

MICROBIOLOGIA

BÁSICA

Dra. Angela Adamski da Silva Reis
Dr. Rodrigo da Silva Santos



R375m Reis, Angela Adamski da Silva; Santos, Rodrigo da Silva
Microbiologia básica / Angela Adamski da Silva; Rodrigo da Silva Santos.
– Aparecida de Goiânia: Faculdade Alfredo Nasser, 2016.

80p. Inclui Bibliografia.

ISBN: 978-85-68122-09-9

I. Microbiologia. II. Bacteriologia. III. Micologia. IV. Virologia. V.
Microbiologia ambiental. VI. Ciências biológicas. VII. Ciências médicas.
CDU: 579.2

FACULDADE ALFREDO NASSER (FAN)

Diretor Geral

Prof. Alcides Ribeiro Filho

Diretor Acadêmico

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicchiatti

Diretor de Relações Institucionais

Prof. Luiz Antonio de Faria

Diretor de Desenvolvimento

Prof. Divino Eterno de Paula Gustavo

EXPEDIENTE

Coordenadora de Pesquisa

Prof^ª. Dr^ª. Sabrina Fonseca Ingênilo Moreira Dantas

Organizador da 2^a edição

Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos

Editora-chefe

Prof^ª. Dr^ª. Michele Giacomet

Editor-assistente

Prof. M. Sc. Frederico Henrique Galves Coelho da Rocha

Editor de layout e diagramação

Cleyton Nascimento

Microbiologia Básica

Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis

Docente e Pesquisadora do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal de Goiás (ICB-UFG)

Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos

Pesquisador do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal de Goiás (ICB-UFG)
Docente da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN)

**Brasil
2016**

Prefácio

O livro Microbiologia Básica é uma obra que apresenta o fascinante mundo dos microrganismos de forma didática, clara e objetiva, em linguagem e abordagem de fácil acesso ao público que visa um melhor conhecimento sobre os microrganismos e sua contribuição para a vida humana. O livro demonstra a importância destes seres microscópicos na manutenção dos ecossistemas, na biotecnologia e na engenharia genética pela produção de diversas substâncias de importância para a população em geral, na proteção dos seres humanos pela sua presença na microbiota normal, e também no desencadeamento de diversos processos infecciosos que acarretam lesões nos seres humanos. A apresentação das principais técnicas utilizadas no isolamento e identificação de microrganismos, bem como as atividades propostas pelos autores para que os leitores possam aplicar o conhecimento adquirido denotam a importância dessa obra para a capacitação de estudantes e profissionais das Ciências Biológicas e da Saúde.

*Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres
Departamento de Morfologia
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade Federal de Sergipe (UFS)*

Sumário

INTRODUÇÃO

O que é Microbiologia? 04

UNIDADE 1

Bacteriologia 08

UNIDADE 2

Micologia 52

UNIDADE 3

Virologia 63

UNIDADE 4

Microbiologia Ambiental 78

O QUE É MICROBIOLOGIA?

A Microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos, sejam eles eucariontes unicelulares, multicelulares ou procariontes, e acelulares como os vírus. Os microrganismos refletem imensa diversidade biológica e desempenham funções importantes na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biológicos. Os microrganismos marinhos e de água doce constituem a base da cadeia alimentar nos oceanos, nos lagos e rios. Já os microrganismos do solo auxiliam na degradação de detritos e na incorporação de nitrogênio da atmosfera em compostos orgânicos, reciclando, de modo geral, os elementos químicos do solo. Apesar de grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos.

Com as grandes descobertas científicas desencadearam-se cronologicamente um processo contínuo evolucionista da ciência. Inúmeros pesquisadores se dedicaram à busca dos agentes etiológicos e a identificação dos seus ciclos de transmissão. A microbiologia tem vivido grandes avanços nas últimas décadas tanto em área de atuação, métodos e técnicas, como também no número de profissionais que a ela começaram a se dedicar a partir do século XIX, em função das descobertas de Leeuwenhoek (1632-1723), Robert Kock (1635-1703) e Louis Pasteur (1822-1895).

A industrialização e a expansão das cidades, com a absorção da população dos campos, inicialmente na Europa, criaram condições propícias para a expansão de novas doenças epidêmicas, como a tuberculose, que tornou-se a primeira causa de morte de adultos jovens na passagem do século XX. As precárias condições de trabalho e moradia dos trabalhadores nas indústrias e a falta geral de saneamento das cidades foram fatores determinantes para ocorrência de doenças e mortes.

Tendemos associar estes seres microscópicos com doenças graves. No entanto, os microrganismos contribuem em aplicações comerciais, como na produção de compostos químicos, tais como a acetona, álcoois, e drogas, como antimicrobianos. Destaca-se também a contribuição na manutenção do equilíbrio entre os organismos vivos pela cadeia alimentar. A microbiota do solo, por exemplo, auxilia na degradação de detritos e na incorporação de nitrogênio da atmosfera e compostos orgânicos, reciclando, desse modo, elementos químicos do solo, da água e do ar. Certos tipos de microrganismos possuem papel essencial no processo de fotossíntese. Nos seres humanos, a microbiota intestinal, por exemplo, auxilia na digestão e na síntese de muitas vitaminas, incluindo as vitaminas B, para o metabolismo, e a vitamina K, para a coagulação. Neste contexto, podemos compreender a importância da microbiologia para a formação de todos os profissionais das áreas de ciências biológicas e da saúde. Os capítulos a seguir irão introduzir o assunto no âmbito da bacteriologia, micologia e virologia.

UNIDADE 1: BACTERIOLOGIA

1.1. ANATOMIA DAS CÉLULAS PROCARIÓTICAS

As bactérias (procariotos) são organismos simples, que apresentam uma única célula, cujo material genético não está envolto por uma membrana nuclear. As células procarióticas são envolvidas por uma parede celular que é composta por um complexo denominado de peptidoglicano. A pressão osmótica interna na maioria das bactérias varia de 5 a 20 ATM, devido à concentração de solutos obtida através do transporte ativo. A parede celular protege a célula das alterações adversas do exterior da célula. Na maioria dos ambientes, esta pressão seria suficiente para resultar no rompimento da célula. Assim, a parede celular tem papel fundamental de proteção à célula procariótica.

O peptidoglicano é um polímero complexo constituído de dissacarídeo repetitivo unido por polipeptídeos para formar uma rede que circunda e protege a célula. Moléculas alternadas de N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), parte dissacarídica, são ligadas às cadeias laterais de tetrapeptídeos que consistem em quatro aminoácidos unidos aos NAMs. Alguns peptídeos de uma cadeia estão em ligação cruzada com os da outra cadeia. Como consequência da ligação cruzada, o peptidoglicano possui estrutura bidimensional semelhante a uma "cerca" ligada em cadeia (Figura 1.1).

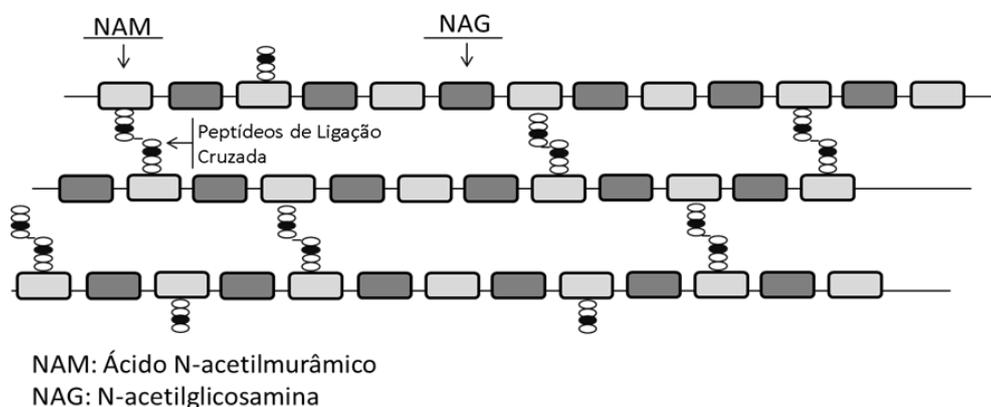


Figura 1.1 - Estrutura do peptidoglicano.

A parede celular devido a suas características químicas é responsável pela classificação das bactérias. Neste contexto, as células procarióticas são classificadas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, classificação esta devido à resposta da parede celular à coloração pelo método de Gram. Este procedimento recebeu o nome do histologista *Christian Gram*, que desenvolveu esta técnica de coloração diferencial na tentativa de corar bactérias em tecidos infectados.

O método da coloração de Gram é crucial em microbiologia, baseado na capacidade de algumas bactérias Gram-positivas de reter o complexo cristal violeta-iodo depois de um tratamento rápido com álcool (bactéria apresentará coloração arroxeada). Já as Gram-negativas não retêm o corante, e é possível aplicar, posteriormente, uma contra coloração com outro corante, normalmente vermelho (bactéria apresentará coloração rosa). Esta distinção está relacionada a diferenças fundamentais na superfície celular dessas duas classes de bactérias (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Procedimento para a coloração de Gram

Coloração de Gram
1. Coloração com cristal violeta (roxo)
2. Tratamento com solução de Iodeto de Potássio
3. Descoramento pelo tratamento com álcool; apenas as células Gram-positivas permanecem roxas
4. Contracoloração com Safranina: as Gram-negativas tornam-se rosa, as Gram-positivas permanecem roxas, pois não foram descoradas na etapa 3

A diferença entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas consiste na característica química da parede celular. A maioria das bactérias Gram-positivas apresentam parede celular com muitas camadas de peptidoglicano, formando uma estrutura espessa e rígida. Diferentemente, as bactérias classificadas como Gram-negativas apresentam parede celular que contém somente uma camada fina de peptidoglicano.

A parede celular das bactérias Gram-positivas contém ácidos teicóicos, que consistem, principalmente, em um álcool (como o glicerol ou ribitol e fosfato), os quais são ligados por pontes fosfodiéster. Existem dois tipos de ácidos teicóicos: ácido lipoteicóico, que atravessa a camada de peptideoglicano e está ligado à membrana plasmática, e ácido teicóico que está ligado ao peptideoglicano (Figura 1.2). Devido à sua carga negativa (dos grupos fosfatos), os ácidos teicóicos podem unir e regular o movimento de cátions (íons positivos) para dentro e para fora da célula. Além disso, assumem papel no crescimento da célula, impedindo a ruptura da parede e lise celular. A característica particular da parede celular de Gram-positivas é que os ácidos teicóicos são responsáveis pela especificidade antigênica, sendo possível identificar tipos bacterianos em testes laboratoriais.

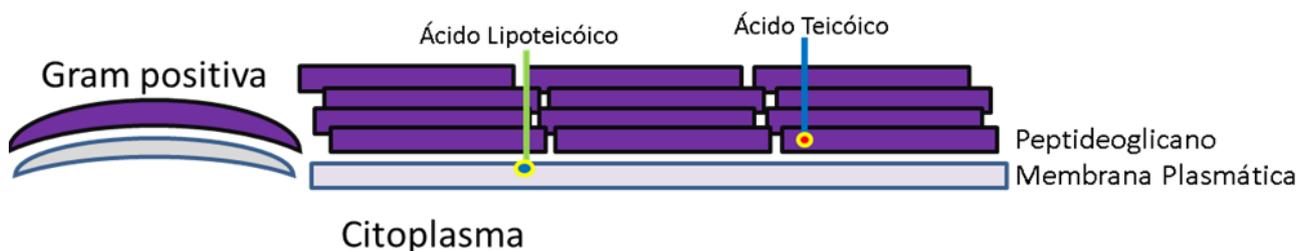


Figura 1.2. Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas.

Nas Gram-negativas a parede celular apresenta uma ou poucas camadas de peptideoglicano e uma membrana externa, desta forma, são susceptíveis ao rompimento mecânico. O peptideoglicano está ligado a lipoproteínas (lipídeos ligados covalentemente a proteína) na membrana externa e está no espaço periplasmático, um espaço cheio de líquido entre a membrana externa e a plasmática. Neste, há alta concentração de enzimas de degradação e proteínas envolvidas no transporte. As paredes celulares de Gram-negativas não contêm ácidos teicóicos.

A membrana externa da célula Gram-negativa consiste de **lipopolissacarídeos** (LPS), lipoproteínas e fosfolipídeos, apresentando fosfolipídeos e proteínas em sua composição química. Os LPS consistem de dois componentes: o **lipídeo A**, um glicolípido composto de dissacarídeos ligados a ácidos graxos de cadeias curtas e grupamento fosfato, com função de endotoxina, causando febre no hospedeiro, e o **antígeno O (polissacarídeo O)**, uma cadeia longa de carboidratos, com quase 40 açúcares de comprimento, que apresenta atividade antigênica, sendo importante também para diferenciar espécies de bactérias Gram-negativas (Figura 1.3).

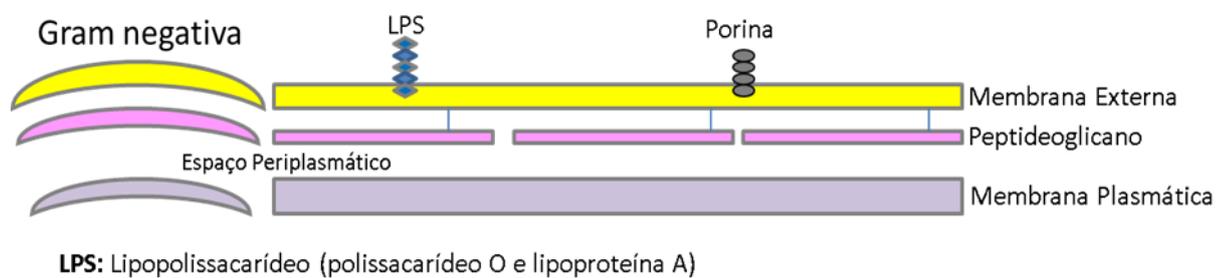


Figura 1.3. Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas

Os **componentes externos à parede celular** são: o **glicocálice** (cápsula), um polímero viscoso e gelatinoso que está situado externamente à parede celular composto por polissacarídeos e polipeptídeos. Sua composição química varia amplamente e é produzido dentro da célula e secretado para a superfície celular; **os flagelos** são longos apêndices filamentosos que propõem as bactérias, tornando-as móveis; **as fímbrias** ocorrem nos polos da célula bacteriana, ou podem prolongar-se por toda superfície da célula auxiliando na colonização; e os **pilis** ou **fímbrias**, associados à aderência bacteriana na preparação para a transferência de DNA de uma célula para outra, responsáveis pela variabilidade genética entre as bactérias.

Quanto aos **componentes internos à parede celular**, podemos descrever a **membrana plasmática** que é fina e situa-se no interior da parede celular, revestindo o citoplasma da célula. Sua composição consiste principalmente de fosfolipídeos e proteínas. Diferentemente, as células

eucarióticas apresentam na composição de sua membrana carboidratos e esteróis, a membrana plasmática das células procarióticas são menos rígidas, com exceção da bactéria *Mycoplasma* que não possui parede celular, e que contém esteróis em sua membrana. A membrana plasmática dos procariotos possui a função de barreira seletiva.

O **citoplasma** é composto por água, contendo principalmente enzimas, carboidratos, lipídeos e íons inorgânicos. Tem como principais estruturas o cromossomo bacteriano e os ribossomos. O cromossomo bacteriano não é circundado por um envelope nuclear e não possui histonas. Acredita-se que as proteínas da membrana plasmática estejam envolvidas no processo de replicação do DNA e na segregação na divisão celular. Além do cromossomo bacteriano, as bactérias, frequentemente, contêm pequenas moléculas de DNA de dupla fita, circulares, denominadas de plasmídeos. Estas pequenas moléculas de DNA são elementos genéticos extracromossômicos. Os ribossomos são responsáveis pela síntese proteica. A célula procariótica contém dezenas de milhares destas estruturas que dão aspecto granular ao citoplasma.

Os endósporos bacterianos são estruturas altamente resistentes associadas ao interior celular. Sendo comuns aos microrganismos que vivem no solo e que precisam adaptar-se a adversidades como: temperatura, radiação, entre outros. A esporulação ocorre em circunstâncias nas quais a sobrevivência da célula é ameaçada, como a inanição para determinados nutrientes ou acúmulo de resíduos tóxicos.

1.1.1. Morfologia Bacteriana

O tamanho, a forma e o arranjo das células bacterianas são importantes para diferenciação entre as espécies. As bactérias possuem as seguintes formas básicas: cocos esféricos, bacilo em forma de bastão e espiral.

Os cocos são normalmente redondos, podendo apresentar-se ovais, alongados ou achatados em uma das extremidades. Quando os cocos se dividem para reproduzir-se, as células podem permanecer unidas umas às

outras. Os cocos que permanecem unidos em pares após a divisão são denominados diplococos, aqueles que se dividem em dois planos e permanecem em grupos de quatro são conhecidos por tétrades, e os que se dividem e permanecem ligados em forma de cadeia são denominados de estreptococos. Os que se dividem em múltiplos planos e formam cachos são os estafilococos e os que formam três planos após a divisão e mantêm-se unidos são conhecidos como sarcina.

Os bacilos da mesma maneira que os cocos se dividem, mas em função ao longo do seu eixo curto, existem menos agrupamentos que os cocos. A maioria dos bacilos apresenta-se isolados. Podendo formar-se em diplobacilos e estreptobacilos, ou ainda podem apresentar-se em formato de cocobacilo.

As bactérias espirais possuem uma ou mais curvaturas. A forma que é semelhante a uma "vírgula" é denominada vibrião. Outra forma é espirilo, que possuem forma helicoidal. Aquelas que apresentam-se em forma de espiral são denominadas de espiroquetas.

