

# Crescimento Microbiano

# Fatores que influem no crescimento

---

- Temperatura
- pH
- Oxigênio
- Agitação
- Pressão osmótica

# Temperatura

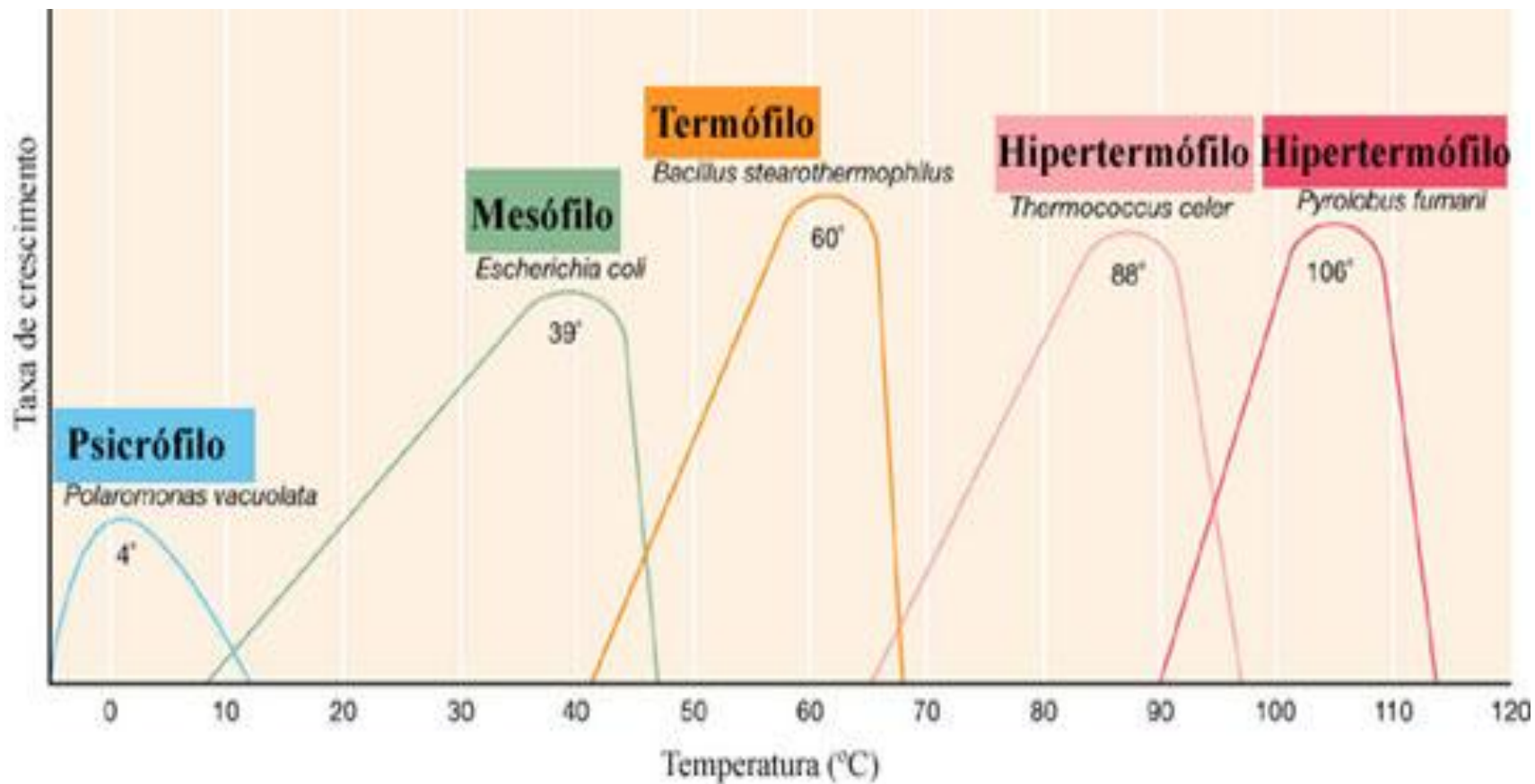
---

Para todos os microrganismos existem três temperaturas cardeais:

- Temperatura mínima – abaixo do qual não há crescimento.
- Temperatura máxima – acima do qual não há crescimento.
- Temperatura ótima – onde o crescimento é máximo.

