

MICROBIOLOGIA FUNCIONAL (2019-2020)

DOCENTE RESPONSÁVEL PELA UC: Catarina Prista
DOCENTES PRÁTICA: Catarina Prista



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa

U LISBOA | UNIVERSIDADE
DE LISBOA

MICROBIOLOGIA FUNCIONAL

**TRABALHOS PRÁTICOS
(MÓDULO DE CRESCIMENTO E STRESS)**

TP 3.1	DETERMINAÇÃO DA TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>
--------	--

	Introdução
--	-------------------

O estudo do crescimento de leveduras e bactérias, nomeadamente a nível industrial, obriga a recorrer a métodos expeditos de avaliação quantitativa de populações microbianas.

Entre estes, os mais vulgarizados são, sem dúvida os métodos colorimétricos e turbidimétricos. Em primeira aproximação todos eles se baseiam na lei de Lambert-Beer, que mostra que quando um feixe de luz incidente atravessa uma suspensão de microrganismos ocorre a diminuição da sua intensidade, a qual é proporcional, dentro de certos limites, à concentração de células em suspensão. Mas esta linearidade só se mantém dentro de certos limites, para concentrações de células relativamente baixas (até $DO(640nm) = 0,5$).

Neste trabalho prático vamos usar a determinação da Densidade óptica da cultura para seguir o crescimento de uma população de leveduras a duas temperaturas diferentes. Vamos também estabelecer a relação existente entre a absorvância, a 640 nm, de suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae* e número de células totais/mL e número de unidades formadoras de colónias/mL.

Meios de cultura

Os meios condicionam o crescimento dos microrganismos, não só em termos de limitação ou de estímulo, mas também na expressão de certos caracteres fenotípicos, o que se reveste de evidente importância para a descrição de microrganismos. A capacidade e velocidade de multiplicação, a biomassa que atingem, o metabolismo que realizam e os metabolitos que produzem, a forma como interagem com os restantes microrganismos, o seu aspecto micro e macromorfológico, tudo é determinado pelo meio de cultura!

Não é pois de estranhar que a escolha do meio de cultura para cultivar os

microrganismos que queremos analisar seja um aspecto determinante de todo o trabalho futuro, não só para podermos garantir que observamos os microrganismos de interesse de forma fiável e que mais nos interessa mas também para garantir que estes estão a realizar o tipo de metabolismo correto. Através de diferentes meios de cultura é ainda possível identificar aspectos metabólicos, morfológicos e estruturais, importantes.

Para garantir que os microrganismos de interesse se multiplicam no meio de cultura é necessário que este tenha na sua composição todos os nutrientes indispensáveis, sob forma assimilável pelo organismo em causa.

Em termos muito gerais, poder-se-á dizer que, do ponto de vista qualitativo, qualquer meio de cultura requer uma ou mais fontes de azoto (N), em formas minerais simples, como o anião nitrato (NO_3^-) ou o catião amónio (NH_4^+), ou formas orgânicas complexas, como podem ser aminoácidos, uma ou mais fontes de carbono (C) em forma igualmente variada, os macronutrientes restantes, P, K, S e os micronutrientes (ex. Fe, Mn, Mg, Ca, Na), todos geralmente sob forma de sais minerais e, em maior ou menor extensão, alguns factores de crescimento (ex. vitaminas). Do ponto de vista quantitativo, os nutrientes devem estar presentes em concentrações não tóxicas, mas suficientes para garantir que o crescimento da população ocorra com o tipo de metabolismo pretendido. O crescimento ocorrerá até que um dos nutrientes, considerado limitante para o crescimento, se esgote. Para além disso, os meios podem conter ainda agentes inibidores do crescimento como antibióticos. E pode ainda acontecer que os microrganismos só cresçam em meios naturais ou que simulem estes (caso dos microrganismos patogénicos obrigatórios).

A variação na composição dos meios sugere, desde logo, que eles podem ser muito variados nos tipos e consoante o que pretendemos usar-se meios de um tipo ou de outro.