Em função da morfologia e das características químicas da parede celular, as bactérias são então classificadas de acordo com suas peculiaridades, como, por exemplo, a bactéria *Staphylococcus aureus*, um coco Gram-positivo grande que cresce em "cachos".

A tabela 1.2. descreve as principais bactérias de interesse médico, classificadas pela coloração de Gram e pela morfologia (características morfo-tintoriais).

Tabela 1.2. Principais bactérias de importância clínica

Cocos * GP	Cocos * GN	Bacilos * GP
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Moxarella catarrhalis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
<i>Staphylococcus sp.</i>		<i>Clostridium sp.</i>

<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Streptococcus canis</i>	** <i>Mycobacterium avium</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	** <i>Mycobacterium bovis</i>
<i>Streptococcus salivarium</i>	** <i>Mycobacterium leprae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	** <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Nocardia asteroides</i>

** Bacilo Álcool Ácido Resistentes (BAAR)

Bacilos * GN

Não- Enterobacteriaceae (bacilos fermentadores)	
Enterobacteriaceae	
<i>Citrobacter sp.</i>	<i>Aeromonas sp.</i>
<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pastereulla multocida</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Morganella morganii</i>	<i>Vibrio sp.</i>
	Não- Enterobacteriaceae (bacilos não-fermentadores)
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Acinetbacter sp.</i>
<i>Salmonella paratyphi A e B</i>	<i>Moraxela sp.</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Cocobacilo * GN

Organismos espiralados

<i>Actinobacillus sp.</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Borrelia sp.</i>
<i>Bartonella bacilliformis</i>	<i>Legionella sp.</i>	<i>Leptospira interrogans</i>
<i>Brucella sp.</i>	<i>Rickettsia sp.</i>	<i>Treponema pallidum</i>

Bordetella sp.
Campylobacter sp.
Haemophilus sp.

Treponema sp.

* GP= Gram positivos; GN= Gram negativos

1.2. METABOLISMO BACTERIANO

1.2.1. Nutrição e metabolismo energético

As bactérias crescem e sobrevivem em diferentes ambientes. Os organismos procariotos necessitam sintetizar seus componentes celulares de forma ordenada para o crescimento bacteriano. A nutrição bacteriana ocorre a partir de reações bioquímicas complexas como as que ocorrem em células eucarióticas de organismo multicelulares, com exceções que podem ser aplicadas na biorremediação, por exemplo: as bactérias que obtêm energia a partir do petróleo, atuando como alternativa no controle da poluição em acidentes com derramamento de petróleo.

As bactérias também possuem uma grande variedade de respostas ao oxigênio, às **aeróbicas estritas**, que necessitam de oxigênio para o crescimento. Podemos exemplificar com o *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo álcool ácido resistente que não é classificado nem como Gram negativa e nem como Gram positiva devido a particularidades em sua parede celular. Este bacilo aeróbico obrigatório obtêm energia a partir da oxidação de muitos compostos simples de carbono.

As **anaeróbicas estritas ou obrigatórias** são bactérias que não utilizam oxigênio para seu crescimento e metabolismo, mas obtêm sua energia das reações de fermentação. Estes organismos exigem uma tensão de oxigênio reduzida para seu crescimento. A espécie *Clostridium botulinum*, responsável pelo botulismo, encontra-se distribuída no meio ambiente. Os esporos conseguem penetrar nos alimentos conservados e enlatados com baixos níveis de oxigênio. As potentes toxinas originadas pelo metabolismo deste micro-organismo podem ser inativadas pelo calor por serem termolábeis. Desta

forma, o alimento em conserva adequadamente aquecido não possui risco de causar botulismo.

A maioria das bactérias que apresentam importância médica crescem tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, estas são chamadas de anaeróbicas facultativas. Podemos incluir como exemplo a *Escherichia coli* e outras bactérias do intestino.

A maioria dos microrganismos oxida carboidratos como sua fonte primária de energia celular. A quebra das moléculas de carboidrato para produzir energia, é, portanto, de grande importância no metabolismo celular. A glicose é a fonte mais comum de energia de carboidrato. Os lipídeos e proteínas também podem ser catabolizados para produção de energia pelas bactérias.

Para produzir energia a partir da glicose, os microrganismos utilizam dois processos gerais: **respiração celular** e **fermentação**. Ambos os processos, geralmente, iniciam-se pela glicólise, mas seguem vias subsequentes diferentes.

A glicólise é a oxidação da glicose em ácido pirúvico com produção de algum ATP e NADH contendo energia. Na respiração celular o produto originado, o ácido pirúvico, é oxidado a acetil Co-enzima A em dióxido de carbono (CO_2) com produção de ATP, NADH contendo energia e um transportador de elétrons reduzido, o FADH_2 . Na cadeia transportadora de elétrons, o NADH e o FADH_2 são oxidados, repassando os elétrons que transportaram do substrato em uma série de reações de óxido-redução.

O estágio inicial da fermentação envolve a glicólise. No entanto, o ácido pirúvico produzido como produto oxidado da glicose é convertido em um ou mais produtos diferentes. Estes podem incluir álcool (etanol) e ácido lático, os quais são usados em larga escala na indústria. Na fermentação não existe o ciclo de Krebs. Assim, a respiração fornece mais energia por molécula de substrato oxidada que a fermentação.

1.2.2. Via de biossíntese do peptidoglicano

A síntese de peptidoglicano começa em etapas de UDP-N-ácido acetilmurâmico-pentapeptídeo no citoplasma. A N-acetilglicosamina liga-se a UDP e, em seguida, é convertida em UDP-ácido acetilmurâmico por

condensação com fosfoenolpiruvato e redução. Os aminoácidos do pentapeptídeo agregam-se de modo sequencial sendo cada adição catalisada por uma enzima diferente, envolvendo cada uma clivagem do ATP em ADP + Pi.

O UDP-N-ácido acetilmurâmico-pentapeptídeo liga-se ao bactroprenol (um lipídeo da membrana celular) e recebe uma molécula de N-acetilglicosamina do UDP. O derivado pentaglicina é formado a seguir, numa série de reações que utilizam glicil-tRNA como doador; o dissacarídeo completo é polimerizado num intermediário oligomérico antes de ser transferido para a extremidade em crescimento de um polímero de glicopeptídeo na parede celular. A ligação cruzada final é efetuada através de uma reação de transpeptidação, em que o grupo amino livre de um resíduo de pentaglicina desloca o resíduo terminal de D-alanina de um pentapeptídeo vizinho.

A via da biossíntese de peptideoglicano é de particular importância na microbiologia médica, pois fornece base para a ação antibacteriana de vários agentes quimioterápicos. Qualquer composto capaz de inibir a etapa da síntese de peptideoglicano provoca a lise celular, apresentando uma ação bactericida.

1.2.3. Regulação das vias metabólicas

Em seu ambiente normal, as células microbianas geralmente regulam suas vias metabólicas de modo que não haja formação de nenhum intermediário em quantidades excessivas. Cada reação metabólica é regulada não apenas no que diz respeito a todas as outras reações na célula, mas também em relação às concentrações de nutrientes no ambiente.

Quando uma fonte esporadicamente de carbono torna-se de repente abundante, as enzimas necessárias para seu catabolismo aumentam tanto na sua concentração quanto na sua atividade; por outro lado, quando uma subunidade se torna subitamente abundante (aminoácido, por exemplo), ocorre diminuição na concentração e na atividade da enzima necessária para a sua biossíntese. Os mecanismos pelos quais regulam a síntese enzimática são compreendidos pela genética bacteriana.

1.2.4. Uso de microrganismos na indústria

O uso industrial da microbiologia iniciou-se com as fermentações, o conhecimento dos fatores e condições específicas de crescimento para os microrganismos envolvidos na produção de produtos destinados a alimentação gerou uma nova área dentro da microbiologia, destinada a produção alimentícia. A produção de queijo, por exemplo, é feita por microrganismos produtores de ácido láctico a partir da proteína caseína que geralmente é formada pela ação da enzima quimosina formando o coalho. Este é esfarelado para permitir a drenagem do soro para posterior maturação. Quanto maior o período de maturação, mais forte será o queijo.

O tipo microbiano na produção de queijos pode influenciar no sabor e no aroma em função do processo de maturação. O queijo *Camembert* é maturado em pequenos pacotes, de maneira que as enzimas produzidas pelo fungo *Penicillium* que cresce aerobicamente difunde-se na superfície dando manchas esverdeadas a azuis. As fermentações além de serem importantes na produção alimentícia, permitiram também que os laticínios fossem estocados e consumidos por um período maior.

Os microrganismos também são usados na produção de pães. Os açúcares dos pães são fermentados por leveduras, sendo a espécie mais utilizada na panificação o fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Em condições aeróbicas há favorecimento de produção de dióxido de carbono e são estimuladas o máximo possível, por essa razão a massa do pão é sovada (amassada) repetidamente. A mesma espécie usada na panificação, também é usada na produção de cerveja e de vinhos.

O *S. cerevisiae* é um microrganismo capaz de se desenvolver em condições aeróbicas e anaeróbicas. Assim, diversas linhagens deste fungo foram adaptadas a determinados processos fermentativos para implementação industrial. Os vinhos são produzidos a partir de frutas, tipicamente as uvas, que contêm açúcares que podem ser usados diretamente pelas leveduras para a fermentação. No entanto, bactérias lácticas são importantes na fabricação de vinhos em função da produção de ácido málico. Essas bactérias convertem o ácido málico em ácido láctico mais fraco em um processo denominado

fermentação maloláctica. O resultado é um vinho menos ácido, com melhor sabor e de melhor qualidade, em função do aprimoramento de microrganismos na obtenção do produto final.

O uso de enzima é amplo na industrialização, como as amilases que são utilizadas na produção de xaropes a partir de amido de milho, na produção de papéis e na produção de glicose de amido. O Saquê, o conhecido "vinho" japonês, faz uso da amilase do koji para transformar os carboidratos do arroz em uma forma que as leveduras possam usar para produzir álcool.

Leia mais sobre a aplicabilidade do uso de microrganismos em biotecnologia avaliando seu benefício.

Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio23/producao.pdf>

O genoma dos procariotos é relativamente mais simples que o genoma de eucariotos. O genoma é circular com a existência de unidades genéticas acessórias (plasmídeos, bacteriófagos e elementos transponíveis) contendo as informações genéticas necessárias para sua própria replicação, possuem a própria origem da replicação, assim, são considerados replicons pela capacidade de autoduplicação.

Todo o genoma é usado na codificação e na regulação gênica. Todos os genes essenciais para o crescimento bacteriano estão localizados no cromossomo bacteriano, enquanto que os plasmídeos contêm genes associados a funções especializadas. **Os plasmídeos** são elementos extracromossômicos com capacidade de replicação autônoma constituídos de DNA fita dupla circular, contendo genes, com cerca de 1 a 5% do tamanho do cromossomo bacteriano. E são de grande aplicação em biotecnologia (engenharia genética).

Muitos plasmídeos transportam genes que medeiam sua transferência de um microrganismo para outro, bem como outros genes associados à aquisição ou rearranjo de DNA. O fator F é um plasmídeo conjugativo que

transporta genes dos *pili* sexuais e da transferência do plasmídeo para outra célula. Os fatores R (fatores de resistência) são plasmídeos que possuem importância significativa. Muitos fatores R contêm dois grupos de genes: um grupo denominado fator de transferência de resistência (FTR) e inclui gene para replicação do plasmídeo e conjugação. O outro grupo, o r-determinante, tem os genes de resistência; ele codifica a produção de enzimas que inativam certas drogas ou substâncias tóxicas. Uma consequência desse tipo particular de plasmídeo (fator R) tem sido observada na rápida propagação de resistência a antibióticos transmitidos por plasmídeos em populações bacterianas tanto na medicina quanto na agricultura. Isso se deve ao fato do uso indiscriminado de antibióticos que promoveu a seleção de bactérias com fatores R. Desta forma, bactérias com este tipo de plasmídeo mantém sua população.

Os transposons são considerados elementos genéticos móveis, tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, pois são pequenos segmentos de DNA que se movem de uma região da molécula de DNA para outra. Os transposons contêm vários kb de DNA, incluindo a informação necessária para sua migração de um *locus* genético para outro. Os transposons simples apresentam sequências de inserção, contêm somente um gene que codifica uma enzima (*transposase*, que catalisa a clivagem e remontagem do DNA que ocorre na transposição) e sítios de reconhecimento.

Os sítios de reconhecimento são sequências curtas invertidas de repetição do DNA, que a enzima reconhece como sítios de recombinação entre o transposon e o cromossomo bacteriano. Os transposons complexos contêm genes com funções especializadas, como resistência a antibióticos, e são flanqueados por sequências de inserção. Estes também transportam outros genes não conectados com o processo de transposição.

1.3.1. Transferência genética

Recombinação

A transferência de DNA entre cepas de procariotos é disseminada e representa uma importante contribuição para a notável diversidade genética

das bactérias. A recombinação genética entre as bactérias é muito diferente da fusão de zigotos em eucariotos. A troca de material genético entre as bactérias pode ser exemplificada como a transferência de um fragmento relativamente pequeno de um genoma doador para uma célula receptora. A recombinação genética bem sucedida exige que este DNA do doador seja replicado no microrganismo recombinante.

A maioria dos microrganismos possuem a capacidade natural de incorporar DNA adicional ao seu genoma. Para os procariotos, esse mecanismo é essencial para ampliar a diversidade genética. A recombinação bacteriana permite a "mistura" de genes, aumentando a probabilidade de gerar microrganismos melhores adaptados para as condições evolutivas. A recombinação ocorre por dois sítios específicos de reconhecimento: o sítio específico e o homólogo.

A recombinação sítio-específico não requer extensa homologia entre as sequências de moléculas de DNA recombinantes e depende de enzimas codificadas pelo DNA integrado, como as *integrases*, que são enzimas que reconhecem uma determinada sequência de DNA como sítio de recombinação.

A recombinação homóloga acontece quando o DNA doador é bastante semelhante à sequência do cromossomo do hospedeiro. A homologia das sequências deve ser suficiente para permitir a recombinação inicial pelo pareamento das duas regiões. Tais regiões pareadas sofrem entrecruzamento, a entrada do DNA doador substitui as sequências residentes.

Conjugação

O material genético das bactérias pode ser trocado pelo mecanismo de conjugação, na qual ocorre uma transferência de mão única de material genético da célula doadora para a receptora. O mecanismo requer o contato célula a célula. A maioria das bactérias não estão capacitadas para processar a conjugação, para que possam conjugar elas devem conter o plasmídeo de conjugação (fator F).

O processo tem início em uma região específica do DNA plasmidial conhecido como origem de transferência. Em princípio, o cromossomo inteiro

poderia ser transferido à célula receptora durante a conjugação. Entretanto, a transferência do DNA é relativamente lenta e requer cerca de duas horas para a passagem de todo o cromossomo. A ponte gerada entre as duas células pelo processo de conjugação é frágil e dificilmente resiste tanto tempo. Assim, na maioria dos casos, apenas a porção do DNA próxima à origem, mais rapidamente é transferido.

Transformação

A transformação consiste na troca de material genético entre bactérias através do DNA. É pouco comum a ocorrência natural desta propriedade entre as bactérias, e algumas de suas cepas são passíveis de transformação apenas na presença de fatores de competência, produzidos apenas pontos específicos no ciclo do crescimento. A transformação é importante para a engenharia genética com a utilização de técnicas de DNA recombinante, devido a facilidade da incorporação de material genético (DNA) modificando o cromossomo bacteriano. Assim, a inserção de um vetor, recombinante ou não em uma bactéria irá gerar novas características genéticas, como por exemplo, resistência a antibióticos. Há métodos para a inserção do vetor, a eletroporação, o choque térmico, e a transformação por cloreto de cálcio.

Esses transformantes podem ser selecionados, por um vetor de clonagem que codifica uma propriedade facilmente selecionável, como a resistência a um determinado antibiótico, como por exemplo a tetraciclina, que pode ser escolhido e adicionado a cultura. Apenas as bactérias que contém o plasmídeo com a marca de seleção, cresceriam no meio de cultura. A resistência a tetraciclina atua como um marcador seletivo e permite o isolamento das bactérias que absorveram o DNA doador que contém a informação genética para a resistência ao antibiótico. Assim, cada clone contém um fragmento de restrição, proveniente da clivagem do DNA que se quer analisar, e o conjunto destes clones é denominado de biblioteca genômica (Figura 1.4).

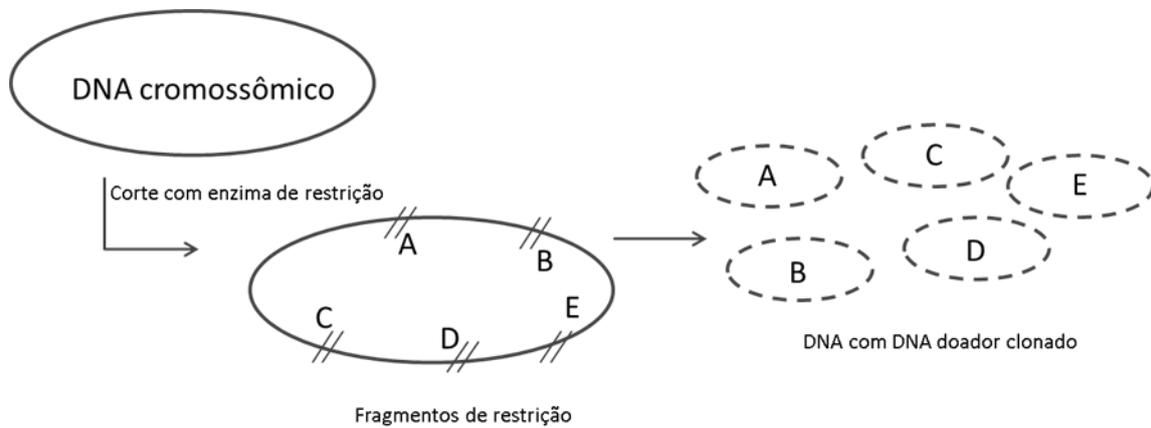


Figura 1.4. Criando uma biblioteca genômica.

