

# Curso de Microbiologia Básica

Curso : MB1504

## INDICE GERAL

---

### Capítulo 1: Introdução à Microbiologia

- a. [Microbiologia como uma Ciência](#)
- b. [A célula](#)
- c. [Origem da Vida](#)
- d. [O microscópico](#)
- e. [Características distintivas dos principais grupos de microrganismos](#)

### Capítulo 2: Caracterização dos Microrganismos

- a. [Isolamento e Cultivo de Culturas puras](#)
- b. [Conservação das culturas puras](#)
- c. [Preparo dos microrganismos para a Microscopia Luminosa](#)
- d. [Informações utilizadas para caracterizar os microrganismos](#)
- e. [classificação dos organismos vivos](#)

### Capítulo 3: Estrutura das células Procarióticas e Eucarióticas

- a. [Ultra-estrutura dos microrganismos procariotos](#)
- b. [Ultra-estrutura dos microrganismos eucariotos](#)

### Capítulo 4: Exigências Nutricionais e o Meio Microbiológico

- a. [Elementos químicos como nutrientes](#)
- b. [Classificação nutricional dos microrganismos](#)
- c. [Meios utilizados para o crescimento dos microrganismos](#)

### Capítulo 5: Cultivo e Crescimento dos Microrganismos

- a. [Condições físicas para o cultivo dos microrganismos](#)
- b. [Reprodução e crescimento dos microrganismos](#)

### Capítulo 6: Controle dos Microrganismos

- a. [Antimicrobianos](#)
- b. [Agentes físicos](#)
- c. [Agentes químicos](#)

### Capítulo 7: Os Principais Grupos de Microrganismos

- a. [Eubactérias e Arqueobactérias](#)
- b. [Eucariótos](#)

## Capítulo 8: Metabolismo Microbiano

- a. [Catabolismo e Anabolismo](#)
- b. [Bioenergética](#)
- c. [Principais fontes de energia dos microrganismos](#)
- d. [Vias de degradação de nutrientes](#)
- e. [Transporte de nutrientes para o interior da célula](#)
- f. [Utilização de energia para processos biosintéticos](#)

## Capítulo 9: Genética Microbiana

- a. [Cromossomos de células procarióticas e eucarióticas](#)
- b. [Replicação do DNA](#)
- c. [O gene](#)
- d. [Variabilidade dos microrganismos - Mutação](#)
- e. [Regulação da expressão gênica](#)

## Capítulo 10: Vírus

- a. [Principais características](#)
- b. [Replicação dos Vírus](#)
- c. [Isolamento e identificação dos vírus](#)
- d. [Patogenicidade](#)

## MICROBIOLOGIA BÁSICA

### CAPÍTULO 1: Introdução à Microbiologia

---

#### Microbiologia como uma Ciência

Estuda a natureza fundamental e as propriedades dos microrganismos (Microbiologia Básica).  
O controle e o uso dos microrganismos de maneira benéfica (Microbiologia Aplicada)

Principais temas de pesquisa usados na Microbiologia Básica:

1. Características Morfológicas - forma e tamanho da célula; composição química e função de suas estruturas internas.
2. Características Fisiológicas - p.ex; a necessidade nutricional específica e as condições físicas necessárias ao crescimento e reprodução.
3. Atividades Bioquímicas - como os microrganismos quebram os nutrientes para obter energia e como eles usam esta energia para a síntese de compostos da célula.
4. Características Genéticas - a hereditariedade e variabilidade das características.
5. Potencial de causar doença - presença ou ausência para o homem, animais e plantas
6. Características Ecológicas - a ocorrência natural dos microrganismos no ambiente e sua relação com outros m.o.
7. Classificação - a relação taxonômica entre os grupos no mundo microbiano.

Principais campos de aplicação da microbiologia Aplicada (medicina, alimentos e laticíneos, agricultura, indústria e ambiente). Alguns exemplos:

1. Produção de vacina com método mais econômico
2. Processos mais eficientes para o tratamento de esgoto
3. Síntese de numerosas substâncias, desde mais simples, como o ácido cítrico, a antibióticos mais complexos, e enzimas
4. Utilizado como suplemento alimentar (proteína de célula única - SCP)
5. Produção de gás metano, utilizado como combustível (pesquisa atual)
6. Biometalurgia - explora a atividade química de bactérias para extrair minerais de minérios de baixa qualidade
7. Usados como "inseticidas biológicos", no lugar de produtos químicos; microrganismos capazes de degradar poluentes
8. Microrganismos capazes de melhorar a capacidade de detergentes caseiros, em remover manchas
9. Inserção de genes bacterianos em plantas para matar insetos
10. Produção de enzimas bacterianas que dissolvem coágulos sanguíneos; vacinas humanas utilizando vírus de insetos; e testes laboratoriais rápidos para diagnóstico de infecção viral (novas pesquisas da Engenharia Genética-Microbiologia Médica)

#### A célula

As células microbianas podem ser divididas em duas categorias com base em como a substância nuclear se apresenta dentro da célula: [Células Eucarióticas](#), apresenta um núcleo separado do citoplasma por uma membrana nuclear; [Células Procarióticas](#), que apresentam material nuclear sem membrana.

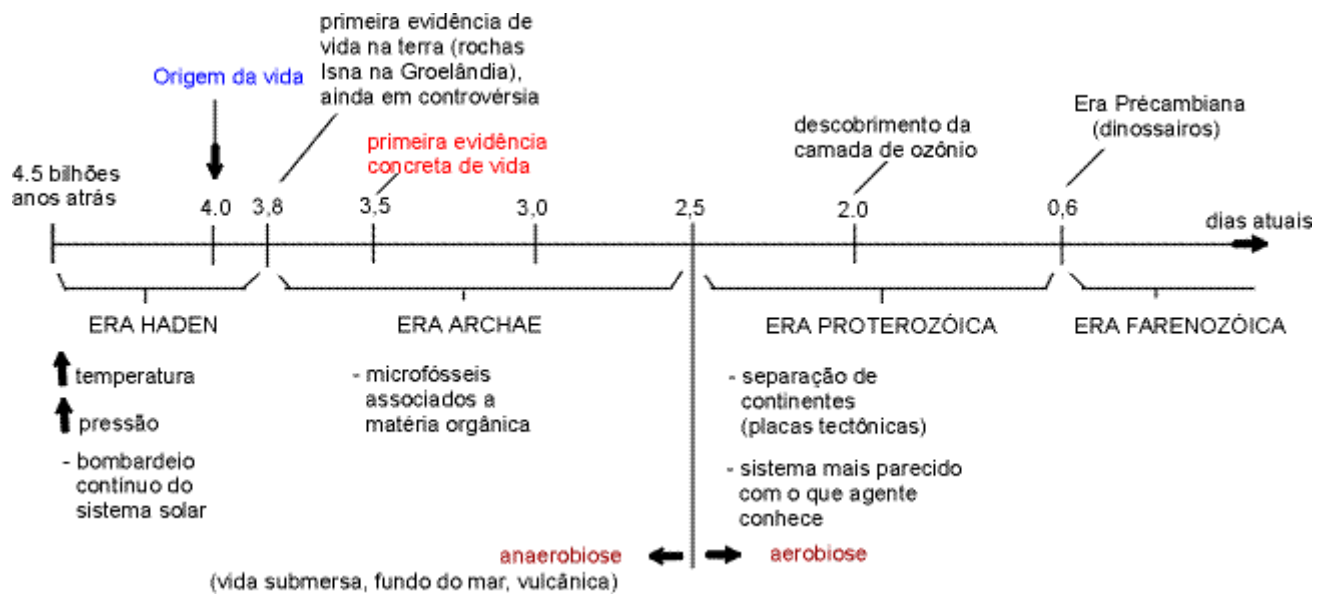
Todos os organismos, unicelulares (constituídos de uma única célula), ou multicelulares (que contém muitas células), apresentam as seguintes características:

1. reprodução
2. utilização de alimentos como fonte de energia
3. síntese de substâncias e estrutura celular
4. excreção de substâncias
5. resposta a alterações ambientais
6. mutações (alterações súbitas em suas características hereditárias), embora ocorram raramente

Elementos diferenciais entre células procarióticas e eucarióticas:

Elemento	Células Procarióticas	Células Eucarióticas
Grupos pertencentes	Bactérias, algas verde-azuis	Algas, fungos, protozoários, vegetais e animais
Tamanho da célula	tipicamente 0.2-2.0 µm	tipicamente 10-100 µm
Núcleo	membrana nuclear e nucléolo ausentes	limitado por membrana nuclear e presença de nucléolo
Organelas envolvidas por membrana	ausente	presentes : lisossomos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndria e cloroplastos
Flagelo	consiste de 2 proteínas construídas em blocos	complexo : consiste de múltiplos microtúbulos
Glicocálice	presente como uma cápsula ou camada limosa	presente em algumas células que tem parede celular
Parede Celular	usualmente presente; quimicamente complexa (parede celular bacteriana típica inclui peptidoglicano)	quando presente quimicamente simples
Membrana citoplasmática	não contém carboidratos e esteróis	presença de esteróis e carboidratos que servem como receptores
Ribossomos	70S, distribuídos no citoplasma	80S (retículo endoplasmático); 70S (mitocôndria e cloroplasto)
Cromossomos (DNA)	cromossomo único, circular, sem histona	um ou mais cromossomos, linear, com histona
Divisão Celular	fissão binária	mitose
Reprodução sexual	transferência de DNA apenas por fragmentos	envolve meiose
Relação G + C (%)	28 a 73	em torno de 40

## Origem da Vida



Conclusões do estudo da origem da vida :

1. origem única das formas de vida
2. existem 3 linhas primárias de descendência evolucionária: [Eubactérias](#), [Arqueobactérias](#) e [Eucariótos](#)
3. há duas linhas de procariótos: Eubactérias e Arqueobactérias
4. tanto os cloroplastos como as mitocôndrias - origem bacteriana
5. o relógio evolucionário não é constante para todos os microrganismos
6. as maiores divergências entre as Arqueo e Eubactérias são das termofílicas
7. a fotossíntese surgiu depois
8. os organismos mais primitivos são associados aos ambientes hidrotermais (água + alta temperatura)
9. os primeiros organismos deveriam ter duas propriedades: mecanismo de metabolismo (energia) e mecanismo de replicação (hereditariedade)

Os primeiros organismos além de anaeróbios, deveriam ser organotróficos fermentativos

No surgimento da vida em aerobiose, imagina-se ter começado com as cianobactérias, as quais crescem produzindo moléculas de oxigênio ( $O_2$ ), as quais se decompõem em átomos ( $O$ ), que reagiria com as novas moléculas de oxigênio produzidas, formando o ozônio ( $O_3$ ). Com a camada de ozônio, surge proteção dos raios UV, e surgimento de microrganismos aeróbios.

Os organismos primitivos devem ter usados RNA como material genético, tanto para reprodução como para produção de enzimas.

Divisão dos Reinos (Antiga):

1. Monera (procariótos) - microrganismos primitivos
2. Protista (algas, protozoários, fungos limosos)
3. Plantae (plantas verdes, algas superiores)
4. Fungi (fungos - bolores e leveduras)
5. Animalia (animais que ingerem alimentos)

Divisão dos Reinos (Atual):

1. Eubactérias (células procarióticas)
2. Archeobactérias (células procarióticas) - microrganismos primitivos
3. Eucariótos (células eucarióticas)

A teoria endossimbiótica propõe a maneira pela qual as células eucarióticas tem evoluído: origem das organelas eucarióticas (cloroplastos e mitocôndrias) a partir dos procariótos.

### O Microscópico

O olho humano é incapaz de perceber um objeto com um diâmetro menor que 0.1 mm, a uma distância de 25 cm. Os microrganismos tem dimensões de  $\mu\text{m}$  ( $1\mu\text{m} = 10^{-3}\text{mm}$ )

Os microscópicos são classificados dependendo do princípio no qual a ampliação é baseada: **ópticos** (empregam dois sistemas de lentes, ocular e objetiva, através das quais a imagem ampliada é obtida) e **eletrônicos** (empregam um feixe de elétrons para produzir a imagem ampliada)

Tamanho	Objeto	Microscópico
100 $\mu\text{m}$	Células Eucarióticas	Microsc. óptico
10 $\mu\text{m}$	Núcleo Maioria das Bactérias Mitocôndria	
1 $\mu\text{m}$	Micoplasma	Microscópio eletrônico
100 nm	Vírus	
10 nm	Ribossomos Proteínas	Microscópio eletrônico
1 nm	Lípidos	
0.1 nm	Pequenas moléculas Átomos	

A microscopia óptica é a mais comumente utilizada no laboratório de microbiologia. Em geral, o microscópio óptico amplia o objeto até certo limite (1.000 a 2.000 vezes). Esta limitação é devida ao poder de resolução.

Poder de Resolução (P.R) - medida do menor objeto que pode ser visto ao microscópico

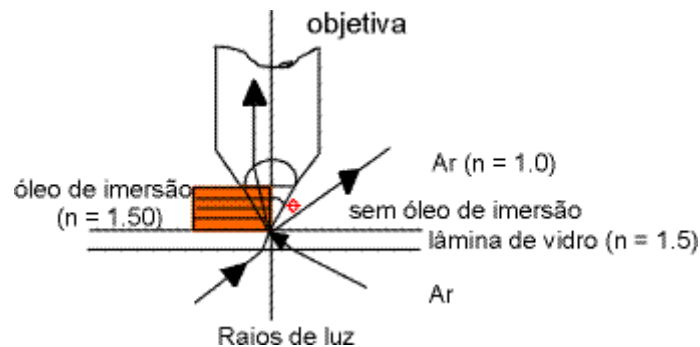
$$P.R = \frac{\text{comprimento de onda}}{A.N.}$$

A.N

$$A.N. (\text{Abertura Numérica}) = n \cdot \sin \theta$$

$n$  = índice de refração;  $\theta$ (teta) = semi ângulo do cone de luz que entra na objetiva.

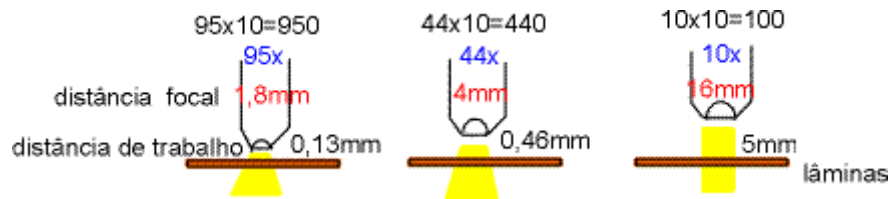
Pode-se usar um meio (p.ex. óleo de cedro) com o mesmo índice de refração do vidro da lâmina, para que os raios de luz deixem a lâmina sem refração, seguindo uma direção reta para dentro da objetiva, aumentando assim o poder de resolução (P.R.)