Os microrganismos são classificados em três grupos principais considerando as variações de temperatura de crescimento:

- Psicrófilos (criófilos) – ótimo se localiza em torno de 10°C. (0-20°C)
- Mesófilos – ótimo se localiza entre 20 e 40°C. (20-50°C)
- Termófilos – ótimo se localiza em torno de 60°C. (40-70°)



# pH

---

Como a temperatura, existe uma faixa de valor de pH ótimo, máximo e mínimo para o crescimento dos microrganismos.

Bactérias – pH 6,5 – 7,5

Fungos – pH 5 e 6

Exceção é o *Thiobacillus thiooxidans*, transforma enxofre em ácido sulfúrico, pH 1.

Os microrganismos cultivados em laboratório com frequência produzem ácidos que podem interferir no seu próprio crescimento.

Para neutralizar os ácidos e para a manutenção do pH normalmente são incluídos tampões químicos no meio de crescimento.

As peptonas e os aminoácidos podem, em alguns meios agir como tampões, grande parte dos meios contém sais de fosfato para manutenção do pH.

# Oxigênio

---

O efeito da variação na quantidade disponível de oxigênio se faz sentir no crescimento de microrganismos aeróbios é facultativos.

Aeróbios – rendimento da cultura

Facultativos – velocidade de crescimento e produtos

As necessidades são providas por borbulhamento de ar e/ou agitação.

O metabolismo aeróbio é muito mais eficiente, favorece o rápido crescimento da cultura.

A via aeróbia tem geralmente como produtos finais do metabolismo  $\text{CO}_2$  e água.

A via anaeróbia, fermentativa, tem como produtos finais produtos orgânicos que variam de acordo com o microrganismo empregado e que, na maioria das vezes inibem o crescimento microbiano.

# Agitação

---

Promove:

- Uma melhor aeração do meio
- Homogeneização dos nutrientes no meio
- Dispersão de metabólicos