A transformação não é a única maneira de introduzir DNA exógeno em bactérias. O mesmo pode ser inserido por bacteriófagos ou fagos (os vírus que infectam bactérias), tal processo é denominado transdução. Para a melhor compreensão deste mecanismo de transferência de material genético, é importante o conhecimento sobre os bacteriófagos e seus ciclos líticos e lisogênicos.

Transdução

Mecanismo de troca de material genético pela utilização de infecção de um fago. Os fagos temperados são os preferidos para a transferência de genes, visto que a infecção de bactérias receptoras em condições que favorecem a lisogenia minimiza a lise celular e, portanto, favorece a sobrevivência de cepas recombinantes. Uma bactéria receptora transportando um prófago apropriado pode formar um repressor que torna a célula imune à infecção lítica. Estas células podem obter DNA bacteriano de partículas transdutoras. Em condições que favorecem o ciclo do fago lítico, é possível preparar bactérias transdutoras transportando DNA do doador.

1.3.2. Uso da tecnologia do DNA recombinante

As bactérias e leveduras são microrganismos que se reproduzem muito rapidamente e são facilmente cultivados em laboratório. Em função desta característica estes são utilizados na engenharia genética pelo uso da tecnologia do DNA recombinante. Assim, em meados da década de 70 e 80 as metodologias de clonagem de DNA, síntese de oligonucleotídeos e de expressão gênica convergiram para um único experimento, utilizando o DNA recombinante. Na qual a partir de métodos modernos de clonagem e de expressão gênica via microrganismos modificados, podem produzir peptídeos recombinantes.

Na atualidade a tecnologia do DNA recombinante é utilizada na medicina, por exemplo, ao tratamento do câncer, doenças auto-imunes, desordens neurológicas, doenças cardiovasculares, doenças genéticas e na

indústria biotecnológica, com aplicação na fabricação de detergentes, sabões, fármacos e produção de alimentos. Esses métodos revolucionaram as pesquisas e proporcionaram inovações tecnológicas aplicadas para o benefício da sociedade.

A primeira droga licenciada, produzida pela tecnologia do DNA recombinante, foi a insulina humana. Importante hormônio regulador do metabolismo de carboidratos, a insulina é produzida no pâncreas e secretada na corrente sanguínea. A incapacidade de produzir insulina resulta em diabetes, mas doses diárias para a doença do tipo I são suficientes para conter os efeitos debilitantes da doença.

A produção da insulina, antes da molécula recombinante, era obtida de pâncreas de suínos e bovinos. Embora, essa insulina seja biologicamente ativa em seres humanos, apresenta estrutura proteica diferente na sequência de aminoácidos. E consequência, alguns pacientes produziram anticorpos contra a insulina exógena, gerando diversas reações imunológicas.

Com a aplicabilidade da tecnologia do DNA recombinante, é possível produzir a insulina humana sem problemas de imunogenicidade. A partir do

isolamento do RNA mensageiro do gene que codifica a insulina, obtêm-se o DNA complementar, o qual é inserido em um plasmídeo que por sua vez, é injetado em *E. coli*. Como estas bactérias reproduzem-se em elevadas quantidades e produzem um elevado número de proteínas, estas após o crescimento em cultura e seleção são extraídas e purificadas, e então são acondicionadas para posteriormente serem administradas aos portadores de diabetes. Similarmente, o hormônio do crescimento e anticorpos monoclonais são produzidos por bactérias.

Antes do advento da engenharia genética, dois tipos de vacinas eram produzidos: as vacinas inativadas, que são derivadas dos agentes infecciosos quimicamente mortos, e as vacinas atenuadas, que são os vírus ou bactérias vivas alteradas de modo a não mais se multiplicarem no organismo inoculado. No entanto, o desenvolvimento na produção de vacinas para a implementação de proteção às doenças infecciosas aprimorou-se com o uso da tecnologia do DNA recombinante e produziu vacinas mais seguras.

A primeira vacina de subunidade proteica bem sucedida foi produzida contra o vírus da hepatite B (HBV), vírus que infecta os hepatócitos causando problemas hepáticos e, em alguns casos, câncer. Os pacientes infectados por HBV possuem grande agregados da proteína viral *HBsAg* (antígeno de superfície). Para a produção da vacina contra HBV foi inserido o gene *HBsAg* em um vetor de expressão de leveduras. A levedura transformada produz grandes quantidades de proteína viral, gerando aproximadamente 50-100 mg de proteína por litro de cultura. A proteína recombinante é hoje utilizada para vacinar a população contra HBV. Assim, a tecnologia do DNA recombinante favorece de forma segura a imunização em crianças e adultos.

As enzimas são utilizadas amplamente na indústria. A subtilisina é uma serino-protease produzida por bactérias. Devido a sua ampla especificidade para proteínas que comumente sujaram as roupas, essa enzima foi desenvolvida para uso comercial usada como aditivo enzimático dos sabões modernos. Inicialmente, essa enzima perdia 90% de sua atividade nos sabões pela oxidação da metionina quando na presença de alvejante.

Mutantes sítios-dirigidos foram construídos no gene que codifica a subtilisina. Estes foram clonados em vetores de expressão e seus 19 derivados foram expressos. A análise bioquímica demonstrou que a enzima que continha o aminoácido alanina na posição 222 era mais ativo que a proteína selvagem. Assim, essa variante mostrou-se resistente ao alvejante, sendo os sabões que contêm essa subtilisina fabricada podem ser usados junto com alvejantes. Esse exemplo demonstra o poder da tecnologia do DNA recombinante como ferramenta para a construção de produtos naturais melhorados.

Atividade: Inovação Tecnológica
Pesquise sobre a aplicabilidade da tecnologia do DNA recombinante e proponha uma atividade aos seus alunos para uma feira de ciências.

1.4. CRESCIMENTO BACTERIANO

Quando as bactérias encontram um ambiente adequado, elas crescem e, conseqüentemente, multiplicam-se. O tempo de geração é, então, o tempo necessário para a bactéria se dividir. O crescimento continua até que a população atinja determinada densidade celular e aconteça a exaustão dos nutrientes do meio ou do acúmulo de metabólitos tóxicos, ao acabar a fonte de carbono, composto inorgânico indispensável, aminoácidos ou vitaminas essenciais.

Nas bactérias aeróbicas, a superpopulação leva a exaustão de oxigênio, já que é pouco solúvel em água. Os metabólitos tóxicos podem ser o peróxido de hidrogênio, e para as anaeróbicas deficientes em catalase, os ácidos formados pela fermentação, resultam num pH muito baixo para ser compatível com o crescimento.

Quando as bactérias encontram ambiente apropriado crescem e duplicam-se. O tempo que uma bactéria leva para dividir-se é chamado tempo de geração. O crescimento bacteriano continua até que a população atinja determinada densidade celular e aconteça a exaustão dos nutrientes do meio

ou acúmulo de metabólitos tóxicos. Até que isso ocorra, as bactérias crescem livremente e são fisicamente semelhantes. Essa condição é chamada de crescimento equilibrado, pois todos os componentes da célula aumentarão proporcionalmente por certo período de tempo. Esse estado de estabilidade não existe por um longo tempo na natureza, pois, usualmente, mudanças rápidas ocorrem no ambiente.

Em função do crescimento bacteriano podemos determinar o número de bactérias em uma colônia. Esse número é determinado pela contagem de colônia, quando semeado em uma diluição adequada em meio de crescimento sólido. Como as colônias se formam apenas a partir de bactérias vivas, o número de colônias multiplicado pelo fator de diluição fornece o número de unidades formadoras de colônia (do inglês, *colony-forming units*) ou CFU.

1.4.1. A curva de crescimento bacteriano

O crescimento de bactérias em cultura pode ser didaticamente explicado de acordo com as fases de crescimento. Se um meio líquido for inoculado com células microbianas retiradas de uma cultura, que previamente cresceu até a saturação, e o número de células viáveis por mililitro for determinado periodicamente e representado sob a forma de gráfico, obtém-se uma curva geral (Figura 4.1).

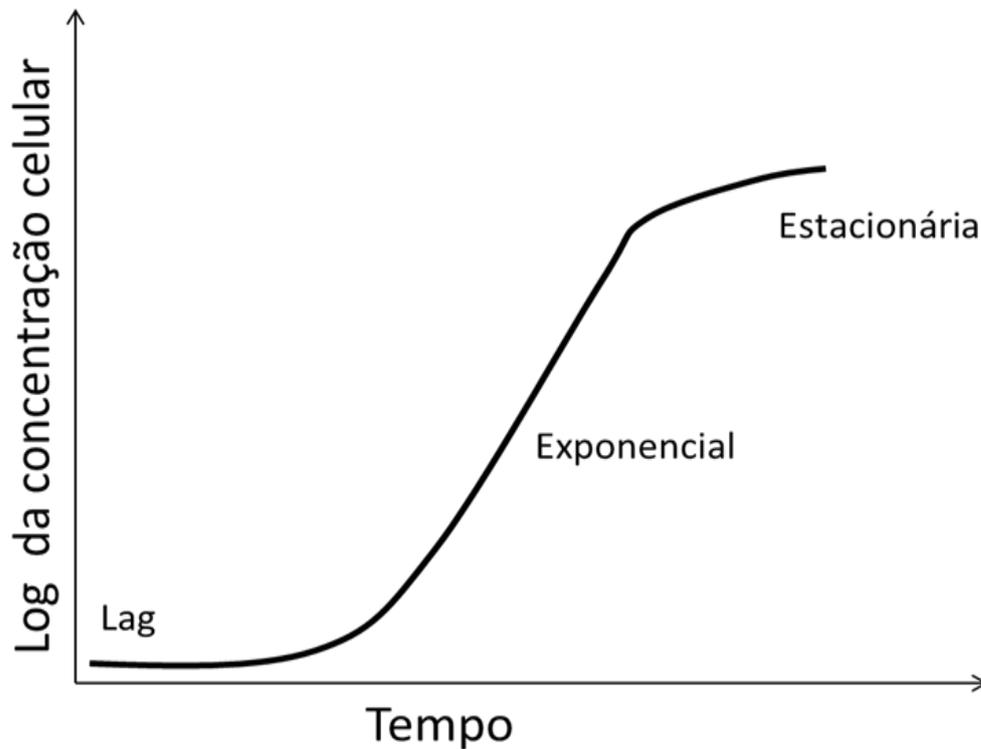


Figura 1.5. Curva de crescimento bacteriano

A **fase Lag** é considerada a fase de demora e representa o período em que as células com depleção de metabólitos e enzimas de condições desfavoráveis, ocorrida no final de sua cultura anterior, adaptam-se para a nova cultura. Observa-se a formação de enzimas e substâncias intermediárias que se acumulam até que alcancem concentrações suficientes para permitir a retomada do crescimento.

Na **fase exponencial** as células encontram-se num estado de equilíbrio dinâmico. Ocorre síntese de novo material celular numa velocidade constante e a massa celular aumenta de modo exponencial. A expansão do crescimento exponencial significa que mesmo um pequeno número de bactérias pode iniciar rapidamente uma infecção. Na meningite bacteriana aguda, causada por *Neisseria meningitidis*, os meningococos crescem tão rapidamente que a partir do diagnóstico, o tratamento deve ser imediato para evitar o óbito do paciente.

Nos tecidos do organismo, as bactérias estão frequentemente estressadas pelas limitações de nutrientes ou pela ação dos agentes causadores de lesão do mecanismo de defesa. Como consequência, as populações de bactérias no organismo raramente são plenamente viáveis. Para permitir que se adaptem a essas condições, as bactérias não cessam todas as atividades metabólicas quando param de crescer. Podem ao contrário, diminuir o crescimento total, mas continuam algumas atividades sintéticas que lhes permitem produzir compostos específicos, necessários para a adaptação.

A **fase exponencial** prossegue até que ocorram duas possibilidades: um ou mais nutrientes no meio se esgotam, ou ocorre acúmulo de produtos metabólicos tóxicos que inibem o crescimento. No caso das bactérias aeróbicas, o oxigênio é habitualmente o nutriente que se torna limitante. Quando a concentração de células ultrapassa cerca de 1×10^7 /mL, a velocidade de crescimento irá diminuir, a não ser que o oxigênio seja suprido ao meio por agitação ou borbulhamento de ar.

Na **fase estacionária** a exaustão de nutrientes ou acúmulo de produtos tóxicos provoca parada completa do crescimento. Mesmo não estando mais em crescimento, as bactérias podem causar lesões no hospedeiro, pois podem induzir respostas imunes com resultados benéficos ou maléficos. Nesta fase, a produção de toxinas acelera-se. Por exemplo: algumas cepas de *Streptococcus* sintetizam nutrientes e enzimas que promovem lise de hemácias e proteases que degradam hemoglobina, assim, obtendo suprimento de aminoácidos, além da fonte de ferro.

A suspensão do crescimento em algumas bactérias provoca o início da esporulação, como lise da "célula mãe". O conteúdo citoplasmático liberado contém, algumas vezes, grandes quantidades de toxinas. A compreensão da etiologia e o curso das infecções podem ter respostas na associação entre o crescimento microbiano e a patogênese.

1.4.2. Fatores de crescimento

Os fatores necessários para o crescimento microbiano podem ser classificados em categorias como: físicos, que incluem temperatura, pH e pressão osmótica; e químicos que incluem fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e oxigênio.

Temperatura: podemos classificar os microrganismos bacterianos em psicrófilos (crescem em baixa temperatura, - 10 a 20°C), mesófilos (crescem em temperaturas moderadas, 10 a 50°C) e termófilos (crescem em temperaturas altas, 40 a 80°C). A maioria dos microrganismos crescem dentro de variações limitadas de temperatura, sendo que há somente 30°C de diferença entre a temperatura máxima e mínima de crescimento. Esses microrganismos não apresentam um bom crescimento nas temperaturas extremas considerando sua faixa ideal.

pH: a maioria das bactérias cresce melhor dentro de variações pequenas próximo da neutralidade. Poucas bactérias são capazes de crescer em pH ácido. No entanto, as bactérias acidófilas apresentam alto grau de tolerância à acidez. As bactérias cultivadas em laboratório com frequência produzem ácidos que podem interferir no seu próprio crescimento. Para neutralizar esses ácidos e para a manutenção do pH, normalmente são incluídos tampões químicos no meio de cultura.

Pressão osmótica: quando uma célula microbiana encontra-se em uma solução contendo uma concentração de solutos superior àquela do interior da célula, a perda de água ocorrerá pela membrana plasmática. Tal perda é denominada plasmólise. Alguns organismos, denominados halófilos extremos, adaptaram-se a altas concentrações de sais, que essas se tornaram necessárias para seu crescimento.

Carbono: é essencial para a síntese de todos os compostos orgânicos necessários para a viabilidade celular, sendo considerado o elemento estrutural básico para os seres vivos. Metade do peso seco de uma bactéria é composta por carbono.

Nitrogênio, Enxofre e Fósforo: a síntese de proteínas necessita de grandes quantidades de nitrogênio e enxofre. Para a síntese de DNA e RNA, também se faz necessária a presença de nitrogênio e de fósforo, assim como para a síntese de ATP, responsável pela transferência de energia química dentro da célula.

Oxigênio: os microrganismos que utilizam o oxigênio molecular (aeróbicos) são capazes de produzir mais energia a partir do uso de nutrientes do que organismos que não utilizam o oxigênio (anaeróbicos). Os organismos que necessitam de oxigênio para sua sobrevivência são denominados aeróbicos estritos ou obrigatórios.

Atividade: Experimento na Escola - Crescimento bacteriano em meio de cultura.

Material:

- ✓ gelatina incolor
- ✓ caldo de carne
- ✓ 1 copo americano de água morna
- ✓ pote vazio e limpo de margarina pequena
- ✓ filme plástico
- ✓ fita crepe
- ✓ caneta de retroprojektor
- ✓ cotonetes limpos

"Meio de cultura": Dissolva a gelatina conforme as instruções, misture o caldo de carne dissolvido no copo de água morna e coloque no pote de margarina vazio e tampe. Leve à geladeira para solidificar.

Depois de pronto, pegue seu "meio de cultura" e os cotonetes, e peça aos alunos para passarem nos dentes, ou entre os dedos do pé ou nas mãos. Esfregue levemente o cotonete no "meio de cultura" (gelatina solidificada) em "zigue zague", como se fosse fazer um rabisco e envolva a parte superior do pote com o plástico filme. Marque com a fita crepe a região anatômica inoculada no meio de cultura, deixe em temperatura ambiente por três dias. Descreva e avalie as alterações no seu "meio de cultura".

1.5. CONTROLE DE CRESCIMENTO MICROBIANO

1.5.1. Esterilização

A esterilização é o processo que inativa todos os microrganismos presentes em determinado material ou ambiente, portanto, é o método indicado para uso em itens que de forma alguma podem ser usados quando houver qualquer tipo de contaminação, classificados como “críticos”, ou seja, aqueles que durante o procedimento penetrarão em pele e mucosa, ou serão introduzidos diretamente na corrente sanguínea, sendo, portanto, de alto risco.

A melhor maneira de garantirmos a destruição de microrganismos presentes em instrumentos e equipamentos é mediante o uso do calor. A maioria dos microrganismos que causam infecções em seres humanos desenvolve-se em temperaturas próximas a do corpo humano, ou seja, 37°C. Assim, ao serem expostos a altas temperaturas são destruídos; o que não acontece quando os colocamos em contato com baixas temperaturas, pois, nesse caso, o microrganismo fica apenas inibido, e não é destruído.