Principais características das objetivas do microscópio óptico :

Ampliação linear da objetiva	Distância focal aproximada(mm)	Diâmetro aprox. do campo(mm)	Abertura Numérica	Dist. de trabalho aprox.(mm)	Poder de resolução (µm)	Máxima ampliação aprox. (ocular 10x)
10x (objetiva à seco de pequeno aumento)	16	1.5	0.25	4.50	2.0	100 vezes
40-45x (objetiva à seco de grande aumento)	4	0.34	0.65	0.65	0.7	450 vezes
90-100x (objetiva de imersão)	1.8	0.15	1.25	0.13	0.4	1000 vezes

A objetiva produz uma imagem real ampliada do objeto, a qual é ainda aumentada em escala muito maior pela ocular, sendo a mesma captada pelo olho humano



O Microscópio eletrônico possui grande vantagem diante do óptico, apresenta um poder de resolução 100 vezes maior, em virtude do comprimento de onda muito curto dos raios eletrônicos utilizados. É possível resolução de objetos tão pequenos quanto  $10 \text{ \AA}$  ( $1 \text{ \AA} = 10^{-4} \mu\text{m}$ ). Produz aumentos úteis de 200.000 a 400.000

Tipos de Microscopia	Aumento máx. útil	Aspecto do Espécime	Aplicações
Microscopia Óptica Campo Luminoso	1000 - 2000	coradas ou não, quando coradas geralmente assumem a cor do corante	determinação dos elementos grosseiros de bactérias, leveduras, bolores, algas e protozoários
Microscopia Óptica Campo Escuro	1000 - 2000	geralmente não coradas, aparecem brilhante sobre um fundo escuro	microrganismos que exibem algum dado morfológico característico em estado vivo
Microscopia Óptica Ultravioleta	1000 - 2000	não visualizado diretamente; fotografado	diferenciação de componentes celulares com base em $>$ ou $<$ absorção da luz UV.
Microscopia Óptica Fluorescente	1000 - 2000	brilhante e corado, corante fluorescente	técnicas diagnósticas
Microscopia Óptica Controle de Fase	1000 - 2000	vários graus de brilho	exames de estruturas celulares em células vivas de microrganismos maiores (leveduras, algas, protozoários, e algumas bactérias)
Microsc. Eletrônica	200.000 - 400.000	visto em tela fluorescente	exames de vírus e da ultra estrutura das células microbianas



### Características distintivas dos principais grupos de microrganismos

Microrganismos	Características
1. <a href="#">Protozoários</a>	eucarióticos, unicelulares, ingerem partículas alimentares, não apresentam parede celular rígida, não contém clorofila, alguns movem-se por meio de flagelo ou cílios, e são amplamente distribuídos na natureza (principalmente aquáticos)
2. <a href="#">Algas</a>	eucarióticos, considerados semelhantes às plantas, contém clorofila, podem ser uni ou multicelulares, apresentam parede celular rígida, crescem em muitos ambientes diferentes (a maioria aquáticos)
3. <a href="#">Fungos</a>	eucarióticos, com parede celular rígida, uni ou multicelulares, desprovidos de clorofila, absorvem nutrientes dissolvidos do ambiente (não digerem alimentos) - são os bolores e leveduras
<i>Bolores</i>	fungos multicelulares, produzem estruturas filamentosas (hifas, micélios...)
<i>Leveduras</i>	fungos unicelulares, apresentam formas variadas (esférica a ovóide; elipsóide a filamentosos)
4. <a href="#">Bactérias</a>	procarióticos, carecem de membrana nuclear e outras estruturas intracelulares organizadas observadas nos eucarióticos, são divididas em dois grupos: Eubactérias e Arqueobactérias
<i>Eubactérias</i>	apresentam várias formas (esférica, bastonete e espirilo) e aparecem em formas agrupadas, variam de 0.5 - 5.0 $\mu\text{m}$ , são unicelulares, algumas apresentam flagelos
<i>Arqueobactérias</i>	semelhantes às eubactérias pelo microscópio, porém apresentam diferenças importantes quanto à sua composição química, hábeis em viver em ambientes não usuais (lagos salinos, piscinas térmicas, fundo de pântanos)
5. <a href="#">Vírus</a>	não são celulares como os citados acima, são muito menores (20 a 300 nm; $1\text{nm}=1/1000\mu\text{m}$ ) e mais simples em estruturas que as bactérias, contém somente um tipo de ácido nucléico circundante por um envelope protéico (DNA ou RNA), podem multiplicar-se somente dentro das células vivas, apresentam-se sob várias formas

## CAPÍTULO 2 : Caracterização dos Microrganismos

---

Uma população microbiana, sob condições naturais, contém muitas espécies diferentes. Os microbiologistas devem ser capazes de isolar, enumerar, e identificar os microrganismos em uma amostra, para então classificá-los e caracterizá-los.

### Isolamento e Cultivo de Culturas Puras

Os microrganismos na natureza normalmente existem em cultura mistas, com muitas espécies diferentes ocupando o mesmo ambiente.

Ao determinar as características de um microrganismo, ele deve estar em **cultura pura**, ou seja, em que todas as células na população são idênticas no sentido de que elas se originaram de uma mesma célula parental.

Em laboratório, os microrganismos são cultivados ou desenvolvidos em material nutriente denominado **meio de cultura**. O tipo de meio utilizado depende de vários fatores :

1. considerações sobre a origem do material a ser analisado
2. a espécie que se imagina estar presente nesta amostra
3. as necessidades nutricionais dos organismos

Técnicas de isolamento de microrganismos:

O material a ser analisado é colocado no meio de cultura - **inóculo** - O processo de inoculação pode ser feito mediante:

1. *técnica de esgotamento por meio de estrias superficiais* - a amostra é semeada na superfície do meio solidificado com uma alça de semeadura para esgotar a população, assim em algumas regiões do meio, células individuais estarão presentes.
2. *técnica de semeadura em superfície* - uma gota da amostra diluída é colocada na superfície do ágar e com o auxílio de uma alça de semeadura de vidro (alça de Drigalky) esta gota é espalhada sobre o meio.
3. *método de pour-plate* - a amostra é diluída em tubos contendo meios liquefeitos (45 °C). Após homogeneização são distribuídos em placas de Petri; e após a solidificação dos meios as placas são incubadas. As colônias se desenvolverão tanto acima quanto abaixo da superfície (colônias internas).

Em cada uma dessas técnicas o objetivo é diminuir a população microbiana, assim as células individuais estarão localizadas a uma certa distância umas das outras. As células individuais, se estiverem distante o suficiente, produzirão uma colônia que não entra em contato com outras colônias. Todas as células em uma colônia tem o mesmo parentesco. Para isolar uma cultura pura, uma colônia individual é transferida do meio para um tubo de ensaio.

### Conservação das Culturas Puras

Uma vez que os microrganismos tenham sido isolados em cultura pura, é necessário manter as culturas vivas por um período de tempo com o objetivo de estudá-las.

Para armazenar por um período curto, as culturas podem ser mantidas à temperatura de refrigeradores (4 a 10 °C)

Para armazenar por um período longo, as culturas são mantidas em nitrogênio líquido (-196 °C) ou em freezers (-70 a -120 °C), ou ainda congeladas, e então desidratadas e fechadas à vácuo em um processo denominado liofilização

Alguns dos mais usados métodos de conservação:

1. transferência periódica para meios novos
2. sob camada de óleo mineral
3. liofilização
4. congelamento

As coleções de culturas são bancos de microrganismos e outras células que estão à disposição de pesquisadores, professores, investigadores de patentes, e todo aquele que necessite estudar um tipo particular de microrganismos - um conjunto de células de referência de uma coleção de cultura padrão. As células são congeladas em cubas de nitrogênio líquido ou liofilizadas para resistir a qualquer variação que possa destruir a identidade da célula original.

### **Preparo dos Microrganismos para a Microscopia Luminosa**

Existem dois métodos gerais utilizados para preparar espécimes microbiológicas para observação por meio do microscópio luminoso.

1. Técnica entre lâmina e lamínula e gota pendente - utiliza uma suspensão de microrganismos vivos em uma gota ou uma camada líquida. Estas preparações (a fresco) são especialmente úteis quando a estrutura de um microrganismo pode ser distorcida pelo calor ou agentes químicos, ou quando o microrganismo não se cora facilmente.
2. Técnicas de Coloração - a camada fina do espécime é seca e corada, assim os microrganismos ficam fixados à superfície e apresentam-se corados para facilitar a visualização. Usadas para mostrar as várias estruturas dos microrganismos, para identificar e separar suas estruturas internas e para ajudar a identificar e separar microrganismos similares.

As principais etapas do preparo de um espécime microbiano corado para exame microscópico são:

1. Confeccionar um esfregaço, ou uma camada fina do espécime sobre uma lâmina de vidro
2. Fixar o esfregaço seco à lâmina, usualmente com o calor, para fazer aderir o microrganismo à lâmina
3. Coloração com um ou mais corantes

*Coloração Simples* - a coloração de microrganismo com uma única solução de corante; ex: azul de metileno para leveduras, ou bolores.

*Coloração diferencial* - envolve mais de uma solução de corante; ex: coloração de álcool-ácido para bactéria causadora da tuberculose; distingue esta bactéria patogênica, por meio da cor (vermelho, pelo corante principal), de outras bactérias (azul, pelo corante do fundo) encontradas em amostras como saliva e escarro.

*Coloração de Gram* - neste processo, o esfregaço bacteriano é tratado com os reagentes na seguinte ordem: o corante púrpura cristal violeta, a solução de iodo (substância que fixa o corante no interior da célula), o álcool (remove o corante de certas bactérias) e o corante vermelho safranina.

Bactérias Gram-positivas, retêm o corante cristal violeta e aparecem coradas em violeta-escuro

Bactérias Gram-negativas, perdem o cristal violeta quando tratadas com álcool, são então coradas com o corante safranina e aparecem coradas em vermelho

### Informações utilizadas para Caracterizar os Microrganismos

As técnicas laboratoriais para caracterizar os microrganismos variam desde uma microscopia relativamente simples à análise de material genético encontrado na célula.

As principais categorias de informações usadas para caracterizar espécies diferentes são :

1. Características Morfológicas - tamanho, forma e arranjo das células
2. Características Metabólicas - maneira pela qual o microrganismo desenvolve os processos vitais
3. Características Antigênicas - os anticorpos produzidos em animais de laboratórios podem ser usados para detectar a presença de antígenos únicos em culturas bacterianas e são usados para caracterizar os microrganismos
4. Características Patogênicas - importante determinar se o microrganismo causa doença (patogênico) ou não causa doença (não-patogênico)
5. Características Genéticas - a maioria dos microbiologistas conta atualmente com técnicas que permitem realizar análises genéticas para classificar ou identificar os microrganismos ou compreender a sua atividade. A **sonda de DNA** é um exemplo de procedimento genético rápido e amplamente utilizado - uma fita de DNA de uma espécie conhecida é misturada com uma fita de uma espécie desconhecida. Se os microrganismos são da mesma espécie, as duas fitas se combinarão, ou se ligarão. Esta combinação aparece como uma fita dupla de DNA com um marcador ligado.

### Classificação dos Organismos Vivos

Como fazer para determinar os nomes dos microrganismos e como catalogá-lo de forma sistemática?

As denominações específicas no mundo biológico, surgem da sistemática, que pode ser descrita como "a ciência do desenvolvimento de um arranjo ordenado das espécies, dentro de cada uma das principais categorias de organismos". **Sistemática = Taxonomia**

A ciência da taxonomia inclui a *classificação* (arranjo), *nomenclatura* (nomes) e *identificação* (descrição e caracterização) dos organismos vivos.

Os organismos que compartilham certas características comuns, são agrupados em grupos taxonômicos denominados **taxa** (singular **táxon**). O **táxon** básico é a **espécie**, que é uma coleção de cepas com características similares. Depois segue com :

### ESPÉCIE-GÊNERO-FAMÍLIA-ORDEM-CLASSE-DIVISÃO-REINO

#### Regra dos nomes - SISTEMA BINOMIAL DE NOMENCLATURA

1. Cada espécie recebe um nome constituído de duas palavras (ex. *Neurospora crassa*)
2. O primeiro termo é o nome do gênero e sempre se inicia com letra maiúscula
3. A denominação do gênero é uma palavra latina ou grega (um novo termo composto de raízes latina ou grega, ou o nome latinizado de uma pessoa - masculino, feminino, ou neutro)
4. Os nomes próprios dos microrganismos são sempre escrito em *itálico*
5. O segundo termo do nome de um microrganismo, específico (espécie), é escrito em letras minúsculas e usualmente é descritivo:

- adjetivo que modifica o nome (*Bacillus albus* - Bacillus branco)
- adjetivo sob a forma de participio presente de um verbo (*Clostridium dissolvens* - que dissolve)
- substantivo no caso, possessivo que modifica o nome genérico (*Salmonella pullosum* - Salmonella dos pintos)
- nome de carácter explicativo (*Bacillus radicolica* - Bacillus habitante da raíz)

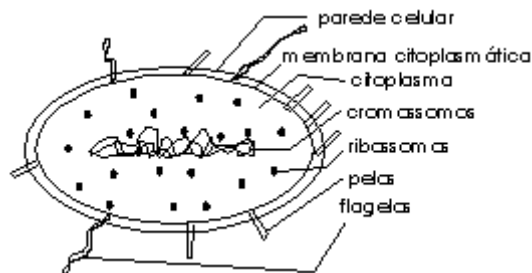
Ocasionalmente, é necessário subdividir uma espécie em variedades. Tal atitude é tomada quando existem diferenças numa espécie, insuficientes para a criação de uma nova espécie, como por exemplo; a amostra de *Streptococcus lactis* que produz um aroma de malte e que é designada de *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*

## CAPÍTULO 3: Estruturas das Células Procarióticas e Eucarióticas

### Ultra-estrutura dos Microrganismos Procarióticos

A maioria das bactérias (organismos procarióticos) são unicelulares e apresentam uma forma simples (esférica, cilíndricas ou espiraladas), apesar dos 3,5 a 4 bilhões de anos durante os quais elas tem evoluído

Estrutura Geral de uma célula (bacteriana) procariótica típica :



#### Flagelos e pelos

1. são estruturas externas à parede celular. Filamentos finos e ocos, que se estendem a partir da membrana citoplasmática atravessando a parede celular, e que nem todas as células possuem
2. os flagelos são usados para locomoção da bactéria, pulsionando-a através do líquido em aproximadamente 100µm/seg (3000 vezes o seu comprimento). São mais longos que a célula (medindo de 15 a 20µm). A energia para mover os flagelos vem da [força protomotiva](#)
3. os pelos ou fímbrias não são usados para locomoção, são mais finos, menores, mais retos e mais numerosos que os flagelos. São ocos e a maior parte deste tipo de filamento está envolvido com a adesão à superfície

#### Glicocálice

1. é um material viscoso (geralmente polissacarídeos) que circunda algumas células bacterianas. Chamado de cápsula quando se encontra organizado e acoplado à parede celular; e camada limosa se se encontra desorganizado e acoplado frouxamente à parede celular - esta última tende a ser solúvel em água deixando assim o meio viscoso (como é o caso da viscosidade do leite)
2. apresentam várias funções :
  - aderência (em pedras onde passa água em grande movimento; em raízes de plantas; na superfície lisa dos dentes humanos provocando a cárie)
  - proteção (contra dessecação)
  - evitar a adsorção e lise das células por bacteriófagos

#### Parede celular

1. é rígida, suportam altas pressões, mantendo assim a forma característica de cada célula. Serve como uma barreira a algumas substâncias prevenindo a evasão de certas enzimas que poderiam causar danos à célula

