

Aula Prática 07: MEDIDAS DE CRESCIMENTO BACTERIANO – CURVA DE CRESCIMENTO

A. Relação entre turvação e contagem em placas

• **Etapas realizadas antes da aula (ver esquema na última página)**

- 1) Uma colônia isolada de *E. coli* foi inoculada em 10 mL de meio Caldo Nutritivo ontem às 18 h (**Pré-inóculo 1**).
- 2) Hoje, 1 mL do pré-inóculo 1 foi transferido para 9 mL de Caldo Nutritivo às 9:30 h (**Pré-inóculo 2**).
- 3) Às 11:30 h, 1 mL do pré-inóculo 2 foi transferido para 9 mL de Caldo Nutritivo (**Pré-inóculo 3**).

• **Etapas a serem realizadas durante a aula (ver esquema na última página)**

- 4) Inocule 1 mL do pré-inóculo 3 de *E. coli* em um tubo contendo 20 mL de Caldo Nutritivo estéril. Agite bem o frasco para homogeneizar o meio com o inóculo.
- 5) A partir do cultivo de 20 mL, realize **rapidamente** os seguintes procedimentos:
 - A) Coloque 1 mL na cubeta;
 - B) Coloque 100 µL em um tubo contendo 900 µL de solução salina estéril (diluição 1:10 ou 10^{-1}).
- 6) Após retirar os volumes pedidos, retorne **imediatamente** o tubo do cultivo de 20 mL à incubação a 37 °C, 150 rpm, por 30 min.
- 7) Utilize a amostra que está na cubeta para realizar a leitura de densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 600 nm. Utilize 1 mL de Caldo Nutritivo estéril para “zerar” o espectrofotômetro. Complete o valor de DO na tabela da página seguinte (item “B”).
- 8) A partir do tubo com a solução 10^{-1} , transfira 100 µL para um tubo com 900 µL de solução salina estéril (diluição 1:100 ou 10^{-2}); repita esse procedimento realizando de duas a cinco diluições (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). Para saber o número de diluições a ser feito a cada tempo, consulte a tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Número de diluições a ser feito a cada tempo amostrado.

Tempo (min)	Diluições a serem feitas
0	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (4)
30	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (5)
60	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (5)
90	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (6)
120	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} (7)
150	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} (7)
180	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} (7)
210	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} (7)

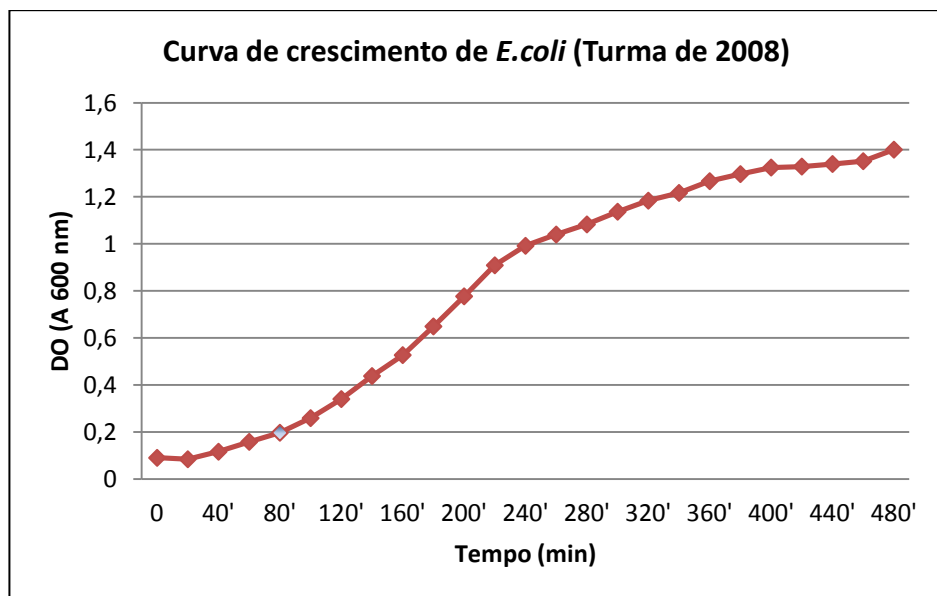
- 9) Com uma caneta, divida o fundo de uma placa de Ágar Nutritivo em 4 regiões.
- 10) Em cada quadrante da placa, distribua 6 microgotas equidistantes (de 5 µL cada) correspondentes às **quatro últimas** diluições. **Atenção:** Misture bem o conteúdo de cada tubo antes de retirar cada alíquota. Identifique a placa com o tempo de análise, as diluições plaqueadas e o grupo.
- 11) **Repita as etapas de 5 a 10 a cada 30 min, até completar 210 min do início do experimento.**
- 12) Incube todas as placas (8 placas) a 37 °C por 16 h.

B. Análise dos resultados

- 1) Conte as colônias formadas em cada microgota nas placas. Para isso, escolha a diluição que apresentar as microgotas com colônias distintas e em número que seja possível realizar a contagem. Faça a média do número de colônias das 6 microgotas e preencha os espaços em branco da tabela abaixo.

Tempo (min)	DO ($A_{600\text{ nm}}$)	Média do número de colônias das 6 microgotas							UFC/mL
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
0									
30									
60									
90									
120									
150									
180									
210									

- 2) Calcule o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL, em cada tempo. Neste cálculo, considere o volume da microgota e a diluição escolhida. Complete a tabela.
- 3) Faça as seguintes representações da curva de crescimento:
- DO x UFC/mL
 - Tempo x DO. Nesse gráfico, identifique as fases do crescimento bacteriano.
 - Tempo x UFC/mL. Nesse gráfico, identifique as fases do crescimento bacteriano.
- 4) Caso a curva tempo x UFC/mL apresente uma fase log definida, calcule o tempo de geração (TG) e a velocidade específica de crescimento (μ). Compare a curva obtida pelo seu grupo com a da figura abaixo (dados obtidos na aula da turma de 2008, nas mesmas condições de cultivo e incubação), quanto aos valores de TG e μ , justificando as possíveis diferenças encontradas.



Equações

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

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

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{0,301}$$

N= número final de células

N_0 = número inicial de célula

n= número de gerações

$$TG = \frac{t}{n}$$

g= tempo de geração

t= tempo de crescimento

n= número de gerações,

$$\mu = \frac{\ln 2}{tg} = 0,693/tg \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

- 5) Observe o esquema da última página e comente sobre a função dos pré-inóculos realizados e como o número de pré-inóculos pode interferir no padrão de uma curva de crescimento.

Esquema: Montagem do experimento para determinação da curva de crescimento de *E. coli*