Alguns microrganismos produzem esporos, que são formas de resistência, podendo permanecer inativos por longos períodos e, depois, voltar ao estágio inicial de infectividade. Portanto, as técnicas de esterilização devem destruir tanto a célula bacteriana, como os esporos.

Existem diversos métodos de esterilização: físicos ou químicos. Mas, definitivamente, os métodos de esterilização mais empregados são os que utilizam o calor, seja este úmido (autoclave) ou seco (estufa, ou forno de Pasteur), sendo que o desempenho do calor úmido (autoclave) é o de melhor qualidade.

1.5.1.1. Esterilização por Calor Seco (Estufa ou forno de Pasteur)

Este tipo de esterilização é realizado a temperaturas de 140°C a 180°C, com tempo de exposição de 60 a 120 minutos em estufas elétricas equipadas com termostatos. O calor seco ou ar quente em temperatura suficientemente alta levam à desnaturação e oxidação das proteínas, que resultam na morte dos microrganismos.

A utilização do calor seco leva mais tempo que o calor úmido, mas como existem materiais que não podem ser esterilizados no calor úmido, o calor seco é o ideal. É indicado para esterilizar vidrarias, instrumentos de corte ou de ponta, os quais podem oxidar na presença do vapor da autoclave, e materiais impermeáveis como ceras, pomadas e óleos.

Para ser eficiente, este processo depende de:

- ✓ Aquecimento da estufa até a temperatura desejada antes da colocação do material.
- ✓ Os materiais devem estar rigorosamente limpos e adequadamente embalados.
- ✓ A colocação do material deve permitir a circulação do ar, portanto a estufa não pode estar abarrotada de material. Deve ser mantida uma distância de 2 cm entre os materiais.
- ✓ O tempo de esterilização deve ser contado apenas após a colocação do material na estufa, e a partir do momento em que a temperatura foi atingida novamente.

1.5.1.2. Esterilização pelo Calor Úmido

O calor úmido pode ser utilizado para destruir microrganismos presentes em materiais através das formas de: vapor d'água, água fervente e água aquecida abaixo de seu ponto de ebulição.

✓ Vapor d'água

O vapor d'água sob pressão é a mais prática e segura aplicação do calor úmido. O aparelho destinado a este fim é a AUTOCLAVE. É um processo mais eficiente para destruir os microrganismos e os esporos que o calor seco.

A autoclavação é feita a 121° C com tempo de exposição de 15 a 30 minutos. A penetração do vapor no material garante maior nível de destruição dos microrganismos e por este motivo é mais rápido.

Funcionamento da autoclave: A câmara de parede dupla da autoclave é lavada com vapor fluente para remover todo o ar; é então preenchida com vapor puro e mantida a uma determinada temperatura e pressão por um

período específico de tempo. É essencial que todo o ar residual inicialmente presente na câmara seja completamente substituído por vapor d'água, porque se o ar estiver presente reduzirá a temperatura interna da autoclave; a autoclave é usualmente operada a uma pressão de 15 lb./pol², na qual a temperatura do vapor é de 121°C. A eficiência do processo de esterilização depende de alguns fatores:

- ✓ Os materiais devem ser limpos antes do processo, sendo adequadamente embalados.
- ✓ O tempo deve ser contado a partir do momento em que a temperatura de 121°C é atingida.
- ✓ A distribuição do material no interior da autoclave deve garantir que o vapor atinja todo o material por igual.
- ✓ Se o material sair úmido da autoclave indica falhas no processo, neste caso deve ser novamente esterilizado.

1.5.1.3. Controle da Esterilização

É imprescindível o controle de qualidade nos processos de esterilização. Como se trata de um processo que inclui diversas variáveis (tempo, temperatura, limpeza prévia, conhecimento da pessoa responsável pelo processo, etc), se qualquer destas variáveis for negligenciada, o processo não será efetivo e o risco de contaminação é eminente.

O controle deve ser realizado através de métodos químicos e bacteriológicos. Os métodos químicos utilizam uma fita especial que mostra, através da mudança de cor, se a temperatura desejada foi atingida. Os métodos bacteriológicos utilizam a bactéria chamada *Bacillus subtilis*, que por ser produtora de esporos, é uma eficiente indicadora da qualidade do processo.

Este controle deve fazer parte da rotina do laboratório para garantir a saúde de pacientes e isolamento correto dos microrganismos, como também biossegurança ocupacional.

1.5.2. Radiação

A radiação tem vários efeitos sobre as células, dependendo de seu comprimento de onda, intensidade e duração. Existem dois tipos de radiação que destroem os microrganismos (radiação esterilizante): não ionizante e ionizante. Iremos discutir somente a radiação não ionizante, pois esta é comumente utilizada como método de controle do crescimento microbiano.

A radiação não ionizante, podemos citar, como exemplo, a luz ultravioleta (UV). Esta danifica o DNA das células expostas, produzindo ligações entre bases pirimídicas adjacentes, normalmente timinas nas cadeias de DNA. Esses dímeros de timina inibem a replicação correta do DNA durante a reprodução celular. O comprimento de onda da UV mais eficaz para controlar o crescimento microbiano é de aproximadamente 260nm, nesse comprimento de onda o DNA celular absorve a luz UV e, conseqüentemente, afeta a replicação do DNA, impedindo a célula de prosseguir o ciclo celular.

1.5.3. Desinfecção

Este processo pode ser realizado de forma física (Pasteurização) e química (Desinfetantes), e pode ser classificado como sendo uma desinfecção de alto, intermediário ou de baixo nível, dependendo da quantidade de microrganismos inativados.

1- Desinfecção de alto nível: inativa todos os **microrganismos**, exceto esporos. Ex: HBV, HIV e *M. tuberculosis*. Este tipo de desinfecção é indicado para itens classificados como “**semicríticos**”, ou seja, que entram em contato com mucosas íntegras e pele não íntegra.

2- Desinfecção de nível intermediário: é aquela que inativa bactérias na forma vegetativa (*M. tuberculosis*), fungos e a maioria dos vírus. É indicada para uso em itens classificados como “**não críticos**”, ou seja, aqueles materiais que entram em contato apenas com a pele íntegra. (por ex. estetoscópios, termômetros, gorro, máscara, refletor, etc.)

3- Desinfecção de baixo nível: inativa a maioria das bactérias na forma vegetativa, exceto *M. tuberculosis*, alguns fungos e vírus. É indicada também para itens de uso “**não crítico**”.

1.5.4. Temperaturas abaixo de seu ponto de ebulição (100°C)

Pasteurização: é o aquecimento lento a baixas temperaturas, suficiente para eliminar as células vegetativas de microrganismos, mas não os esporos, portanto, é um método de desinfecção de alto nível. É indicado o uso de temperatura de 77°C por 30 minutos.

1.5.5. Agentes químicos

Álcoois: São tóxicos para as células em concentrações relativamente altas. Os álcoois etílico e isopropílico são comumente utilizados. Seu mecanismo de ação é através da desnaturação de proteínas. São usados em concentração de 70% por 10 minutos para a desinfecção de superfícies. O uso destas substâncias é contraindicado para materiais cirúrgicos, borrachas, plásticos e acrílicos.

Fenólicos: O fenol e compostos fenólicos são potentes agentes antibacterianos. Nas concentrações elevadas geralmente empregadas, desnaturam proteínas. Seu mecanismo de ação é através do rompimento da parede celular, precipitando proteínas, quando usado em alta concentração, e alteração dos sistemas enzimáticos fundamentais, quando utilizado em baixa concentração. Sua concentração para uso é de 1-2%, sendo que o tempo de exposição deve ser menor ou igual a 10 minutos. Seu uso é indicado para descontaminação de ambiente hospitalar, como itens cirúrgicos, sendo que devem ser consideradas as limitações devido à toxicidade e ação residual em materiais porosos.

Agentes oxidantes: Os agentes oxidantes fortes inativam as células através da oxidação dos grupos sulfidrilas livres. Os agentes utilizados incluem peróxido de hidrogênio, iodo, hipoclorito, cloro e compostos que liberam cloro lentamente.

Agentes alquilantes: Alguns agentes reagem com compostos na célula ao substituir átomos lábeis de hidrogênio por grupos alquila. Os agentes deste tipo, comumente utilizados para a finalidade de desinfecção, são o formaldeído e o óxido de etileno, sendo o último utilizado em ambientes hospitalares para

desinfecção de instrumentos cirúrgicos em câmaras especiais a vácuo para esta finalidade.

Detergentes: São agentes "tensoativos", com ação detergente, umectante e emulsionante. Podem ser classificados como catiônicos, aniônicos, por exemplo, sabões, detergentes sulfatados ou sulfonados e enzimáticos. A interface entre a membrana contendo lipídio de uma célula bacteriana e o meio aquoso circundante atrai uma classe particular de composto tenso ativo, devido ao grupo lipossolúvel e ao grupo hidrossolúvel.

5.6. Controle do crescimento bacteriano por quimioterápicos

Os agentes antimicrobianos baseados no mecanismo de ação caracterizam os antibióticos como bactericidas ou bacteriostáticos, sendo inócuo ao hospedeiro. Assim, o agente microbiano ideal exibe toxicidade seletiva, ou seja, o fármaco deve ser prejudicial somente à bactéria patogênica e não ao hospedeiro. A toxicidade seletiva pode ser uma função de receptor específico para ligação do fármaco ou depender da inibição de atividade bioquímica, essencial à fisiologia bacteriana.

Os mecanismos de ação dos principais antimicrobianos quimioterápicos são:

Inibição da síntese de parede celular: As bactérias possuem uma camada externa rígida, a parede celular. Essa estrutura mantém a forma do microrganismo e funciona como "proteção" para a célula bacteriana, que apresenta elevada pressão osmótica interna. A lesão ou inibição da síntese da parede celular resulta na lise da célula bacteriana. Os antibióticos do tipo β -lactâmicos são inibidores seletivos da síntese de parede celular bacteriana e, portanto, são ativos contra bactérias em crescimento.

A etapa inicial de ação farmacológica consiste na ligação do fármaco aos receptores celulares do tipo proteínas de ligação da penicilina - PBP (do inglês, *penicillin-binding proteins*). Existem 3 tipos de PBP, algumas das quais são enzimas de transpeptidação, onde a síntese do peptidoglicano é bloqueada. A inibição das enzimas de transpeptidação pelas penicilinas e cefalosporinas está

na semelhança estrutural desses fármacos com acil-D-alanil-D-alanina. A reação envolve a perda de uma D-alanina do pentapeptídeo.

A resistência às penicilinas e cefalosporinas deve-se ao fato da produção de enzima pelo microrganismo, que destrói as penicilinas (β -lactamases). Essas enzimas rompem o anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas, anulando sua atividade antimicrobiana.

Inibição da função da membrana celular: A membrana celular atua como barreira de permeabilidade seletiva, desempenhando funções de transporte ativo e, assim, controlando a fisiologia celular. Se a integridade da membrana plasmática for rompida, as macromoléculas e íons escapam e, conseqüentemente, ocorre lesão ou morte celular. A membrana citoplasmática das células bacterianas e fúngicas possui estrutura diferente das células animais e pode ser mais facilmente rompida por agentes antimicrobianos. Assim, a quimioterapia é seletiva.

Inibição de síntese de proteínas: Esta classe de antimicrobianos é capaz de inibir a síntese de proteínas nas bactérias. As bactérias possuem ribossomos com subunidades diferentes das da célula do hospedeiro. Desta forma, são capazes de inibir a síntese de proteínas dos ribossomos bacterianos. Diversos antimicrobianos podem ser citados nesta classe de quimioterápicos, como: cloranfenicol, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos e lincomicina.

Inibição de síntese de ácidos nucleicos: A rifamicina inibe o crescimento bacteriano ao ligar-se fortemente à RNA-polimerase, inibindo a síntese de RNA bacteriano. A resistência à rifamicina resulta de mutações no gene da RNA-polimerase de alta frequência. Todas as quinolonas e fluoroquinolonas inibem a síntese de DNA microbiano ao bloquear a DNA girase. Para muitos microrganismos, o ácido *p*-aminobenzóico (PABA) é um metabólito essencial. O modo de ação específico do PABA envolve uma condensação adenosina trifosfato (ATP) dependente de uma pteridina com o

PABA, produzindo ácido diidropteróico que é subsequentemente convertido em ácido fólico. O PABA está envolvido na síntese de ácido fólico, que é um precursor importante da síntese de ácido nucleico. As sulfonamidas podem entrar na reação em lugar do PABA e competir pelo centro ativo da enzima. Em consequência, formam-se análogos não funcionais do ácido fólico impedindo o crescimento bacteriano.

CURIOSIDADE: Leia mais sobre a aplicabilidade dos antimicrobianos em aves de produção.

Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria12/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev162.pdf>

1.6. MÉTODOS E TÉCNICAS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

1.6.1. Colorações

As colorações podem ser simples ou diferenciais. As simples são efetuadas com um único corante, sendo as células geralmente coloridas de maneira uniforme. Para as colorações diferenciais, a coloração é realizada com mais de um corante para poder evidenciar diferenças entre as estruturas de uma mesma célula.

As colorações simples são aquelas em que se usa apenas um corante. A maioria dos corantes são sais, compostos por um ânion e um cátion.

As bactérias possuem uma pequena carga elétrica negativa, quando o pH do meio é aproximadamente neutro. Assim, as células bacterianas combinam-se com o cátion azul de metileno, obtendo-se a coloração azul das células.

São muito usados outros corantes, como o violeta de cristal e a carbol-fucsina. Estes corantes diferem na sua taxa e grau de coloração. O azul de metileno reage com as células bacterianas à taxa mais lenta, de 30-60 segundos, o violeta de cristal é mais reativo, usualmente requer só 10 segundos, a carbol-fucsina é um corante ainda mais rápido e atua em apenas 5 segundos.

Antes da coloração é necessário fazer o esfregaço, sendo necessário sua fixação na lâmina pelo calor. Um esfregaço faz-se espalhando uma suspensão de bactérias numa lâmina limpa e deixando-a secar ao ar. O esfregaço é então levado à chama de um bico de Bunsen, para fixar as bactérias pelo calor. Este passo desnatura as enzimas bacterianas, evitando que digiram partes das células, provocando a sua autólise. O calor também promove a aderência das células à lâmina.

A parede celular de bactérias Gram-positivas difere-se das bactérias Gram-negativas pela presença de uma espessa camada de peptidoglicano e pela ausência de uma membrana externa. Esta diferença de constituição da parede celular é a base da coloração de Gram, uma técnica primordial na identificação microbiológica, de diferenciação, visto que através dela se definem características morfológicas e tintoriais da bactéria em pesquisa.

A coloração de Gram é a técnica de coloração diferencial mais importante e mais utilizada em bacteriologia, pois identifica e classifica as bactérias. Como vimos no capítulo 1, as bactérias coradas por essa técnica classificam-se em Gram positivas e Gram negativas. A reação de Gram pode apresentar resultados variáveis, dependendo da idade da cultura, das condições ambientais de crescimento e o não seguimento do protocolo da técnica de forma correta.

A coloração de Gram consiste em tratar bactérias sucessivamente com cristal violeta, lugol, álcool-acetona e fucsina ou safranina. O cristal violeta e o lugol formam um complexo denominado iodopararosanilina, o qual confere coloração roxa tanto pelas bactérias Gram-positivas, quanto as Gram-negativas. Com a adição de álcool-acetona, as bactérias Gram negativas liberam o complexo formado, pois a camada de peptidoglicano é de pequena espessura, enquanto que as Gram-positivas retêm o complexo, permanecendo roxas. A adição de fucsina (ou safranina) não altera a cor das Gram-positivas, mas confere a cor avermelhada às bactérias Gram-negativas, que foram descoradas pelo álcool-acetona. A seguir o protocolo da técnica da coloração de Gram:

1.6.1.1. Técnica coloração de Gram:

Esfregaço da cultura bacteriana líquida:

- 1- Flambe uma alça, deixe esfriar, mantendo-a próximo a chama;
- 2- Retire uma amostra da cultura com a alça e deposite no centro da lâmina;
- 3- Espalhe o material com a alça em movimento circular, obtendo um esfregaço de forma oval, uniforme e fino;
- 4- Fixe o esfregaço, passando a lâmina na chama do bico de Bunsen, como se cortando a chama, repetindo este procedimento 3 vezes, para que o material fique bem aderido.

Esfregaço de cultura bacteriana sólida:

- 1- Flambe uma alça, deixa esfriar, mantendo-a próximo a chama.
- 2- Retire uma gota da água estéril e deposite sobre a lâmina.
- 3- Flambe novamente a alça, espere esfriar, e retire uma amostra da cultura sólida.
- 4- Leve a amostra até a gota de água depositada sobre a lâmina, e homogeneíze com movimentos circulares, para obter um esfregaço de forma oval, uniforme e fino.
- 5- Fixe o esfregaço, passando a lâmina na chama do bico de Bunsen, como se cortando a chama, repetindo este procedimento 3 vezes, para que o material fique bem aderido.

Adição de Corantes:

- 1- Coloque a lâmina com o esfregaço sobre um suporte.
- 2- Cubra a lâmina com cristal violeta (Gram I) e deixe agir por 1 minuto.
- 3- Lave a lâmina em jato fraco de água corrente, do lado contrário ao esfregaço.
- 4- Cubra a lâmina com lugol (Gram II), deixe agir por 1 minuto e depois lave novamente a lâmina.
- 5- Cubra a lâmina com a solução de álcool-acetona (Gram III), verifique a descoloração que deve ocorrer em cerca de 20 segundos.