2. podem reter corantes, alguns antibióticos, sais biliares, metais pesados e enzimas degradativas, em contra partida os nutrientes líquidos necessários à célula tem passagem permitida
3. as paredes celulares são camadas de diferentes substâncias que variam de acordo com o tipo de bactéria envolvida, diferindo em espessura e composição

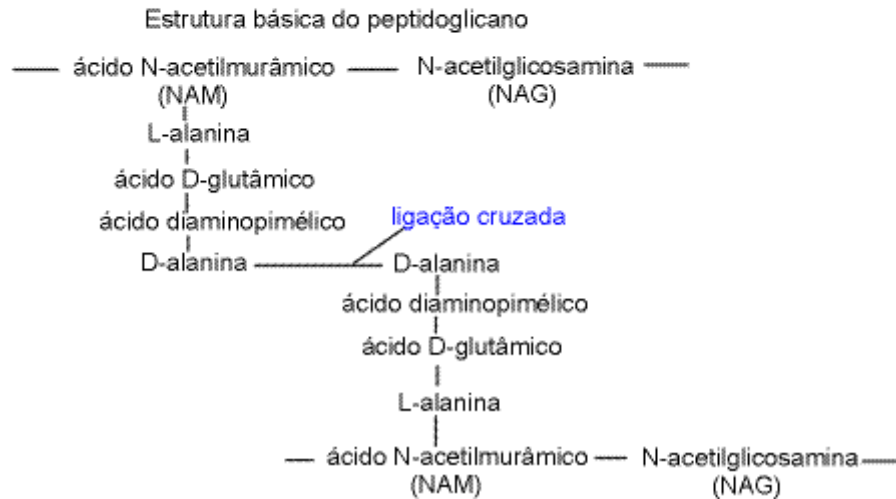
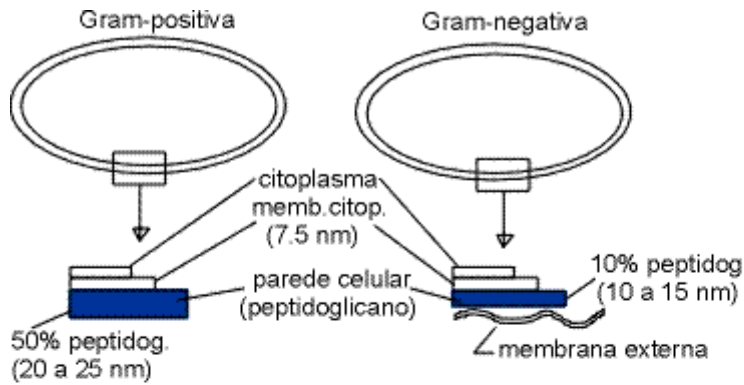
#### **Gram-Positivas :**

1. membrana citoplasmática:
  - fosfolípidos
  - proteínas
2. parede celular:
  - peptidoglicano - polímero poroso e insolúvel, em grande quantidade nestas bactérias (50% ou mais do peso seco da célula), tornando a parede bem espessa
  - ácido teicóico - polímero de glicerol e ribitol fosfato; carregados negativamente pode ajudar no transporte de íons + para dentro e fora da célula; e no armazenamento de fósforo. Se encontram ligados ao peptidoglicano ou à membrana citoplasmática
  - polissacarídeos - ligados ao peptidoglicano

#### **Gram-Negativas:**

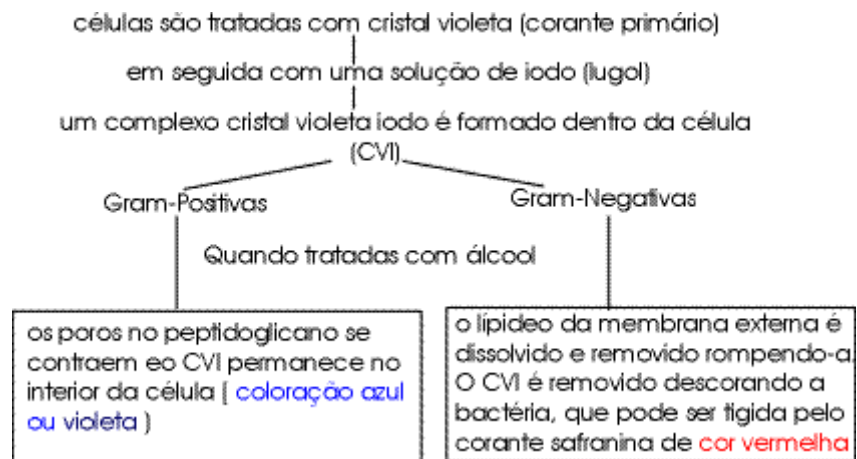
1. membrana citoplasmática:
  - fosfolípidos
  - proteínas
2. parede celular - localizada no espaço periplasmático, ou seja, entre as membranas citoplasmática e externa.
  - peptidoglicano - representa 10% do peso seco da célula
  - lipoproteínas
3. membrana externa - presente apenas nestas bactérias, serve para distingui-las.
  - lipopolissacarídeos - típicos destas bactérias, ocorrem somente na membrana externa; formados de lípidos, cadeia de polissacarídeo e antígenos O. Podem atuar como um veneno (LPS ou endotoxina)
  - trímeros de porina

Comparação entre as paredes celulares de bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas :



- as paredes celulares das Arqueobactérias diferem das Eubactérias tanto em composição química quanto na estrutura. Tais paredes contém proteínas, glicoproteínas ou polissacarídeos completos. Não contém peptidoglicano.
- quando a parede de uma bactéria Gram-positiva é quase completamente destruída, por enzimas, o resultado é uma célula esférica conhecida como PROTOPLASTO, a qual permite a entrada de grande quantidade de água, resultando em lise. As paredes das Gram-negativas são mais resistentes a estas enzimas

Mecanismo de Coloração de Gram :





## Membrana Citoplasmática

- é o sítio de atividade enzimática específica, e do transporte de moléculas para dentro e para fora da célula. É uma barreira para a maior parte das moléculas solúveis em água e muito mais seletiva que a parede celular
- composta primariamente de: 20 a 30% de fosfolipídeos e 50 a 70% de proteínas, estas podem fluir pelos fosfolipídeos
- contém enzimas envolvidas :

no transporte de moléculas (permeases)

na produção de energia

síntese de parede celular

- a fotossíntese ocorre em invaginações da membrana citoplasmática, as quais fornecem uma extensa área para acomodar uma alta concentração de pigmentos absorvidos da luz

## Difusão e Osmose através da Membrana Citoplasmática

1. Difusão Simples - é passivo e a célula não gasta energia para realizá-lo. O soluto se movimenta do lado menos diluído para o mais diluído até o equilíbrio. Ex. entrada e saída de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>
2. Difusão por meio de Permeases - transporte da maior parte de nutrientes para dentro da célula. Requer gasto de energia pela célula
3. Osmose - passagem do solvente de uma solução de baixa concentração de soluto (alta conc. de água) para uma solução com alta concentração de soluto (ou baixa conc. de água). A força com que a água se move através da membrana é a pressão osmótica. As células microbianas podem ser expostas a 3 tipos de condições osmóticas :
  - [Isotônica](#) - a concentração total dos solutos é a mesma em qualquer lado da membrana
  - [Hipotônica](#) - a concentração do soluto é mais baixa no interior da célula. A água entra na célula por pressão osmótica. A maioria das células crescem nesta condição
  - [Hipertônica](#) - a concentração do soluto é mais alta no interior da célula. A água deixa a célula por pressão osmótica

## Estruturas Celulares Internas da Membrana Citoplasmática (Citoplasma)

### Área Citoplasmática (porção fluida)

- o citoplasma tem em torno de 80% de água, além de ácidos nucléicos, proteínas, carboidratos, lipídeos, íons inorgânicos, muitos compostos de baixo peso molecular, e partículas com várias funções :
1. Ribossomos - partículas densas, onde ocorre a síntese protéica. Encontradas em todas as células procarióticas e eucarióticas. Consistem em 2 subunidades de tamanhos diferentes (50S e 30S), que juntas formam o ribossomo bacteriano 70S; S= unidade de quão rápido a partícula sedimenta quando centrifugada em alta velocidade
  2. Poli-β-hidroxibutirato (PHB) - material lipídico solúvel em clorofórmio. Atua como uma reserva de carbono e fonte de energia

3. Inclusões - diferentes tipos de substâncias químicas que se acumulam formando depósitos insolúveis. Os grânulos e inclusões não são comuns a todas as células bacterianas

#### Área Nuclear

- não apresenta núcleo delimitado por membrana, e ocupa uma porção próxima do centro da célula - parece estar ligado ao sistema "membrana citoplasmática-mesossomo"
- nucleóide - consiste em um único cromossomo (DNA) circular. O cromossomo é a estrutura interna das células que fisicamente carrega a informação hereditária de uma geração para outra

#### Formas Latentes de Microrganismos Procarióticos - Esporos e Cistos

##### Esporos

- são formas inativas (não estão em crescimento), que podem viver em condições desfavoráveis, como dessecação e calor, mas se expostas novamente em condições ambientais apropriadas começam a crescer e tornar-se células vegetativas metabolicamente ativas
- os esporos que se formam dentro da célula são chamados ENDOSPOROS, e são exclusivos das bactérias
- possuem parede celular espessa, brilham muito com a luz do microscópico, e são altamente resistente às mudanças ambientais - a maioria suportam até 80 °C/10min
- o esporo contém o ácido dipicolínico (DPA) não encontrados em células vegetativas, responsável por 5 a 10% do peso seco do endosporo, ocorre em combinação com grande quantidade de cálcio, e provavelmente contribui na resistência ao calor
- durante a esporulação ocorre um processo de desidratação, eliminando a maior parte de água do esporo, o que possivelmente também vem contribuir para a resistência ao calor
- as bactérias Actinomicetes produzem outro tipo de esporo, o CONÍDIO, muito resistente ao dessecação mas não tanto ao calor. Este organismo pode produzir muitos destes conídios na extremidade de um filamento, assim que tais conídios são usados para a reprodução e para proteção

Endospóros	Conídios
produzidos no interior da célula	na extremidade de filamentos
1 por cada célula vegetal	vários são produzidos por célula
resistentes ao calor e dessecação	mais resistentes ao dessecação
utilizados para proteção	utilizado para reprodução e proteção

##### Cistos

- apresenta estrutura e composição química diferente dos endospóros, e não apresentam alta resistência ao calor. Ex. cistos presentes em *Acetobacter*

## Ultra-estrutura dos Microrganismos Eucarióticos - Fungos, Algas e Protozoários

A característica predominante das células eucarióticas é o núcleo com cromossomos lineares, envolvidos por uma membrana que não é encontrada em procariotos

Função de cada estrutura :

### Flagelos e Cílios

- estruturas delgadas, ocas, utilizadas para locomoção, diferem das das células procarióticas, no que a energia necessária para movimentar estes apêndices provém da hidrólise do ATP

### Parede celular

- encontradas nas plantas, algas e fungos, apresenta a função de manter a forma da célula e evitar que sofra lise pela pressão osmótica

Eucariotos	Composição da Parede Celular
plantas	polissacarídeos - celulose e pectina
fungos filamentosos	quitina e celulose
leveduras unicelulares	mananas - um polímero de manose
algas	celulose ou outro polissacarídeo, e CaCO <sub>3</sub>

### Membrana Citoplasmática

- possui morfologia e funções semelhantes as das células procarióticas, porém apresentam características diferenciais destas células como :
  1. a presença de esteróis - principalmente colesterol - os quais entrelaçam-se na bicamada lipídica e conferem resistência à membrana citoplasmática dos eucariotos que não apresentam parede celular
  2. a membrana citoplasmática é reforçada por fibras de microtúbulos formados pelas proteínas actina e miosina.
  3. não possuem enzimas em sua membrana citoplasmática envolvidas no metabolismo gerador de energia

### Organelas Celulares

São estruturas envolvidas por uma membrana com funções específicas tais como, a fotossíntese, respiração, síntese protéica, etc. O citoplasma é a "residência" das organelas"

### Núcleo

- a característica marcante do núcleo dos eucariotos é a **membrana nuclear**, que contém muitos poros grandes, através dos quais proteínas e RNA podem passar para o citoplasma
- a membrana nuclear geralmente dá origem ou é contínua ao retículo endoplasmático, organela onde as proteínas são sintetizadas
- esférico ou oval, é a maior organela na célula eucariótica. Nele está contida as informações hereditárias da célula na forma de DNA
- é formado de 5 a 10% de RNA e o restante de proteínas

### Retículo Endoplasmático

- conectados às membranas nuclear e citoplasmática, podem ter ribossomos ligados (rugosos) ou sem ribossomos ligados (lisos)
- no retículo endoplasmático rugoso as proteínas produzidas pelos ribossomos presentes nestas organelas, são liberadas no citoplasma
- o retículo endoplasmático liso está envolvido na síntese de glicogênio, lipídeos e esteróides

### Complexo de Golgi

- é o centro de empacotamento ou distribuição da célula. Responsável pelo "transporte seguro" dos compostos sintetizados, para o exterior da célula, e também pela proteção da célula ao ataque de suas próprias enzimas
- no complexo de Golgi enzimas que foram sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (proteases, nucleases, glicosidasas, sulfatases, lipases, e fosfatases) são empacotadas dentro de organelas chamadas lisossomos
- as proteínas sintetizadas no R.E. rugoso, são levadas para o complexo de Golgi, onde os açúcares são adicionados a estas para produzir as glicoproteínas

### Mitocôndrias

- local onde o ATP é gerado durante a respiração aeróbia. A membrana interna é altamente invaginada (cristas) - as quais aumentam a área da superfície disponível para a atividade respiratória
- assemelham-se às células procarióticas em vários aspectos :
  - mede em torno de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diâmetro;
  - contém seus próprios ribossomos, que também são 70S, em vez de 80S como os presentes no citoplasma eucariótico;
  - contém seu próprio DNA, o qual é uma molécula única, em fita dupla como nos procariotos - este DNA carrega informações genéticas para a síntese de um número limitado de proteínas que são produzidas nos ribossomos mitocondriais
  - dividem-se para formar uma nova mitocôndria, praticamente da mesma forma que as células procarióticas se dividem - se dividem independentemente do núcleo celular, entretanto são incapazes de se dividirem se forem removidos do citoplasma

### Cloroplastos

- presentes nas plantas e nas algas, também são organelas geradoras de energia. É o sítio das reações fotossintéticas
- apresenta um DNA circular (como nos procariotos) o qual codifica proteínas no ribossomo destas organelas (70S) e enzimas necessárias para a utilização de  $\text{CO}_2$  no ar
- a membrana interna dobra-se no estroma (citoplasma dos cloroplastos) para formar pilhas de sacos em forma de disco ou fita chamadas tilacóides - contém pigmentos clorofila e carotenóides
- são capazes de se dividir por fissão binária no citoplasma como as mitocôndrias

### Formas Latentes dos Microrganismos Eucariotos - Esporos e Cistos

#### Esporos

Os fungos produzem esporos sexuais e assexuais. Algumas características destas formas latentes de vida são :

- os esporos sexuados são resultado de 2 células reprodutivas (gametas) em uma célula fertilizada. São produzidos menos frequentemente e em menor número que os esporos assexuados
- os esporos assexuados são produzidos por hifas aéreas, e tem a função de disseminar a espécie. São especialmente estruturados para serem dispersos do talo-mãe. São normalmente brancos quando recém produzidos, e depois adquirem cores características coma a idade
- os esporos dos fungos terrestres podem ser recobertos por camadas espessas para evitar ressecamento. Podem ser leves para serem carregados em correntes de ar

