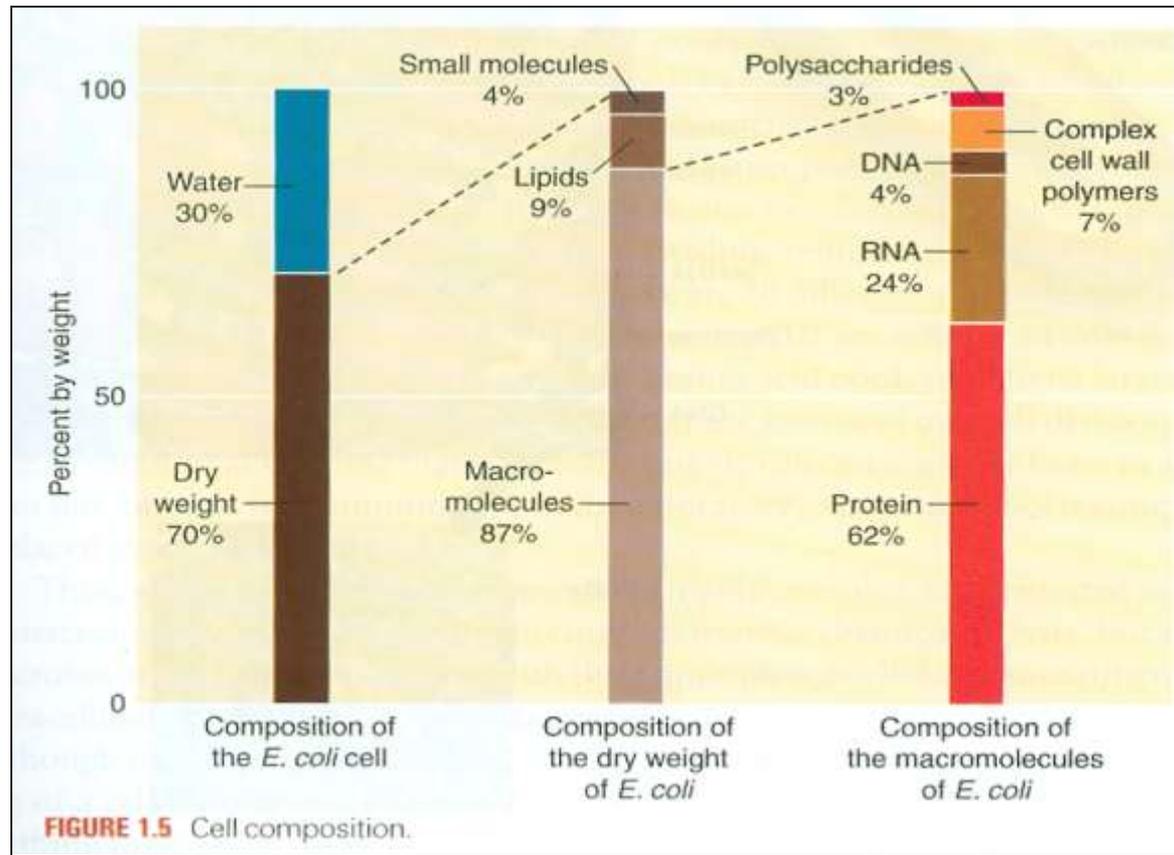
CURSO ENGENHARIA BIOQUIMICA
MICROBIOLOGIA – 2015
4º AULA

NUTRIÇÃO E CONDIÇÕES DE
CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO

Profa. Dra. Maria Bernadete de Medeiros

COMPOSIÇÃO CELULAR DA BACTÉRIA

Escherichia coli



COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DOS MICRORGANISMOS - BASE SECA (%)

ELEMENTO	BACTERIA	LEVEDURA	FUNGO FILAMENTOSO
CARBONO	45 - 52	45 - 52	45 - 55
NITROGENIO	10 - 14	6 - 9	4 - 7
HIDROGENIO	10	10	10
OXIGÊNIO	20	20	20
ENXOFRE	0.2 - 1.0	0.05 - 0.3	0.1 - 0.5
FÓSFORO*	2.0 - 3.0	0.8 - 2.5	0.5 - 4.5
MAGNÉSIO	0,1 - 0.5	0.1 - 0.5	0.1 - 0.3
POTÁSSIO	0.2 - 1.0	0.2 - 0.8	0.5 - 1.0

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CÉLULA DE *Escherchia coli* BASE SECA (%)

TABLE 14.1 Chemical Composition of an *E. coli* Cell

Elemental breakdown % dry mass of an *E. coli* cell

Major elements

Carbon	50
Oxygen	20
Hydrogen	8
Nitrogen	14
Sulfur	1
Phosphorus	3

Minor elements

Potassium	2
Calcium	0.05
Magnesium	0.05
Chlorine	0.05
Iron	0.2

Trace elements

Manganese	all trace elements combined comprise 0.3% of dry weight of cell
Molybdenum	
Cobalt	
Copper	
Zinc	

Adapted from Neidhardt *et al.* (1990).

FONTES DE ENERGIA

- ELETROMAGNETICA DA LUZ
- OXIDAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS
- COM RELAÇÃO AOS CRITÉRIOS DA FONTE DE ENERGIA E DO ESTADO TROFOS OS MICRORGANISMOS PODEM SER CLASSIFICADOS EM 4 GRUPOS:
- TROFOS DERIVADO DO GREGO “TROPHÊ” QUE SIGNIFICA ALIMENTO.

FONTES DE ENERGIA E DE CARBONO PARA O CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS

- **CARBONO**
- **AUTOTRÓFICOS:** UTILIZAM COMO FONTE DE CARBONO O CO_2
- **HETEROTRÓFICOS:** UTILIZAM O CARBONO ORGÂNICO COMO OS CARBOIDRATOS.
- **ENERGIA**
- **FOTOTRÓFICOS:** USAM A ENERGIA RADIANTE
- **QUIMIOTRÓFICOS:** ENERGIA QUÍMICA OBTIDA DA OXIDAÇÃO OU FERMENTAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS

PRINCIPAIS TIPOS NUTRICIONAIS DE PROCARIOTOS

Quadro 3.3 Principais tipos nutricionais dos procariotos

Tipo nutricional	Fonte de energia	Fonte de carbono	Exemplos
Fotoautotróficos	Luz	CO ₂	Bactérias fotossintéticas: cianobactérias, algumas bactérias púrpuras e verdes
Foto-heterotróficos	Luz	Compostos orgânicos	Bactérias fotossintéticas: algumas bactérias púrpuras e verdes
Quimioautotróficos	Compostos inorgânicos H ₂ , NH ₃ , NO ₃ , H ₂ S	CO ₂	Maioria das arqueas e algumas bactérias
Quimio-heterotróficos	Compostos orgânicos	Compostos orgânicos	Maioria das bactérias e algumas arqueas

CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS QUANTO AS FONTES DE ENERGIA

TIPO	FONTE DE ENERGIA PARA CRESCIMENTO	FONTE DE CARBONO PARA CRESCIMENTO	EXEMPLO DE GÊNERO
Fototrófico			
Fotolitotrófico (autotrófico)	luz	CO ₂	<i>Chromatium</i>
Fotorganotrófico (heterotrófico)	luz	composto orgânico	<i>Rhodopseudomonas</i>
Quimiotrófico			
Quimiolitotrófico (autotrófico)	oxidação de composto inorgânico	CO ₂	<i>Thiobacillus</i>
Quimiorganotrófico (heterotrófico)	oxidação de composto orgânico	composto orgânico	<i>Escherichia</i>

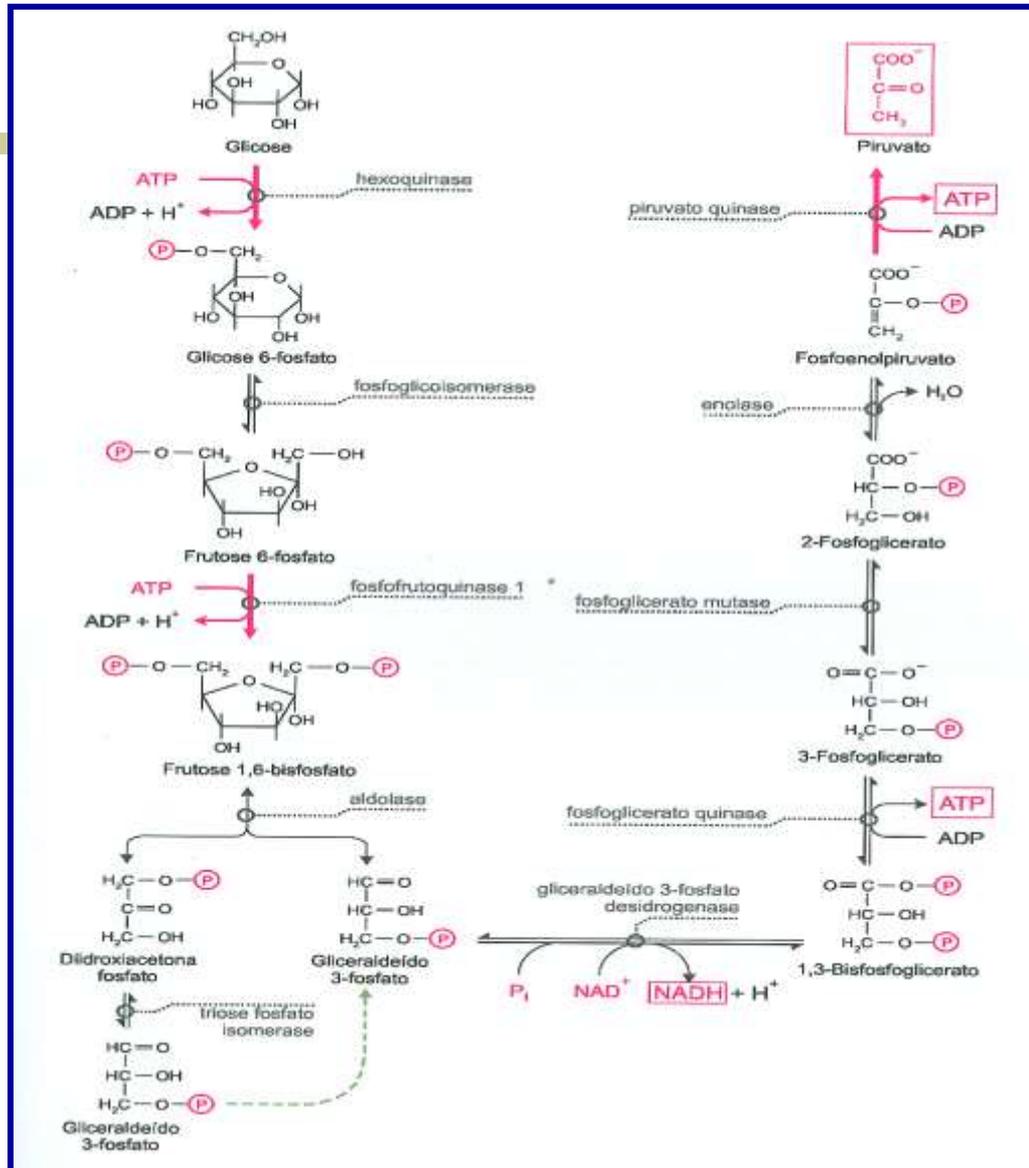
FATORES NUTRICIONAIS

- Os nutrientes necessários aos microrganismos são: CARBONO, NITROGÊNIO, ENXOFRE, FOSFORO, (H_2PO_4^-).
- Certos oligoelementos: Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}
- VITAMINAS: ácido fólico, vitaminas B_{12} e vitamina K.
- Algumas bactérias são **FASTIDIOSOS**, significa que possuem necessidades nutricionais especiais. Exemplo: bactérias do gênero *Lactobacillus*.