Os meios de cultura podem ter uma aplicação mais ou menos geral permitindo o cultivo de muitos tipos de microrganismos (meios genéricos), podem ser seletivos impedindo o crescimento de uns tipos e promovendo o crescimento de outros tipos de microrganismos (meios seletivos), ou podem permitir o crescimento de vários tipos de microrganismos mas de forma a que seja possível distinguir claramente os vários tipos de

microrganismos que crescem neles (colónias de cores diferentes por exemplo) (meios diferenciais).

Em relação à composição do meio é ainda possível distinguir aqueles em que a composição do meio em termos de cada um dos seus componentes (fonte de C, fonte de azoto, fontes de oligoelementos, etc) não é exatamente conhecida (meios complexos) e aqueles meios em que se sabe exatamente que e em que quantidade se colocaram todos os componente (meios de composição definida). Para além deste temos ainda os meios artificiais e os meios naturais (normalmente meios complexos).

Para além de diferirem em termos de composição, os meios podem ter estados físicos diferentes e isso também é alvo de escolha em função do que queremos observar. Os meios de cultura podem ser líquidos (caldos), sólidos (adicionados de 15-20 g de agar/L) ou semi-sólidos (adicionados de 10 g de agar/L).

Determinação da taxa específica de crescimento

Consideremos um meio de cultura líquido, num recipiente com agitação, com uma adequada fonte de energia, os nutrientes necessários, condições físicas e químicas favoráveis e sem inibidores. Se nele inocularmos uma população viável de microrganismos ocorrerá, ao fim de algum tempo, crescimento da população. Se construirmos um gráfico semi-logarítmico tendo por ordenadas uma medida linear da densidade populacional (como é, na maioria dos casos e dentro de certos limites, a densidade óptica da cultura) e por abcissas o tempo que decorre o crescimento, obter-se-á uma curva que mostra as várias fases do crescimento (Fig. 1).

Como se pode observar, a maior parte do crescimento da população é representado por uma recta, podendo traduzir-se pela equação:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu_c t \quad (1)$$

em que: x_t = densidade populacional ao fim do tempo t

x_0 = densidade populacional

μ_c = constante de proporcionalidade

Como se pode observar nas figs. (1a e 1b), na zona linear da curva de crescimento, μ_c , para além de constante, atinge o valor máximo, donde $\mu_c = \mu_{m\acute{a}x}$.

Quando a concentração de um nutriente essencial diminui a ponto de se tornar limitante do crescimento, μ_c decresce de $\mu_{m\acute{a}x}$ até zero, atingindo-se, então a fase estacionária. De um modo geral este decréscimo é muito rápido devido às elevadas densidades populacionais e às baixas concentrações do nutriente limitante.

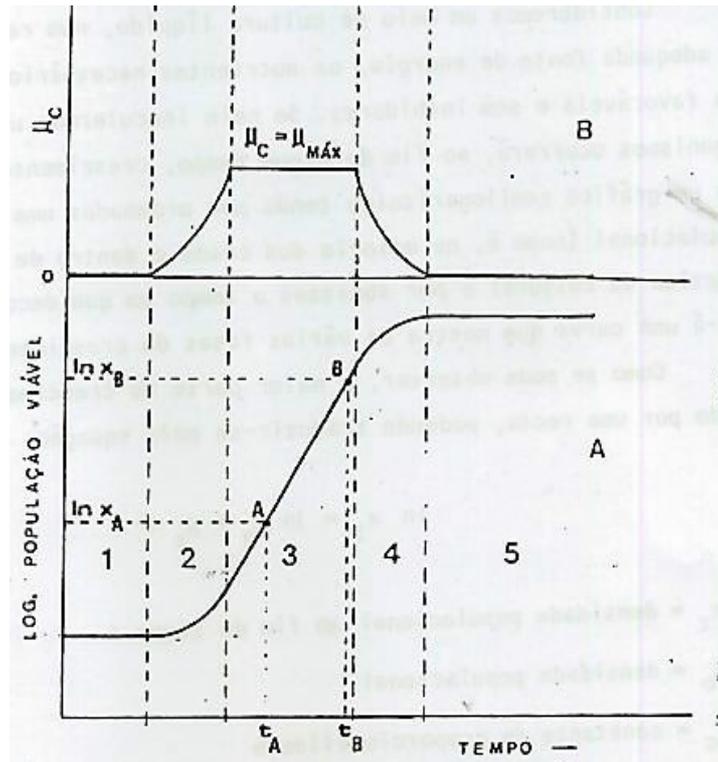
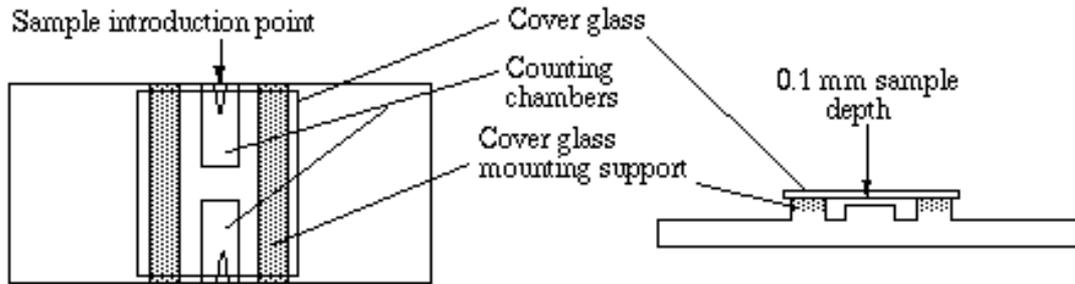