Cistos

- Produzidos por muitos protozoários, podem apresentar função de proteção ou de reprodução para estes eucariotos

## CAPÍTULO 4: Exigências Nutricionais e o Meio Microbiológico

---

### Elementos Químicos como Nutrientes

Os elementos químicos principais para o crescimento da célula são : carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo

#### Carbono - C

- todos os organismos requerem carbono de alguma forma. Em geral os compostos orgânicos são os que possuem carbono
- o carbono forma o esqueleto das 3 maiores classes de nutrientes orgânicos : carboidratos, lipídeos, e proteínas - estes fornecem energia para o crescimento da célula e serve como unidade básica do material celular
- os heterotróficos utilizam compostos orgânicos como sua principal fonte de carbono, obtendo tais moléculas a partir do meio, ou ingerindo organismos autotróficos ou mesmo heterotróficos
- os autotróficos utilizam o  $\text{CO}_2$  como sua principal ou única fonte de carbono

#### Nitrogênio - N

- todos os organismos necessitam em alguma forma, é a parte essencial dos aminoácidos, que formam as proteínas
- as bactérias são mais versáteis para usar o N que os organismos eucariotos. Algumas bactérias podem utilizar o  $\text{N}_2$  (nitrogênio atmosférico) - fixação de nitrogênio - e outras podem utilizar compostos nitrogenados como : nitratos, nitritos e sais de amônia. E algumas utilizam ainda compostos de nitrogênio orgânico tais como os aminoácidos e peptídeos

#### Hidrogênio (H), Oxigênio (O), Enxofre (S) e Fósforo (P)

- essenciais a todos os organismos.
- H e O fazem parte de muitos compostos orgânicos e da água
- S é necessário para a biossíntese dos aminoácidos cisteína, cistina, e metionina
- P é essencial para a síntese de ácidos nucleicos e ATP
- alguns desses elementos são encontrados na água ou na atmosfera gasosa do meio. Os íons inorgânicos como sulfatos e fosfatos, podem também suprir os principais elementos necessários ao microrganismo

#### Outros Elementos

- muitos outros elementos essenciais são requeridos, porém em menor quantidade que os citados acima - sódio, ferro, molibdênio, cobalto, zinco, cobre manganês
- o sódio,  $\text{Na}^+$ , é requerido pelas permeases da membrana que transporta o açúcar melibiose em células de *Escherichia coli*
- o ferro,  $\text{Fe}^{+2}$ , é requerido pelas enzimas citocromo, catalases e succinil desidrogenases (como cofator)
- alguns minerais, em pequenas quantidades (mg/l) como o  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mo}^{+6}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  são requeridos para ativar enzimas. O  $\text{Mo}^{+6}$  por exemplo é requerido pela nitrogenase, a enzima que catalisa a conversão do  $\text{N}_2$  para o  $\text{NH}_3$  (amônia) durante a fixação do  $\text{N}_2$

### Classificação Nutricional dos Microrganismos

Grupo Nutricional	Fonte de Carbono	Fonte de Energia	Exemplos
Quimioautotróficos	CO <sub>2</sub>	compostos inorgânicos	bactérias nitrificantes do Fe, H e S
Quimioheterotróficos	compostos orgânicos	compostos orgânicos	muitas bactérias, fungos, protozoários e animais
Fotoautotróficos	CO <sub>2</sub>	luz	bactérias sulfurosas verde e púrpura, algas, plantas e cianofíceas
Fotoheterotróficos	compostos orgânicos	luz	bactérias púrpuras e verdes não enxofradas

### Meios Utilizados para o Cultivo de Microrganismos

Os componentes comuns na estrutura do meio farão parte de uma destas categorias :

1. nutrientes nitrogênio-amínico - peptonas, infusões, extratos .....
2. fonte de energia - glicose ....
3. fatores de promoção de crescimento - sangue, soro, vitaminas, NADH ....
4. tampão fosfato, para manutenção de pH em meios de fermentação - sais de fosfato acetatos e citratos solúveis
5. sais minerais e metais, para melhorar o crescimento - PO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> e metais
6. agentes seletivos - reagentes químicos, antibióticos, e tinturas inibidoras
7. corantes indicadores, úteis para indicar mudanças de pH no meio, durante e depois do crescimento de microrganismos - fenol vermelho, vermelho neutro, bromocresol púrpura ....
8. agentes gelificantes - ágar, gelatina ....

Características de alguns produtos complexos usados como ingredientes dos meios de cultura

Ingredientes	Características
Agar	uma mistura de 2 polissacarídeos, obtido de algas marinhas, usado para solidificar o meio; insolúvel em água fria, gelifica a <45°C. Não serve como nutriente para a maioria dos microrganismos e não é metabolizado durante seu crescimento
Extrato de Carne	extrato aquoso de tecido muscular, concentrado sob a forma de pasta, contém carboidratos, compostos orgânicos de nitrogênio, vitaminas hidrossolúveis e sais
Sais Biliares	preparado de bilis de boi fresca, usado como agente inibidor seletivo em bacteriologia
Caseína	é um digerido pancreático de caseína, uma fonte importante de nitrogênio-amínico
Corantes	fazer uso somente daqueles certificados pela CSBS
Gelatina	um produto protéico purificado, usado para solidificar o meio
Gelisato	um hidrolisado pancreático de gelatina que possui um conteúdo escasso de cistina, triptofano e carboidrato

Infusões	usa-se infusões de coração de boi ou de bezerro, e de cérebro
Neopeptona	digerido enzimático de proteínas, adequado p/ multiplicação de organismos cuja cultura <i>in vitro</i> se considera difícil
Ox-Gall	constituído por bilis fresca purificada; é um agente inibidor
Peptona	um produto da digestão enzimática da carne, solúvel em água e formada por polipeptídeos, água e oligossacarídeos. Se trata de uma peptona para uso geral
Fitona	peptona vegetal preparada por digerido de farinha de soja com papaína, útil para culturas de organismos de multiplicação difícil
Polipeptona	mistura de peptonas (tripticase + thiotone) para uso em meios que requerem ambas proteínas
Proteose Peptona	uma peptona especializada, preparada por digestivos de carne fresca selecionada com papaína, útil para produção de toxinas microbianas
Soytona	hidrolizado anzimático de farinha de sementes de soja, adequados para meios que não há hidratos de carbono
Açúcares	todos devem ser quimicamente puros e adequados para fins bacteriológico
Tiotona	preparado por digestivo péptico de tecido animal; alto conteúdo de enxofre, útil nas análises de formação do H <sub>2</sub> S
Trypticase	peptona derivada da caseína por digestão pancreática, fonte rica em nitrogênio de aminoácidos
Triptona	hidrolisado pancreático, fonte rica de nitrogênio-amínico; destinado ao isolamento de cultivo de organismos de difícil crescimento
Extrato de Levedura	extrato aquoso de células de leveduras lisadas, fonte excelente de substâncias estimulantes do crescimento como vitamina B; contém compostos orgânicos de N e C
Água	deve-se usar somente água desmineralizada, que não é tóxica aos microrganismos

## 1. Meios para Cultivo de Bactérias

Os meios escolhidos para o cultivo de bactérias específicas normalmente imitam o habitat normal das mesmas, assim:

- para as bactérias que preferem os nutrientes encontrados no sangue - adiciona-se sangue ao meio
- se a glicose é o constituinte comum de um nicho bacteriano - adiciona-se o açúcar ao meio

Para aquelas bactérias que apresentam maiores exigências nutricionais - **fastidiosas** - utiliza-se os meios complexos, citados acima na tabela, os quais contêm uma grande variedade de substâncias orgânicas preparadas a partir de matérias naturais

Alguns exemplos de meios quimicamente definidos utilizados no crescimento de bactérias :

1. bactéria quimioautotrófica :

fonte de nitrogênio - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



fonte de carbono (na forma de  $\text{CO}_2$ ) -  $\text{NaHCO}_3$

tampão e íons essenciais -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

íons essenciais -  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

solvente -  $\text{H}_2\text{O}$

2. bactéria heterotrófica não fastidiosa :

fonte de energia e carbono - glicose (0.1%)

fonte de nitrogênio, tampão e íons essenciais -  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

tampão e íons essenciais -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

íons essenciais -  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

solvente -  $\text{H}_2\text{O}$

3. bactéria heterotrófica fastidiosa :

fonte de carboidrato, nitrogênio orgânico, vitaminas, sais - extrato de carne

fonte de nitrogênio orgânico e algumas vitaminas - peptona

íons e requerimento osmótico -  $\text{NaCl}$

solvente -  $\text{H}_2\text{O}$

## 2. Meios para o Cultivo de Fungos

Assim como as bactérias os fungos absorvem nutrientes em vez de ingerí-los. A adsorção é auxiliada por enzimas secretadas no meio, que quebram as moléculas orgânicas em porções menores que podem ser transportadas mais facilmente para dentro da célula

Todos os fungos são heterotróficos. E podem crescer no laboratório;

- em uma mistura simples contendo açúcar, uma fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns minerais;
- alguns necessitam de vitaminas;
- e outros podem crescer somente em meio complexo que contenha uma grande variedade de compostos orgânicos providos da peptona e extrato de carne.

Em geral, o meio utilizado para culturas de fungo tem : (1) uma concentração maior de açúcar que as bactérias - 4%; (2) e um pH menor - 3.8 a 5.6

Composição de um meio utilizado para o isolamento e crescimento de fungos em geral : **Ágar Sabourand**

fonte de carbono, nitrogênio - peptona

fonte de carbono e energia - glicose (em alta concentração inibe o crescimento bacteriano)

agente solidificante - ágar

solvente - H<sub>2</sub>O

### 3. Meios para o Cultivo de Algas

As algas utilizam luz para produzir energia, e requerem somente CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e vários íons inorgânicos para crescer.

Os meios complexos para algas normalmente contêm extrato de soja. Mais existem poucos meios "prontos" como os existentes para bactérias e fungos

#### Meios com finalidades especiais - MEIOS ESPECIAIS

São utilizados quando se quer isolar, identificar ou contar os microrganismos, eles fornecem informações específicas sobre os microrganismos

##### *Meios para Anaeróbios*

- os primeiros cultivos de anaeróbios foram em camadas profundas de meios solidificado, assim podem crescer pois a camada de ágar da superfície exclui o oxigênio atmosférico
- a adição de um agente redutor ao meio remove o oxigênio - MEIO REDUZIDO - ex. tioglicolato de sódio
- para anaeróbios estritos, como as arqueobactérias produtoras de metano por exemplo, o cuidado deve ser maior. Deve-se :

(1) ferver o meio para que a maior parte do oxigênio dissolvido seja retirado

(2) adicionar o gás N<sub>2</sub>, livre de oxigênio, nos tubos contendo o meio

(3) adicionar um agente redutor, p.ex. a cisteína remove os últimos traços de oxigênio

(4) esterilização do meio (recomendável a utilização de válvula de selagem no topo do frasco para prevenir a entrada de oxigênio)

##### *Meios Seletivos*

- serve para selecionar um microrganismo permitindo um tipo particular de microrganismo ou suprimindo o crescimento de outros microrganismos. Exemplos : ágar sabourand para fungos; ágar verde brilhante para *Salmonella*; o corante verde brilhante adicionado ao meio inibe as bactérias Gram + comuns do trato intestinal; o ágar feniletanol inibe o crescimento de Gram-negativas, mais não das Gram-positivas
- recentemente os antibióticos vem sendo adicionado aos meios, tornando-os seletivos para os microrganismos resistentes à estes agentes antimicrobianos

##### *Meios Diferenciais*

- servem para diferenciar os vários tipos de microrganismos em uma placa com ágar. P.ex. : se uma amostra de secreção da garganta é semeada numa placa de ágar sangue, pode-se diferenciar as bactérias hemolíticas (produzem enzimas que lisam as células vermelhas formando uma zona clara ao redor da colônia) das não hemolíticas (que não dissolvem as células vermelhas, e portanto não formam este halo ao redor das colônias)

#### *Meios Seletivos/Diferenciais*

- agem tanto como seletivos como diferenciais, são particularmente úteis em microbiologia de saúde pública, como na determinação da qualidade da água ou na identificação de causas de infecção alimentar

ágar MacConkey - contém sais biliares e corante cristal violeta, os quais inibem o crescimento de Gram+ e permitem o desenvolvimento de Gram-negativas, e ainda a lactose, que distingue as Gram + (produtoras de ácido a partir do açúcar tornando-as vermelhas) das Gram-negativas (não produtoras de ácido)

#### *Meios de Enriquecimento*

- utilizados para selecionar microrganismo que está presente em determinado local, em pequenas quantidades com relação à população. O meio favorece o crescimento da espécie desejada, mas não o crescimento das outras espécies presentes em uma população mista
- ao contrário do meio seletivo, nenhum agente inibido é utilizado para prevenir o crescimento de microrganismos indesejáveis
- um exemplo são as bactérias que oxidam o fenol - que podem ser isoladas de amostras do solo, utilizando um meio de enriquecimento, constituído de sais de amônia, e fenol como única fonte de carbono e energia - assim somente os microrganismos capazes de oxidar o fenol estarão presente em grande número depois de vários cultivos seletivos

#### *Meios de Estocagem*

- utilizado para a manutenção da viabilidade e das características fisiológicas de uma cultura, a qual pode exigir um meio diferente daquele ótimo para o seu crescimento - o desenvolvimento rápido e luxuriante pode estar associado com a rápida morte celular. Assim p.ex., a glicose, que favorece com frequência o crescimento, também desenvolve maior quantidade de ácidos no meio, sendo preferível omitir a glicose na preparação de um meio de estocagem

## CAPÍTULO 5: Cultivo e Crescimento dos Microrganismos

---

Crescimento - é o aumento ordenado de todos os componentes de um organismo. Morte - a perda irreversível da capacidade de reprodução, crescimento e divisão, por parte de um organismo ou de uma célula

### Condições Físicas para o cultivo dos Microrganismos

A temperatura, os gases do meio, e o pH são os principais fatores físicos, que juntos criam condições ótimas para o crescimento celular

#### 1. Temperatura :

De grande influência no crescimento dos microrganismos - todos os processos de crescimento são dependentes de reações químicas, as quais são afetadas pela temperatura

A temperatura na qual uma espécie de microrganismo cresce mais rapidamente é a **temperatura ótima** de crescimento - em temperaturas mais favoráveis para o crescimento, o número de divisões celulares por hora, chamada de **taxa de crescimento**, dobra para cada aumento de temperatura de 10 °C

Para qualquer microrganismo particular há 3 temperaturas importantes a conhecer : mínima, ótima e máxima (nesta última as enzimas são danificadas pelo calor e a célula para de crescer)

Os microrganismos podem ser divididos em 3 grupos de acordo com a variação de temperatura na qual crescem melhor :

*Psicrófilos* - crescem em baixas temperaturas (15 - 20 °C)

- alguns morrem se expostos à temperatura ambiente (25 °C). A temperaturas muito alta certas enzimas e a membrana citoplasmática podem ser danificadas
- existem bactérias, fungos, algas e protozoários que são psicrófilos. Em temperaturas de 4-10 °C os microrganismos psicrófilos deterioram alimentos estocados por longo períodos
- são encontrados principalmente em águas frias e solos, tais como os oceanos e regiões polares. Alguns gêneros são : *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*.