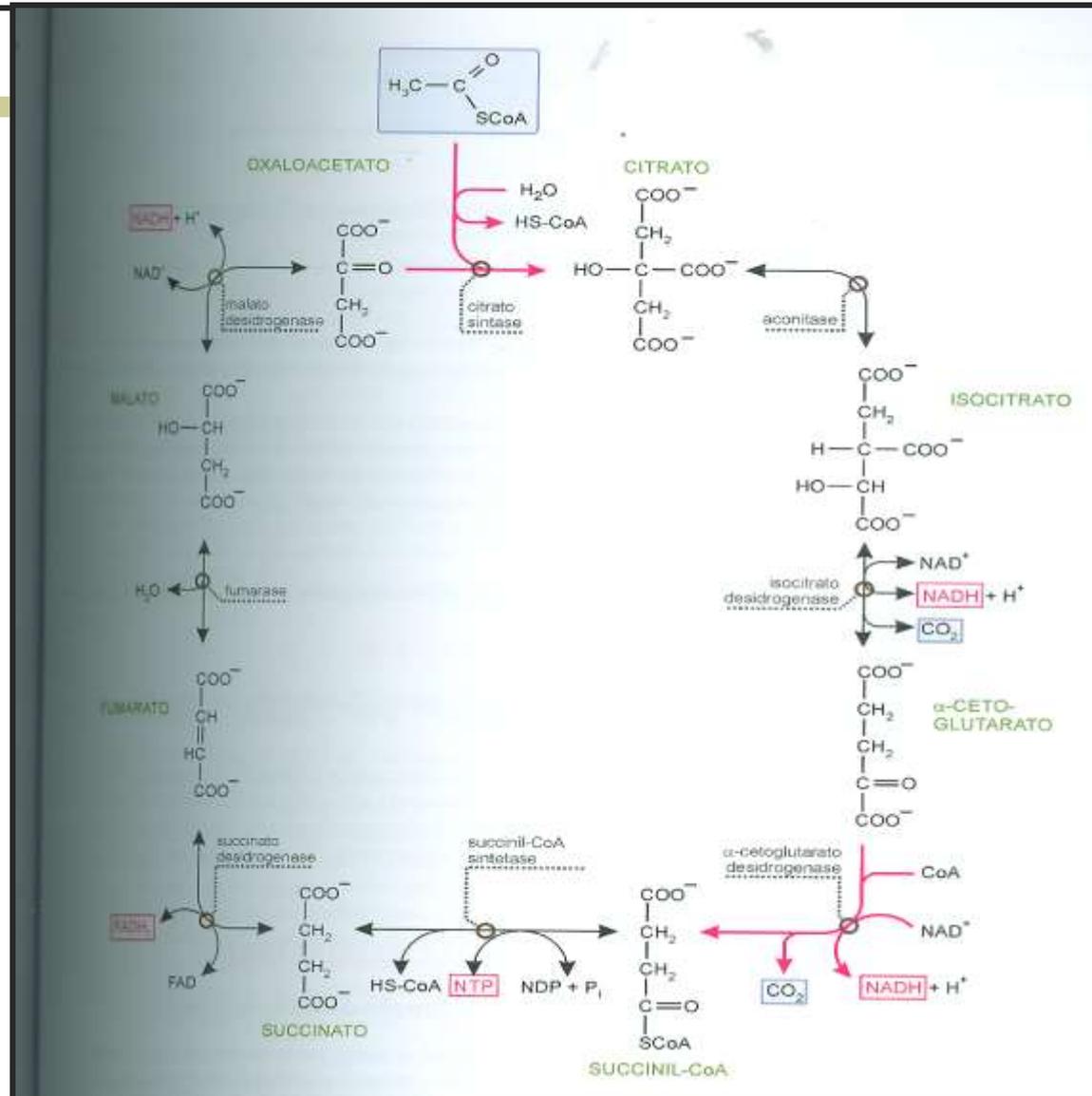
CONCEITOS DE MICRO E MACRONUTRIENTES

- OS ELEMENTOS **CARBONO**, **NITROGÊNIO**, **HIDROGÊNIO** E **OXIGÊNIO** SÃO CONSTITUINTE DE QUASE 98% DA CELULA (Base seca).
- SÃO DENOMINADOS DE MACRONUTRIENTES PORQUE SÃO NECESSÁRIOS NUMA CONCENTRAÇÃO SUPERIOR A $0,1 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$.
- QUANDO O ELEMENTO É REQUERIDO NUMA CONCENTRAÇÃO INFERIOR A $0,1 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$ É CONSIDERADO COMO MICROELEMENTO.

VIA GLICOLÍTICA



CICLO DE KREBS CONTRIBUI COM CETO-GLUTARATO E OXALOACETATO



CADEIA RESPIRATORIA

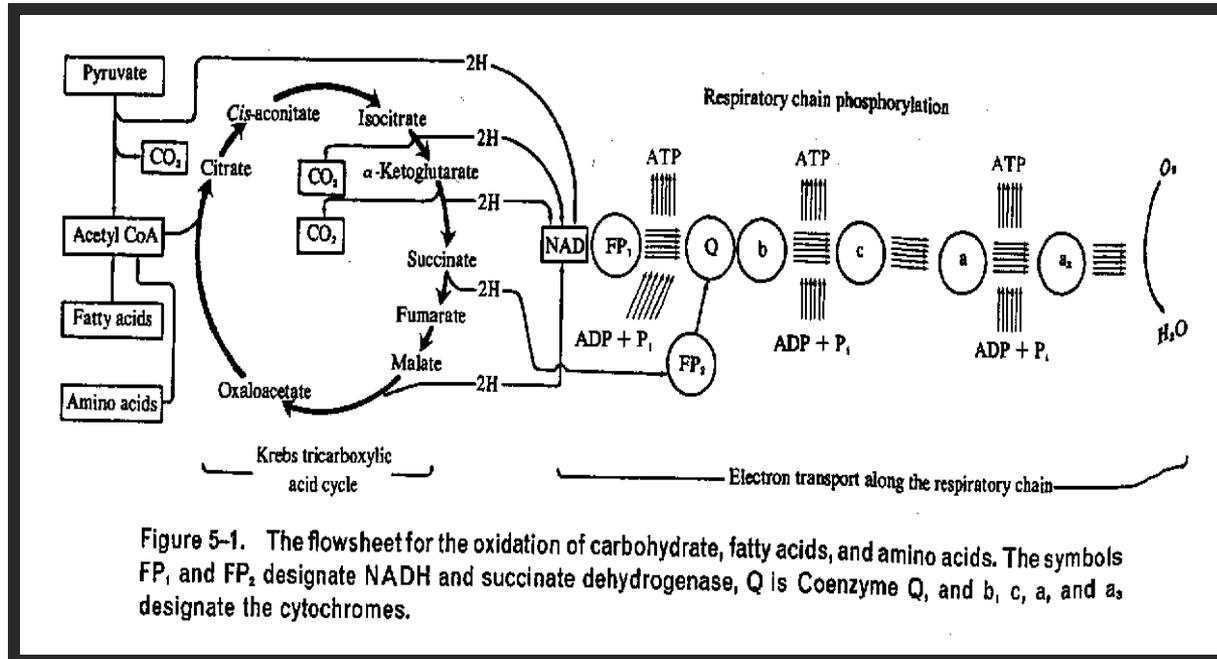
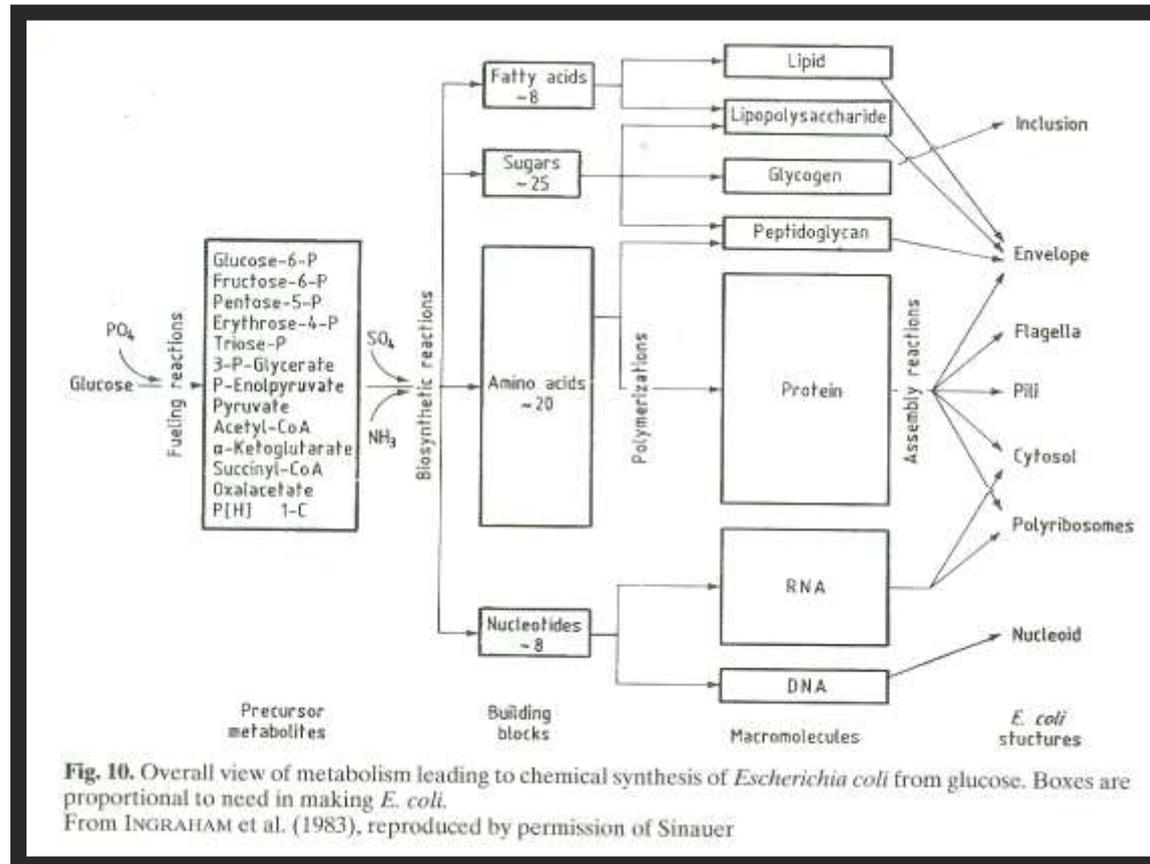
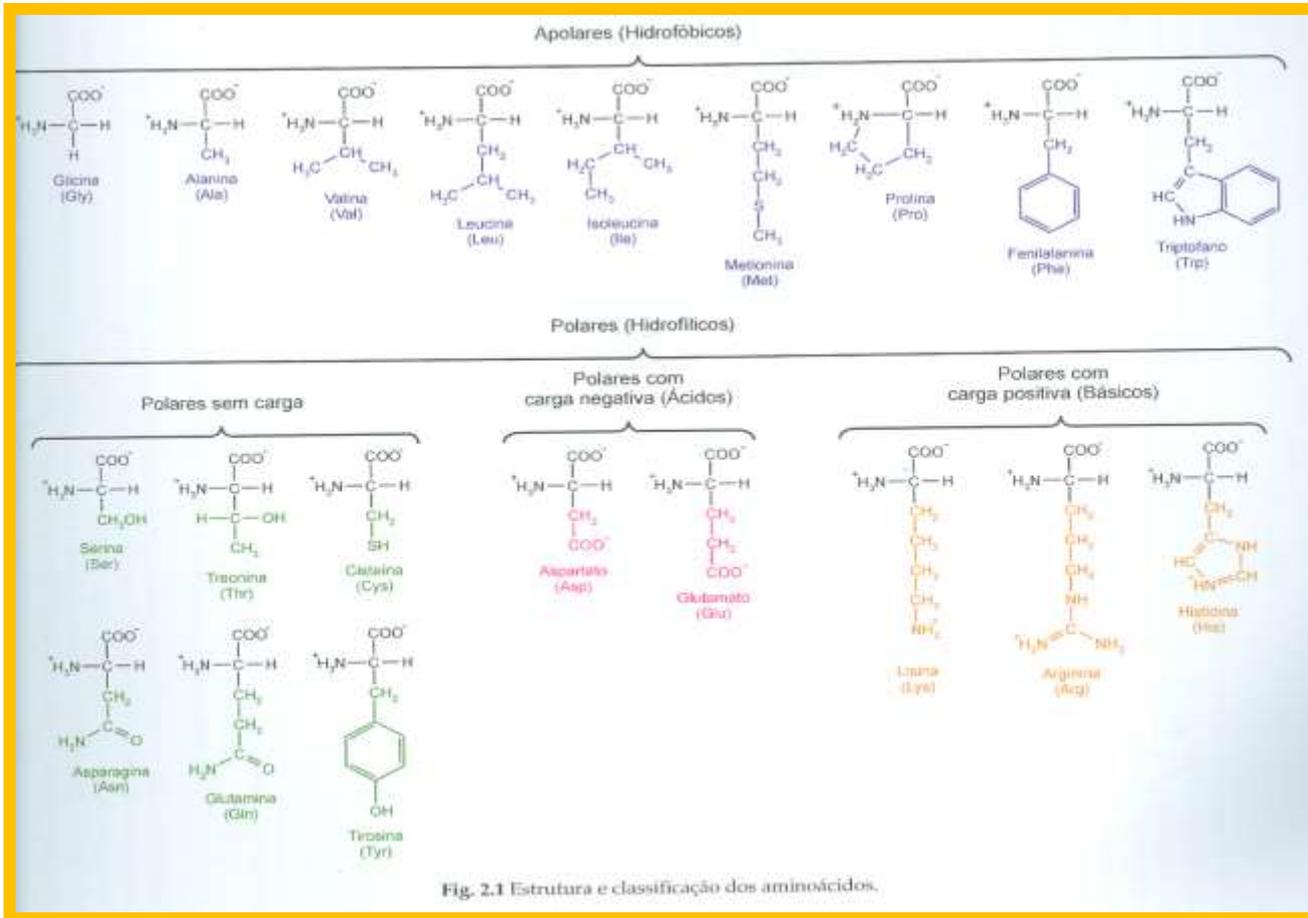