# Pressão Osmótica

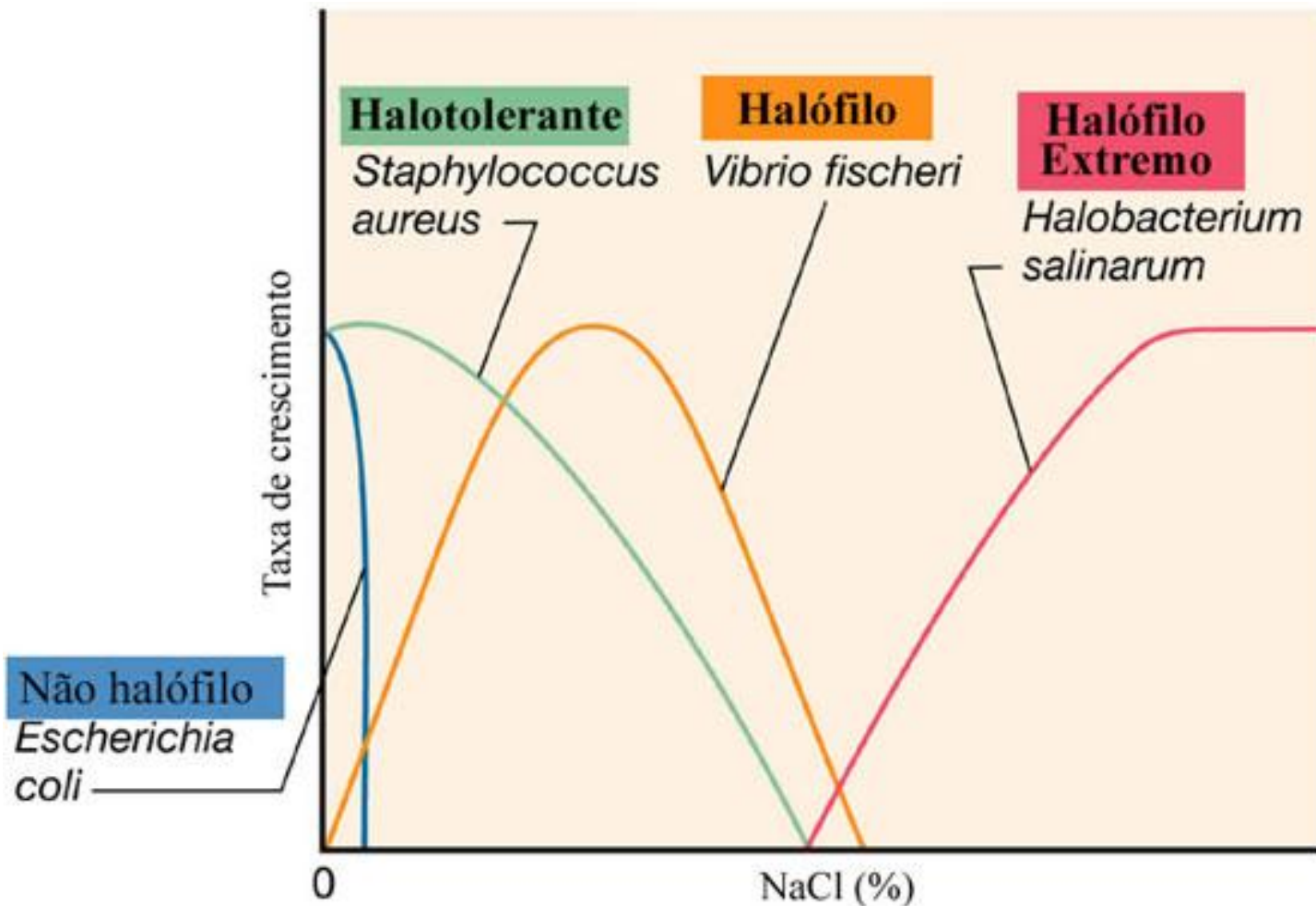
---

Os microrganismos necessitam de água para crescimento e seu conteúdo celular é de 80 a 90 %.

A alta concentração de solutos – **solução hipertônica** – causa a **plasmólise** ou encolhimento da célula, inibindo o crescimento.

Alguns organismos chamados **halófilos extremos** necessitam de aproximadamente 30% de sal para crescerem.

Halófilos facultativos são mais comuns e crescem em concentrações de até 2% de sal.



Classes de organismos, em relação à salinidade

# Medidas de crescimento

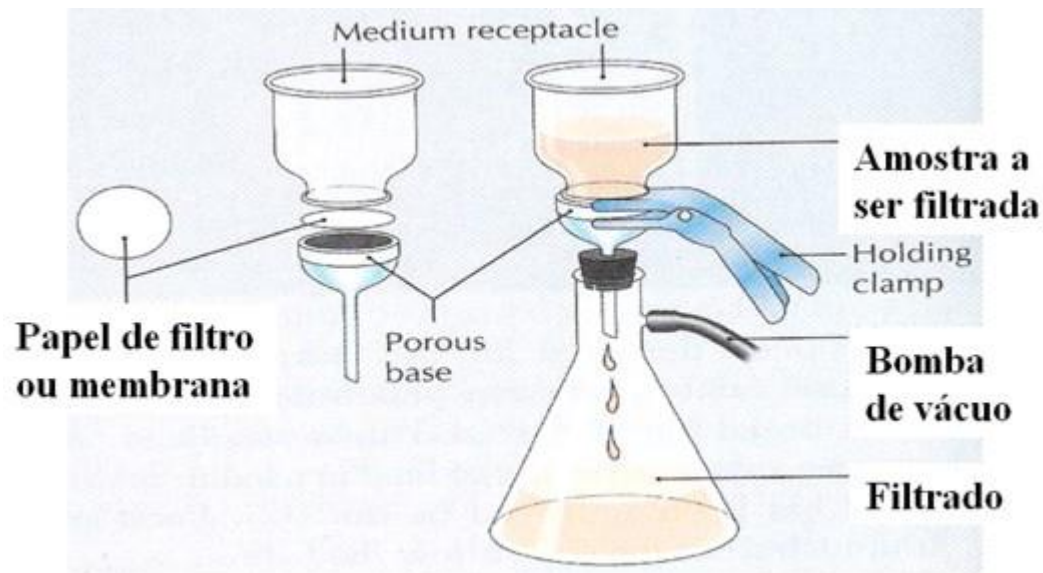
---

Em microbiologia, o termo crescimento refere-se a um aumento do número de células e não ao aumento das dimensões celulares.