*Mesófilos* - crescem em temperaturas moderadas (25 - 40 °C)

- a maioria dos microrganismos pertencem a este grupo. As bactérias saprófitas, os fungos, as algas e os protozoários crescem no limite mínimo da variação de temperaturas mesófilas (25 °C), e os parasitários de humanos e animais no limite máximo dessa variação (40 °C)

*Termófilos* - crescem a altas temperaturas (40 - 85 °C)

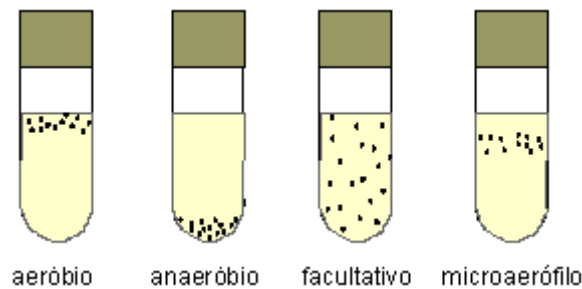
- podem ser encontrados em áreas vulcânicas, em misturas de fertilizantes e em nascentes quentes
- a maioria são procariotos, nenhuma célula eucariótica cresce em uma temperatura superior a 60 °C - a perda de função da membrana citoplasmática a baixa temperatura pode ser o que determina a temperatura de crescimento mínima dos termófilos

## 2. Atmosfera Gasosa

Os microrganismos no seu habitat natural necessitam de quantidades variadas de gases tais como :  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $N_2$ ,  $CH_3$  .

Alguns gases são utilizados no metabolismo celular; outros podem ter sido excluídos de uma cultura por serem tóxicos às células. O  $O_2$  e  $CO_2$ , são os dois gases principais que afetam o crescimento de células microbianas

De acordo com a resposta ao  $O_2$  os microrganismos são divididos em 4 grupos :



**Aeróbios** - requerem oxigênio para o crescimento (padrão: 21% de  $O_2$ )

- alguns aeróbios podem crescer mais lentamente quando o  $O_2$  é limitado. Se os microrganismos crescem em meio líquido podem rapidamente utilizar o  $O_2$  dissolvido na camada superficial do meio. Para evitar este problema, as culturas líquidas de microrganismos aeróbios são algumas vezes agitadas (shaker) para aumentar o suprimento de  $O_2$  dissolvido e produzir um estoque celular maior num tempo de incubação menor
- existem alguns grupos de microrganismos que requerem níveis elevados de  $CO_2$  - *Neisseria gonorrhoea* - 5 a 10% de  $CO_2$ . Neste caso pode-se colocar a placa com meio semeado com o microrganismos dentro de uma jarra hermeticamente fechada, contendo uma vela acesa, a qual queimará enquanto tiver  $O_2$  suficiente para manter esta combustão ( $C + O_2 \rightarrow CO_2$ ), assim a atmosfera dentro da jarra vai conter uma quantidade de  $O_2$  reduzida e uma concentração de  $CO_2$  aumentada.

**Facultativos** - crescem na presença de  $O_2$  ou podem também crescer em anaerobiose

- quando em condições de anaerobiose, obtém energia pelo processo metabólico chamado **fermentação**. Ex. gêneros da família bacteriana Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

**Anaeróbios** - aqueles que podem ser mortos pelo oxigênio

- não utilizam o  $O_2$  para reações de produção de energia
- alguns até toleram baixas concentrações de oxigênio :
  - Clostridium perfringens* - altamente tolerantes ao  $O_2$
  - Clostridium tetani* - moderadamente tolerantes ao  $O_2$
  - Methanobacterium* - anaeróbios estritos
- a toxicidade do oxigênio para os anaeróbios :
  - $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$  (radical superóxido) : podem causar danos às células (1)
  - $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio) : podem destruir os componentes vitais da célula (2)

- $O_2^- + H_2O \rightarrow O_2 + OH^- + OH$  (hidroxila) : pode danificar quase todo tipo de molécula encontrada em uma célula viva, inclusive o DNA (3)

Os microrganismos aeróbios e facultativos, que crescem em aerobiose, e até alguns microrganismos anaeróbios, desenvolveram vários mecanismos protetores contra estas formas tóxicas de  $O_2$  :

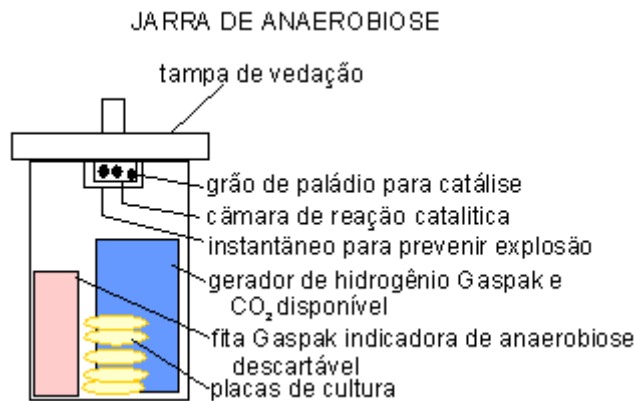
(1) produção da enzima superóxido dismutase - que elimina os radicais superóxidos convertendo-os rapidamente em peróxido de hidrogênio

(2) metabolização do peróxido de hidrogênio por mais duas enzimas - catalase, que converte o  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$ ; e a peroxidase que converte o  $H_2O_2$  em  $H_2O$ . Assim a reação (3) não mais ocorre e os radicais OH não mais são formados

- Cultivo de bactérias anaeróbias :

(1) uma incubadora - câmara de anaerobiose

(2) jarra de anaerobiose - este sistema é inadequado para o cultivo de anaeróbios estritos



Depois que a jarra é fechada o  $O_2$  presente é removido em horas pela reação catalisada pelo pládio :



*Microaerófilos* - podem utilizar oxigênio nas reações químicas para a produção de energia (1 a 15% de  $O_2$ )

- não suportam níveis de  $O_2$  de 21% presentes na atmosfera, como requerem os aeróbios, mais podem utilizar o  $O_2$  em níveis mais baixos
- a tolerância moderada ao oxigênio deve-se à alta susceptibilidade aos radicais peróxidos e o peróxido de hidrogênio que são formados nas culturas incubadas sob condições de anaerobiose. Exemplo : *Campylobacter jejuni* (provoca diarreia em humanos)

### 3. pH - Potencial Hidrogeniônico

$\text{pH} = -\log \{H^+\}$ . Quanto  $> \{H^+\}$ ,  $< \text{pH}$ , e mais ácido

- o pH ótimo é normalmente bem definido para cada espécie. Encontra-se no valor mediano de variação de pH sobre o qual o crescimento acontece, diferentemente da temperatura ótima
- para o melhor crescimento do microrganismo num meio ácido ou básico, ele deve ser capaz de manter o seu pH intracelular em torno de 7.5, não importando qual o valor do pH externo. A maneira de obter o pH da célula viva nessa faixa, é expulsando ou absorvendo íons hidrogênio (até um certo limite)
- as variações de pH podem ser mortal ao cultivo de microrganismo, isto pode ser prevenido pela adição de um tampão ao meio
- pH de alguns ambientes :
  - águas de escoamento de solos vulcânicos e de minas : pH = 1 a 3
  - águas de nascentes : pH = 10
  - solos ricos em amônia : pH = 11
  - oceanos : pH = 8; águas polares : pH = 6

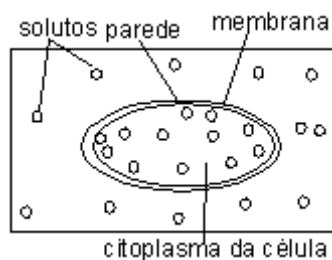
Microrganismos	pH ótimo
bactérias	4 a 9
fungos	5 a 6
protozoários	6.7 e 7.7
algas	4 a 8.5

### 4. Outras condições

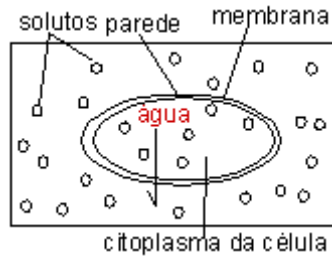
- os microrganismos podem apresentar outras necessidades como : a luz, para os organismos fotossintéticos. Além da função ligada ao metabolismo celular e aos nutrientes, a água influencia o crescimento por meio da pressão osmótica e da pressão hidrostática

*Pressão Osmótica* - força com a qual a água se move através da membrana citoplasmática de uma solução contendo uma baixa concentração de solutos para uma contendo alta concentração de soluto. As células podem estar em um meio:

(a) Isotônico - onde a concentração de solutos em um meio é igual àquela no interior da célula. Não há movimento de água para dentro e para fora da célula



(b) Hipertônico - onde a concentração de solutos fora da célula é maior que no interior. A água flui para fora da célula resultando na desidratação e contração do protoplasto



(c) Hipotônico - a concentração de soluto no interior da célula é maior que fora dela. A água flui para dentro da célula, o influxo da água força o protoplasto contra a parede celular. Se a parede for fraca, pode romper-se; o protoplasto pode inchar, e eventualmente rompe



*Pressão Hidrostática* - é a pressão exercida pelo peso da água que permanece na superfície dela. Os microrganismos dependente de pressão são chamados **barófilos**, estes microrganismos morrem um meio com baixa pressão hidrostática pois contêm vesículas de gás que se expandem com grande força na descompressão e rompem as células

## Reprodução e Crescimento dos Microrganismos

O crescimento em uma cultura microbiana normalmente significa um crescimento no número total de células devido à reprodução dos organismos individuais na cultura

Dois fenômenos ocorrem : (1) o crescimento, ou reprodução das células individualmente; (2) crescimento ou aumento na população de uma cultura microbiana

### Reprodução em Microrganismos Eucarióticos

- Na natureza a reprodução ocorre de duas maneiras :
  - (1) Reprodução Assexuada - basicamente resulta em novas células idênticas às originais
  - (2) Reprodução Sexuada - permite a troca de material genético e assim a geração de um novo ser

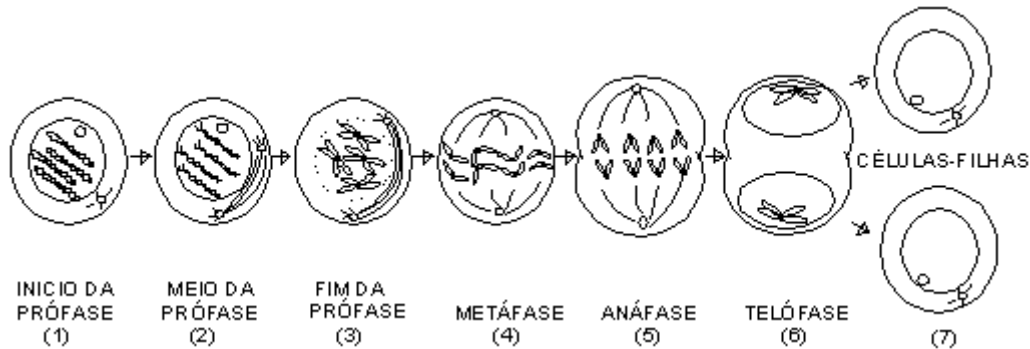
#### 1. Reprodução Assexuada

- apesar de não implicar em variação genética é mais eficiente que a reprodução sexuada em propagar as espécies. Neste tipo de reprodução os novos indivíduos são produzidos por: (1) um organismo parental ou; (2) uma célula (organismos unicelulares)
- a reprodução assexuada nos organismos eucarióticos é mais complexa que nos procariotos, onde uma única célula parental simplesmente se divide em duas células-filhas idênticas. Nos eucarióticos deve ser precedida de MITOSE - uma forma de divisão nuclear na qual todos os cromossomos da célula são



duplicados e os dois novos conjuntos se separam para formar os núcleos filhos idênticos. A célula então se divide em 2 células-filhas, cada uma recebendo um núcleo

Etapas da Mitose em detalhe :



(1) assim que as células entram em PRÓFASE os cromossomos condensam-se em estruturas em forma de fitas e tornam-se visíveis ao microscópio

(2) os cromossomos são duplicados, dispostos lado a lado, unidos no centro pelo centrômero (um anel de proteínas), ao mesmo tempo, os centríolos (cilíndricos de microtúbulos proteicos) migram para lados opostos da célula

(3) a medida que os centríolos se separam um fuso mitótico começa a se formar entre eles. No FINAL DA PRÓFASE os centríolos se movem para os polos opostos da célula com o fuso entre eles. Durante esta fase, a membrana nuclear começa a desintegrar-se

(4) a membrana nuclear desaparece, e os cromossomos parecem estar acoplados pelos seus centrômeros às fibras do fuso. O centrômero de cada cromossomo se divide e os dois cromossomos-filhos em cada conjunto se separam completamente

(5) este é o estágio mais curto da MITOSE, onde os cromossomos-filhos se movem para um dos lados da célula utilizando as fibras do fuso como guia

(6) é marcada pela chegada dos dois conjuntos de cromossomos em um dos polos do fuso. Uma membrana nuclear forma-se ao redor do agrupamento dos cromossomos em cada pólo e o cromossomo se alonga em fitas de cromatina típica da INTERFASE (fase em que as células se apresentam em estágio de repouso)

(7) todas as células derivadas da MITOSE de um organismo eucariótico tem então o mesmo número de cromossomos e o mesmo tipo de genes das células parentais

## 2. Reprodução Sexuada

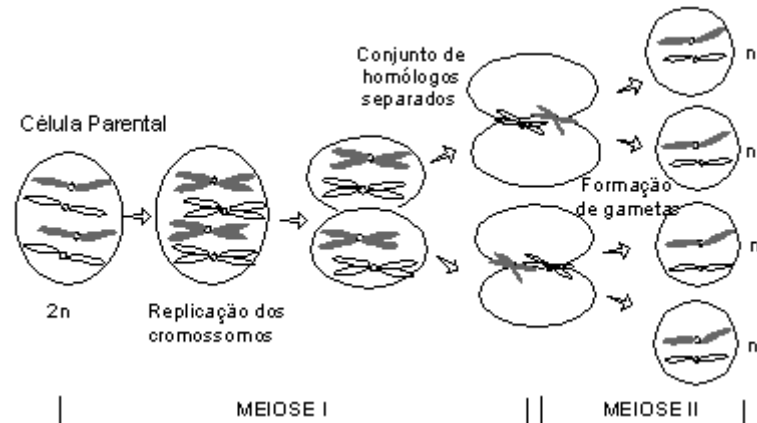
- fusão de duas células sexuais diferentes (gametas) que são procedentes de dois pais de sexos diferentes ou tipo de relação sexuada
- a fusão de gametas é denominada fertilização e a célula resultante, de zigoto
- na reprodução sexual tem-se :

(1) fusão de dois núcleos haplóides

(2) formação de um zigoto (diplóide)

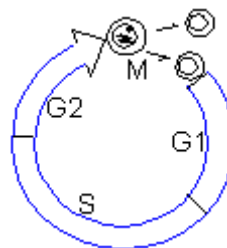
(3) MEIOSE, resultando novamente em células haplóides