Fig1. (A) Curva de crescimento de uma população microbiana (B) Variação da taxa específica de crescimento ao longo da curva de crescimento

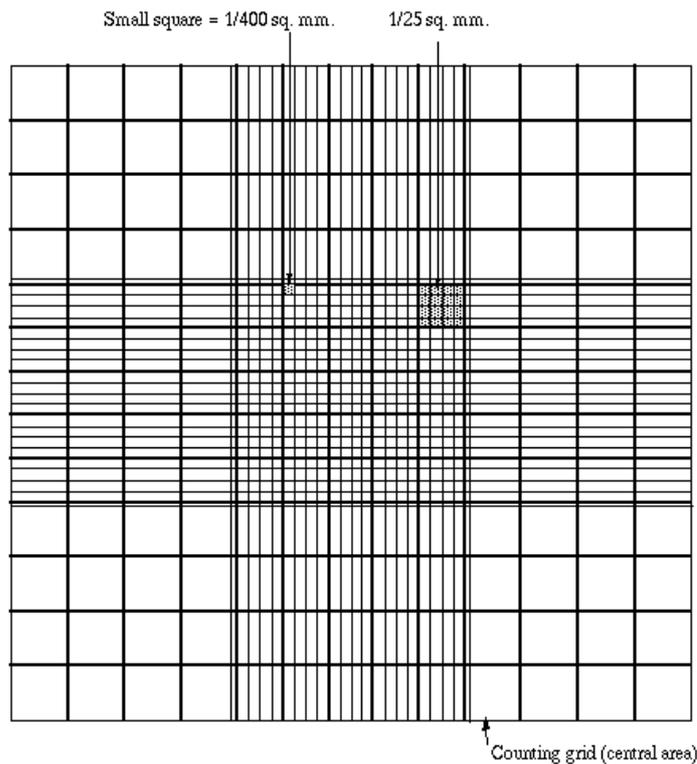
Determinação do número total de células

A contagem do número de células totais numa suspensão faz-se utilizando um hemocítmetro.

(<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>)



To prepare the counting chamber the mirror-like polished surface is carefully cleaned with lens paper. The coverslip is also cleaned. Coverslips for counting chambers are specially made and are thicker than those for conventional microscopy, since they must be heavy enough to overcome the surface tension of a drop of liquid. The coverslip is placed over the counting surface prior to putting on the cell suspension. The suspension is introduced into one of the V-shaped wells with a pasteur or other type of pipet. The area under the coverslip fills by capillary action. Enough liquid should be introduced so that the mirrored surface is just covered. The charged counting chamber is then placed on the microscope stage and the counting grid is brought into focus at low power.