Geralmente o que se mede é o crescimento de uma população, exprimindo-se em termos de massa total ou em função do número de indivíduos.

## Determinação do peso seco

Constitui o processo básico de medida de massa, servindo de referência na padronização de outros métodos.



## Determinação do peso seco

$$X = \frac{m_2 - m_1}{V}$$

Onde:

$m_2$  = massa da membrana com a biomassa, no final do experimento, após secagem.

$m_1$  = massa da membrana, no início do experimento.

$V$  = Volume da amostra utilizada na filtração.

O material centrifugado ou papel de filtro contendo microrganismos é seco em estufa até peso constante.

No processo por centrifugação são necessárias amostras relativamente grandes para que as medidas tenham significado.

A lavagem das células antes da secagem pode levar a perda de material e componentes celulares solúveis podem ser retirados.

O processo não pode ser aplicado quando o meio de cultura contém partículas sólidas em suspensão.

## Determinação química dos componentes celulares

É possível calcular a massa microbiana pela dosagem de certos componentes celulares, como proteínas e ácidos nucléicos.

Aplicável a amostras pequenas.

Inconveniente da composição celular variar com as condições de crescimento.

Usado para o processo em estado sólido como estimativa do crescimento.

# Turbidimetria

Consiste na medida da turvação de uma suspensão microbiana.

Quantificação em espectrofotômetro ou colorímetro a 660 nm.

Tal metodologia requer a confecção de uma curva padrão.

É menos sensível mas, é de rápida e fácil execução, não destruindo a amostra.

Entretanto, não permite a determinação de células viáveis.

# Contagem de microrganismos viáveis

## Contagem de colônias após espalhamento em placa

É o método mais utilizado para contagem de bactérias e leveduras.

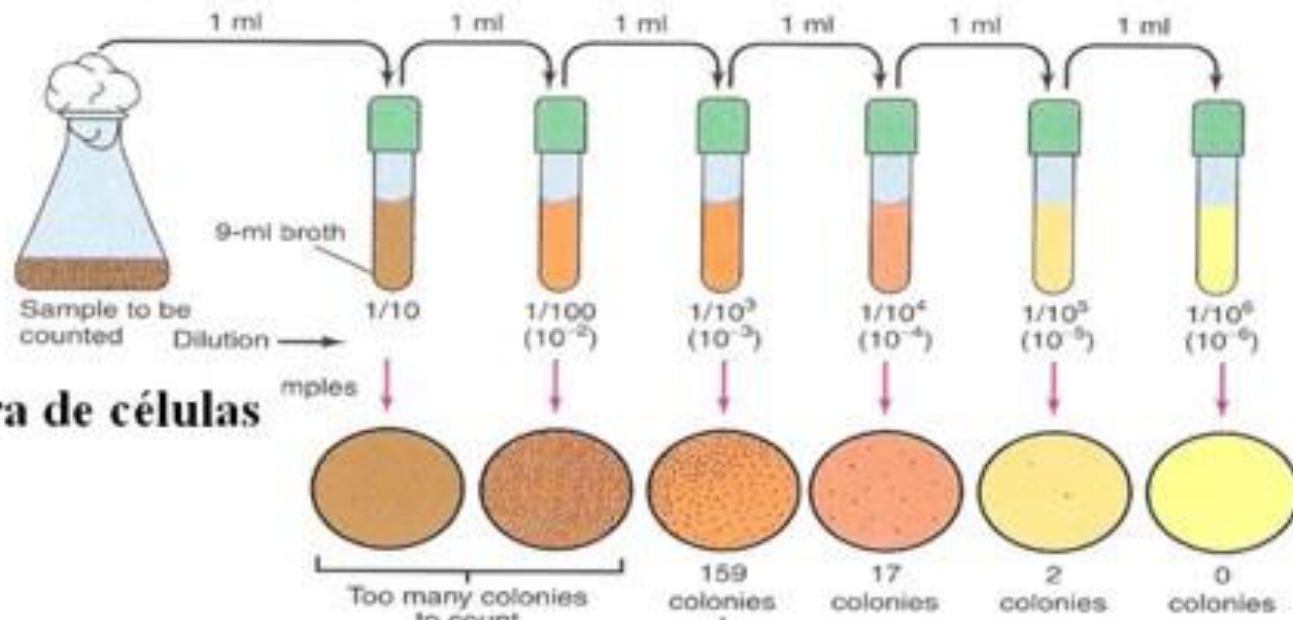
São feitas diluições adequadas da suspensão, geralmente em água destilada estéril ou solução salina isotônica (NaCl 8,5g/L), semeando-se alíquotas na superfície de meios sólidos.