Figure 5-1. The flowsheet for the oxidation of carbohydrate, fatty acids, and amino acids. The symbols FP_1 and FP_2 designate NADH and succinate dehydrogenase, Q is Coenzyme Q, and b, c, a, and a_1 designate the cytochromes.

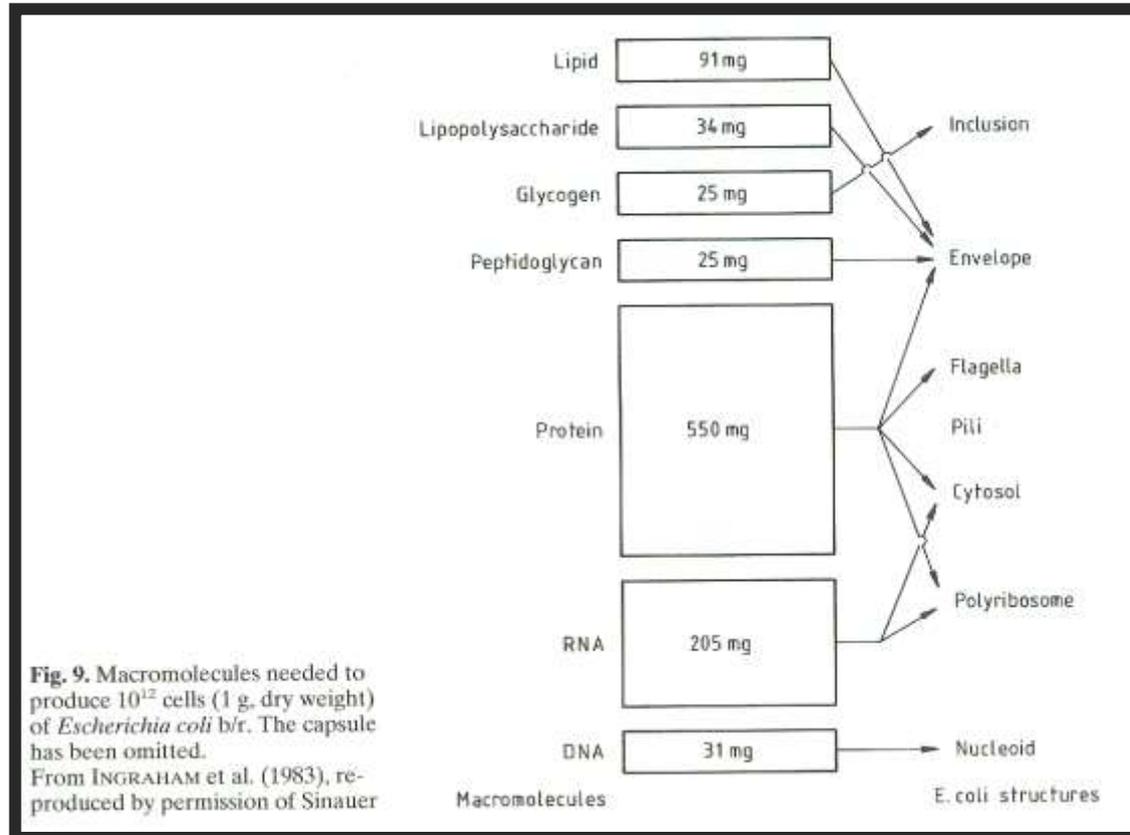
DE GLICOSE ATÉ AS ORGANELAS DA CÉLULA



OS 20 AMINOÁCIDOS



BIOMOLÉCULAS ENCONTRADAS NA MASSA CELULAR DE *E. coli*. (1g.- massa seca ou 10^{12} células)

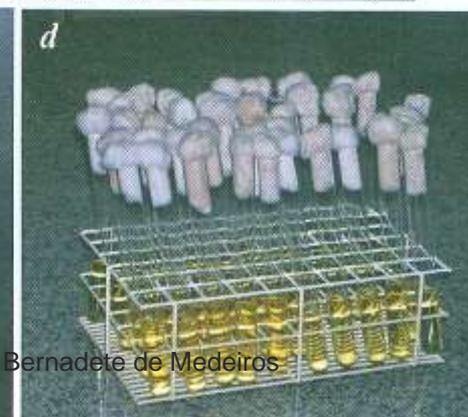
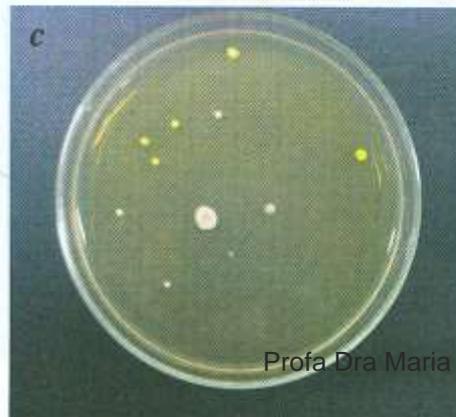
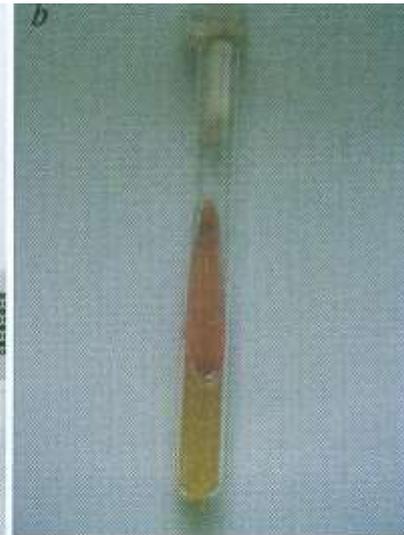
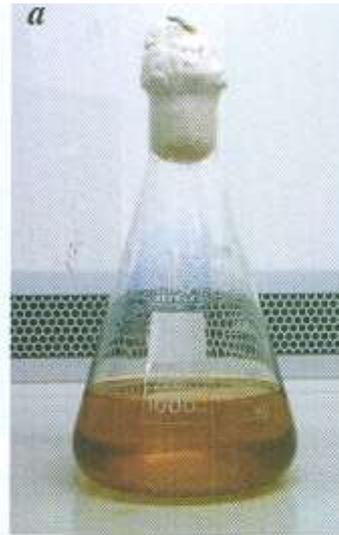


MEIOS DE CULTURA ENCONTRADOS NO MERCADO



MEIOS DE CULTURA PARA O CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

- MEIO LÍQUIDO SÃO OS CALDOS E SÓLIDOS SÃO OS USADOS NOS MEIOS INCLINADOS E EM PLACAS.



CRESCIMENTO CELULAR DE DIFERENTES BACTÉRIAS EM CALDO NUTRITIVO.