It is essential to be extremely careful with higher power objectives, since the counting chamber is much thicker than a conventional slide. The chamber or an objective lens may be damaged if the user is not careful. One entire grid on standard hemacytometers with Neubauer rulings can be seen at 40x (4x objective). The main divisions separate the grid into 9 large squares (like a tic-tac-toe grid). Each square has a surface area of one square mm, and the depth of the chamber is 0.1 mm. Thus the entire counting grid lies under a volume of 0.9 mm-cubed.

Suspensions should be dilute enough so that the cells or other particles do not overlap each other on the grid, and should be uniformly distributed. To perform the count, determine the magnification needed to recognize the desired cell type. Now systematically count the cells in selected squares so that the total count is 100 cells or so (number of cells needed for a statistically significant count). For large cells this may mean counting the four large corner squares and the middle one. For a dense suspension of small cells you may wish to count the cells in the four 1/25 sq. mm corners plus the middle square in the central square. Always decide on a specific counting pattern to avoid bias. For cells that overlap a ruling, count a cell as "in" if it overlaps the top or right ruling, and "out" if it overlaps the bottom or left ruling.

Here is a way to determine a particle count using a Neubauer hemocytometer. Suppose that you conduct a count as described above, and count 187 particles in the five small squares described. Each square has an area of 1/25 mm-squared (that is, 0.04 mm-squared) and depth of 0.1 mm. The total volume in each square is $(0.04) \times (0.1) = 0.004$ mm-cubed. You have five squares with combined volume of $5 \times (0.004) = 0.02$ mm-cubed. Thus you counted 187 particles in a volume of 0.02 mm-cubed, giving you $187 / (0.02) = 9350$ particles per mm-cubed. There are 1000 cubic millimeters in one cubic centimeter (same as a milliliter), so your particle count is 9,350,000 per ml.

Cells are often large enough to require counting over a larger surface area. For example, you might count the total number of cells in the four large corner squares plus the middle combined. Each square has surface area of 1 mm-squared and a depth of 0.1 mm, giving it a volume of 0.1 mm-cubed. Suppose that you counted 125 cells (total) in the five squares. You then have 125 cells per 0.5 mm-cubed, which is 250 cells/mm-cubed. Again, multiply by 1000 to determine cell count per ml (250,000).

Sometimes you will need to dilute a cell suspension to get the cell density low enough for counting. In that case you will need to multiply your final count by the dilution factor. For example, suppose that for counting you had to dilute a suspension of *Chlamydomonas* 10 fold. Suppose you obtained a final count of 250,000 cells/ml as described above. Then the count in the original (undiluted) suspension is $10 \times 250,000$ which is 2,500,000 cells/ml.

	Objetivos
--	------------------

- Observar a curva de crescimento de uma levedura numa cultura em batch e a variação da concentração de glucose.
- Determinar a taxa específica de crescimento máxima da cultura.

- Determinar a relação entre DO e número total de células/mL e entre DO e UFC/mL.

	Material
--	-----------------

Material Biológico

- Suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* ISA1000 cultivadas em glucose em fase exponencial de crescimento.

Soluções e reagentes

- Meio YPD

Material de laboratório e equipamento

- Vortex
- Cuvettes
- Espectrofotómetro
- Pipetas de 1000uL, 200uL, 20uL e 10uL
- Pontas azuis, amarelas e brancas
- Placas de Petri
- Água desmineralizada estéril
- Espalhadores em L
- Hemocitómetro

	Procedimento experimental
--	----------------------------------

Preparação da suspensão de células

1. Cultive a estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* ISA1000 em meio YPD com glucose 2%(p/v) como fonte de carbono e energia, a 28°C com agitação, até fase exponencial de crescimento DO 1-2.

Curva de crescimento

1. Acertar as temperaturas do banho-maria a 30°C e a 35°C e aguardar a sua estabilização;
2. Introduzir os balões com o meio de crescimento no banho-maria para equilíbrio térmico;

3. Medir a densidade óptica da cultura fornecida (*Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000) a 640nm, usando água desmineralizada como branco;
4. Com base no valor medido da D.O., diluir convenientemente para o balão com 200 ml de meio fresco de modo a obter uma D.O. 0,15 e começar a contar o tempo (tempo zero);
5. Retirar de imediato a primeira amostra (cerca de 2 ml) e ler a absorvância a 640nm.
6. Para cada tempo, retirar também uma amostra de 100 μ l para contagem ao microscópio e para plaqueamento à superfície.
7. Tirar amostras (fazendo leituras imediatas da densidade óptica) de 60 em 60 minutos, durante 6 horas. Usar pipetas esterilizadas.