Após um período de incubação, conta-se as colônias que cresceram.

Se o espalhamento foi bem feito cada colônia corresponde a uma bactéria (UFC), usa a diluição feita para calcular o número de bactérias ou leveduras vivas presentes na suspensão original.

O número de colônias estatisticamente válido é de 20 a 200 para uma placa de 9 cm de diâmetro.

## Diluições seqüenciais por transferências de 1 ml das células para 9 ml de meio



Tapete de células  $\times 10^3$  Dilution count factor =  $1.59 \times 10^5$  Cells (colony-forming units) per milliliter of original sample

## Método do Número Mais Provável (N.M.P)

Após diluição, inocula-se uma série de 3, 5 ou 10 tubos com volume conhecido.

Depois da incubação, anota-se o número de tubos que apresentam turvação (crescimento) ou não para cada diluição.

A proporção de tubos turvos e não turvos em cada diluição inoculada está relacionado com o número de organismos vivos.

O cálculo é obtido a partir dos resultados obtidos na prática recorrendo a tabelas adequadas.

# Método do Número Mais Provável (N.M.P)

**Leitura:** Tabela estatística para combinações de 3 tubos



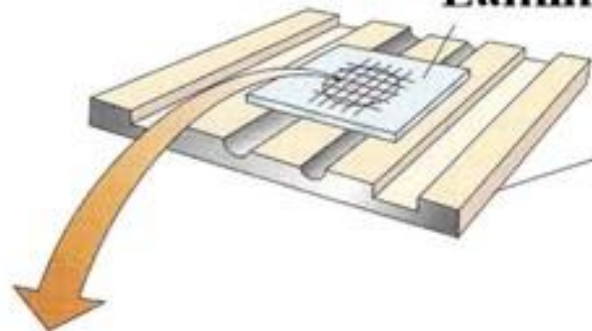
Número de tubos cujo crescimento é visível para cada quantidade do produto sob exame			Número Mais Provável de microrganismos / mL	Limite NMP	
0,1 mL /tubo	0,01 mL /tubo	0,001 mL /tubo		Inferior	Superior
0	0	0	<3	-	-
0	0	1	3	<0,5	9
0	1	0	3	<0,5	13
1	0	0	4	0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	50	4800
3	3	3	>2.400	-	-

## Contagem do número total de indivíduos

Colocar diluições conhecidas da suspensão em câmara de contagem e, sob o microscópio, contar diretamente o número de partículas presentes num determinado volume.

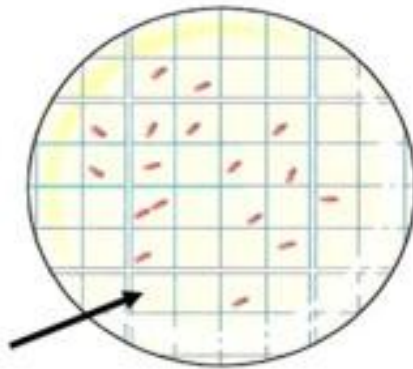
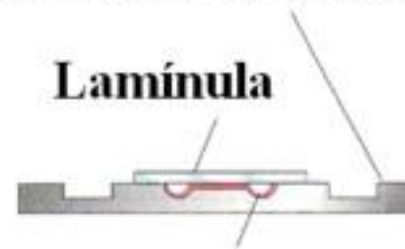
Sabendo-se a área de campo, calcula-se o número na suspensão.