(4) a fusão das células haplóides completando o ciclo



O ciclo celular dos eucariótos

- o todas as células eucarióticas perfazem um ciclo celular semelhante, com exceção dos gametas.
- o a duração do ciclo celular varia de um tipo de célula para outra.
- o as fases do ciclo pode ser resumida :



G1 - fase de crescimento - a célula cresce e sintetiza proteínas

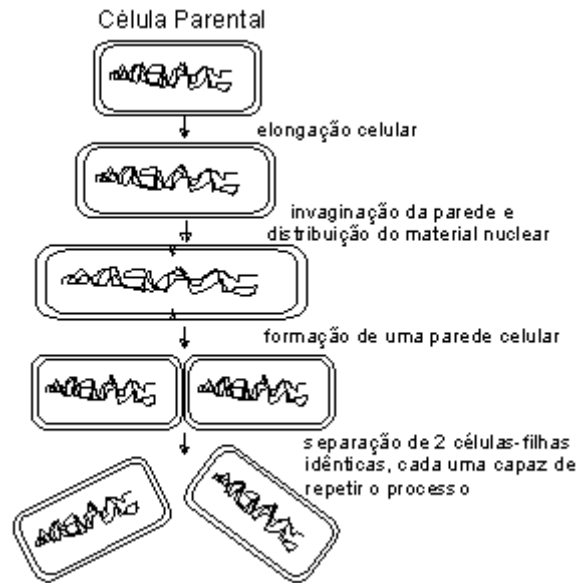
S - fase de síntese de DNA - a célula continua a crescer e a síntese de DNA ocorre no núcleo até que a quantidade de DNA seja duplicada

G2 - fase de crescimento - o crescimento celular atinge o seu máximo

M - mitose - a síntese de macromoléculas quase cessa e o núcleo sofre mitose

### Reprodução em Microrganismos Procarióticas

A maioria das bactérias se multiplicam pelo processo de reprodução assexuada - **FISSÃO BINÁRIA TRANSVERSA** - onde as células dividem-se individualmente em 2 células-filhas de tamanho aproximadamente igual

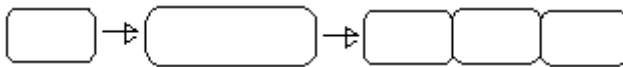


Alguns procaríotos reproduzem-se assexuadamente por outros modelos de divisão celular :

(1) Brotamento - ex. *Rhodospseudomonas acidophila*



(2) Fragmentação - ex. *Nocardia*



(3) Formação de Exospóros - ex. *Streptomyces*



#### Crescimento de uma cultura bacteriana

- durante o crescimento ativo de uma cultura microbiana as populações de células crescem exponencialmente, aumentando por meio de uma progressão geométrica ( $2^n$ )
- o intervalo de tempo requerido para que cada microrganismo se divida é conhecido como TEMPO DE GERAÇÃO, os quais são fortemente influenciados não somente pela composição nutricional do meio mais também pelas condições físicas de incubação

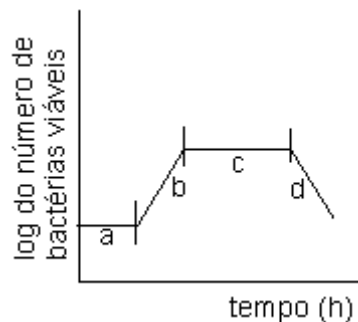
tempo de geração:  $g = t/n$  ;  $t$  = intervalo de tempo particular,  $n$  = número de gerações

taxa de crescimento:  $R = n/t$

Exemplos :

*Escherichia coli*:  $tg = 12.5$  min; *Mycobacterium tuberculosis*:  $tg = 13$  a  $15$  h

Curva de crescimento bacteriana típica



Fase de crescimento	Taxa de crescimento	Características
(a) - Lag	zero	nenhum aumento no número de células, aumentam de tamanho, são sintetizadas novas enzimas para as células se adaptarem ao novo meio
(b) - Exponencial ou Log	máxima ou constante	condições de crescimento balanceado; as células são uniformes em termos de composição química e atividade metabólicas e fisiológicas. Pico da atividade e eficiência fisiológica
(c) - Estacionária	zero	acúmulo de produtos metabólicos tóxicos e/ou exaustão de nutrientes. Algumas células morrem, outras crescem e se dividem. O número de células viáveis diminui
(d) - Morte	negativa	acúmulo adicional de produtos metabólicos inibitórios. A taxa de morte é acelerada; o número de células diminui de modo exponencial. Tipicamente todas as células morre em dias ou meses

#### Medida de crescimento da população

- os microbiologistas utilizam uma variedade de técnicas para quantificar o crescimento microbiano. Os mais comuns são :

(1) Contagem Microscópica - muito comum, aplicada para quantificar células em vacinas, leite e culturas, e expresso em número de células/ml

(2) Contagem Celular Eletrônica - muito comum, aplicada para quantificar células em vacinas, leite e culturas, e expresso em número de células/ml

(3) Contagem em Placa - muito comum, aplicada para quantificar células em vacinas, de leite, culturas, solos e alimentos, expresso em UFC/ml (unidade formadora de colônia)

(4) Membrana Filtrante - aplicada para quantificar células em vacinas, de leite, culturas, solos e alimentos, expresso em UFC/ml (unidade formadora de colônia)

(5) Turbidez - aplicado para ensaio microbiológico, estimativa de unidades de absorvância da massa de células em caldo ou outras suspensões

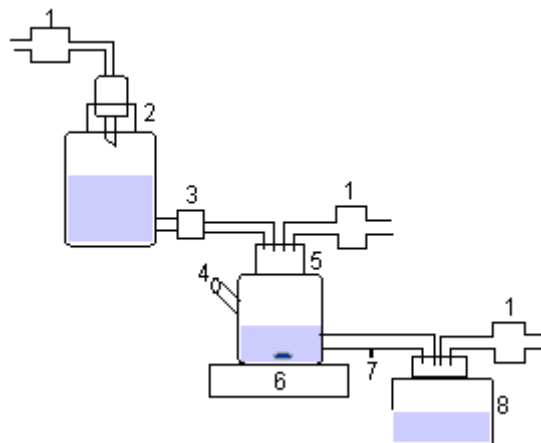
(6) Conteúdo de Nitrogênio - muito comum, aplicado para a medida indireta da massa celular, expresso em mg de N/ml

(7) Peso Seco - muito comum, aplicado para a medida indireta da massa celular, expresso em mg de N/ml

(8) Produtos Metabólicos - aplicados a ensaios microbiológicos e medidas indiretas da atividade metabólica (crescimento), expressa em quantidade do produto/ml

### Cultura Contínua

- usadas para simular o habitat natural de uma espécie microbiana para estudar sua estabilidade genética em relação ao tempo
- nas indústrias, manter as células em fase de crescimento logarítmico ativo cessará o volume máximo de produtos desejados. Estes sistemas abertos ou CULTURAS CONTÍNUAS podem ser obtidos assim :



- o quimiostato é um aparelho amplamente usado para o crescimento contínuo dos microrganismos

### Culturas Sincrônicas

- as células se dividem todas ao mesmo tempo, mais pode se conseguir isto (por um determinado período), por exemplo semeando uma cultura em uma temperatura razoável para seu crescimento, mantendo-a nessa temperatura, onde elas metabolizarão lentamente, mas não se dividirão. Quando a temperatura é rapidamente aumentada para a de crescimento ótimo da célula, estas sofrerão divisões sincronizadas (ao mesmo tempo)
- as culturas sincrônicas permitem aos pesquisadores estudar o crescimento microbiano, a organização e a morfogênese durante estágios particulares do ciclo de divisão celular
- na verdade não é prático analisar uma única célula microbiana, por causa do seu tamanho diminuto. Entretanto, se todas as células em uma cultura estão no mesmo estágio de crescimento a informação que se pode extrair de toda a população de células pode ser extrapolada para fornecer informações aplicáveis a uma única célula

## CAPÍTULO 6: Controle dos Microrganismos

---

Controlar - destruir, inibir ou remover. Vários são os agentes físicos e químicos que podem ser utilizados para manter os microrganismos em níveis aceitáveis

- processos usados : aquecimento, baixas temperaturas, radiação, filtração e dessecação. O método de escolha depende do tipo de material que contém o microrganismo : (1) meio de cultura; (2) produtos farmacêuticos; (3) superfície de instrumentos cirúrgicos; (4) sala de cirurgia de um hospital; (5) alimento de consumo humano
- substâncias químicas que matam os microrganismos, ou previnem o seu crescimento são chamados de agentes ANTIMICROBIANOS (antibacterianos, antivírus, antifúngicos, antiprotozoários)

Antimicrobianos :

- que **matam** os microrganismos - MICROBICIDA (bactericida, fungicida, viricida)

Esterilização - destruição de todos os microrganismos presentes em um material, incluindo esporos

- que apenas **inibem** o crescimento dos microrganismos - MICROBIOSTÁTICOS (fungistático ou bacteriostático)
- aspectos fundamentais que se deve aplicar aos agentes físicos e químicos :

### 1. Padrão de morte em uma população microbiana

- o critério de morte de um microrganismo em Microbiologia é baseado em uma única propriedade : **a capacidade de se reproduzir**. Assim a morte de um microrganismo é definida como a perda da capacidade de reprodução
- a avaliação da eficiência de um agente microbicida pode ser testada cultivando uma amostra do material tratado para determinar o número de sobreviventes

### 2. Condições que influenciam a atividade antimicrobiana

- tamanho da população microbiana - quanto maior mais tempo para morrer
- concentração do agente microbicida - quanto menor a concentração mais tempo leva para destruir
- tempo de exposição ao agente microbicida - quanto maior o tempo de exposição maior será o número de células mortas
- temperatura em que são expostos ao agente microbicida - quanto mais alta a temperatura mais rapidamente a população é morta
- natureza do material que contém os microrganismos - tempo de exposição menor - meio fluido e pH 5.0
- características dos microrganismos que estão presentes

### 3. Mecanismo de destruição das células microbianas

- conhecendo o **mecanismo de ação** de um dado composto é possível predeterminar as condições sob as quais atuará mais eficientemente, além de também revelar que espécies de microrganismos serão mais susceptíveis àquele agente

- os possíveis mecanismos estão associados com os principais aspectos estruturais : alteração do estado físico do citoplasma, inativação de enzimas, ou rompimento da membrana ou parede celular - podem levar à morte da célula

## Agentes Físicos

**Altas Temperaturas** : calor úmido, calor seco, incineração

### 1. Calor Úmido

- mais eficiente que o calor seco para destruir os microrganismos - leva menos tempo e a temperaturas menores
- causa desnaturação e coagulação das proteínas vitais, as enzimas, enquanto o calor seco causa oxidação dos constituintes orgânicos da célula (queima lentamente)
- os endosporos bacterianos são as formas mais resistentes de vida

células vegetativas de bactérias - mortas de 5-10 min a 60-70 °C

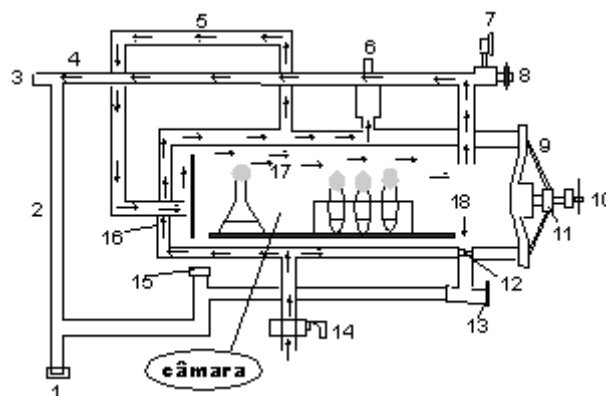
células vegetativas de fungos - mortas de 5-10 min a 50-60 °C

esporos de fungos - mortas de 5-10 min a 70-80 °C

- o calor úmido utilizado para matar os microrganismos pode ser na forma de : vapor, água fervente, água aquecida a temperaturas abaixo do seu ponto de ebulição (100 °C)

#### (a) 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, desenvolvida no século XIX



1 - vazão; 2 - cano de saída; 3 - saída; 4 - câmara de exaustão; 5 - vapor para a câmara; 6 - válvula de segurança; 7 - manômetro; 8 - válvula operadora; 9 - porta; 10 - maçaneta; 11 - fecho de segurança; 12 - tela removível; 13 - termômetro; 14 - regulador de pressão; 15 - injetor de ar de condensação automática; 16 - revestimento de vapor; 17 - vapor; 18 - ar.

Procedimento do funcionamento da autoclave :

1. a câmara de parede dupla da autoclave é primeiramente lavada com vapor fluente para remover todo o ar
2. 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 - se o ar estiver presente reduzirá a temperatura interna da autoclave, e é a temperatura e não a pressão no interior da câmara que mata os microrganismos

- uma autoclave é usualmente operada à uma pressão de 15 lb/pol<sup>2</sup>, na qual a temperatura de vapor é de 121 °C. Leva mais tempo para um calor penetrar em um material viscoso ou sólido do que em um material fluido. Quanto maior o volume mais tempo para o calor penetrar

Recipiente	Tempo de exposição (min, a 121 - 123 °C)
Tubos de ensaios	
18 x 150 mm	12 - 14
32 x 200 mm	13 - 17
38 x 200 mm	15 - 20
Frascos Erlenmeyer	
50 ml	12 - 14
500 ml	17 - 22
1.000 ml	20 - 25
2.000 ml	30 - 35
Garrafas de diluição, 100 ml	13 - 17
Frascos de soro, 9.000 ml	50 - 55

### (b) Água Fervente

- água levada ao ponto de ebulição : 100 °C
- mata microrganismos vegetativos presente no líquido
- os materiais ou objetos contaminados não são esterilizados com segurança pois alguns endosporos bacterianos podem resistir a 100 °C por mais de 1 hora
- água em ebulição não é considerado um método de esterilização

### (c) Temperaturas abaixo do seu ponto de ebulição (100 °C) - Pasteurização

- aquecimento lento a baixas temperaturas
- mata as células vegetativas de patógenos, mais não esteriliza

### 2. Calor Seco

- calor seco ou ar quente em temperaturas suficientemente altas levam os microrganismos à morte. Leva mais tempo que o calor úmido
- há materiais que não podem ser esterilizados por calor úmido, neste caso o calor seco é o preferido

### 3. Incineração

- é uma prática de rotina : alça ou agulhas de sementes bacteriológicas no bico de Bunsen

### Baixas Temperaturas



- temperaturas abaixo de 0 °C inibirão o metabolismo dos microrganismos em geral. Não mata, preserva-os como forma de latência
- Ex. freezer doméstico: - 20 °C; freezer: - 70 °C; nitrogênio líquido: -196 °C

### **Radiações**

- energia na forma de ondas eletromagnéticas transmitidas através do espaço ou através de um material
- as radiações magnéticas são classificadas de acordo com seus comprimentos de onda : Quanto maior, menos energia (conteúdo energético)
- radiações de alta energia (comprimento de onda baixo) podem matar as células, inclusive microrganismos - raios X, gama e luz UV