Determinação do número total de células com um hemocitómetro (não se realizará)

1. Preparar o hemocitómetro para contagem, colocando a lamela sobre a base na zona da grelha
2. Usar a amostra de 100 μ l que recolheu (se necessário diluir a amostra 1:10). Adicionar 100 μ l de azul de metileno aos 100 μ l de suspensão. Incubar 15 minutos.
3. Numa das grelhas, colocar uma gota de suspensão não diluída junto à borda da lamela e deixar a suspensão entrar preenchendo a câmara de contagem.
4. Realizar o mesmo procedimento na segunda grelha com uma suspensão diluída 1:10.
5. Contar o número total de células nos 25 quadrados da grelha (assinalado com um traço mais grosso na figura acima). Caso tenha um número muito elevado de células contar apenas 5 quadrados na diagonal. (pode tirar uma foto e contar depois)

Determinação do número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) (não será realizado)

1. Diluir a cultura até 10^{-4} , 10^{-5} ou 10^{-6} de acordo com as instruções dadas para cada ponto de amostragem.
2. Para três diluições consecutivas (de acordo com as indicações dadas para o ponto de amostragem) plaquear 100 μ l para cada placa (fazer um duplicado) e espalhar com vareta de vidro dobrada em L.

Registos (para cada temperatura)

Horas	Tempo (h)	Diluiç.	Absorv. medida (DO _{640nm})	Absorv. real (DO _{640nm})	Diluiç.	Contagem N ^o cél totais/ 0,1mm ³	N ^o cél totais/ mL	Contagem N ^o cél totais/ 0,1mm ³	Contagem N ^o cél azuis/ mL

3. Construir um gráfico, em papel semi-logarítmico, colocando em ordenadas a densidade óptica e em abcissas o tempo.

4. Fazer os cálculos ao n^o de células totais/mL e ao n^o de células viáveis/mL. Representar no mesmo gráfico.

	Temas de Discussão
--	---------------------------

1. Como explica a duração da fase “lag” ?
2. Qual o tempo de duplicação das células em cada caso?
3. Como explica as diferenças entre a absorvância e nº células viáveis/mL?
4. Estabeleça um protocolo de ensaio para estudar a influência de um agente químico sobre a $\mu_{\text{máx}}$.

	ANEXOS
--	---------------

Composição do meio de cultura GYP (Glucose - Yeast extract - Peptone)

Componente	g/l
Extrato de levedura	5
Peptona	5
Glucose	20

(completa-se o volume a 1 l com água destilada ou desionizada. Para maiores ou menores volumes, ajustam-se as respectivas quantidades.)

O meio é autoclavado durante 15 minutos a 121 °C. O pH do meio GYP é de aproximadamente 6,46. No caso de se necessitar de preparar meio GYP sólido, adiciona-se 20 g/l de agar-agar.

Use of Extracellular Acidification for the Rapid Testing of Ethanol Tolerance in Yeasts

J. Jiménez

Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Sevilla,
Apto 1095, Sevilla, Spain

N. van Uden*

Laboratory of Microbiology, Gulbenkian Institute of Science, 2781 Oeiras
Codex, Portugal

Accepted for publication February 12, 1985

The overall kinetics of the inhibition by ethanol of growth and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts is composite and depends on the contribution of a number of underlying inhibitory mechanisms (for a review, see van Uden¹). Among these, the interference of ethanol with membrane-bound processes plays a dominant role, including the exponential enhancement of thermal death² and of passive proton influx,³ and the exponential noncompetitive inhibition of the transport of glucose,⁴ maltose,⁵ ammonium,⁶ and amino acids.⁷ The exponential constant of ethanol-enhanced passive proton diffusion across the plasma membrane of yeast can be estimated rapidly and easily. It occurred to us that this might constitute a rapid method for the preliminary evaluation of ethanol tolerance in yeasts, such as would be convenient to use when large numbers of mutant and other strains have to be screened. To test its feasibility we verified, using a number of strains, whether a correlation existed between the values of the exponential constant (k) of ethanol-enhanced proton influx and the ethanol concentration (K_i) that reduced the specific growth rate by 50%.