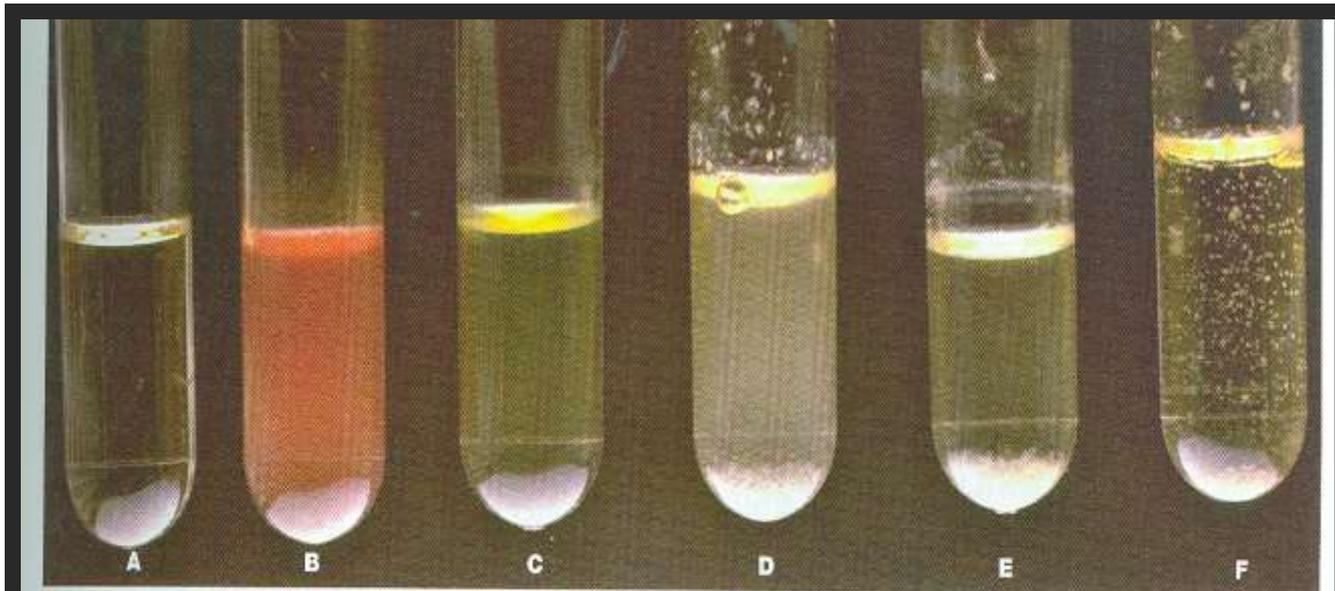
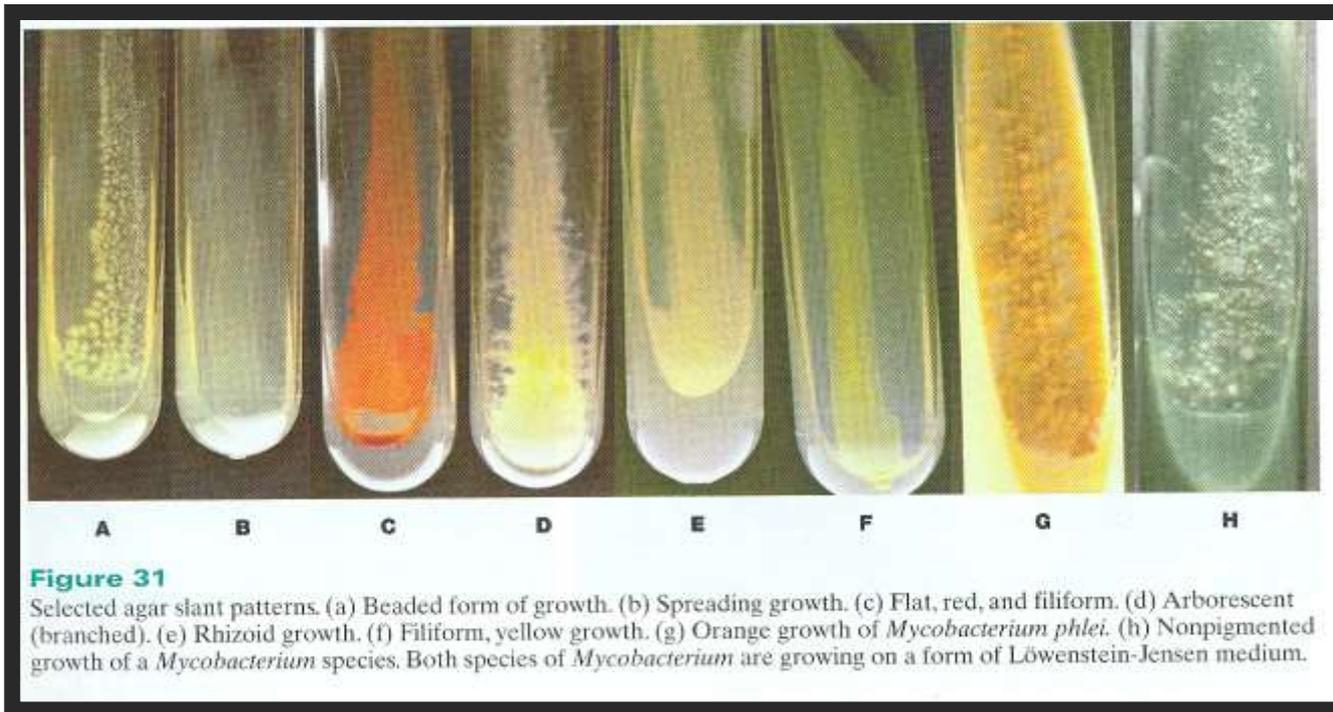


Figure 32

Selected broth culture patterns. (a) Clear, uninoculated broth. (b) Turbid (cloudy) growth and red pigmentation. (c) Turbid and green pigmentation in the upper portion of the broth. (d) Turbid growth. (e) Slightly turbid and ring formation (1 ml of the broth was removed to demonstrate the presence of the ring). (f) Somewhat clear broth with flocculent growth.

CRESCIMENTO CELULAR DE DIFERENTES BACTÉRIAS EM MEIO AGAR NUTRITIVO.



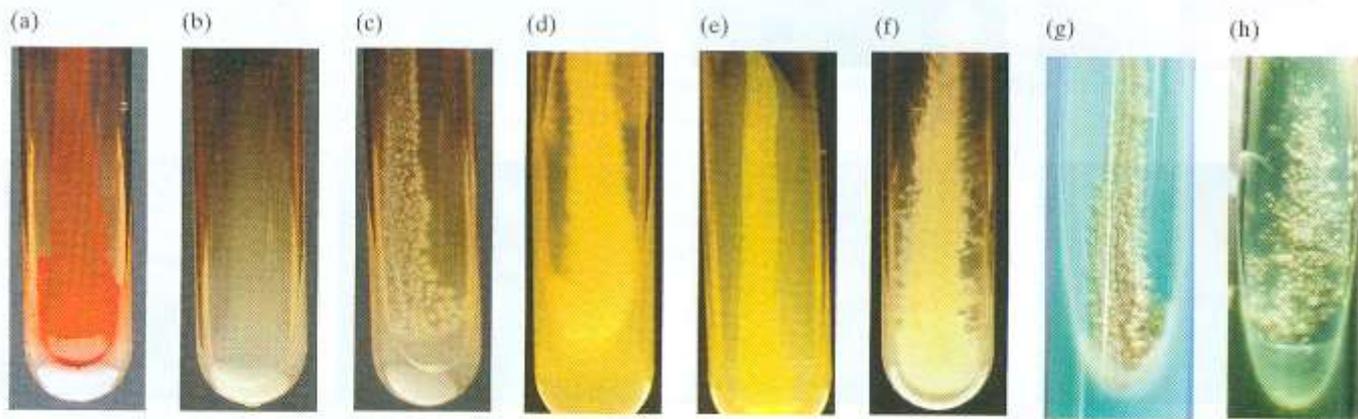


Figure 7-4

Agar stroke patterns. Tube a, spreading growth; Tube b, the beaded form of growth; Tube c, flat, red, and filiform; Tube d, filiform, nonpigmented growth; Tube e, rhizoid growth; Tube f, arborescent (branched); Tube g, shows the orange growth of *Mycobacterium phlei*; Tube h shows the nonpigmented growth of *M. smegmatis*. Both species are growing on a form of Löwenstein–Jensen medium.

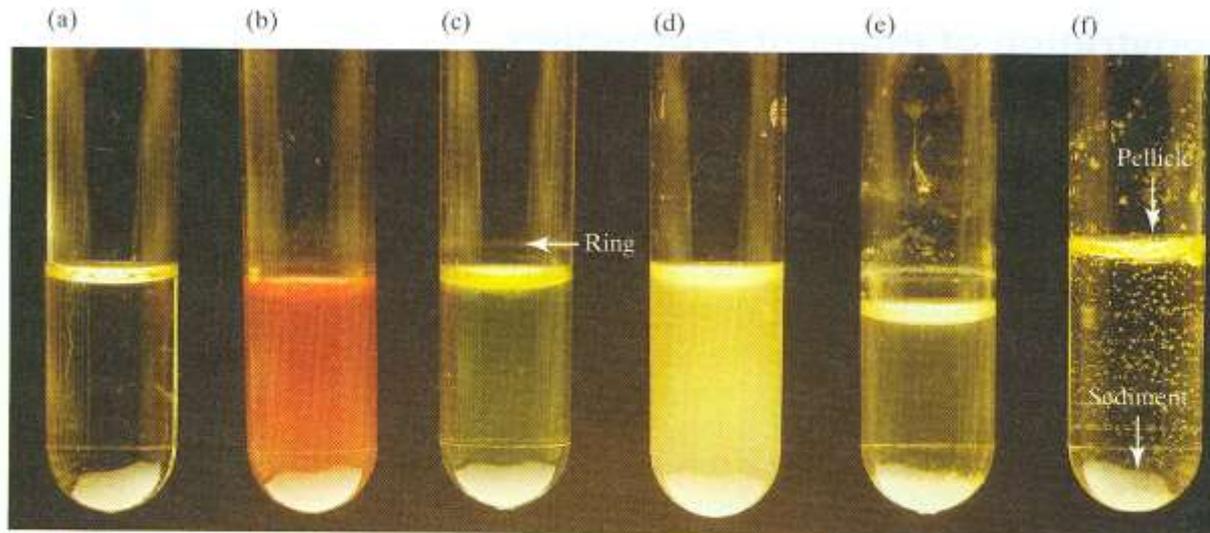
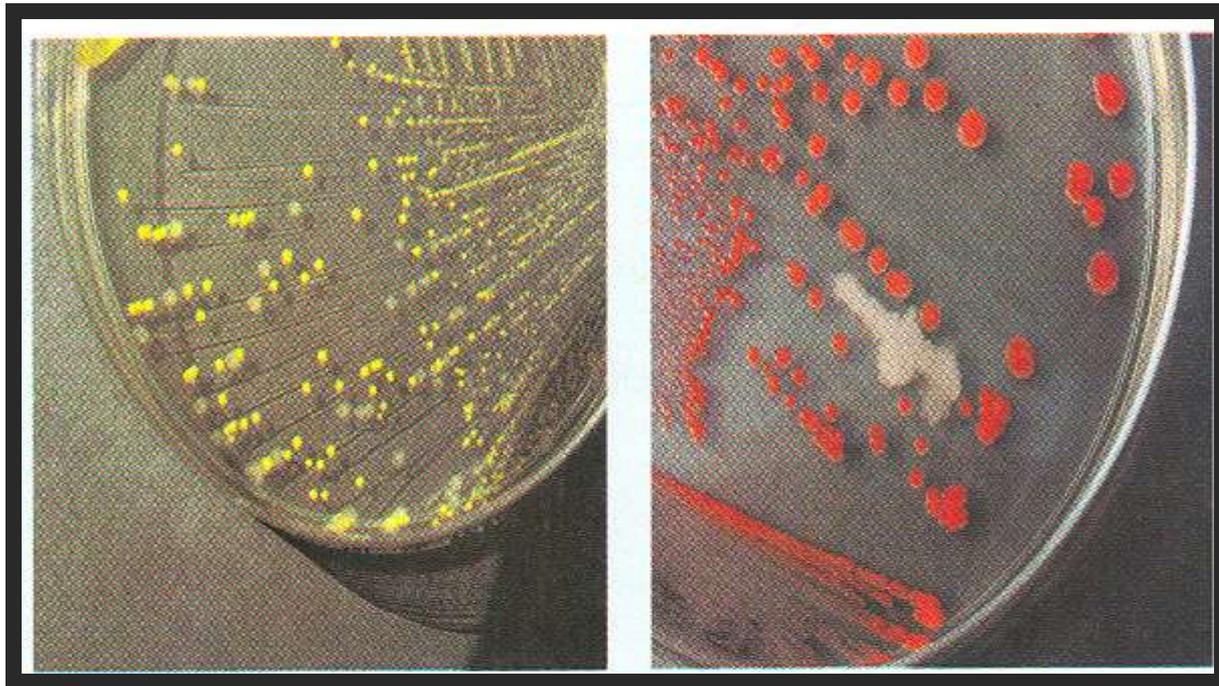