6- Cubra a lâmina com fucsina Gram IV), deixe agir por 30 segundos, e, novamente lave a lâmina.

7- Seque inicialmente o lado da lâmina oposto ao esfregaço com papel toalha, e a seguir seque o restante da lâmina na chama do bico de Bunsen (como se estivesse “cortando” a chama).

8- Leve a lâmina ao microscópio e observe em objetiva de imersão. (Não esqueça de colocar uma gota de óleo para imersão sobre o esfregaço)

Outra coloração diferencial utilizada em bacteriologia é coloração de Ziehl-Neelsen para a identificação de agentes patogênicos do gênero *Mycobacterium* como, o *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis*. Esse gênero apresenta um diferencial em relação a parede celular, por isso não podem ser classificadas pela coloração de Gram. As micobactérias possuem uma complexa parede celular rica em lipídeos, sendo a responsável por muitas das características deste gênero. A estrutura dessa parede é típica de um gram-positivo, ou seja, uma membrana citoplasmática revestida por uma camada de peptidoglicano.

As micobactérias possuem a capacidade incomum de reter corantes básicos quando tratados com soluções ácidas. Assim, são denominadas ácido-resistentes, devido a presença de ácido micólico (ceras) que é um ácido graxo β - hidróxi ligado covalentemente ao peptidoglicano da parede celular. Assim o princípio de identificação destes tipos bacterianos está relacionado com a estrutura e a composição da parede celular composta de lipídios complexos como ácidos graxos e ceras (ácido micólico), resistindo ao descolorimento por álcool-ácido clorídrico.

Essa barreira lipídica afeta as propriedades de permeabilidade desses microrganismos. Assim, os corantes comuns não penetram nestes microrganismos. Entretanto, a coloração de Ziehl-Neelsen consiste em dissolver temporariamente a "cera" pelo aquecimento do esfregaço de bactérias oriundos de cultura com uma solução saturada de um corante vermelho básico a fucsina. Quando o esfregaço é tratado com solução de 3% de ácido clorídrico em etanol, as micobactérias não descoram a coloração absorvida pela fucsina, por isso álcool-ácidas resistentes. Então, o esfregaço

contendo as micobactérias é contra corado com azul de metileno irá promover um contraste. As micobactérias aparecem com os bastonetes vermelhos e delgados sobre um fundo azul.

1.6.1.2. Coloração de Ziehl -Neelsen (Álcool Ácida Resistente)

1. Corar o esfregaço com fucsina de Ziehl e aquecer até a emissão de vapores por 5 min.
2. Escorrer o corante e cobrir a lâmina com álcool-ácido clorídrico por 1 min.
3. Lavar com água
4. corar com solução de azul de metileno por 1 min.
5. Lavar com água e secar ao ar
6. Observar em microscópio com objetiva de imersão
7. Lavar com água e secar ao ar;
8. Observar em microscópio com objetiva de imersão

1.6.2. Meios de cultivo

Algumas bactérias podem crescer em qualquer meio de cultura (cultivo), outras, no entanto, necessitam de meios especiais. Quando os microrganismos são inseridos em um meio de cultura, são denominados inóculos. E os microrganismos que crescem e multiplicam-se nos meios de cultura são denominados de cultura.

Os meios de cultura são complexos que se destinam ao cultivo artificial de microrganismos. As técnicas de semeadura permitem que o cultivo destes microrganismos nos meios de cultura seja eficiente e que as seguintes finalidades sejam atingidas:

- ✓ crescimento bacteriano;
- ✓ isolamento bacteriano;
- ✓ estudo da morfologia colonial;
- ✓ pesquisa de patogenicidade;
- ✓ pesquisa das características bioquímica

Os meios de cultivo devem conter as substâncias exigidas pelas bactérias para o seu crescimento e multiplicação. Para que possam fazer a síntese de sua própria matéria nutritiva devem dispor de fontes de carbono (proteínas, açúcares), fontes de nitrogênio (peptonas) e fontes de energia. São também necessários alguns sais inorgânicos, vitaminas e outras substâncias favorecedoras do crescimento.

Classificação dos meios de cultivo:

Quanto à consistência:

Meios líquidos: são aqueles em que os nutrientes estão dissolvidos em uma solução aquosa. O crescimento bacteriano nesse meio muda seu aspecto, ou seja, o meio sofre uma turvação.

Meios semi-sólidos: são aqueles que possuem na sua composição, além dos nutrientes, uma pequena porcentagem de um polissacarídeo proveniente de algas marinhas, chamado Ágar. São geralmente utilizados em tubos e a partir desse tipo de cultura é possível observar a motilidade bacteriana.

Meios sólidos: são aqueles que possuem uma porcentagem maior de Ágar (cerca de 15 g/litro de água destilada), além dos nutrientes. Podem ser dispostos em tubos ou em Placas de Petri, dependendo da finalidade. Através do meio sólido em placas de Petri é possível, utilizando-se a técnica do esgotamento, conseguir o isolamento de colônias bacterianas e, portanto, é o meio ideal para que seja feito o estudo da morfologia colonial. Já a cultura em Ágar inclinado fornece somente o crescimento bacteriano com a obtenção de uma biomassa de microrganismos.

Quanto à função:

Meios simples: possuem os componentes essenciais para o crescimento de microrganismos pouco exigentes. Ex: caldo simples.

Meios de enriquecimento: são adicionadas ao meio simples substâncias enriquecedoras como sangue, soro, ovo, extrato de leveduras, etc. Ex: Caldo *Brain Heart Infusion* e o Caldo Tetracionato.

Meios seletivos: aqueles que favorecem o desenvolvimento de determinados microrganismos em detrimento de outros, geralmente pela adição de substâncias inibidoras. Ex: Ágar Salmonella-Shigella.

Meios diferenciais: permitem o desenvolvimento de grupos de microrganismos com características relativamente definidas, o que permite diferenciar um grupo ou uma espécie de microrganismo. Ex: Ágar MacConkey.

Meios de manutenção: são aqueles destinados a manter a viabilidade de uma cultura bacteriana. Ex: Ágar Nutriente.

Quanto à natureza:

Meios animados: são constituídos de células vivas, como animais de laboratório, tecidos vivos ou ovo embrionado.

Meios inanimados: não possuem células vivas. Podem ser naturais ou sintéticos. Naturais são aqueles que possuem substâncias provenientes da natureza, e o sintético contém substâncias obtidas em laboratório. Ainda podemos obter meios de cultivo semi-sintéticos, que são resultantes da união dos dois anteriores.

Os meios de cultivo são preparados e armazenados seguindo um rigoroso controle de qualidade, pois devem ser mantidas todas as suas propriedades nutricionais e garantida a esterilidade até o momento de sua utilização.

1.6.3. Preparo do meio de cultura

O meio de cultura deve ser preparado seguindo os procedimentos padrões do laboratório de microbiologia. Inicialmente, verificar a quantidade e tipo de meio que será preparado, fazer os cálculos para a pesagem do Ágar de acordo com a hidratação (aferindo o volume em proveta) do meio seguindo as indicações do rótulo. A aferição do pH deve ser avaliada, e o mesmo deve ser igual a 7,0. Se houver diferença, o mesmo deve ser ajustado usando HCl ou NaOH 1M. O Ágar deve estar totalmente dissolvido e homogeneizado em água no volume final para a quantidade de meio pesada indicado pelo fabricante por meio de aquecimento.

O balão volumétrico contendo o meio de cultivo totalmente dissolvido deve então ser tampado com tampa de "chumaço" de algodão hidrofóbico com papel pardo e levar a autoclave para a esterilização do meio de cultivo. Após a autoclave, deixar resfriar até uma temperatura média de 60°C, e distribuir nas placas de *petri* dentro da capela. As placas devem ficar fechadas até a solidificação do meio, posteriormente, acondicionar os meios de cultivos preparados em geladeira para o uso rotineiro no laboratório.

É importante incubar 10% do lote preparado com meio de cultivo para avaliação da qualidade, colocando-a em estufa a 35°C por 2 dias para verificar se há crescimento de cultura. Se crescerem duas ou mais colônias por placa, descartar todos os meios preparados naquele lote, pois os mesmos não são viáveis para isolamento bacteriano, esse procedimento é conhecido como teste de esterilidade. Outro controle para os meios de cultivo é o teste de desempenho. Neste, inocula-se cepas conhecidas, como *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* para avaliar se há crescimento bacteriano, como por exemplo, o uso de Ágar sangue que é um meio seletivo para as cepas descritas.

1.6.4. Isolamento em cultura

A obtenção de culturas puras, também denominadas isolamento, é um dos primeiros procedimentos para que se possa realizar estudos sobre microrganismos. Sua aplicabilidade é necessária em produtos comerciais e industriais, como inoculantes e antibióticos.

O procedimento inicial do isolamento depende da amostra a ser utilizada, que pode ser um tecido animal ou vegetal, água, solo, e etc. da qual podemos obter uma cultura mista pela inoculação no meio, ou em uma cultura mista da qual queremos isolar uma ou mais espécies.

O método mais prático para obtenção de colônias isoladas consiste na semeadura em superfície, no meio de cultura, até o esgotamento do inóculo. Nesse caso, os microrganismos são inoculados na superfície de um meio de cultura sólida com o auxílio da alça de platina, fazendo-se estrias na superfície do meio. O inóculo é progressivamente diluído, de modo a obterem-se no final, células isoladas que darão origem a culturas puras.

1.6.5. Quantificação em cultura

A obtenção de culturas puras, também denominadas isolamento, é um dos primeiros procedimentos em laboratórios de microbiologia. O crescimento bacteriano é usado como referência à grandeza da população total avaliada. Assim, o crescimento em cultura (quantificação) pode ser avaliado por:

- a) contagem celular (direta e indireta)
- b) determinação da massa celular (diretamente, por pesagem ou indiretamente pela determinação de um componente celular ou turbidimetria)
- c) avaliação da atividade celular (indiretamente pela relação entre grau de atividade bioquímica da célula e o tamanho da população bacteriana).

O método mais comum utilizado para a contagem do número de células numa população é a contagem dos viáveis, também chamada contagem em placa. Numa suspensão de células bacterianas, cada mililitro deve conter milhões de células. Nem todas, obviamente, estão viáveis. O número de células viáveis presentes em uma suspensão tem sido genericamente denominado U.F.C. (unidades formadoras de colônias), do inglês *colony forming units*, (C.F.U.). Assim, UFC (unidade formadora de colônia) é usado quase como sinônimo de célula viável (Figura 6.1.).

Os métodos de contagem de colônias em placas ancoram-se no princípio que, sendo a diluição e o semeio em placas bem feitos, cada colônia surgida é considerada originária de uma única célula viável. A quantificação de UFC necessariamente envolve o preparo, com toda assepsia, de uma suspensão de células bacterianas, que a seguir sofre diluições em série e uma alíquota de cada diluição é semeada em placa. Após a incubação, conta-se o número de colônias, sempre se assumindo ser cada colônia originária de uma única célula.

É recomendável o cultivo da bactéria em um meio pobre em carboidratos, pois, caso contrário, há abundante produção de cápsula e eventual aderência de células umas às outras, ocasionando erros de contagem. Isso porque, quando acontece de um grupo de células ser depositado na superfície do meio, a colônia surgida é contada na

pressuposição de ser ela originária de uma única célula viável, o que pode não ser verdade.

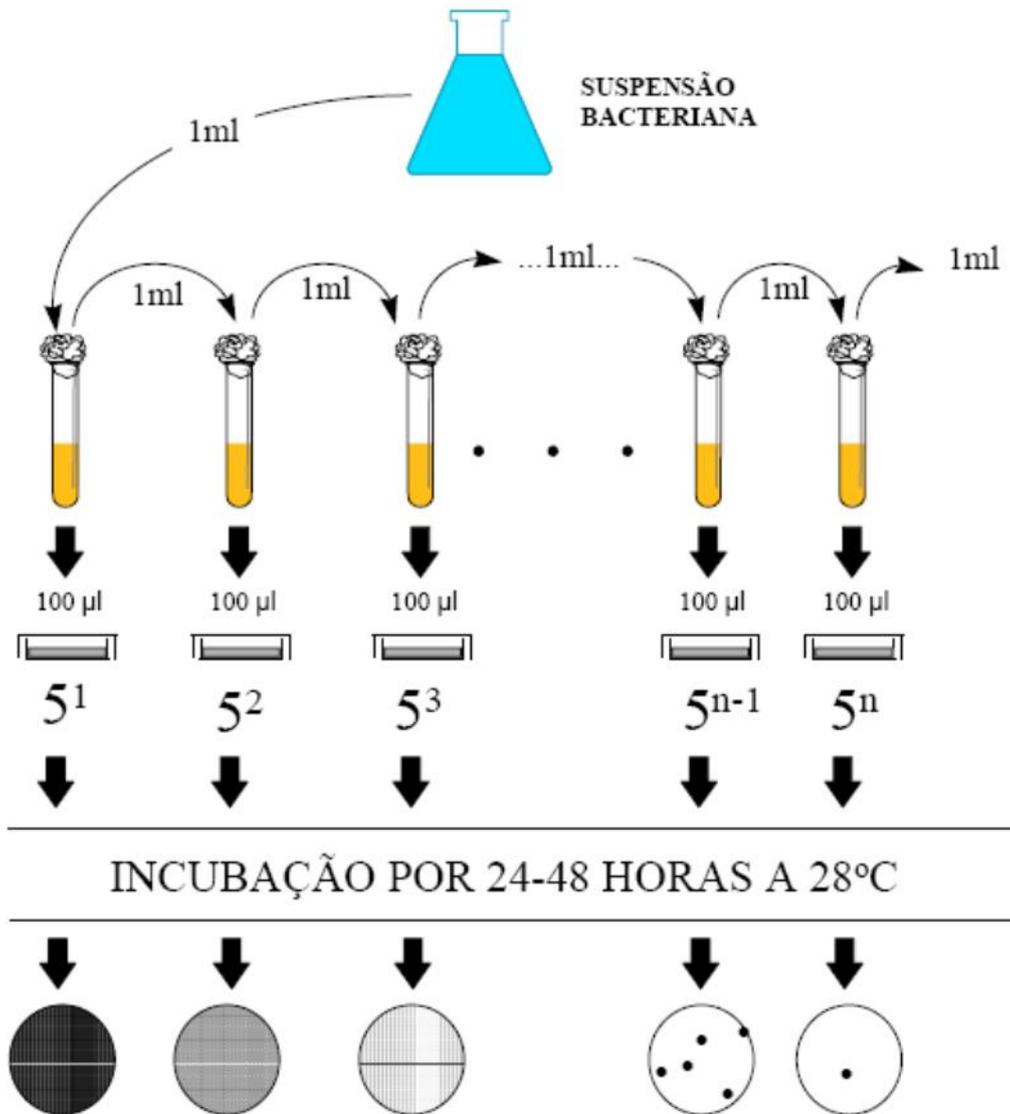


Figura 1.6. Esquema explicativo do procedimento para execução da técnica de diluições seriadas e cultivo em placas e contagem de C.F.U.

1.6.6. Identificação

A identificação de uma bactéria requer a observação de um conjunto complexo de características. Certas características devem ser analisadas com detalhes para chegar a determinação da espécie em avaliação, pois muitas espécies distintas, podem apresentar mesma morfologia e metabolismo

semelhante. Recomenda-se que sejam avaliados os aspectos morfológicos, bioquímicos, hemolíticos, antigênicos e genotípicos.

A avaliação bioquímica é importante, pois se pode avaliar diferentes microrganismos pelas vias metabólicas para obtenção de energia, bem como estes podem possuir enzimas específicas utilizadas nos processos de metabolização de substratos ou mecanismos de virulência. Os principais testes bioquímicos utilizados no laboratório de microbiologia são:

Fermentação de carboidratos: usado para identificar bactérias enteropatogênicas Gram negativas.

Teste da catalase: diferencia as espécies *Micrococcaceae* (catalase positiva) de *Streptococaceae* (catalase negativa).

Teste da coagulase: utilizado para distinguir a bactéria patogênica *S. aureus* e outras *Micrococcaceae* que inclui outras espécies de *Staphylococcus* e o gênero *Micrococcus*.

Teste do citrato: utilizado para diferenciação entre *Enterobacteriaceae* para determinar a habilidade do organismo em usar citrato.

Teste da urease: utilizado para diferenciar organismos que tem habilidade de hidrolisar uréia com a enzima urease. Exemplo, o patógeno do trato urinário *Proteus* é diferenciado de outras bactérias entéricas.

Teste da β -galactosidase: utilizado para identificar bactérias que fermentam lactose ---> glicose + galactose pela ação da enzima β -galactosidase. **Produção de gás sulfídrico:** identifica bactérias capazes de reduzir enxofre.

Teste do indol: usado para diferenciar *Enterobacteriaceae*, a qual produz indol, amônia e ácido pirúvico pela ação da enzima triptofanase a partir de triptofano.

Outros testes diferenciais como meios seletivos, por exemplo, Ágar sangue são importantes para isolamento bacteriano.

1.7. GENÔMICA DE PROCARIOTOS

O genoma é o conjunto completo dos genes de um organismo, e como falado anteriormente, as bactérias possuem uma estrutura genômica simples, e este fato permitiu que uma grande quantidade de conhecimentos venha sendo acumulada sobre estes organismos. Muitos projetos de sequenciamento de genomas completos vêm sendo desenvolvidos intensivamente nos últimos anos, o que trouxe uma nova visão sobre, filogenia, fisiologia, patogenicidade e regulação gênica em bactérias. E esses projetos de sequenciamentos genômicos realizados e em andamento, onde utiliza-se os procariotos como modelos biológicos de estudo, continuam a nos lembrar que o nosso conhecimento sobre o funcionamento de um organismo ou célula, a nível molecular, é realmente muito limitado.