**Lamínula**



**Detalhes da parte lateral da câmara de Neubauer**

**Lamínula**

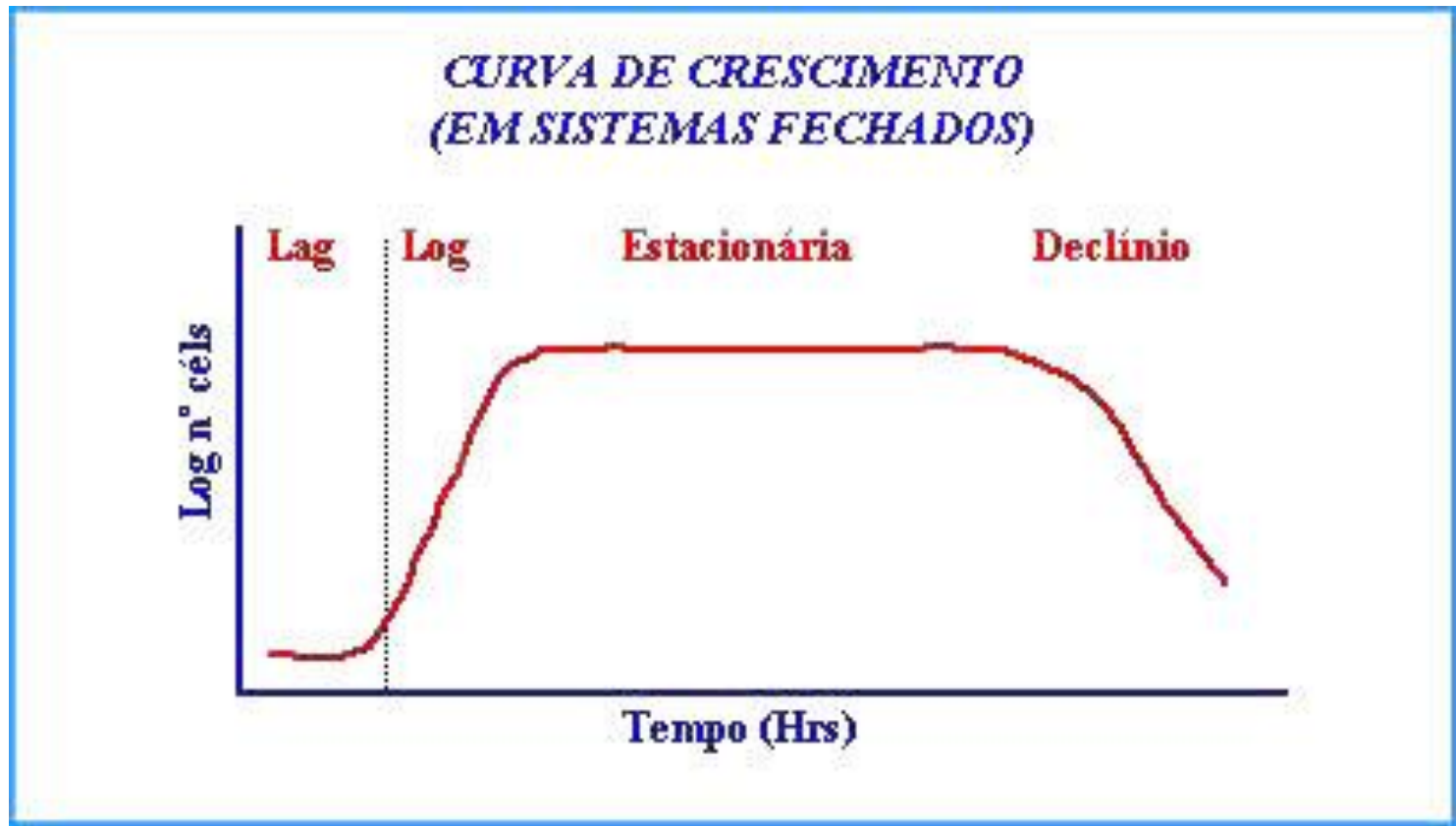


# Fases do Crescimento Microbiano

Numa cultura descontínua, as condições não permanecem ideais por muito tempo.