Figure 7-5

Selected broth culture characteristics of bacteria. Tube a, clear, uninoculated broth; Tube b, turbid (cloudy growth) and red pigmentation; Tube c, turbid and green pigmentation in the upper portion of the broth; Tube d, turbid; Tube e, slightly turbid, and ring formation (1 mL of the broth was removed to demonstrate the presence of the ring); Tube f, somewhat clear broth with flocculent growth.

PLACAS DE PETRI COM CULTURAS DAS
BACTÉRIAS *Micrococcus luteus* (AMARELO) E
Serratia marcescens (VERMELHA)



DIFERENÇA ENTRE O MEIO DE CULTURA CALDO NUTRIENTE E AGAR NUTRIENTE.

- O MEIO SÓLIDO CONTÉM O AGENTE GELIFICANTE CHAMADO ÁGAR. TEM COMO FUNÇÃO SOLIDIFICAR O MEIO DE CULTURA.
- O ÁGAR É ENCONTRADO NAS **ALGAS VERMELHAS** MARINHAS DA DIVISÃO *Rhodophyta*. É EXTRAÍDO DAS ALGAS DOS GÊNEROS *Gelidium spp.* E *Gracilaria spp.*
- É UM POLIMERO COMPOSTO DE UNIDADES DE **galactose - ácido galacturônico.**

PROPRIEDADES DO ÁGAR

- O ÁGAR É UTILIZADO DEVIDO A SUAS PROPRIEDADES FÍSICAS: LIQUEFAZ A 100⁰C E PERMANECE LÍQUIDO ATÉ 40⁰C;
- EM TEMPERATURA INFERIOR A 40 ⁰C, O ÁGAR SOLIDIFICA.

CLASSIFICAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

- OS MEIOS DEVEM TER UMA MISTURA DOS NUTRIENTES NECESSÁRIOS PARA O CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO. SÃO CLASSIFICADOS DE ACORDO COM A SUA COMPOSIÇÃO EM DIFERENTES CATEGORIAS:
 1. MEIO SINTÉTICO OU DEFINIDO
 2. MEIO COMPLEXO
 3. MEIO SELETIVO
 4. MEIO DIFERENCIAL
 5. MEIO MINIMO

MEIO SINTÉTICO OU DEFINIDO QUANTO A SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

- SÃO CONHECIDAS A COMPOSIÇÃO E A QUANTIDADE DOS COMPOSTOS DO MEIO:

- Meio para o cultivo de *E. coli*

■	K_2HPO_4	7,0
	KH_2PO_4	2,0
	$(NH_4)_2SO_4$	1,0
	$MgSO_4$	0,1
	$CaCl_2$	0,02
	GLICOSE	10,0 g / L

Elementos traços de Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni : 2-10 μ g

Água destilada 1,0 Litro

MEIO COMPLEXO (INDEFINIDO)

- UTILIZA OS EXTRATOS QUE SÃO OS HIDROLISADOS ÁCIDOS OU ENZIMÁTICOS DE **PROTEÍNAS, VEGETAIS E MICRORGANISMOS.**
- CASEINA → PROTEÍNA DO LEITE
- EXTRATO DE CARNE → EXTRATO AQUOSO DE TECIDO MUSCULAR
- EXTRATO DE LEVEDURA → LEVEDURA.
- PEPTONA OU TRIPTONA → DERIVADO SOJA

MEIO DE CULTURA COMPLEXO

■ MEIO DE CULTURA PARA	<i>L. mesenteroides</i>
GLICOSE	15,0
EXTRATO DE LEVEDURA	5,0
PEPTONA DE SOJA	5,0
KH ₂ PO ₄	2,0
ÁGUA DESTILADA	1,0 g/ L.
pH 7,0	

MEIO DE CULTURA SELETIVO

- TAMBÉM CONHECIDO COMO MEIO DE ENRIQUECIMENTO FAVORECE O CRESCIMENTO DE UM MICRORGANISMO DE INTERESSE E IMPEDE O CRESCIMENTO DAS OUTRAS BACTÉRIAS.
- O CORANTE VERDE-BRILHANTE INIBE SELETIVAMENTE O CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS. ESSE CORANTE É A BASE DE UM MEIO DE CULTURA DENOMINADO AGAR VERDE-BRILHANTE UTILIZADO NO ISOLAMENTO SELETIVO DA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA *Salmonella*.

MEIO SELETIVO PARA HALÓFILOS COM CONCENTRAÇÃO ELEVADA DE SAL

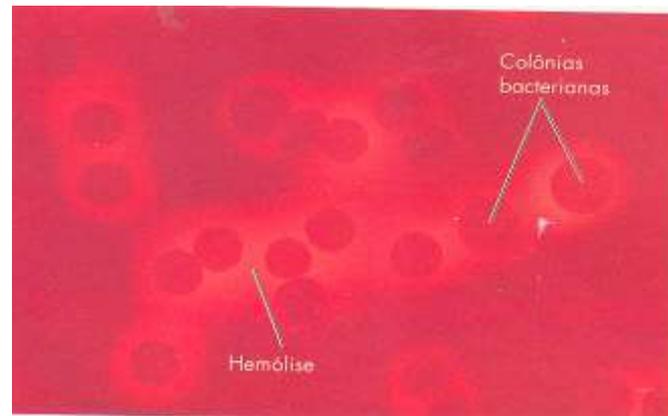
		FONTES
■ CASAMINOÁCIDOS	7,5	N, S e P
■ EXTRATO DE LEVEDURA	10,0	fatores de crescimento
■ CITRATO DE SÓDIO	3,0	Carbono e energia
■ KCL	2,0	K
■ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	20,0	S e Mg
■ $FeCl_2$	0,023	Fe
■ NaCl	25,0 g/L	Na

MEIO DE CULTURA DIFERENCIAL

- É UTILIZADO PARA A FÁCIL IDENTIFICAÇÃO DA COLÔNIA DA BACTÉRIA DE INTERESSE QUANDO EXISTEM OUTRAS CRESCENDO NA MESMA PLACA DE MEIO DE CULTURA.
- MEIO AGAR SANGUE PARA IDENTIFICAR A BACTÉRIA *Streptococcus pyogenes*.

MEIO DE CULTURA DIFERENCIAL

- O meio ágar sangue contém células vermelhas do sangue. A bactéria *Streptococcus pyogenes* lisa as células sanguíneas apresentando um halo claro característico (beta-hemólise).

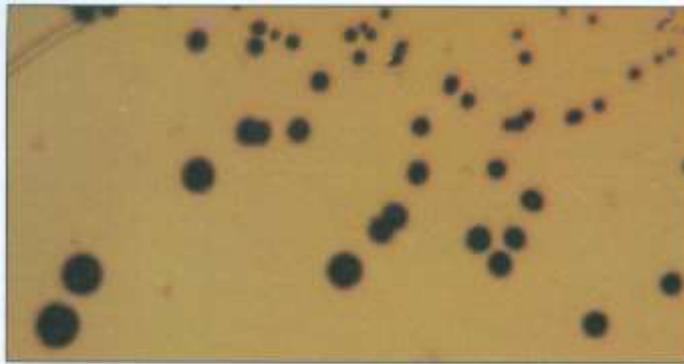


MEIOS DE CULTURAS DEFINIDO E COMPLEXO

<i>Examples of growth media for bacteria</i>		
Defined media		Complex medium
For <i>Escherichia coli</i> ^a	For <i>Cyanobacteria</i>	Tryptone soya broth (TSB) for many different types of bacteria
Glucose	NH ₄ Cl	Enzymic digest of casein (tryptone)
Na ₂ HPO ₄	NaNO ₃	Enzymic digest of soybean meal (peptone)
KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	Glucose
NH ₄ Cl	NaH ₂ PO ₄	NaCl
NaCl	MgSO ₄	K ₂ HPO ₄
MgSO ₄	FeSO ₄	
FeSO ₄	Trace elements	
CaCl ₂ (optional)	ZnSO ₄	
	H ₃ BO ₃	
	MnSO ₄	
	MoO ₃	
	CoSO ₄	
	CuSO ₄	

^aNormally enough trace elements are present in the water.

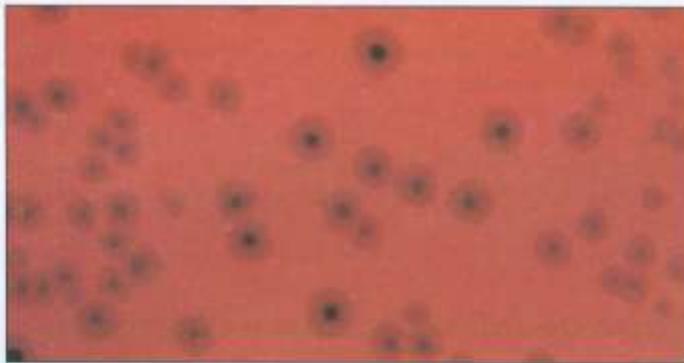
COLÔNIAS DE BACTÉRIAS EM VÁRIOS MEIOS DIFERENCIAIS



(a) *Staphylococcus aureus* em meio telurito-glicina.