As pesquisas em genômica de microrganismos têm avançado constantemente, e uma vantagem da utilização das bactérias em estudos genéticos é o seu tempo de geração reduzido, como por exemplo, existem algumas linhagens de bactérias *E. coli*, em que o tempo de geração pode ser de 20 minutos, sob condições favoráveis necessárias. Outro fator, relevante, é o fato das bactérias serem haploides, o que favorece a aplicação de várias técnicas de genética clássica, através de pesquisas com linhagens mutantes, permitindo assim, uma visão funcional desses organismos e de distintos mecanismos moleculares.

A integração de várias áreas do conhecimento permitiu avançar os estudos em relação à genômica, os processos de transcrição das informações contidas nos genes, a transcritômica, bem como a compreensão do conjunto dos produtos destes genes pela proteômica. No início desta década também se iniciava as discussões e as ações para uma nova era da biologia, a “era pós-genômica”. Neste contexto, promoveu-se o desenvolvimento e o aperfeiçoamento das técnicas que permitiram os avanços destas novas ciências ômicas, como a transcriptômica, proteômica e metabolômica, com o objetivo de isolar e caracterizar o RNA, as proteínas e os metabólitos,

respectivamente; sendo possível devido também, ao desenvolvimento de uma ciência crucial, a bioinformática.

Assim, os estudos com procariotos vêm contribuindo intensamente com a compreensão dos mecanismos envolvidos na expressão e interação dos genes, assim como a compreensão das redes funcionais estabelecidas pelas proteínas, fazem com que, no cenário científico atual, a genômica e a proteômica estejam cada vez mais em evidência.

1.8. LEITURA RECOMENDADA

BLACK, Jacquelyn G. **Microbiologia – Fundamentos e Perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

BURTON, Gwendolyn; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia para as ciências da saúde**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

MARQUES, Marilis V. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**, 1. Ed. Ribeirão Preto (SP), Editora SBG, 2012.

PELCZAR JUNIOR, Michael J., CHAN, E. C. S., KRIEG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Editora Pearson, 2005.

TORTORA, Gerard J., FUNKE, Berdell R., CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

UNIDADE 2: MICOLOGIA

2.1. ASPECTOS GERAIS DOS FUNGOS

Os fungos são eucariotos, com núcleo bem definido circundado por uma membrana, uma membrana celular que contém lipídios, glicoproteínas e esteróis, mitocôndrias, aparelho de Golgi, ribossomos ligados ao retículo endoplasmático; e filamentos intermediários. Existem milhares de espécies de fungos conhecidas como leveduras e bolores, mas cerca de 100 delas provocam doenças em seres humanos, em animais ou em plantas.

No âmbito da micologia médica, os fungos podem causar micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. As três primeiras micoses associadas a pele, cabelo e unhas, as quais podem ser crônicas e resistentes ao tratamento com antimicóticos, mas não afetando o quadro clínico geral do paciente. Entretanto, as micoses sistêmicas causadas por fungos patogênicos ou oportunistas afetam a saúde geral do paciente, podendo em alguns casos ser fatais. Neste sentido, o sistema imunitário do hospedeiro é importante na determinação da evolução deste tipo de micose. Na Tabela 2.1. estão descritas as principais infecções fúngicas em humanos.

Tabela 2.1. Principais infecções fúngicas

Tipo de Infecção	Microrganismo fúngico	Doença
Superficial	<i>Malassezia furfur</i>	Pitíriase versicolor
Cutânea	<i>Dermatófitos</i>	Dermatofitose (pele, unha e cabelo).
	<i>Candida albicans</i>	Candidíase de mucosas
Subcutânea	<i>Sporothrix schenckii</i>	Esporotricose
Sistêmica	<i>Blastomyces dermatidis,</i>	Blastomicose,
	<i>Coccidioides immitis,</i>	Coccidioidomicose,
	<i>Histoplasma capsulatum,</i>	Histoplasmose,
Oportunistas Sistêmicas	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Paracoccidioidomicose
	<i>Aspergillus fumigatus e outros,</i>	Aspergilose, Candidíase,
	<i>Candida albicans e outros,</i>	Criptococose, Zigomicose

Cryptococcus neoformans,
Espécies de *Mucor* e *Rhizopus*

Os fungos são protistas não-fotossintéticos que crescem como uma massa de filamentos entrelaçados e ramificados (hifas) conhecidas como micélio. As leveduras são formas, não-miceliais. Os fungos são classificados baseando-se na sua forma de reprodução: sexuada ou assexuada. A maioria dos fungos se reproduz por reprodução assexuada, formando conídios através de mitose.

As descrições das espécies incluem principalmente várias estruturas assexuadas, e os fungos são identificados baseando-se nas características morfológicas das hifas, leveduras e conídios, que podem formar-se em conidióforos especializados, nas laterais ou nas extremidades de hifas. O desenvolvimento dos conídios apresenta nomenclatura diferenciada em sua forma de desenvolvimento, por exemplo: clamidoconídio e blastoconídio.

Alguns fungos patogênicos e não patogênicos respondem a estímulos ambientais, podendo exibir diferentes formas, estes são denominados dimórficos. Na classificação geral, podem ser ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos e ficomicetos.

2.2. Ciclo de vida

Os fungos filamentosos podem reproduzir-se assexuadamente pela ramificação de suas hifas. Além, disso, tanto a reprodução sexuada quanto a reprodução assexuada ocorrem pela formação de esporos.

Os **esporos assexuais** são formados pelas hifas. Quando esses esporos germinam, tornam-se organismos geneticamente idênticos ao parental.

Os **esporos sexuais** resultam da fusão de núcleos de tipos opostos de cruzamento de uma mesma espécie do fungo. Os fungos produzem esporos sexuais com menos frequência que os esporos assexuais. Os esporos são de considerável importância na identificação de fungos.

2.3. Formas e estruturas

Os fungos patogênicos têm duas formas: as formas filamentosas, os bolores, e as formas unicelulares, as leveduras. Os bolores crescem na forma de filamentos ramificados microscópicos. Esses filamentos são denominados hifas, e o seu conjunto é conhecido como micélio.

As leveduras são células isoladas, ovoides ou esféricas, com parede celular rígida, exibindo a mesma complexidade celular das hifas. As leveduras dividem-se, em sua maioria por brotamento, embora algumas espécies se multipliquem por divisão binária. Em ágar, formam colônia que se assemelham àquelas das bactérias, mas que habitualmente se tornam consideravelmente maiores. Algumas leveduras também produzem uma cápsula de polissacarídeo, uma característica importante da levedura responsável pela criptococose (*Cryptococcus neoformans*).

2.4. Dimorfismo e crescimento

Muitos fungos patogênicos importantes exibem ambas as formas de leveduras. Por exemplo, o agente da histoplasmose, *Histoplasma capsulatum*, cresce como levedura em determinadas condições e como micélio em outras. Esse fenômeno é denominado dimorfismo. No laboratório, a transição entre duas fases pode ser reversivelmente induzida por mudanças na temperatura; a fase de levedura é mais típica na temperatura do corpo humano.

A mudança de micélio para levedura ocorre frequentemente quando um microrganismo de vida livre torna-se parasita. No caso da maioria dos fungos que provocam infecções sistêmicas, como por exemplo, os agentes da histoplasmose e da blastomicose, a levedura é a forma parasitária, enquanto o bolor é a forma encontrada no ambiente (solo). Em alguns casos raros, como em *Candida*, essa regra é invertida, e a forma de micélio costuma ser encontrada nos tecidos do hospedeiro.

Nem todos os fungos patogênicos são dimórficos e sofrem alterações morfológicas quando infectam um hospedeiro. Os *Aspergillus*, que estão entre os bolores mais comuns no meio ambiente, são sempre filamentosos, enquanto *C. neoformans* ocorre sempre na forma de levedura. Certas leveduras,

particularmente espécies de *Candida*, possuem uma forma modificada de brotamento em que as células que sofreram brotamento recente permanecem fixadas às células parentais, tornando-se alongadas. Esses agregados são denominados de pseudo-hifas ou, no agregado, pseudomicélio.

2.4. Classificação das micoses

As infecções fúngicas podem ser classificadas de acordo com as áreas do corpo que são afetadas primariamente.

As **micoses superficiais** são infecções limitadas às camadas mais externa da pele e dos cabelos. Em geral, trata-se de infecções leves, com resposta inflamatória mínima ou ausente. As micoses superficiais são principalmente problema estéticos, que são facilmente diagnosticadas e que respondem de modo satisfatório a terapia. Esse grupo compreende quatro infecções. Duas delas acometem os cabelos do couro cabeludo (*pedra negra* e *pedra branca*), enquanto as outras duas acometem a pele sem pêlos (*tinea nigra* e *tinea versicolor*).

As **micoses cutâneas**, como o pé de atleta ou a *tinea*, são encontradas em locais ligeiramente mais profundos na epiderme. Essas condições são causadas por fungos denominados **dermatófitos**. As doenças que esses fungos causam podem ser agudas ou crônicas, dependendo do agente etiológico e do estado imunológico do paciente. Em geral, essas micoses cutâneas são mais difíceis de tratar do que as infecções fúngicas superficiais. Os agentes etiológicos pertencem a três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. As doenças clínicas que são denominadas *tinea* são classificadas de acordo com a área do corpo acometida, *tinea pedis* (pés), *tinea capitis* (cabeça) e *tinea corporis* (corpo).

As **micoses subcutâneas** constituem um grupo de doenças fúngicas que acometem a derme e o tecido subcutâneo. São causadas por fungos que

costumam ser isolados do ambiente e que só produzem doenças em circunstâncias que estão associadas a traumatismo. Essas micoses não respondem satisfatoriamente a terapia antifúngica. Algumas vezes, a excisão da lesão ou a amputação tornam-se necessárias para o tratamento dessas infecções: fomicose subcutânea, micetoma eucomicótico, feo-hifomicose, cromoblastomicose e esporotricose linfangítica.

As **micoses sistêmicas** são infecções que invadem os órgãos internos do corpo. Essas micoses são causadas por patógenos primários, como *H. capsulatum* ou *C. immitis*, que infectam indivíduos saudáveis, ou podem ser causadas por fungos oportunistas, como *C. albicans*. Os indivíduos saudáveis afetados geralmente apresentam, em sua maioria, sinais leves ou manifestações subclínicas. Em contraste, as infecções por fungos oportunistas no hospedeiro imunocomprometido quase sempre produzem doença significativa.

2.3. Contato

Com algumas exceções importantes, os fungos implicados em doenças humanas são de vida livre na natureza. A maioria das micoses é adquirida em consequência de contato acidental por inalação ou penetração traumática a partir de uma fonte exógena. Por exemplo, *H. capsulatum* é encontrado no solo contaminado por excrementos de morcegos e *C. neoformans* está associado a excrementos de pombos.

Alguns fungos possuem preferências geográficas distintas. Assim, *C. immitis* é encontrado na área bioclimática conhecida como a *Lower Sonram* do sudoeste dos Estados Unidos e áreas geográficas semelhantes na América Central e na América do Sul. Essas regiões possuem clima áridos ou semi-áridos, verões quentes, poucas geadas no inverno e solo alcalino.

A paracoccidiodomicose é uma doença provocada por *P. brasiliensis*, limita-se geograficamente à América do Sul e América Central, sendo uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina. Os propágulos da fase miceliana do fungo, quando inalados, diferenciam-se na forma de leveduras

estabelecendo a infecção nos pulmões humanos. O estabelecimento da doença depende, dentre vários aspectos da habilidade do fungo em modular a resposta do sistema imune. Em contraste com esses habitats ambientais, a *Malassezia furfur* é uma levedura encontrada na pele humana sadia, sobretudo na parte superior do tronco, face e couro cabeludo, ou seja, as áreas ricas em glândulas sebáceas, que produzem lipídios utilizados por esses microrganismos.

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que são inter-relacionados pela similaridade morfológica, fisiológica e de patogenicidade, e que em vida parasitária, têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados de humanos e de outros animais, causando infecções denominadas dermatofitoses. As dermatofitoses são enfermidades infectocontagiosas, cujos agentes etiológicos pertencem aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, que constituem um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica. Além disso, podem ser divididos em conformidade com seu habitat primário, sendo que espécies geofílicas habitam o solo, zoofílicas os animais e as antropofílicas os seres humanos.

As dermatofitoses estão entre as doenças infecciosas cosmopolitas mais diagnosticadas no mundo e os dermatófitos estão entre os agentes etiológicos mais comuns de infecção no homem, não existindo povos ou regiões geográficas sem terem sido acometidas por eles. Essas infecções afetam aproximadamente 40% da população mundial, representando 30% de todas as infecções fúngicas cutâneas. Além disso, registros epidemiológicos apontam o predomínio das espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* como um dos principais agentes causadores de dermatofitoses em humanos, nas mais diversas manifestações clínicas.

Atualmente, as infecções causadas por dermatófitos e outros fungos vêm aumentando consideravelmente entre crianças, idosos e principalmente na população imunocomprometida. As dermatofitoses, também chamadas de tineas, são infecções muito comuns no mundo inteiro e têm como agente etiológico mais comum o fungo filamentosos e antropofílico *T. rubrum*, sendo isolado principalmente dos pés (*tinea pedis*), das unhas (*tinea unguinum*), das

virilhas (*tinea cruris*) e do corpo (*tinea corporis*). Estudos envolvendo este patógeno são cada vez mais importantes devido à sua incidência, ao aparecimento de linhagens resistentes aos medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado e ao comportamento invasivo deste agente em pacientes com o sistema imune comprometido. Estes fatos levam à necessidade de se ampliar o conhecimento sobre a biologia deste microrganismo na tentativa de se desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes.

2.4. Diagnóstico e tratamento

As infecções fúngicas são diagnosticadas por microscopia direta, cultura e sorologia. As características morfológicas dos microrganismos ajudam na identificação de todos os fungos, tanto nos tecidos quanto em cultura. Esses aspectos são particularmente úteis no diagnóstico das infecções sistêmicas graves. Entre as características notáveis destacam-se as esférulas de *C. immitis* nos tecidos, as leveduras em brotamento típicas de *B. dermatitidis* no pus, as hifas cenocíticas da mucormicose e as células leveduriformes encapsuladas de *C. neoformans* no líquido cefalorraquidiano ou no tecido cerebral. Sua detecção permite o estabelecimento de um diagnóstico imediato e seguro nas infecções sistêmicas.

Para os patógenos oportunistas, como *Mucor*, *Candida* e *Aspergillus*, o exame microscópico das amostras clínicas é particularmente útil, visto que a cultura isoladamente pode não ser útil (pois, estes microrganismos podem fazer parte da microbiota).

Os fungos patogênicos também podem ser isolados de tecidos infectados através de procedimentos de cultura. Quando o microrganismo isolado é o patógeno primário com *H. capsulatum*, o diagnóstico é inequívoco. O isolamento de microrganismos oportunistas, como *Candida*, de locais superficiais pode ter pouca importância clínica, visto que pode representar uma colonização; entretanto, a cultura desses microrganismos a partir do sangue é sempre significativa no aspecto clínico.

Devido ao crescimento lento dos fungos, observa-se quase sempre um considerável intervalo entre o momento em que se obtém a amostra e o momento em que se observa uma cultura positiva. A espera de resultados de culturas pode resultar em demora significativa na implementação do tratamento. Apesar dessas limitações, as técnicas de biologia molecular são importantes em definir o diagnóstico em casos de importância clínica emergencial, devido à sensibilidade e especificidade na determinação do agente patogênico.

Quanto ao tratamento, a maioria dos antifúngicos é incluído em duas categorias: os agentes que agredem a membrana celular dos fungos e aqueles que são capturados pelas células e interrompem os processos celulares (inibição da síntese de DNA e RNA, inibe a organização dos microtúbulos).

A toxicidade representa um problema no tratamento dessas doenças. Além disso, muitos agentes antifúngicos possuem valor terapêutico limitado, devido a problemas de solubilidade, estabilidade e absorção.

2.5. GENÔMICA DE FUNGOS

Após cinco décadas de estudos de fungos modelos biológicos, através da Genética Clássica e Molecular, as informações obtidas estão sendo aplicadas no controle de fungos patogênicos e na exploração daqueles que têm interesse industrial e econômico. A habilidade que muitos fungos têm para secretar enzimas, antibióticos e outros produtos de interesse comercial, torna-os atrativos do ponto de vista da biotecnologia moderna.

As doenças infecciosas por outro lado, representam uma das principais causas de mortes humanas e de diminuição da qualidade de vida dos pacientes, sendo mais frequentes em locais onde não existe saneamento básico adequado. A incidência destas doenças foi intensificada com o aumento de casos de AIDS, aumento na frequência de órgãos transplantados e de portadores de câncer submetidos à quimioterapia, uma vez que indivíduos imunocomprometidos são mais susceptíveis a infecções oportunistas, como as micoses superficiais que se tornam invasivas nestas condições.

O uso indiscriminado de drogas vem acarretando a seleção de linhagens

resistentes de várias espécies fúngicas, dificultando tratamentos e elevando os custos dos mesmos. Além disto, existem poucos antifúngicos disponíveis no mercado, sendo que a maioria deles atua sobre os mesmos alvos celulares. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novos antifúngicos para o controle das mais prevalentes infecções fúngicas, principalmente baseados em novos alvos. Para isto, torna-se crucial um maior entendimento da biologia dos fungos patogênicos, como fisiologia, aspectos moleculares e sistemas de adaptação a diferentes condições de estresse ambiental, mecanismos de resistência a inibidores fúngicos, e das interações patógeno-hospedeiro. Entretanto, pouco se sabe sobre os aspectos moleculares envolvidos no processo infeccioso e na interação com o hospedeiro durante os processos infecciosos.