### Formas de Radiações :

#### 1. Radiação Ionizante

as radiações de alta energia tem energia suficiente para causar ionização das moléculas - rompendo as moléculas em átomos ou grupo de átomos (H<sub>2</sub>O ---- H<sup>+</sup> + OH<sup>-</sup>) - e os radicais hidroxilas por exemplo são altamente reativos e destroem compostos celulares como o DNA e proteínas

exemplos: raios X e raios gama. Além de microbicidas os raios de alta energia são capazes de penetrar em pacotes de produtos e esterilizar seus interiores

são mais utilizados para esterilizar alimentos e equipamentos médicos

#### 2. Radiação Não-Ionizante

a radiação UV tem um comprimento de onda entre 136 a 400 nm, que ao invés de ionizar uma molécula excita os elétrons - resultando em uma molécula que reage diferente das moléculas não-irradiadas. O DNA sofre a maior avaria

a maior atividade bactericida ocorre no comprimento de onda próximo de 260 nm (mais fortemente absorvido pelo DNA)

lâmpadas especiais que emitem luz UV com comprimento de onda microbicida são utilizadas para matar microrganismos - apenas os microrganismos da superfície de um objeto são mortos

### **Filtrações**

- as membranas filtrantes são úteis para esterilização, e separação de diferentes tipos de microrganismos e para coletar amostras microbianas
- tamanho dos poros que retém ou não os microrganismos :

bactérias - 0.5 a 1.0 µm (geral)

leveduras - 1.0-5.0 µm x 5-30 µm

- alguns tamanhos de poros comerciais : 0.25 µm ; 0.45 µm ; 0.5 µm ; 1 µm

### **Dessecação**

- células microbianas vegetativas quando dessecadas interrompem suas atividades metabólicas, levando a um declínio na população total viável

- no processo chamado liofilização os microrganismos são submetidos à desidratação extrema em temperaturas de congelamento mantidas em ampolas fechadas à vácuo

## Agentes Químicos

### Aplicação dos compostos químicos

- redução do número de microrganismos na superfície de material inanimado (assoalhos, mesas, e utensílios domésticos)
- em lesões de pele para prevenir a infecção
- eliminação de microrganismos patogênicos da água potável e de piscinas

Não existe um único composto químico que seja ideal para todos os propósitos. Assim é importante conhecer algumas propriedades para que se possa escolher o mais adequado:

1. as vantagens que o agente apresenta quando utilizados em determinadas situações
2. as principais categorias de agentes químicos antimicrobianos
3. algumas de suas características e suas utilizações práticas
4. e como atuam nos microrganismos

### Definição de Termos

*Esterilizante* - é um composto químico que realiza uma esterilização. **Estéril** é um termo absoluto, ou seja, um material está estéril ou não. Não pode ser "parcialmente estéril" ou "quase estéril"

*Desinfetante* - é uma substância química que mata as formas vegetativas de microrganismos patogênicos, mais não necessariamente suas formas esporuladas. Refere-se normalmente a substâncias utilizadas em objetos inanimados

*Germicida* - sinônimo do desinfetante; entretanto os microrganismos mortos por um germicida não são necessariamente patogênicos. São usados mais termos específicos como fungicida, bactericida, etc

*Anti-séptico* - é um composto químico usualmente aplicado na superfície do corpo humano para prevenir a multiplicação dos microrganismos. Mata os microrganismos, ou inibe seu crescimento e sua atividade metabólica

*Saneador* - agente que mata 99,9% dos microrganismos contaminantes de uma área. São normalmente aplicados em objetos inanimados (copos, talheres, pratos e utensílios em restaurantes), e também na limpeza de equipamentos de laticíneos e indústrias de alimentos

As normas de saúde pública determinam que em certos lugares, a população microbiana não deve exceder um número específico. em atendimento a estas determinações utiliza-se um SANEADOR

### Características de um agente químico ideal

1. *Atividade antimicrobiana* - a capacidade de uma substância de inibir ou preferencialmente matar os microrganismos - Esta é sempre a primeira exigência

2. Solubilidade - a substância deve ser solúvel em água ou outros solventes (álcool) em quantidades necessária ao seu uso efetivo
3. *Estabilidade* - o armazenamento da substância durante um período razoável não deve resultar em uma perda significativa de ação antimicrobiana
4. *Ausência de toxicidade* - não deve prejudicar o homem ou os animais
5. *Homogeneidade* - as preparações devem ser uniformes em sua composição (os componentes ativos devem estar presentes em cada aplicação)
6. *Inativação mínima por material estranho* - alguns compostos químicos antimicrobianos combinam facilmente com proteínas, diminuindo a quantidade de substância química disponível para agir contra os microrganismos
7. *Atividade em temperatura ambiente ou corporal* - não deve ser necessário aumentar a temperatura além daquela normal encontrada no ambiente, onde os compostos químicos são utilizados
8. *Poder de penetração* - a ação antimicrobiana é limitada ao local de aplicação, entretanto a ação na superfície é algumas vezes necessárias
9. *Ausência de poderes corrosivos e tintoriais* - os componentes não devem corroer ou desfigurar metais nem corar ou danificar os tecidos
10. *Poder desodorizante* - o desinfetante ideal deve ser inodoro ou apresentar um odor agradável
11. *Capacidade detergente* - um agente antimicrobiano que tem propriedades detergente tem a vantagem de ser capaz de remover mecanicamente os microrganismos da superfície que esta sendo tratada
12. *Disponibilidade a baixo custo* - o produto deve ser facilmente encontrado e de baixo custo

### **Principais Grupos de Desinfetantes e Anti-sépticos :**

#### **1. Fenol e Compostos Fenólicos:**

- solução de fenol 5% mata rapidamente as formas vegetativas dos microrganismos, porém os esporos são muito mais resistentes
- o fenol por ser tóxico e apresentar odor desagradável não é muito utilizado como desinfetante ou anti-séptico. Tem sido substituído por vários derivados químicos, os quais são menos tóxicos para os tecidos e mais ativos para os microrganismos. Exemplos : lysol - desinfetante produzido a partir de uma solução de sabão contendo o-fenilfenol, o-benzil-p-clorofenol e xilenol, usado para desinfetar objetos inanimados (assoalhos, paredes e superfícies de mesa, termômetro retal); hexaclorofeno - atua como um bacteriostático em bactérias Gram +, particularmente em estafilococos
- mecanismo de ação : fenol e derivados, alteram a permeabilidade seletiva da membrana, desnaturam e inativam proteínas como enzimas, causando uma perda de substâncias intracelulares (lisam as células). Dependendo da concentração utilizada podem ser bacteriostático ou bactericida

#### **2. Álcoois**

- em concentração entre 70 e 90 % as soluções de etanol são eficientes contra as formas vegetativas dos microrganismos
- não é utilizado para esterilizar um objeto porque não mata os endosporos bacterianos (*Bacillus anthracis* pode sobreviver no álcool por 20 anos)
- o metanol não é utilizado como agente bactericida - é altamente tóxico. Quanto maior for a cadeia de carbono do álcool maior suas propriedades bactericida, porém os álcoois maiores como o propílico e isopropílico já não são mais solúveis em água
- os álcoois propílicos e isopropílicos 40 a 80% são bactericidas para células vegetativas. O álcool etílico 70% e o álcool isopropílico 90% (mais eficiente

contra vírus) são utilizados como anti-sépticos de pele e como desinfetantes de termômetro clínicos de uso oral, e de certos instrumentos cirúrgicos

- Mecanismo de ação : capazes de desnaturar proteínas; como são solventes de lipídeos, lesam as estruturas lipídicas da membrana das células microbianas

### 3. Halogênios

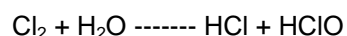
iodo cloro e bromo - fortes agentes oxidantes e altamente reativos - destruindo os componentes vitais da célula microbiana

(1) Iodo e compostos iodados :

- o iodo puro é um elemento cristalino preto azulado com brilho metálico, pouco solúvel em água mais altamente solúvel em álcool e iodeto de potássio ou sódio
- tradicionalmente usado como agente anti-séptico. É um agente microbicida de alta eficiência contra todas as espécies bacterianas. É também esporicida, fungicida, virucida e amebicida
- usados principalmente para assepsia da pele. Também desinfecta pequenas quantidades de água; na sanitificação de utensílios de alimentação; desinfecta o ar (vapores de iodo)
- mecanismos de ação : destruição de compostos metabólitos essenciais dos microrganismos por meio de oxidação. Ex. inativação do aminoácido tirosina

(2) Cloro e Compostos Clorados

- o cloro na forma gasosa ( $\text{Cl}_2$ ) ou em combinações químicas representa um dos desinfetantes mais largamente utilizados
- o gás comprimido em forma líquida é a escolha universal para a purificação de águas de abastecimento, pública, piscinas e estações de tratamento de água e esgoto.
- pelo fato da difícil manipulação do cloro gasoso, se utiliza muito os compostos inorgânicos clorados, como os hipocloritos e cloraminas, esta última é mais estável, mais o cloro é liberado num período maior que nos hipocloritos
- para ser efetivo a concentração do cloro deve atingir 0.5 a 1.0 ppm. Uma solução de hipoclorito 1% é usada como desinfetante doméstico; de 5 a 12% como alvejantes e desinfetantes domésticos e como sanitificantes em instalações de laticíneos e indústrias de alimentos
- mecanismo de ação :



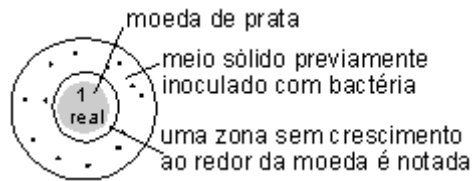
$\text{HClO}$  -----  $\text{HCl} + \text{O}$  (poderoso agente oxidante que pode destruir subst. celulares)

\*o cloro pode também combinar diretamente com as proteínas celulares e destruir suas atividades biológicas

### 4. Metais Pesados e seus Compostos - Hg, Pb, Zn, Ag, Cu

- antigamente a água era armazenada em recipientes de prata (Ag) e cobre (Cu) pois as pessoas notavam que ali a água de beber era conservada
- o  $\text{HgCl}_2$  era amplamente usado. Hoje tem sido substituído por outros agentes menos tóxico e e menos corrosivos

\*ação oligodinâmica - a capacidade de quantidade extremamente pequenas de certos metais, particularmente a prata de exercer efeito letal sobre as bactérias - acredita-se que a atividade desses íons metálicos se deve à inativação de certas enzimas que se combinam com o metal



- compostos contendo Hg orgânico possuem maior atividade antimicrobiana e menos toxicidade que os inorgânicos - mercuriocromo, mertiolate
- o sulfato de cobre é efetivo como um algicida em resíduos abertos de água e piscinas, tem também ação fungicida
- mecanismo de ação : inativam as proteínas celulares combinando-se com alguns componentes da proteína

### Detergentes ou Surfactantes

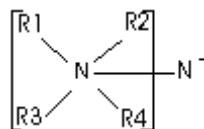
- compostos que diminuem a tensão superficial, utilizados para a limpeza de superfícies
- a ação umectante deve-se ao fato de serem compostos anfipáticos (possuem uma parte polar e outra apolar), como por exemplo os sabões

Quimicamente os detergentes são classificados em :

1. Detergentes Aniônicos - a propriedade detergente do composto reside na porção aniônica. Ex. sabão -  $[\text{C}_9\text{H}_{19}\text{COO}]^-\text{Na}^+$
  2. Detergentes Catiônicos - a propriedade detergente do composto reside na porção catiônica. Ex. cloreto de cetilpiridínico -  $[\text{Ar-N C}_{16}\text{H}_{33}]^+\text{Cl}^-$
  3. Detergentes Não-Iônicos - não ionizam quando dissolvidos na água. Ex. polissorbato 80; octoxinol. Não são antimicrobianos
- muitos detergentes antimicrobianos pertencem ao grupo catiônico, dos quais os COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO são mais largamente usados

Compostos Quaternários de Amônio

Estrutura Geral



- são bactericidas (Gram-positivas e Gram-negativas) mesmo em concentrações muito baixas
- apresentam uma combinação de propriedades que fazem dele um excelente anti-séptico, desinfetante e sanificante :
  1. baixa toxicidade
  2. alta solubilidade em água
  3. alta estabilidade em solução
  4. não são corrosivos
- largamente aplicados em assoalhos, paredes e outras superfícies em hospital, enfermarias e outros estabelecimentos públicos. E também em equipamentos em instalações de processamento de alimentos

- mecanismo de ação : desnaturação de proteínas das células, interferências com os processos metabólicos, e lesão da membrana citoplasmática

Alguns desinfetantes, antisépticos e detergentes mais comumente usados

Agente Químico	Concentração (%)	Aplicações	Nível de Atividade
Compostos Fenólicos	0.5 - 3.0	desinfecção de objeto inanimado	intermediário
Álcoois	70 - 90	antissepsia da pele, desinfecção de instrumento cirúrgico	intermediário
Iodo	1	antissepsia da pele, pequenos cortes, desinfecção da água	intermediário
Compostos Clorados	0.5 - 5.0	desinfecção de água, superfícies não metálicas, equipamento de laticínios, materiais domésticos	baixo
Compostos Quaternários	0.1 - 0.2	saneamento ambiental de superfícies e equipamentos	baixo
Compostos Mercuricos	1	antissepsia da pele, desinfecção de instrumentos	baixo

\* alta - mata todas as formas de vida microbiana, inclusive os esporos bacterianos

intermediário - mata o bacilo da tuberculose, fungos e vírus, mais não os esporos bacterianos

baixo - não mata esporos bacterianos, nem o bacilo da tuberculose ou os vírus em um tempo aceitável

#### Avaliação do poder antimicrobiano dos desinfetantes e anti-sépticos

- o agente químico é testado contra um microrganismo específico (organismo-teste) - usualmente *Staphylococcus aureus* representando os Gram + ou *Salmonella* representando as Gram -
- os 3 procedimentos amplamente usados no laboratório são : (1) técnica de diluição em tubo; (2) técnica de inoculação em placa; (3) técnica de coeficiente fenólico

#### Esterilizantes Químicos

- são particularmente utilizados para a esterilização de materiais medido sensíveis ao calor. Os principais são :

##### 1. Óxido de Etileno

- líquidos a temperaturas abaixo de 10.8 °C, acima disso torna-se gás;
- seus vapores são altamente irritantes para os olhos e a mucosa .
- são inflamáveis mesmo a baixa concentração
- tem um grande poder de penetração; atravessa e esteriliza o interior de grandes pacotes com objetos, roupas e mesmo certos plásticos - as seringas descartáveis p. ex.
- apresenta a desvantagem de agir a baixa velocidade, necessitando de várias horas de exposição para ser eficiente

- utilizados rotineiramente para a esterilização de materiais médicos e laboratoriais. No programa espacial pelos cientistas americanos e russos para a descontaminação dos compostos das naves espaciais
- mecanismos de ação : inativa as enzimas e outras proteínas que tem átomos de hidrogênio lábeis (grupos sulfidrilas)

## 2. $\beta$ -Propiolactona

- líquido incolor em temperatura ambiente; p.e = 155 °C; não é inflamável; e causa bolhas quando em contato com a pele e irritação nos olhos
- é bactericida, esporicida, fungicida e viricida
- não apresenta poder de penetração, mais é considerado mais ativo contra os microrganismos que os óxidos de etileno. Ex. é necessário 2 a 5 mg/l de  $\beta$ -propiolactona para fins de esterilização de material, contra 400 a 800 mg/l do óxido de etileno
- desvantagem: além de seu baixo poder de penetração provavelmente presente propriedades carcinogênica, o que torna seu uso como esterilizante restringido