(b) *Escherichia coli* em meio eosina azul de metileno (EMB). As colônias pretas no centro são cercadas por um verde metálico brilhante característico.



(c) *Enterobacter aerogenes* em meio EMB apresentando colônias características escuras no centro.



(d) *Pseudomonas aeruginosa* no meio agar pseudomonas P (PSP) apresentando colônias com pigmento azul-esverdeado solúvel em meio aquoso.

MEIO MINIMO

- CONTÉM SOMENTE OS NUTRIENTES ESSENCIAIS PARA O CRESCIMENTO CELULAR
- UTILIZADO NA GENÉTICA PARA SELEÇÃO DO MICRORGANISMO

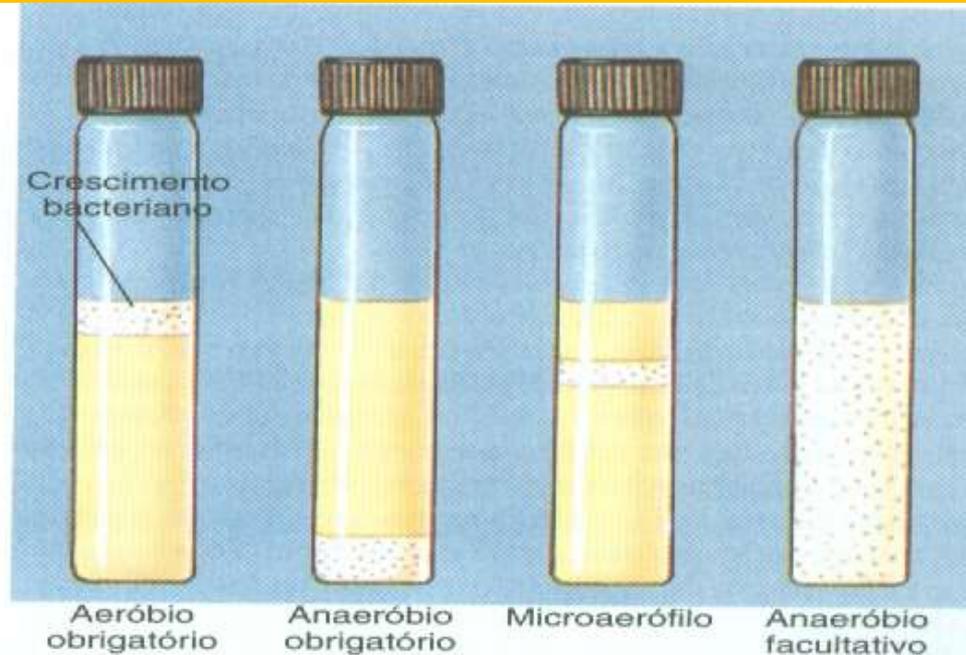
FATORES DE CRESCIMENTO

- ALGUNS MICRORGANISMOS SOMENTE APRESENTAM CRESCIMENTO QUANDO SÃO ADICIONADOS **VITAMINAS** OU **AMINOÁCIDOS** AO MEIO DE CULTIVO.
- *B. anthracis* exigente em tiamina
Leuconostoc mesenteroides → biotina
Clostridium tetani → riboflavina

CONDIÇÕES FÍSICA E AMBIENTAIS PARA O CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO.

1. OXIGÊNIO
2. pH DO MEIO DE CULTURA
3. TEMPERATURA
4. PRESSÃO OSMÓTICA

PADRÕES DE USO DO OXIGÊNIO



➤ **Fig. 6.15 Padrões de uso do oxigênio.** Diferentes organismos incubados por 24 horas em tubos de caldo nutritivo e acumulados em regiões diferentes, de acordo com sua necessidade ou sensibilidade em relação ao oxigênio.

FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO CELULAR

INFLUÊNCIA DO OXIGÊNIO NO CRESCIMENTO CELULAR

O₂ É POUCO SOLÚVEL NA ÁGUA

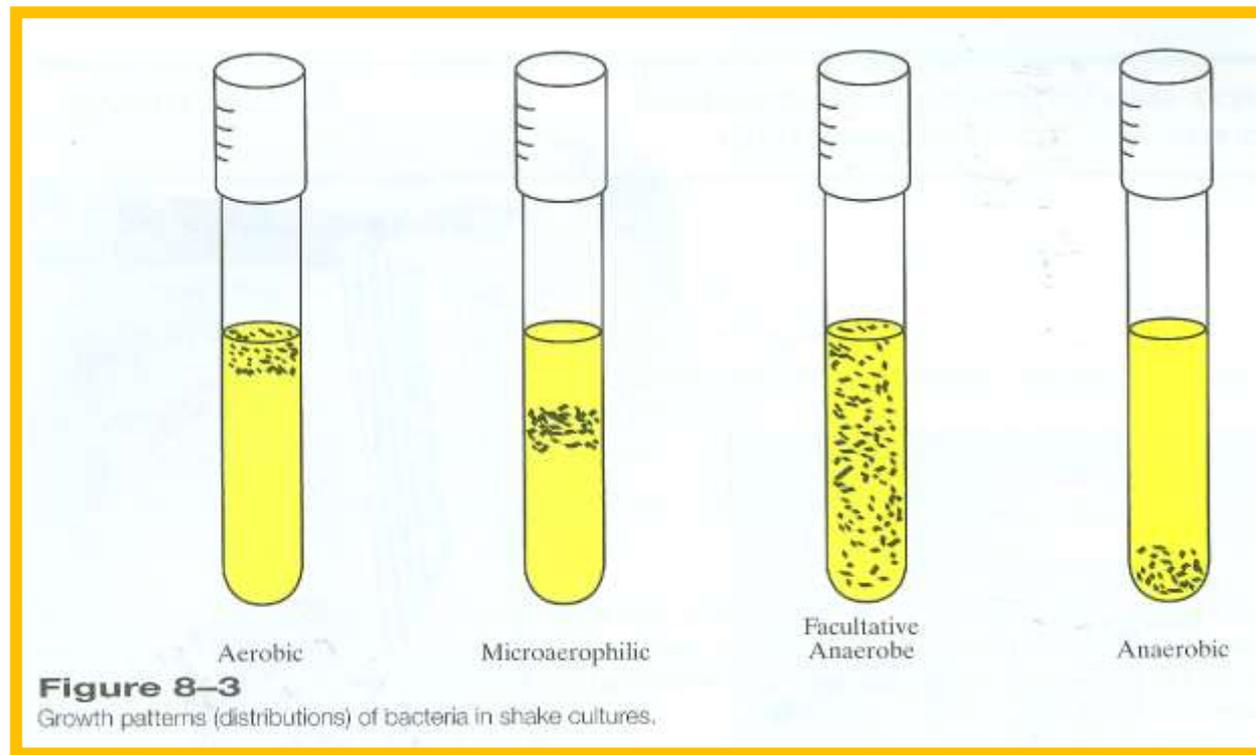
AERÓBIA
OBRIGATÓRIA



ANAERÓBIA
OBRIGATÓRIA.

MICROAERÓFILAS
ANAEROBIAS FACULTATIVAS

CRESCIMENTO DA BACTÉRIA



CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS ANAERÓBIAS EM CALDO THIOGLICOLATO

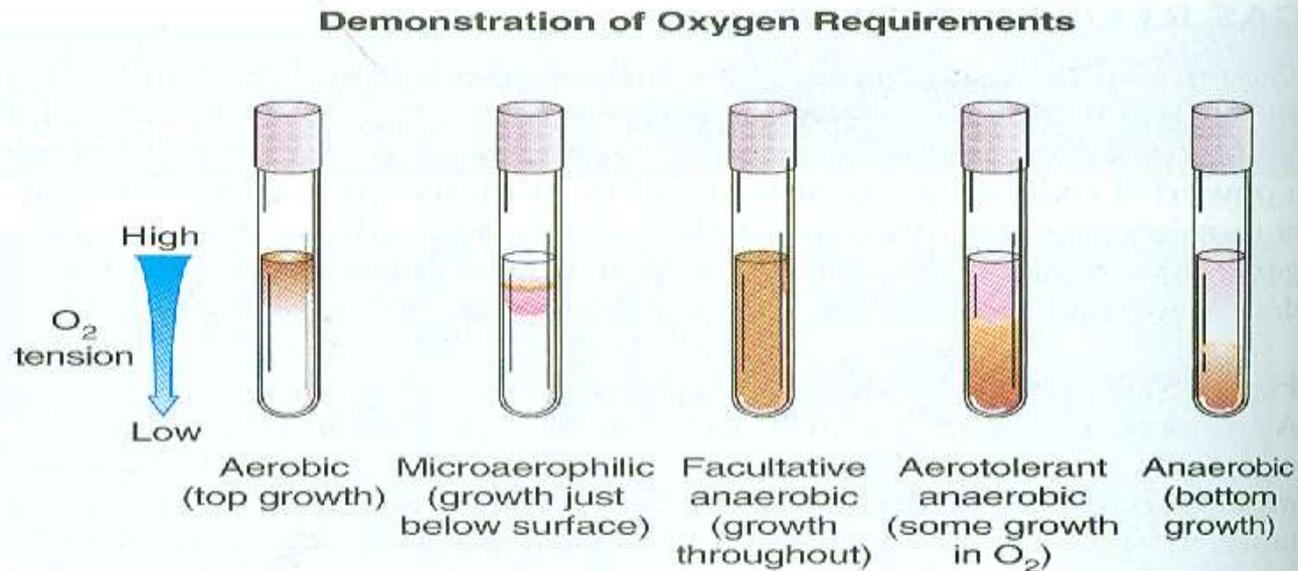


FIGURE 7.12

Use of thioglycollate broth to demonstrate oxygen requirements.

Thioglycollate is a chemical that absorbs O_2 gas from the air. Oxygen at the top of the tube is dissolved in the medium and absorbed; its presence is indicated by the red dye resazurin. When a series of tubes is inoculated with bacteria that differ in O_2 requirements, the relative position of growth provides some indication of their adaptations to oxygen use.

PADRÕES DE USO DO OXIGÊNIO

- **MICROARÓFILAS:** as células crescem melhor na presença de uma pequena quantidade de O_2 livre.
- **ANAERÓBIAS FACULTATIVAS:** na presença do O_2 mantêm o metabolismo aeróbio. Porém, na sua ausência o metabolismo é anaeróbio.
- **ANAERÓBIO AEROTOLERANTE:** sobrevive na presença do O_2 porém, não o utiliza.

CARACTERÍSTICA DAS BACTÉRIAS ANAERÓBIAS OBRIGATÓRIAS

- As bactérias não são mortas por O_2 mas por seu derivado o **íon superóxido (O_2^-)**, que é altamente tóxico e reativo.
- **O_2 apresenta tendência em atrair elétrons.**
- **PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO**



OS RADICAIS SUPERÓXIDO DÃO ORIGEM A H_2O_2 E AO RADICAL HIDROXILA $OH\cdot$

■ DOIS RADICAIS SUPERÓXIDO REAGEM UM COM O OUTRO PARA PRODUZIR H_2O_2



EM SEGUIDA O SUPERÓXIDO REAGE COM O H_2O_2 PARA FORMAR RADICAIS HIDROXILA:



OS RADICAIS HIDROXILAS SÃO MUITO REATIVO E DANIFICA VARIAS MOLÉCULAS NA CÉLULA.
A VIDA MÉDIA É DE 1/10 000 segundo

BACTÉRIAS AERÓBIAS OBRIGATORIAS E AS ANAEROBIAS FACULTATIVAS POSSUEM AS ENZIMAS SOD E CATALASE

- As bactérias utilizam as enzimas **superóxido dismutase (SOD)** e catalase para impedir a toxicidade do superóxido e do peróxido de hidrogênio.