Nessa perspectiva, de pesquisas genômicas, informações biológicas e instrumentos desenvolvidos para fungos modelo biológico, como *A. nidulans* e *Neurospora crassa* continuarão auxiliando no entendimento da fisiologia celular de patógenos. Além disto, a genômica funcional e comparativa entre diferentes espécies de fungos poderá revelar vias metabólicas e produtos celulares comuns que servirão como potenciais alvos terapêuticos, contribuindo para o controle das infecções fúngicas.

2.6. LEITURA RECOMENDADA

AMEEN M. **Epidemiology of superficial fungal infections.** Clin Dermatol; 28 (2): 197-201. 2010.

BLACK, Jacquelyn G. **Microbiologia – Fundamentos e Perspectivas.** 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

BURTON, Gwendolyn; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia para as ciências da saúde.** 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

MARQUES, Marilis V. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**, 1. Ed. Ribeirão Preto (SP), Editora SBG, 2012.

PELCZAR JUNIOR, Michael J., CHAN, E. C. S., KRIEG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Editora Pearson, 2005.

TORTORA, Gerard J., FUNKE, Berdell R., CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

WEITZMAN, I. e R. C. SUMMERBELL. **The Dermatophytes**. Clin Microbiol Rev, 8, 240-259. 1995.

UNIDADE 3: VIROLOGIA

3.1. ASPECTOS GERAIS DOS VÍRUS

Os vírus são agentes infecciosos, contendo apenas um tipo de ácido nucleico (RNA ou DNA) como genoma. O ácido nucleico fica envolto por uma capa proteica, que pode ser circundada por uma membrana contendo lipídeo. A unidade infecciosa é denominada *vírião*. Os vírus são inertes no ambiente extracelular. Replicam-se apenas em células vivas, sendo parasitas em nível genético.

A diferença fundamental entre os vírus e os demais agentes infecciosos reside no seu mecanismo de reprodução. Em contraste com as formas celulares de vida, os vírus não se dividem. A replicação do vírus é efetuada pela maquinaria celular do hospedeiro, que sintetiza múltiplas cópias do genoma e das proteínas virais. Esses componentes virais se reúnem espontaneamente no interior da célula do hospedeiro, formando partículas virais. Os vírus não dispõem de nenhum mecanismo para produzir energia. Assim, os vírus dependem totalmente das células hospedeiras, trata-se de parasitas intracelulares obrigatórios.

O ácido nucleico viral contém informações necessárias para programar a célula infectada do hospedeiro, de forma a sintetizar várias moléculas específicas do vírus, necessárias para o ciclo viral. Durante o ciclo de replicação, são produzidas numerosas cópias de ácido nucleico viral e proteínas do envoltório.

As etapas no processo da replicação dos vírus incluem a infecção de uma célula suscetível, a reprodução do ácido nucleico e das proteínas e montagem da liberação da progênie infecciosa. A diversidade estrutural e genética dos vírus reflete-se na variedade de estratégias utilizadas pelos vírus para a sua replicação.

Os vírus podem ser classificados pelo tipo de ácido nucleico, tamanho e morfologia, presença de enzimas específicas relacionadas à replicação viral, propriedades imunológicas e sintomatologia. Aqui iremos abordar a classificação por ácido nucleico, que está descrita na tabela 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1. Sumário dos principais vírus de DNA.

Tipo viral	Características
Adenovírus	<p>Vírus de tamanho médio (70 a 90 nm), DNA de filamento duplo e exibem simetria cúbica, com 252 capsômeros. Infectam mucosas, provocando doenças respiratórias agudas, faringites, conjuntivites e gastroenterites.</p>
Hepadnavírus	<p>Vírus pequenos (42 nm) contendo moléculas de DNA circular. Tipicamente, ocorre produção excessiva da proteína superficial durante a replicação do vírus no fígado. Provocam Hepatite aguda e crônica (HBV); infecções persistentes estão associadas a um elevado risco de desenvolvimento de câncer hepático.</p>
Herpesvírus	<p>Vírus de tamanho médio contendo DNA duplo filamento. É circundado por um invólucro contendo lipídios. As infecções latentes podem perdurar por toda a vida do hospedeiro, geralmente em células glanglionares ou linfoblastóides. Os Herpes vírus humanos incluem os vírus herpes 1 e 2 (lesões orais e genitais), vírus da varicela zoster (herpes zoster e varicela), citomegalovírus, vírus Epstein-Barr (mononucleose infecciosa) e herpes vírus humano 6 e 7 (linfotrópico).</p>
Papilomavírus	<p>Vírus pequeno (45 a 55 nm), termoestáveis, contendo DNA circular duplo. O papilomavírus humano (HPV) possui mais de 100 tipos virais, são classificados em tipos virais de baixo e Alto risco oncogênico. Está associado aos carcinomas da região anogenital (ânus, vulva, vagina, colo do útero e pênis).</p>
Poxvírus	<p>Vírus grandes contendo DNA de filamento duplo, com invólucro de lipídios. Todos os tipos virais tendem a produzir lesões cutâneas. Sendo alguns patogênicos para o homem (varíola); outros que são patogênicos para animais, mas que podem infectar humanos.</p>

Tabela 3.2. Sumário dos principais vírus de RNA

Tipo viral	Características
Ortomixovírus	<p>Vírus de tamanho médio entre 80 a 120 nm, com invólucro contendo RNA de filamento único segmentado e de sentido negativo, exibindo simetria helicoidal. Apresentam hemaglutinina e neuraminidase. Todos os vírus são da influenza que infectam aves e mamíferos, incluindo o homem. A natureza segmentada do genoma viral permite um rearranjo genético, gerando alta taxa de variação natural entre os vírus influenza. É o vírus da gripe comum, e, também, do H1N1.</p>
Paramixovírus	<p>Tamanho viral de 150 a 300 nm, RNA de filamento único, não segmentado e de sentido negativo é superior à soma dos segmentos de RNA dos Ortomixovírus. Tanto o nucleocapsídeo quanto a hemaglutinina são formados no citoplasma. Os vírus que infectam humanos incluem vírus da caxumba, sarampo, parainfluenza e vírus sincicial respiratório. Vírus com invólucro, 90 a 120 de diâmetro, cujo genoma apresenta duas cópias de RNA e transcriptase reversa. No processo de replicação, o DNA das células infectadas serve como cópia para a maquinaria viral. Os retrovírus causam a</p>
Retrovírus	<p>Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), hepatite e hepatocarcinoma (HCV) e alguns tipos de leucemia e sarcoma.</p>

O ácido nucleico viral é circundado por um capsídeo, isto é, um envoltório proteico simples ou duplo. Em seu conjunto, o ácido nucleico e o capsídeo são denominados nucleocapsídeo. Os capsídeos são compostos por subunidades repetitivas menores (capsômeros) dispostas em padrões simétricos. As subunidades repetidas de proteínas virais organizam-se em virions maduros.

Muitos vírus possuem um envoltório que circunda o núcleocapsídeo. Esses vírus são denominados vírus com envoltório ou envelopados; os vírus sem envoltório são denominados vírus sem envoltório ou não envelopados. O envoltório viral é composto de proteínas específicas do vírus, juntamente com lipídios e carboidratos derivados das membranas das células hospedeiras, como por exemplo, membrana plasmática. Em alguns casos, as proteínas do envoltório específicas do vírus incluem uma proteína de matriz (proteína M), que reveste a superfície interna do envoltório e está em contato com o capsídeo.

As glicoproteínas específicas do vírus podem projetar-se a partir da superfície externa do envoltório, formando estruturas conhecidas como espículas. Certos vírus contêm glicoproteínas de superfície que aglutinam os eritrócitos (hemaglutininas) através da sua ligação aos receptores de superfície do eritrócito.

Grande número de vírus possui atividades enzimáticas associadas ao *virion*, dependendo da estratégia empregada para a replicação de seus ácidos nucleicos. A enzima viral que atua na formação de mRNA vírus-específico, que é necessária para a síntese de todas as proteínas virais, pode ser uma RNA-polimerase DNA-dependente. Os retrovírus contêm uma DNA-polimerase RNA-dependente conhecida como transcriptase reversa. Alguns vírus possuem enzimas de processamento do mRNA, como as “enzimas de cobertura” (*capping enzymes*), que modificam os mRNA virais nas extremidades 5' através da adição de um envoltório de metilguanossina ou enzimas que efetuam a poliadenilação da extremidade 3' do mRNA viral.

Outras enzimas codificadas pelos vírus incluem proteínas quinases, nucleosídeo trifosfato-fosfatases, endonucleases e RNAses. Certos vírus, como os da influenza, apresentam enzimas em sua superfície (neuraminidases) que estão envolvidas na sua fixação às células hospedeiras.

3. 1.1. Replicação viral

Fora da célula hospedeira, as partículas virais não têm atividade metabólica independente e são incapazes de se reproduzir por processos

característicos de outros microrganismos (por exemplo, fissão binária nas bactérias).

A reprodução dos vírus dá-se pela replicação, na qual os componentes proteicos e o ácido nucleico viral são reproduzidos dentro de hospedeiros susceptíveis. Para que isso ocorra, os vírus redirecionam os processos metabólicos das células hospedeiras para produzir novos *vírions*, e elas deixam então de produzir material novo para si. O processo de infecção e replicação viral pode ser dividido em cinco fases:

1. *Adsorção ou fixação* – esta fase requer a participação de receptores específicos presentes na superfície das macromoléculas do *vírion* e da célula hospedeira. Ocorre em duas etapas: primeiro ocorre uma adsorção preliminar por ligação iônica, facilmente reversível por alteração do pH ou concentração salina do meio; e posteriormente, há uma fixação mais firme e irreversível;
2. *Penetração* – aqui os vírus penetram na célula hospedeira pela fusão do envelope viral e a membrana celular e os nucleocapsídeo são liberados dentro do citoplasma;
3. *Biossíntese dos componentes virais* – nesta fase, a replicação ativa do ácido nucleico e a síntese de proteínas virais podem ser divididas em funções precoces e tardias. Nas funções precoces, ocorre a síntese do mRNA viral. A síntese de outras proteínas, bem como a montagem do nucleocapsídeo, caracterizam as funções tardias;
4. *Maturação e montagem* – após a síntese de um bom número dos componentes essenciais para progênie do vírus, estes dirigem o acoplamento destes materiais sob forma de *vírions* maduros. É denominada maturação a fase da infecção viral onde se observa a produção dos componentes estruturais dos *vírions* e sua montagem com o ácido nucleico, para formar a estrutura do nucleocapsídeo;
5. *Liberação* – fase final que varia de acordo com o agente viral. Enquanto em alguns casos a lise celular é responsável pela liberação concomitante das partículas virais, em outros, tanto a maturação quanto

a liberação são relativamente lentas e os *vírions* são liberados sem que haja destruição da célula hospedeira.

3.1.2. Bacteriófagos

Os bacteriófagos (também chamados de fagos) são vírus que infectam bactérias, possuem tamanho entre 30 e 70nm (a maioria é menor que 60nm) e são abundantes em vários ecossistemas. O material genético destes vírus pode variar, onde alguns vão conter RNA e outros DNA; alguns de fita simples e outros de fita dupla. De maneira geral, o material genético do fago é envolvido por uma estrutura proteica, chamada capsídeo, quando o vírus se encontra fora da célula hospedeira. A estrutura dos capsídeos dos bacteriófagos é variável, alguns possuem duas partes, bem definidas como cabeça e cauda, enquanto outros são filamentosos.

A infecção da bactéria pelo vírus se inicia com a adsorção deste a receptores na superfície bacteriana. Ao infectar uma célula bacteriana, um bacteriófago pode integrar-se ao cromossomo bacteriano e comportar-se como parte integrante deste sem destruir a célula hospedeira. Vários bacteriófagos transportam genes que codificam fatores de virulência, tais como a toxina escarlatínica em *Streptococcus pyogenes*, a toxina diftérica em *Corynebacterium diphtheriae*, a toxina botulínica de *Clostridium botulinum*, enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* e citotoxinas de *E. coli*. Bactérias não-patogênicas podem ser convertidas em patogênicas após infecção com bacteriófagos específicos em um processo denominado conversão fágica.

Vale ressaltar, que essa interação bacteriófago-bactéria ocorre de maneira específica, ou seja, fagos que infectam uma espécie bacteriana em geral não infectam outras, uma consequência direta do reconhecimento de receptores na superfície. Na literatura científica, os bacteriófagos mais bem estudados são os que infectam *E. coli*, assim como seus papéis na transferência de DNA de uma bactéria para outra, durante o processo conhecido como transdução, e já descrito anteriormente neste livro.

3.2. Resposta do hospedeiro na defesa e no dano ao organismo

Inúmeros mecanismos de defesa constitutivos e induzidos do hospedeiro estão envolvidos no combate as infecções virais. A idade e a constituição genética do hospedeiro têm importantes implicações na evolução de certas infecções virais. Os recém-nascidos, por exemplo, mostram-se particularmente susceptíveis a infecções disseminadas e graves pelo vírus do herpes simples. Em contraste, muitas das doenças exantematosas, a infecção pelo poliovírus e a infecção pelo vírus *Epstein-Barr* geralmente são mais graves em indivíduos.

Nos camundongos, genes específicos ajudam a determinar a susceptibilidade a certas infecções virais, atuando através de efeitos sobre o sistema imune, a produção de *interferon* ou receptores virais. O estado nutricional do hospedeiro pode aumentar a susceptibilidade a infecções, como sarampo, talvez deprimindo a imunidade mediada por células. Essa associação explica a elevada taxa de mortalidade associada ao sarampo em alguns países em desenvolvimento. O estresse pode desencadear herpes labial recorrente.

A imunidade celular constitui habitualmente o mais importante mecanismo de defesa induzido contra infecções virais. Os pacientes com deficiência da imunidade celular, mas com capacidade normal de produção de anticorpos frequentemente se recuperam de modo precário das infecções virais. A fagocitose pelos neutrófilos não desempenham um papel tão importante nas infecções virais quanto nas infecções bacterianas. Por outro lado, os macrófagos estão frequentemente envolvidos no refreamento dos vírus, bem como na sua disseminação pelo corpo.

3.2.1. Resposta Humoral

Os vírus são, em sua maioria, antigênicos o suficiente para estimular a resposta imunológica. Os vírus possuem um grande número de proteínas estranhas, e cada uma delas pode conter múltiplos sítios antigênicos. Além disso, embora a quantidade de material antigênico viral possa ser inicialmente muito pequena, ela é amplificada durante a replicação viral. Entretanto, os anticorpos geralmente não desempenham um papel primário na interrupção das infecções virais agudas, porém são muito importantes na prevenção de

reinfeção. Em alguns casos, os próprios anticorpos podem estar implicados na patogenia da doença.

A imunogenicidade dos vírus depende da natureza do próprio vírus e de uma variedade de fatores do hospedeiro. Os príons responsáveis por doenças degenerativas neurológicas, como o *kuru* e a doença de *Creutzfeldt-Jakob*, não parecem provocar qualquer resposta imune detectável no hospedeiro. A via de infecção viral também pode desempenhar algum papel na imunidade. Nas infecções experimentais por influenza, a inoculação intravenosa é mais imunogênica do que a intraperitoneal, que, por sua vez, é mais imunogênica do que a subcutânea.

Os anticorpos que protegem o hospedeiro ao destruir a infectividade do vírus são denominados de anticorpos neutralizantes. Em geral, esses anticorpos neutralizantes ao vírus é, em geral, uma reação reversível. Os anticorpos neutralizantes reduzem a infectividade viral possivelmente ao inibir várias etapas do ciclo de replicação, como fixação, penetração ou desnudamento do vírus.

3.2.2. Complemento

Na ausência de resposta humoral, os vírus podem desencadear a ativação de ambas as vias do complemento, tanto a clássica quanto a alternativa. Os componentes ativados do complemento (por exemplo, C3b) podem atuar como opsoninas, intensificando a fagocitose dos vírus.

A ativação da via alternativa do complemento, em associação à produção de anticorpos, pode resultar em lise dos vírus com envoltório ou das células infectadas por vírus. Apesar de o sistema do complemento desempenhar um papel na proteção do hospedeiro contra infecção viral em animais, a deficiência do complemento nos seres humanos não está tipicamente associada a um aumento na frequência ou na gravidade das doenças virais. Por conseguinte, esse sistema provavelmente não desempenha um papel na proteção do hospedeiro contra a infecção viral em animais, a deficiência do complemento nos seres humanos está tipicamente associada a um aumento na frequência ou na gravidade das doenças virais. Neste sentido,

esse sistema provavelmente não desempenha um papel tão importante na defesa contra infecções virais quanto aquele desempenhado contra infecções bacterianas.

3.2.3. Imunidade Celular

A imunidade celular constitui habitualmente um importante fator na interrupção das infecções virais quanto na patogenia dessas doenças. Devido ao habitat intracelular dos vírus, as células infectadas tornam-se susceptíveis à ação dos linfócitos que reconhecem a presença de antígenos virais sobre a sua superfície. As células infectadas por vírus podem ser lisadas por diversos tipos de células linfoides através de vias tanto de anticorpos independentes quanto anticorpos dependentes.

Independentemente do anticorpo, a citotoxicidade exercida pelas células destruidoras naturais (*natural killer*, NK) proporciona uma das defesas mais precoces do hospedeiro contra a infecção viral (pico de atividade dentro de 2 a 3 dias) e precede o aparecimento de anticorpos (7 dias), linfócitos T citotóxicos (CTL, cytotoxic T lymphocytes) e da hipersensibilidade de tipo tardio (DTH, delay type hypersensitivity). As células NK são grandes linfócitos granulares que se fixam as células infectadas e, a seguir, secretam moléculas citotóxicas contidas em vesículas granulares. Essas células não representam um mecanismo de defesa específico induzido por vírus, embora sejam ativadas inespecificamente por interferons induzidos por vírus.