MATERIAL AND METHODS

Information on the 11 yeast strains used in the study is listed in Table I. The strains were grown with magnetic stirring at 25°C in thermostated Erlenmeyer flasks containing a liquid medium of the following composition: glucose, 2%; yeast extract, 0.5%; peptone, 1%; with or without added ethanol.

The specific growth rates were calculated in the usual way from the linear parts of semilog plots of the optical densities of samples against the sampling times. To estimate K_i , the concentration of ethanol

that reduced the specific growth rate by 50%, growth experiments were performed using batteries of flasks containing the above medium to which ethanol had been added to final concentrations of 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, and 10% (v/v). Estimates of K_i were obtained by visual inspection of plots of the specific growth rates against ethanol concentrations. The K_i values finally retained were averages of from three to five sets of experiments done with each strain (Table I).

For estimating k , the exponential constant of ethanol-enhanced proton diffusion, the yeasts were grown in 500 ml medium into early stationary phase, centrifuged, washed twice with distilled water, and resuspended in 10 ml distilled water. Of this suspension, 0.5 ml was placed in a 20-ml glass vial together with 0.5 ml of a 20% glucose solution and distilled water with or without ethanol at the desired concentration to a total volume of 4.5 ml. The ethanol concentrations used were 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, and 10% (v/v). The vials were screw-capped and incubated at 25°C with mechanical shaking during 75 min, after which the pH was measured with a standard pH meter PHM62 (Radiometer, Copenhagen).

In preliminary experiments done with all strains using the pH meter connected to a flat-bed recorder LKB 6500, it was established that after 75 min the final pH values were stable while glucose was still present ensuring active proton efflux (without which the pH would start to rise again).

RESULTS AND DISCUSSION

For determining the exponential enhancement constants of proton influx, the following relations were used.³ When yeast cells are suspended in water containing glucose, protons are extruded and the extracellular pH drops to a final value following a char-

* To whom all correspondence should be addressed.

Table I. Yeast strains: identity, origin, and parameters of ethanol toxicity.

Serial number	Strain	Species	Origin	K_i^* (M)	k^\dagger (M ⁻¹)
1	IFI 256	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wine from Galicia, Spain	1.24 (0.08)	0.55 (0.998)
2	IFI 82	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wine from Andalusia, Spain	1.13 (0.10)	0.80 (0.951)
3	ACA 4	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Grape must from Extremadura, Spain	1.22 (0.07)	0.83 (0.999)
4	ACA 174	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grape must from Andalusia, Spain	1.37 (0.09)	0.26 (0.967)
5	RBV-DSA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Meiotic product of a distillery strain	1.26 (0.11)	0.59 (0.995)
6	K5-SA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Genetic strain	0.96 (0.10)	1.01 (0.990)
7	FIF 414	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	Flor of Sherry wine from Andalusia, Spain	1.50 (0.08)	0.15 (0.862)
8	X30-36	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Genetic strain	0.96 (0.16)	0.70 (0.963)
9	FSP 6	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	Meiotic product of strain 7	1.37 (0.06)	0.45 (0.976)
10	FXH 1	hybrid	8 × 9	1.16 (0.15)	0.51 (0.921)
11	IGC 3507	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Respiration-deficient mutant	1.26	0.55 (0.991)

* This is the concentration of added ethanol that reduced the specific growth rate by 50% (standard deviation in parentheses).