A quantidade de nutrientes começa a diminuir e produtos do metabolismo microbiano vão se acumulando.

Essas modificações influem sobre o crescimento dos microrganismos.



**Curva de Crescimento Padrão, em um sistema fechado**

## Fase “lag”

Fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultura.

Não há reprodução celular.

A duração desta fase varia com o tamanho do inóculo, com a idade das células e com seu estado bioquímico.

Sendo **X** a concentração celular e **t** o tempo de cultivo, a velocidade de crescimento (g/L.h):

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

## Fase de crescimento exponencial “log”

A quantidade de nutrientes é superior às necessidades do microrganismo.

Ainda não se acumulou uma quantidade significativa de substâncias tóxicas no meio.

A velocidade de reprodução celular atinge o máximo, e é constante.

Varia de acordo com o microrganismo e as condições de cultivo.

Tratando-se de bactérias, certas algas unicelulares e algumas leveduras que se multiplicam por divisão binária, temos

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

N é o número de microrganismos ao fim de n divisões (ou gerações) e  $N_0$  é o número inicial.

Aplicando logaritmos, temos

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

O número de gerações será:

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

A velocidade exponencial de crescimento,  $R$ , é expressa pelo número de gerações na unidade de tempo:

$$R = \frac{n}{t - t_0} = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2 (t - t_0)}$$

A recíproca de R é o tempo de geração:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{t - t_0}{n}$$

Estas equações só se aplicam a microrganismos que se dividem binariamente e com 100% de viabilidade

No caso mais geral:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Ou seja, a velocidade de crescimento é proporcional à concentração de microrganismos num instante dado.

$\mu$  é a velocidade específica de crescimento.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

Integrando temos,

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t$$

Ou

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t$$

Fase mais importante do crescimento  
microbiano.

Nela é possível estudar a influência de uma  
série de fatores, analisando as modificações  
introduzidas na curva de crescimento e na  
composição do meio de cultura.

## Fase estacionária

O número de indivíduos novos é igual ao número de indivíduos que morre.

As causas na parada de crescimento podem ser o acúmulo de metabólitos tóxicos, o esgotamento de nutrientes e o esgotamento de  $O_2$ .

## Fase de declínio

Depois de certo tempo, o número de organismos que morre torna-se maior aos dos que surgem.

Eventualmente a cultura se esteriliza.

Como as demais fases, a duração é extremamente variável.