PEROXIDASE (NADH.H dependente)

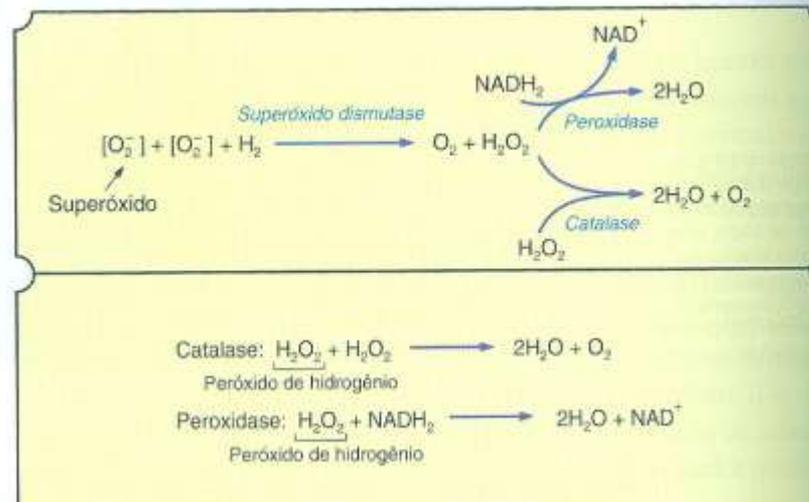
Bactérias anaeróbias: facultativas e obrigatórias

- As bactérias anaeróbias facultativas e aerotolerantes possuem a enzima superóxido dismutase (**SOD**), entretanto não possuem a **CATALASE**.
- As anaeróbias obrigatórias não possuem as enzimas **SOD** e a **CATALASE**. Portanto, as células morrem em consequência dos efeitos tóxicos do $\cdot O_2^-$ e do H_2O_2 .

Enzimas relacionadas com o metabolismo

Quadro 3.5 Distribuição das enzimas relacionadas com o metabolismo respiratório

Grupo	Superóxido dismutase	Catalase peroxidase
Aeróbicos obrigatórios	+	+/-
Maioria dos facultativos	+	+/-
Maioria dos anaeróbicos aerotolerantes	+	+/-
Anaeróbicos obrigatórios	-	-



zimnas

Classificação das bactérias relacionadas com o metabolismo

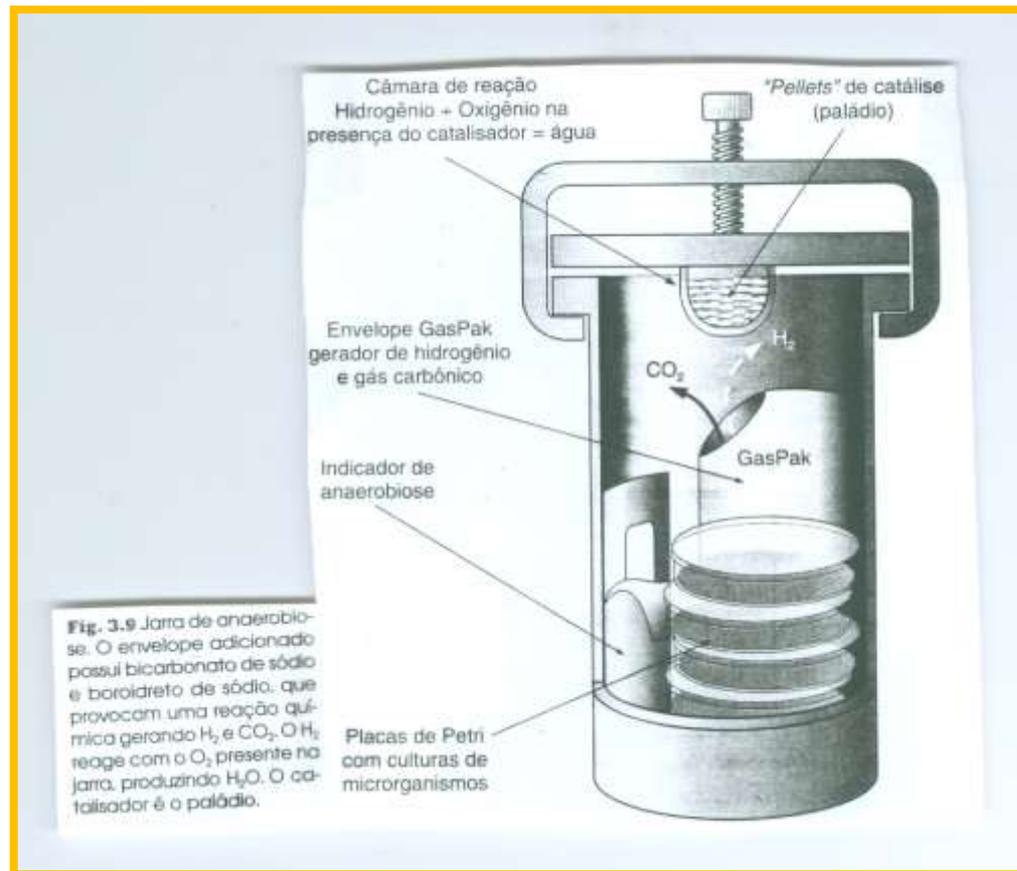
Quadro 3.4 Classificação das bactérias em relação ao oxigênio

Grupo	Aerobiose	Anaerobiose	Efeito do oxigênio
Aeróbico obrigatório	Cresce	Não cresce	Requerido (acceptor final de elétrons na respiração aeróbica)
Microaerófilo	Cresce pouco	Não cresce	Requerido em níveis abaixo de 0,2 atm
Anaeróbico obrigatório*	Não cresce	Cresce	Tóxico
Facultativo	Cresce	Cresce	Não é requerido, mas, quando disponível, é utilizado
Anaeróbico aerotolerante**	Cresce	Cresce	Não é requerido nem utilizado

*Não usam o oxigênio como nutriente por ser tóxico para eles. Realizam respiração anaeróbica, fermentação, fotossíntese bacteriana ou metanogênese.

**Crescem fazendo exclusivamente fermentação, que é indiferente ao O_2 .

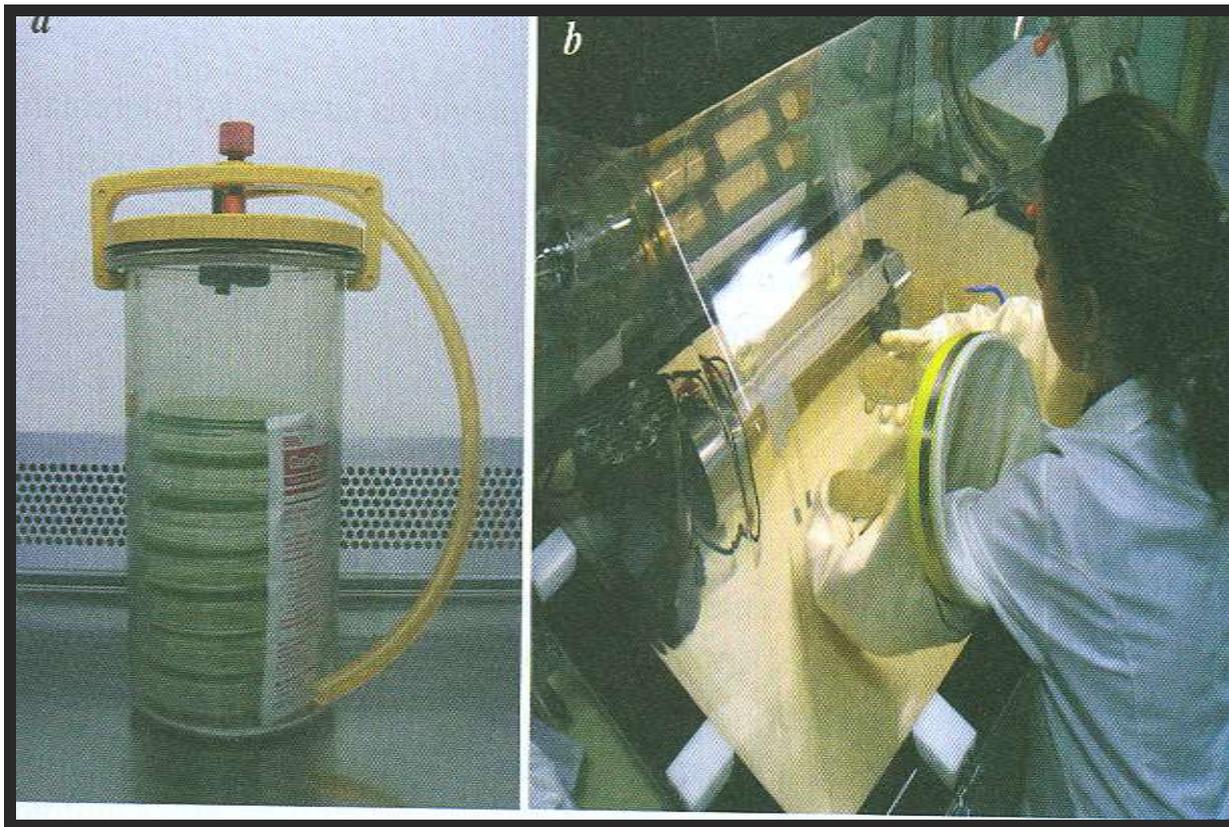
GARRAFA DE ANAEROBIOSE



GARRAFA DE ANAEROBIOSE



GARRAFA DE ANAEROBIOSE



Profa Dra Maria Bernadete de Medeiros

CULTIVO SOB CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE



(a)

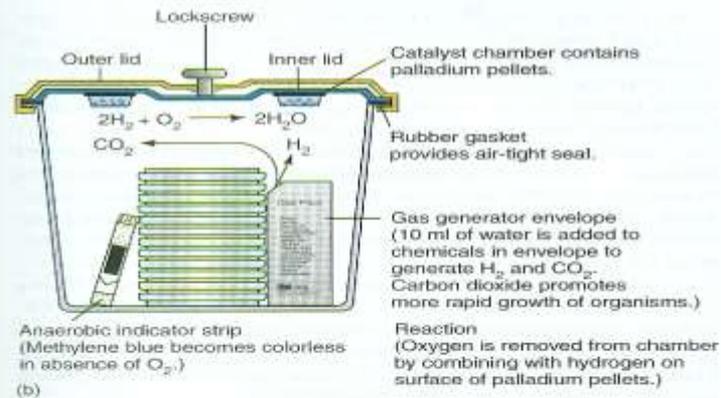


FIGURE 7.11

Culturing techniques for anaerobes. (a) A special anaerobic environmental chamber makes it possible to handle strict anaerobes without exposing them to air. It also has provisions for incubation and inspection in a completely O_2 -free system. (b) The anaerobic jar, or CO_2 incubator system. To create an anaerobic environment, a packet is activated to produce hydrogen gas, and the chamber is sealed tightly. The gas reacts with available oxygen to produce water. Carbon dioxide can also be added to the system for growth of capnophiles.

FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO CELULAR

- FATORES FÍSICOS

pH DO MEIO DE CULTIVO

PRESSÃO OSMÓTICA

TEMPERATURA

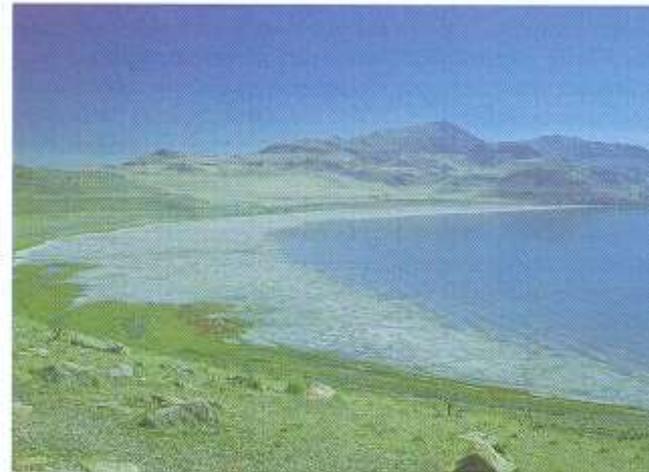
O valor do pH no sistema

- Acidez ou alcalinidade de um meio é expresso em termos de pH
- pH ótimo é o pH no qual o microrganismo cresce melhor
- ACIDÓFILOS → pH 0,1 a 5,4
- NEUTRÓFILAS → pH 5,4 a 8,5
- ALCALÓFILOS → pH 7,0 a 11,5

PRESSÃO OSMÓTICA



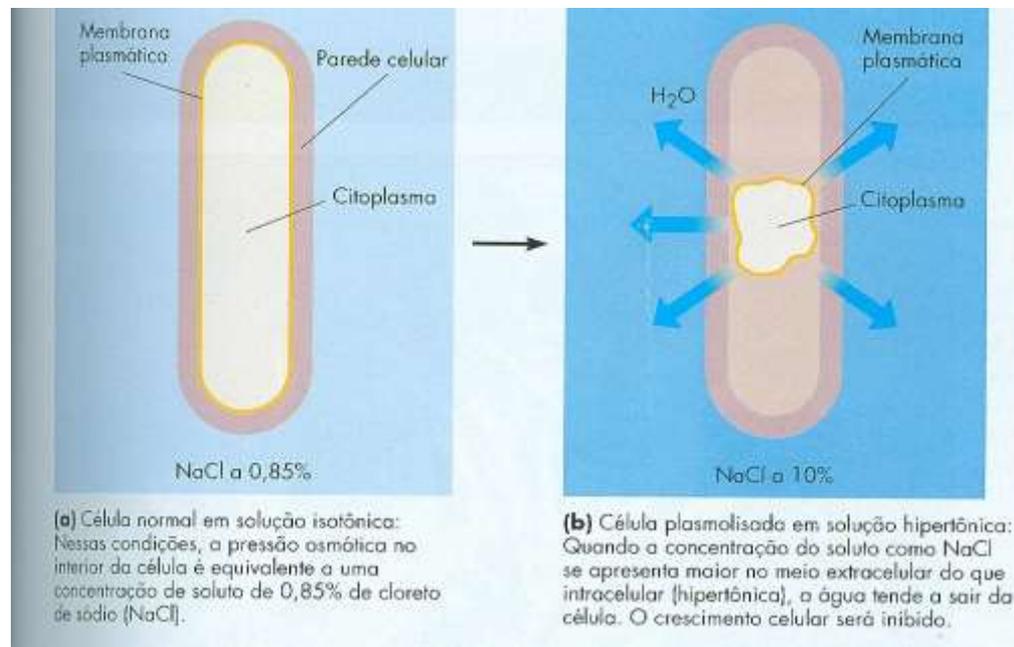
(a)



(b)

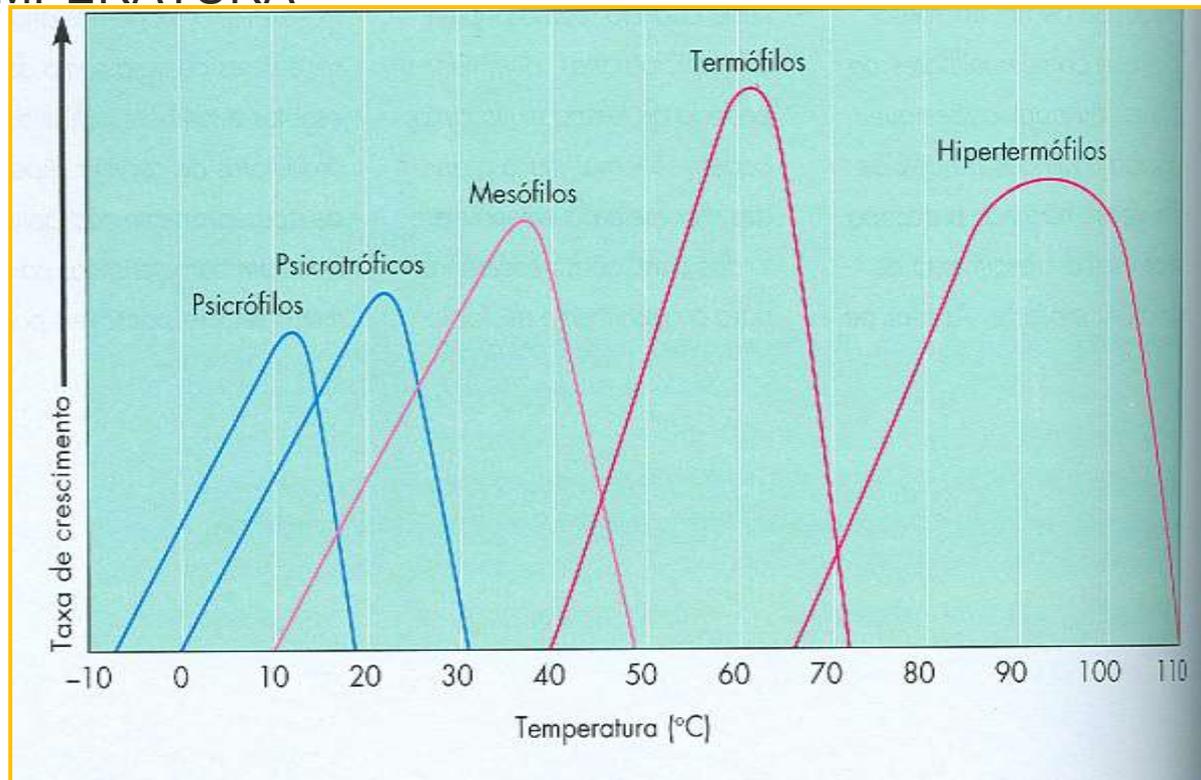
➤ **Fig. 6.16 Respostas ao sal.** (a) As taxas de crescimento dos organismos halofílicos (organismos que gostam do sal) e não-halofílicos estão relacionadas à concentração do íon sódio. (b) O Grande Lago Salgado (*Great Salt Lake*), em Utah, um exemplo de ambiente onde se desenvolvem organismos halofílicos. Observe as áreas brancas de sal seco às margens do lago.

PRESSÃO OSMÓTICA

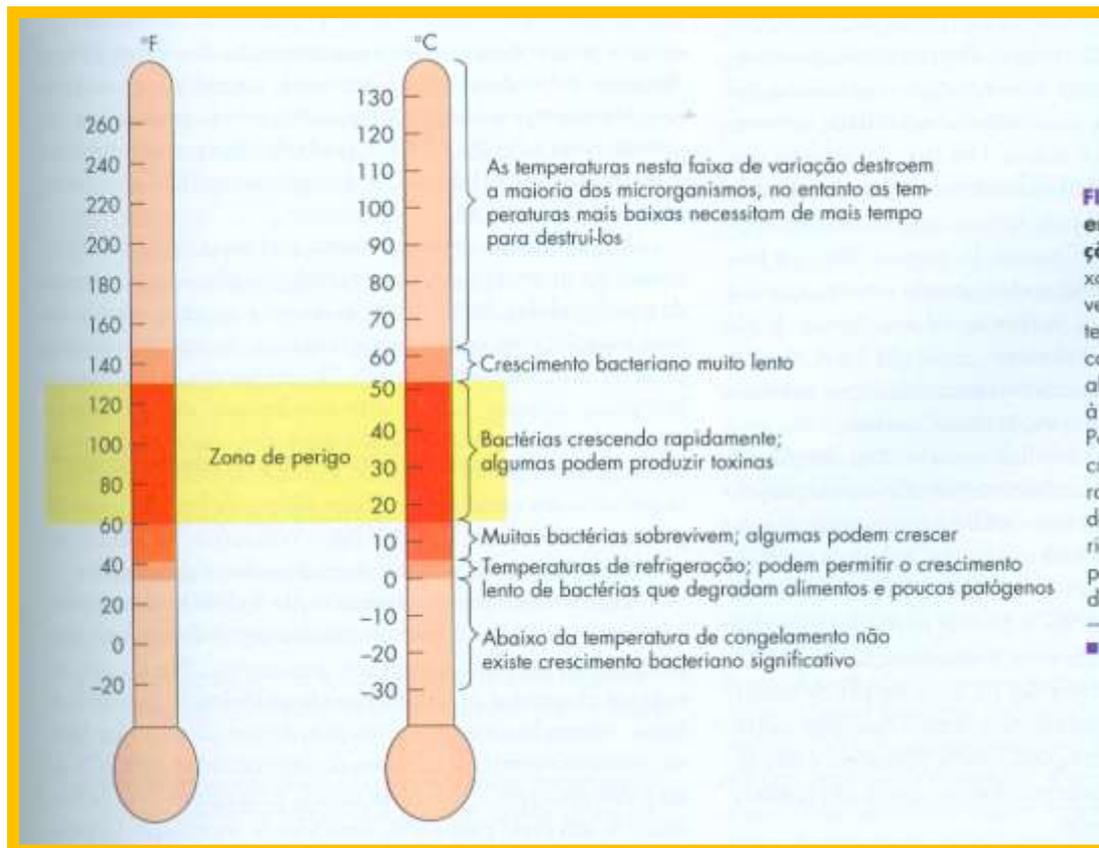


CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

- CURVAS DE CRESCIMENTO EM RESPOSTA A VARIAÇÃO DA TEMPERATURA



TEMPERATURA



Profa Dra Maria Bernadete de Medeiros