† This is the exponential constant of ethanol-enhanced proton diffusion across plasma membrane (correlation coefficient from linear regression).

acteristic acidification curve. At the final pH value the active extrusion of protons is balanced by passive proton influx. Ethanol exponentially enhances the diffusion constant of the proton influx:

$$C_X = C_0 e^{kX} \quad (1)$$

where C_X and C_0 are the values of the diffusion constants at concentration X and 0 of ethanol, respectively, and k is the exponential enhancement constant. Consequently, ethanol increases the final pH value according to

$$\text{pH}_f = \log_{10} C_0 - \log_{10} k_p + kX \log_{10} e \quad (2)$$

where k_p is the rate of active proton extrusion. Under the condition that $(\log_{10} C_0 - \log_{10} k_p)$ is a constant or nearly so over the range of experimental pH_f values, eq. (2), if valid, should be linear and estimates of k may be obtained from the slope (for a more detailed theoretical treatment see Leão and van Uden³).

In 10 of the 11 strains the relations between final pH and ethanol concentrations were indeed linear with correlation coefficients ranging from 0.951 to 0.999, while in strain 7 the linear fit was poorer (correlation coefficient 0.862). Using eq. (2), estimates for k were calculated from the slopes of the regression lines (Table I).

As is shown in Fig. 1, the relationship in the 11 strains between K_i (concentration of added ethanol that reduces the specific growth rate by 50%) and k (exponential constant of ethanol-enhanced proton dif-

fusion) was roughly linear (correlation coefficient of 0.848).

We conclude that it is worthwhile to determine k with the rapid method described above when large numbers of strains have to be screened and that the values obtained provide preliminary information on the probable effects of ethanol on growth. Whether a similar correlation applies to other toxic effects of ethanol on yeasts remains to be seen.

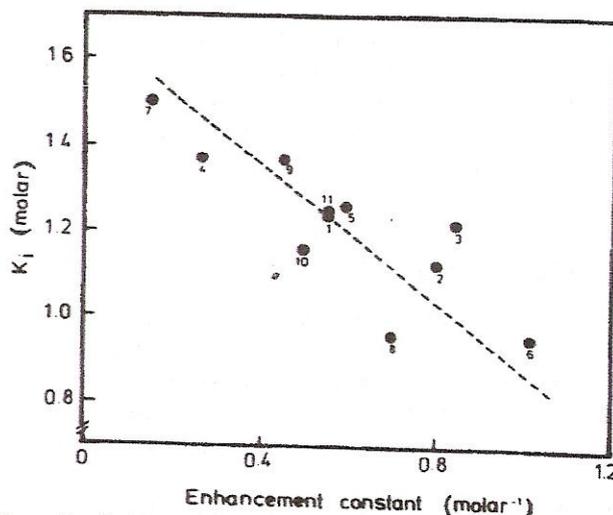


Figure 1. Relations between K_i (concentration of added ethanol that reduced the specific growth rate of yeast growth by 50%) and k (the exponential constant of ethanol-enhanced proton diffusion across the yeast plasma membrane). Numbers refer to yeast strains as listed in Table I.

References

1. N. van Uden, *Ann. Rep. Ferment. Proc.*, **8**, in press (1985).
2. C. Leão and N. van Uden, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1581 (1982).
3. C. Leão and N. van Uden, *Biochim. Biophys. Acta*, **774**, 43 (1984).
4. C. Leão and N. van Uden, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2601 (1982).
5. M. C. Loureiro-Dias and J. M. Peinado, *Biotechnol. Lett.*, **11**, 721 (1982).
6. C. Leão and N. van Uden, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2085 (1983).
7. C. Leão and N. van Uden, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 403 (1984).

	Temas de Discussão
--	---------------------------

O artigo descreve um método rápido para testar rapidamente a tolerância ao etanol de estirpes de leveduras.

1. De acordo com os autores, quais são importantes mecanismos de inibição de leveduras pelo etanol?
2. Na prática em que consiste o método?
3. Qual é o efeito do etanol que está na base do método?
4. Prepare uma tabela com os volumes de cada solução a pipetar para cada frasco, de forma a reproduzir as condições indicadas no artigo.
5. Sugira um protocolo que permita avaliar o efeito da temperatura na tolerância ao etanol.
6. No artigo o método descrito foi validado por comparação com outro método? Qual foi esse método? Qual dos dois será mais apropriado para avaliar uma grande quantidade de estirpes?