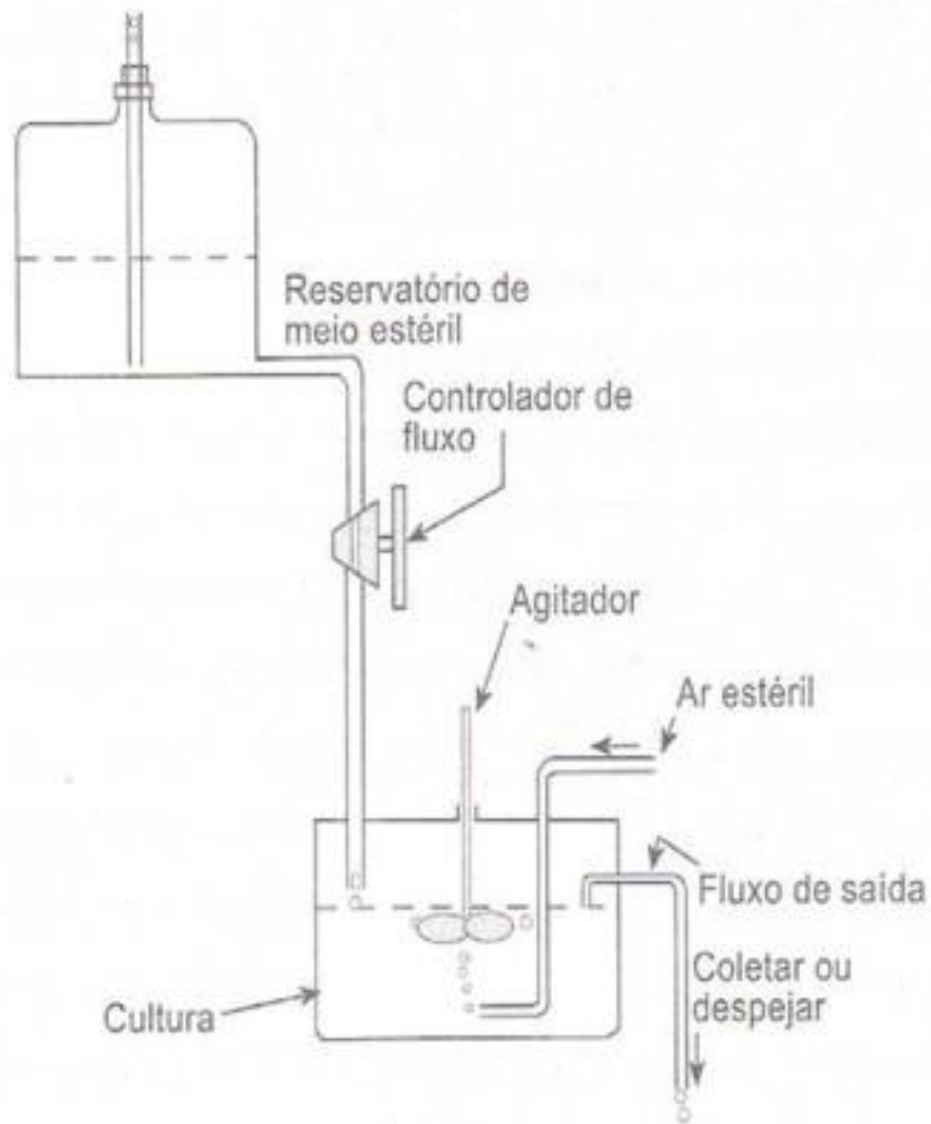
# Cultivo Contínuo

---

Descontínuo – o meio não é renovado, as condições variam de forma progressiva.

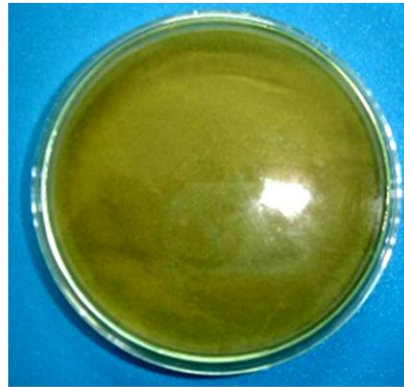
Contínuo - todos os parâmetro se mantêm constantes ao longo do cultivo.

No cultivo contínuo novo meio é adicionado constantemente ao sistema, do qual se retirar um volume correspondente.



# Produção de celulases por *Trichoderma reesei* RUT C30 em meio com lactose

## ➤ Microrganismo



*Trichoderma reesei* RUT C 30

## ➤ Meio de manutenção do microrganismo (BDA)

Composição	Concentrações(g/L)
Extrato de Batata	200
Glicose ou Dextrose	20
Ágar	15

## ➤ Pré-inóculo

*Meio Xiong – 200 rpm, 30°C, 36 horas*



---

## Meio Xiong

---

Reagentes	(g/L)
Lactose	30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
CaCl <sub>2</sub>	0,8
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,6
Peptona	0,75
Extrato de levedura	0,30
Tween 80	0,2mL/L
Solução estoque*	10 mL/L

---

---

## Solução estoque

---

Reagentes	(g/L)
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,16
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,14

---

## ✓ Cultivos em Biorreator de Bancada



## Condições de Cultivo

Agitação= 500 rpm

Tempo= 72 horas

pH= 5,0

Aeração= 2 vvm

Fontes de carbono= lactose

Biorreator de bancada instrumentado  
(Bioflo 110, New Brunswick Scientific)



Sistema usado para determinar biomassa