Os anticorpos participam na lise das células infectadas através de citotoxicidade mediada por células anticorpo dependente (ADCC, antibody dependent cell mediated cytotoxicity). Nas respostas imunes de ADCC, o anticorpo vírus-específico ligado a antígenos sobre a superfície das células infectadas interage com receptores da porção Fc da IgG sobre a superfície das células NK. A ligação da IgG ao receptor da porção Fc ativa as NKs, resultando em morte da célula alvo. Os macrófagos, os linfócitos e os neutrófilos, que também possuem receptores de Fc, também podem participar na ADCC.

Os linfócitos T citotóxicos (CTL) constituem um mecanismo de defesa específico induzido pelo vírus, visto que devem ser ativados pelo antígeno

apresentado por macrófagos ou outras células apresentadoras de antígenos. A lise das células infectadas mediada pelos CTL limita-se, tipicamente, a antígenos ligados a proteínas do complexo de histocompatibilidade da classe I.

Em comparação com os anticorpos neutralizantes, que geralmente reconhecem epítopos sobre proteínas de superfície virais intactas, os CTL reconhecem fragmentos proteicos derivados de proteínas virais tanto de superfície quanto internas. As vias pelas quais esses peptídios são processados e aparecem sobre a superfície das células infectadas e interagem com antígenos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, *major histocompatibility complex*), os quais são objetos de intensa investigação.

3.4. Diagnóstico viral

O diagnóstico definitivo requer isolamento do vírus em animais ou em cultura de tecidos, a identificação do vírus ou a detecção de antígenos vírus-específicos ou de ácidos nucleicos virais em tecidos ou líquidos orgânicos ou a demonstração de respostas sorológicas específicas. Devem-se obter amostras apropriadas para avaliação do diagnóstico.

O isolamento do vírus a partir de amostras clínicas é obtido em culturas de células, ovos embrionados e animais como camundongos recém-nascidos. As técnicas de cultura de células envolvem o uso de culturas primárias de células preparadas a partir de órgãos de animais; de linhagens celulares diploides humanas, e de linhagens celulares contínuas.

A coloração imunocitoquímica das culturas de células para a detecção de antígenos virais utilizando fluoresceína ou anticorpos antivirais específicos conjugados com enzima pode ajudar na detecção e na identificação de muitos vírus. Os ortovírus e os paramixovírus podem ser detectados em virtude de capacidade de culturas infectadas de adsorverem certos eritrócitos (hemadsorção).

A identificação de partículas ou antígenos virais em amostras biológicas constitui outro método importante de diagnóstico viral. Em geral, uma elevação de quatro vezes ou mais nos títulos de anticorpos contra um agente viral específico em amostras de soro da fase aguda e convalescente (dentro de 3 a

4 semanas) é considerada diagnóstico de infecção aguda. A obtenção de uma única amostra de soro útil no diagnóstico viral. Diversos tipos diferentes de anticorpos, incluindo anticorpos neutralizantes, fixadores do complemento e inibidores da hemaglutinação são testados rotineiramente. Tanto o tempo de resposta desses anticorpos quanto a sua sensibilidade e especificidade difere acentuadamente.

A análise dos genomas dos virais é importante para os estudos epidemiológicos, bem como para estabelecer a origem de certos tipos de vírus isolados. Neste contexto, os tipos virais de interesse de notificação compulsória são avaliados em caráter epidemiológico.

3.5. Vírus e Câncer

Ação viral sobre os genes supressores de tumor

Dados epidemiológicos indicam que aproximadamente 20% dos cânceres humanos são causados por mecanismos que envolvem a participação de vírus. Alguns são agentes causais da transformação neoplásica dos tecidos infectados.

Os vírus da família *Papillomaviridae* (HPV) estão implicados no desenvolvimento de grande número de tumores epiteliais em humanos, principalmente no processo de tumorigênese do câncer de cérvix uterina (99,7% dos casos). Dentre os mais de 100 tipos virais, destacam-se os HPV 16 e HPV18, considerados de alto risco oncogênico. As oncoproteínas virais são capazes de alterar a expressão gênica e atividade de diversas proteínas celulares incluindo as proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, que são inativadas pelas proteínas E6 e E7.

A proteína E6 inativa a p53 induzindo a sua degradação (proteólise) através de um mecanismo que envolve a ubiquitinação desta proteína. As proteínas E6 ligam-se a uma ubiquitina ligase celular E6-AP (*E6-associated protein*) que se associa a p53 promovendo a ubiquitinação nos resíduos de lisina na p53 iniciando o seu processo de degradação via proteassoma celular. Acredita-se que a indução da degradação da p53 pela proteína viral E6 seja um evento-chave na imortalização celular promovida pelo HPV. Os oncogenes E6

e E7 destes tipos virais desempenham papel importante no processo que culmina a transformação celular neoplásica, tendo a expressão dos genes aumentada pela perda do gene E2, o que proporciona a imortalização celular.

Através da ligação a pRb no seu estado hipofosforilado, a E7 impede a sua ligação ao fator E2F e desta maneira, estimula a progressão através do ciclo celular. Assim, a pRb tem a função de inibir a progressão do ciclo celular, pois é capaz de sequestrar o fator de transcrição E2F e impedi-lo de promover a transcrição de genes necessários para a replicação do DNA na fase S. Assim, a pRb exerce uma regulação negativa do ciclo celular através da sua fosforilação específica ciclo-dependente. A associação da pRb com a proteína viral E7 causa uma perturbação no controle normal do ciclo celular, resultando em um estímulo excessivo para a proliferação das células infectadas. Mecanismo que parece ser essencial na progressão do ciclo e consequentemente, a carcinogênese.

A infecção pelo HPV é a doença sexualmente transmissível encontrada com mais frequência entre os indivíduos sexualmente ativos, envolvendo diversos fatores de risco. Estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação etiológica entre o HPV e o carcinoma de cérvix uterina, sendo o homem considerado um importante fator propagador do vírus.

Os mais de cem tipos virais molecularmente genotipados, cerca de quarenta tipos têm sido encontrados em infecções na mucosa anogenital, e atualmente é a infecção sexualmente transmissível mais frequente. Esses tipos virais são considerados carcinogênicos para o epitélio da cérvix uterina e essa associação é bem estabelecida. O DNA dos HPV de alto risco é detectado na maioria (92,9% a 99,7%) dos espécimes de câncer cervical invasivo.

Quanto aos fatores de risco relacionados à infecção por HPV, o número de parceiros sexuais demonstra ser o mais importante. No entanto, outros fatores são considerados para o câncer da cérvix uterino: alta paridade, uso prolongado de contraceptivos orais e tabagismo. Dessa forma, é necessário esclarecer a população sobre as formas de transmissão, diagnóstico, tratamento e formas de prevenção das infecções ocasionadas pelo HPV. Neste sentido, o professor de biologia deve cumprir seu papel para a educação em

saúde e propagar o conhecimento sobre o HPV, bem outros tipos de microrganismos que são transmitidos sexualmente para prevenção primária, secundária e terciária.

Atividade: Saúde Humana - Educação Sexual

A saúde constitui um dos temas importantes no ensino de Biologia. Neste sentido, a escola tem a função de orientar o estudante com noções básicas de higiene e saúde. A educação sexual engloba o tema saúde humana, mesmo sendo um assunto polêmico que aborda questões de foro íntimo. Mas, é papel do educador esclarecer dúvidas sobre esse assunto. No âmbito da microbiologia as Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) são doenças infecciosas ocasionadas por agentes microbianos que são disseminadas através do contato sexual. Diante do aumento de DSTs em adolescentes, proponha uma atividade para que os alunos na faixa etária da adolescência tenham conhecimento sobre as DSTs, seus agentes etiológicos, patologias e formas de prevenção.

Leia Mais: A leitura do Manual de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis é indicada para a elaboração de sua atividade. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_controle_das_dst.pdf

3.6. LEITURA RECOMENDADA

BLACK, Jacquelyn G. **Microbiologia – Fundamentos e Perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

BURTON, Gwendolyn; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia para as ciências da saúde**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

MARQUES, Marilis V. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**, 1. Ed. Ribeirão Preto (SP), Editora SBG, 2012.

PELCZAR JUNIOR, Michael J., CHAN, E. C. S., KRIEG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Editora Pearson, 2005.

TORTORA, Gerard J., FUNKE, Berdell R., CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERHUM, Flavio. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

UNIDADE 4: MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

4.1. Ecologia Microbiana

4.1.1. Ecologia microbiana do solo

O solo é um recurso natural importante para o ecossistema e sua fração biológica composta principalmente por microrganismos (bactérias e fungos), além de insetos, nematoides e minhocas. Os microrganismos do solo desempenham diversas funções, as quais são essenciais para a decomposição da matéria orgânica, liberação de nutrientes para as plantas e degradação de substâncias tóxicas. As bactérias do solo contribuem na solubilização de minerais e na estruturação e agregação do solo.

A microbiota (biomassa) do solo é considerada de suma importância para a produção agrícola e sustentabilidade ambiental. Podemos destacar associações simbióticas entre raízes de plantas e bactérias (*Rhizobium*) que atuam na fixação de nitrogênio do solo. Um processo de quebra de tripla ligação do Nitrogênio através de um complexo enzimático, denominado *nitrogenase*. O processo ocorre nos nódulos de raízes de leguminosas, onde as bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Arorhizobium* presentes nestes, convertem o N_2 atmosférico em NH_3 , o qual é incorporado em diversas formas de Nitrogênio orgânico para benefício da planta. Neste contexto, observamos que a microbiota do solo é importante para a manutenção dos ciclos biogeoquímicos, onde os elementos são oxidados e reduzidos por microrganismos para fornecer suas necessidades metabólicas, como o ciclo do nitrogênio (*Rhizobium*, *Nitrossomonas*, *Pseudomonas*), ciclo do carbono, ciclo do enxofre (*Beggiatoa*) e ciclo do fósforo (*Thiobacillus* e fungos *Micorrizicos*).

4.1.2. Biorremediação

A forte industrialização e o desenvolvimento econômico a partir da década de 70 exigiram grande estruturação de toda a cadeia produtiva dos derivados do petróleo, desde novas descobertas de campos de petróleo passando pela formação de vários polos petroquímicos e o aumento das redes de distribuição, a ponta dessa cadeia. Diante desta logística de produção e comercialização de petróleo e seus derivados, o potencial de contaminação

dos solos e águas subterrâneas, principalmente por vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo de postos de combustíveis, vêm aumentando. Neste sentido, a biorremediação pode ser considerada como uma ferramenta para detoxificar ou degradar poluentes, como o petróleo e seus derivados, pela ação de microrganismos.

As estratégias de biorremediação incluem microrganismos selecionados para a degradação de certos poluentes ou de bactérias geneticamente modificadas que são especialmente adaptadas para metabolizar, por exemplo, produtos de petróleo. Esses microrganismos são considerados microrganismos enriquecidos - Bioaumento.

A biorremediação natural envolvendo microrganismos autóctones, ou seja, do próprio ambiente, sem qualquer interferência recombinante, apresenta vantagens pelo baixo custo e por ter mínima intervenção genética. No entanto, é necessária a caracterização geológica, hidrológica, biomassa dos microrganismos, bem como dos ciclos biogeoquímicos para uma eficiente ação de degradação de poluentes.

Princípios semelhantes são utilizados para a descontaminação por pesticidas e outras substâncias químicas que podem causar poluição. Algumas bactérias que apresentam resistência à radiação têm sido alteradas geneticamente para tornarem-se úteis na "limpeza" de locais contaminados com solventes radioativos. A fundamentação para a implementação da biorremediação utilizando bactérias para degradação de compostos químicos envolve a diversidade metabólica e combinação genética destes microrganismos.

4.1.3. Microbiologia Aquática e Monitoramento de Doenças Emergentes

A água desempenha importante função para a vida e atividades humanas considerando-se um elemento essencial para a existência do Homem. No entanto, a água pode ser veículo de transmissão de variados tipos de microrganismos patogênicos, alguns naturais do ambiente aquático e outros introduzidos na água por hospedeiros infectados. Os microrganismos

normalmente presentes na água podem ter o seu habitat normal nas águas de superfície, ter sido transportado por enxurradas, provir de esgotos domésticos e outros resíduos orgânicos que atingiram a água por diversos meios, entre outros.

Muitos dos microrganismos patogênicos associados à água são também transmitidos por alimentos e, é difícil determinar a origem de muitas das infecções esporádicas. Entretanto, dentre uma grande variedade de patógenos, destaca-se os emergentes como a *Helicobacter pylori* associada ao desenvolvimento de gastrites, úlcera gástrica e câncer gástrico, *E. coli* e *Campylobacter jejuni* relacionadas a diarreias, Síndromes de Miller Fisher e Guillain-Barre também podem ser encontradas nestes ambientes aquáticos. E os oportunistas como *Aeromonas*, *Pseudomonas*.

A contaminação das águas envolve um "leque" de possíveis alterações em resposta a variáveis como o aumento da população humana e animal, aumento do uso de águas residuais, mudanças no estilo de vida e movimentos das populações. A água contaminada por excreções humanas e animais, particularmente fezes, quando usada para beber ou preparar alimentos, em contato durante lavagens ou banhos, e até mesmo, por inalações de vapores de água ou aerossóis pode transmitir o agente patogênico. No entanto, é importante ressaltarmos que a imunidade de cada indivíduo varia consideravelmente e é adquirida pelo contato com o patógeno ou influenciada por fatores a ele inerentes como a idade, sexo, estado de saúde e condições de vida.

As infecções causadas por ingestão de água contaminada dependem da concentração de microrganismos patogênicos nela presentes, da dose de infecção do microrganismo e da exposição e susceptibilidade individual. Para patógenos transmitidos via oral-fecal, a água para o consumo é considerada um veículo de transmissão. Assim, condições de higiene precária, a contaminação de alimentos, mãos, utensílios e vestuários têm relevância na transmissão destes patógenos.

De modo a impedir a propagação de doenças pela água medidas de precaução e proteção devem ser realizadas. Assim, é essencial a

implementação de medidas de controle da poluição, tratamento adequado na distribuição, controle permanente da qualidade bacteriológica e química na rede de distribuição.

A qualidade da água destinada ao consumo humano consiste em fazer um controle contínuo da qualidade com base na rotina verificando que o tratamento e distribuição agem em conformidade com os objetivos e regulamentos propostos e a monitorização periódica dos parâmetros microbiológicos em todo o sistema de abastecimento de água desde a origem até o consumidor. A maior preocupação relativa a água de consumo humano ao nível de saúde pública prende-se com a tentativa de reduzir a níveis insignificantes a presença de microrganismo patogênicos.

Os métodos tradicionais para identificação de patógenos, dos quais se destacam os métodos de cultura, acarretam inúmeros problemas e falhas, sendo muitas vezes adequados apenas para análise de rotina. As limitações associadas a esses métodos consistem na incapacidade de detectar alguns microrganismos, com características de crescimento desconhecidas; na fraca discriminação entre microrganismos com características comportamentais semelhantes; na aparência visual não específica; na detecção demorada de microrganismos de crescimento lento, além do que muitos dos microrganismos presentes na água são viáveis para a cultura, dentre os quais, muitos vírus e bactérias.

Entretanto, muitas bactérias, fora do seu *habitat* natural, desenvolvem mecanismos específicos de diferenciação celular como resposta à deficiência de nutrientes ou outros tipos de condições ambientais adversas como o pH e a salinidade, tornando-as inativas e capazes de transitar entre um estado cultivável e não cultivável permanecendo capazes de infectar, como é o caso de *C. jejuni*.

Outro problema consiste na necessidade de grandes quantidades de água para que possa ser detectado um pequeno número de microrganismos. No entanto, a maioria dos métodos tende a favorecer a detecção de bactérias mesófilas capazes de crescer em meios ricos em nutrientes, fato que limita grandemente o número e variedade de bactérias detectadas.

Neste contexto, com o aumento do número de genomas de patógenos sendo sequenciados, sequências de genes foram exploradas para o desenvolvimento de testes diagnósticos baseados na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). É uma técnica molecular que foi proposta por Kary Mullis no final da década de 1980, sendo atribuído o Prêmio Nobel de Química em 1993. Esta técnica ampliou as possibilidades da análise de DNA e fez com que a biologia molecular encontrasse novas aplicações até mesmo em áreas fora do seu campo tradicional. Deste modo, têm-se desenvolvido métodos moleculares adequados às amostras não só ambientais, mas também de alimentos e que permitem analisar de um modo direto, os microrganismos existentes.

Dentre o monitoramento de doenças emergentes de transmissão hídrica, destacam-se os microrganismos: *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila* e *Helicobacter pylori*. Estes microrganismos, muitas vezes considerados patógenos emergentes (cuja incidência foi aumentada nas últimas décadas), são potencialmente mais resistentes aos métodos de controle de crescimento bacteriano (desinfecção) e não são detectados por métodos rotineiros que pesquisam microrganismos como indicadores de contaminação fecal.

Atividade: Ecologia Microbiana na escola

Proponha uma atividade sobre ecologia microbiana para ser desenvolvida em feira de ciências na escola para proporcionar o conhecimento sobre este assunto aos alunos.

4.2. LEITURA RECOMENDADA

BLACK, Jacquelyn G. **Microbiologia – Fundamentos e Perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

BURTON, Gwendolyn; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia para as ciências da saúde**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

PELCZAR JUNIOR, Michael J., CHAN, E. C. S., KRIEG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Editora Pearson, 2005.

TORTORA, Gerard J., FUNKE, Berdell R., CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERHUM, Flavio. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.