## 3. Glutaraldeído

- líquido oleoso, incolor; e 2% já tem um largo espectro de atividade antimicrobiana
- efeito contra vírus, células vegetativas e esporuladas de bactérias e fungos
- utilizado na medicina para esterilizar instrumentos urológicos, equipamentos respiratórios

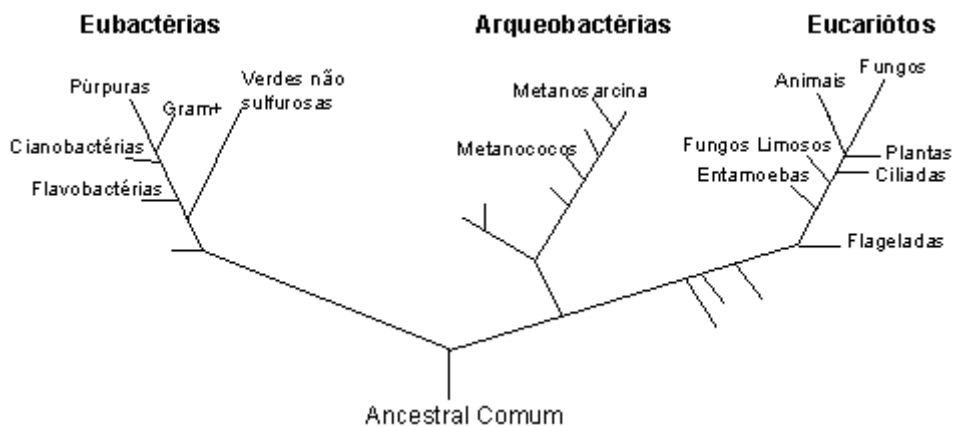
## 4. Formaldeído

- um gás que se mostra estável somente em alta concentração e temperatura
- extremamente tóxico e seus vapores intensamente irritantes à mucosa
- em temperatura ambiente polimeriza-se formando uma substância sólida incolor (paraformaldeído) que libera o formaldeído pelo aquecimento
- o formaldeído em solução é utilizado para desinfecção de certos instrumentos. Na forma gasosa pode ser utilizado para desinfecção e esterilização de áreas fechadas
- mecanismo de ação : inativação de constituintes celulares (proteínas e ácidos nucleicos)

Mecanismos de ação de vários compostos químicos antimicrobianos em célula bacteiana :



## CAPÍTULO 7: Os Principais Grupos de Microrganismos



### Eubactérias e Archeobactérias

#### Características Morfológicas da Bactérias

Embora existam milhares de espécies bacterianas diferentes, os organismos isolados apresentam uma das três formas :

1. Elipsoidal ou Esférica (COCOS) - apresentam tipos e arranjos diferentes:

- diplococos - dois cocos
- estreptococos - vários cocos arranjados em cadeias
- tétrades - cocos arranjados em 4 - quadrado
- estafilococos - cocos arranjados em cachos de uva
- sarcina - cocos arranjados em forma cúbica

2. Cilíndricas ou Bastonetes (BACILOS)

- diplobacilos - ocorrem em pares
- estreptobacilos - ocorrem em cadeias

3. Espiraladas ou Elicoidais - ocorrem predominantemente como células isoladas

#### Exigências Nutricionais para a maioria das Bactérias

pH :	limites: 4 - 9 ótimo: 6.5 - 7.5
Temperatura :	limites 0 - 79 °C ótimo 20 - 37 °C
Gases :	aeróbias, microaerófila, facultativas ou anaeróbias
Luz :	alguns grupos fotossintéticos
Concentração de carbono no meio :	0.5 - 1.0 %



Carbono :	autotróficos ou heterotróficos
-----------	--------------------------------

### Classificação

Existem dois grupos principais de bactérias : Eubactérias e Arqueobactérias. As diferenças fundamentais entre estes grupos são :

1. Quanto à composição da parede celular - eubactérias: peptidoglicano; arqueobactérias: constituída de proteínas ou polilissacarídeo
2. Quanto à estrutura química dos fosfolípidos da membrana citoplasmática - eubactérias: ácidos graxos de cadeia longa; arqueobactérias: contém álcoois de cadeia longa ramificada (fitanóis)
3. Quanto à síntese protéica - eubactérias: o aminoácido usado para iniciar a cadeia protéica é sempre o formilmetionina; arqueobactérias: o aminoácido é a metionina
4. Além do mais as arqueobactérias são notáveis por formarem produtos finais incomuns do metabolismo, que as eubactérias não podem produzir, como o gás metano, ou ainda por habitar ambientes extremamente adversos que muitas eubactérias não podem tolerar

#### 1. Eubactérias

São divididas em dois grupos :

1. Com parede celular
  - Gram-Negativas ( 12 subgrupos )
  - Gram-Positivas ( 6 subgrupos )
2. Sem parede celular
  - Micoplasmas

Principais Características diferenciais do grupo das eubactérias :

GRUPOS	CARACTERÍSTICAS
<b>Gram-Negativas</b>	
Espiroquetas	helicoidais, com flagelo, vivem na água, lodo, insetos, animais e humanos; várias são patógenas ao homem. Ex. <i>Borella</i> , <i>Leptospira</i> , <i>Spirochaeta</i>
Bacilos aeróbios ou Microaerófilos	helicoidais, com flagelos ou não, vivem na água, solo, animais; alguns são patógenos ao homem. Ex. <i>Campylobacter</i>
Cocos e Bacilos aeróbios	bastonetes ou cocos, vivem na água, solo; alguns são patógenos ao homem e animal. Ex. <i>Acetobacter</i> , <i>Brucella</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Neisseria</i>
Bacilos anaeróbios facultativo	bastonetes retos ou vibrões, vivem na água, solo, plantas intestino do homem e de animais; alguns são patógenos. Ex. <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Serratia</i>

Bactérias anaeróbias	bastonetes e cocos, vivem no trato intestinal e causam infecções teciduais. Ex. <i>Fusobacterium</i>
Riquétsias e Clamídeos	bastonetes e cocos, muitas são patôgenas ao homem e animal, necessitam de hospedeiros vivos para se desenvolverem. Ex. <i>Coxella</i> , <i>Rickettsia</i>
Fototróficas anoxigênicas	bactérias púrpuras e verdes, anaeróbios, fotossintéticas, vivem em ambiente aquático, não patôgenos. Ex. <i>Rhodospseudomonas</i> , <i>Chlorobium</i>
Fototróficas oxigênicas	cianobactérias, fotossintéticas, produzem O <sub>2</sub> , vivem no solo e na água, não patogênicos. Ex. <i>Anabaena</i> , <i>Gloetricha</i>
Bactérias deslizantes	bastonetes ou filamentos, sem flagelos, vivem no solo e na água, não patogênicos. Ex. <i>Beggiotoa</i>
Bactérias com bainha	bastonetes em cadeia ou filamentos, envolvidas por uma bainha tubular, saprófitas aquáticas, não patogênicas. Ex. <i>Crenothrix</i>
Bactérias gemulantes e/ou apendiculares	saprófitas aquáticas e do solo, não patogênicas. Ex. <i>Ancalomicrobium</i>
Quimiolitotróficas	obtem energia pela oxidação da amônia, nitrito, compostos sulfurados, vivem no solo e água, não patogênicos. Ex. <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrosomonas</i>
<b>Gram-Positivas</b>	
Cocos	aeróbios, facultativos ou anaeróbios, saprófitas ou parasitas, alguns são patogênicos. Ex. <i>Deinococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Sarcina</i>
Bactérias esporuladas	bastonetes ou cocos, formam endosporos, aeróbios, facultativos ou anaeróbios, vivem no solo, água, insetos, animais, humanos, alguns são patogênicos. Ex. <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
Bacilos regulares	aeróbios ou facultativos, vivem no solo, água, produtos alimentícios, alguns causam doenças humanas. Ex. <i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i>
Bacilos irregulares	células exibem saliência (forma de Y ou V), aeróbios facultativos ou anaeróbios, alguns são patogênicos. Ex. <i>Actinomyces</i> , <i>Propionibacterium</i>
Micobactérias	bastonetes aeróbios, álcool-ácido resistentes, saprófitas ou parasitas, alguns patogênicos ao homem. Ex. <i>Mycobacterium</i>
Actinomicetos	aeróbios do solo que formam micélio, hifas ramificadas, multiplicam-se por fragmentação ou por produção de esporos, alguns produzem antibióticos. Ex. <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i>
<b>Micoplasmas</b>	assumem várias formas, pois não tem parede celular, não inibidos pela penicilina, possuem esteróis como os eucariotos, habitam na mucosa do homem e de outros animais. <i>Mycoplasma</i>

## 2. Archeobactérias

São divididas em dois grupos :

1. Com parede celular

Produtoras de metano

Bactérias halofílicas extremas

Arqueobactérias dependente de enxofre

2. Sem parede celular

Termoplasmas

Principais Características diferenciais do grupo das arqueobactérias :

GRUPOS	CARACTERÍSTICAS
Metanogênicas	anaeróbias, produz grande quantidade de metano, cocos, Gram-, vivem em lodoçal, açude, brejos, estação de tratamento de água de esgoto. Ex. <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanospirillum</i>
Halofílicas extremas	crecem em 17 a 23% de sal (água do mar = 3% de NaCl), vivem em lagos salgados (mar morto), tanques industriais que produzem sal, alimentos salgados com sal, contém pigmento carotenóide. Ex. <i>Bacteriorrodopsina</i>
Dependentes de enxofre	vivem em fonte de água quente ácidas, crescem a 50 ou 87 °C, não crescem em pH menor que 4.0 ou 5.5, aeróbias, obtém energia da oxidação do enxofre ou de açúcares e aminoácidos. Ex. <i>Sulfolobus</i> , <i>Thermoproteus</i>
Termoplasmas	ausência de parede celular, temperatura ótima: 55 a 59 °C, pH ótimo: 2, as células desintegram-se em pH 7

**Eucariótos**

Os microrganismos eucariótos podem ser divididos em 3 principais grupos : Fungos, Algas e Protozoários. De um modo geral os microrganismos eucariótos são facinantes devido a seu ciclo de vida complexo, sua morfologia variável, seus métodos alternativos de reprodução, seus efeitos como agentes de doença e como fonte de interesse econômico e seu papel no ambiente

**Características Morfológicas e Nutricionais dos microrganismos Eucariótos**

Principais características que diferenciam os microrganismos eucariótos :

Microrganismos	Arranjo Celular	Modo de Nutrição	Motilidade	Miscelânea
Fungos	unicelular ou multicelular	quimioheterotrófico pela absorção de nutrientes solúveis	não-móvel	esporos sexuais ou assexuais
Algas	unicelular ou multicelular	fotoautotrófico pela absorção de nutrientes solúveis	principalmente não-móvel	pigmentos fotosintéticos
Protozoários	unicelular	quimioheterotrófico pela absorção ou injeção de partículas de	principalmente móvel	alguns formam cistos

		alimentos		
--	--	-----------	--	--

### 1. Fungos

- possuem parede celular, com algumas exceções, diferentemente das células animais
- não possuem clorofila (não-fotosintéticos)
- formam esporos que são dispersos por correntes de ar

Exigências Nutricionais para a maioria das espécies

pH :	limites: 2 - 9 ótimo: 5.6
Temperatura :	limites 0 - 62 °C ótimo 20 - 30 °C
Gases :	aeróbios estritos
Luz :	nenhum
Concentração de carbono no meio :	4 %
Carbono :	heterotróficos

Classificação

Baseia-se primariamente em :

1. características dos esporos sexuais e corpos de frutificação presentes durante os estágios sexuais
2. da natureza de seus ciclos de vida
3. características morfológicas de seus micélios vegetativos ou de suas células

Os fungos são divididos em 3 grupos : Fungos Limosos, Fungos Inferiores Flagelados, Fungos Terrestres

*Fungos Limosos*

- apresentam tanto características de fungos como de protozoários, mais não são considerados fungos típicos nem protozoários típicos
- assemelham-se aos protozoários por não possuírem parede, apresentar movimentos amebóides e por nutrir-se por injeção de partículas.
- assemelham-se aos fungos por formar corpos de frutificação e esporângios
- divididos em duas classes principais :
  - Acrasiomycetes ou Celulares - células amebóides, se alimentam de bactérias e se agregam para formar corpos de frutificação que produzem esporos; ex. *Dictyostelium discoideum*
  - Myxomycetes ou Acelulares - multicelulares, plasmódio sem parede que se transforma em esporângio altamente organizado; ex. *Physarum polycephalum*

*Fungos Inferiores Flagelados*

- incluem todos os fungos, com exceção dos limosos, que produzem células flageladas
- alimentam-se pela absorção de nutrientes
- a grande maioria são filamentosos
- divididos em quatro classes principais :
  - Chytridiomycetes - células móveis com 1 único flagelo chicoteante localizado na extremidade posterior; ex. *Allomyces macrogynus*
  - Hyphochytridiomycetes - células móveis com 1 único flagelo do tipo falso, localizado na porção anterior; ex. *Rhizidiomyces arbuscula*
  - Plasmodiophoromycetes - células móveis com 2 flagelos chicoteantes anteriores desiguais, parasitas obrigatórios em plantas superiores, estágio vegetativo como plasmódio; ex. *Plasmodiophora brasicae*
  - Oomycetes - células móveis com 2 flagelos inseridos lateralmente; ex. *Saprolegnia ferax*

### Fungos Terrestres

- são os mais conhecidos. Incluem as leveduras, bolores, orelhas de pau, fungos em forma de taça, ferrugem, carvão, bufa-de-lobo, e cogumelos
- todos caracterizam-se pela nutrição através da absorção
- com exceção das leveduras, que são geralmente unicelulares, a maioria produz um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou não
- não possuem células móveis
- a reprodução assexuada ocorre através de brotamento, fragmentação e produção de esporangiósporos ou conídeas. A reprodução sexuada culmina na produção de zigosporos, ascosporos e basidiosporos
- divididos em quatro classes principais :
  - Zygomycetes - reprodução sexual por gamentagial, zigoto: zigosporo com parede celular espessa, reprodução vegetativa por meio de esporangiósporo no interior de esporângio, ex. *Rhizopus stolonifer*, *Mucor rouxii*
  - Ascomycetes - esporos sexuais produzidos endogenamente em um asco, reprodução vegetativa por conídeos. ex. *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*
  - Basidiomycetes - esporos sexuais produzidos exogenamente em basídios (células em forma de clava), engloba os fungos comestíveis, ex. *Agaricus bisporus*
  - Deuteromycetes - reprodução sexual desconhecida, reprodução vegetativa por meio de conídeos que se originam de conidióforos, ex. *Candida albicans*

Em geral aqueles fungos que possuem todos os estágios sexuais são conhecidos como : FUNGOS PERFEITOS, enquanto aqueles que não possuem todos os estágios sexuais conhecidos são chamados FUNGOS IMPERFEITOS ou DEUTEROMICETOS. Quando passa-se a conhecer estes estágio sexual o organismo é então reclassificado numa das outras 3 classes. Um exemplo são algumas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Candida*, que já foram reclassificados dos Deuteromycetes para os Ascomycetes

### 2. Algas

- são fotoautotróficas (algumas crescem heterotroficamente), quando crescem fotosinteticamente produzem oxigênio e utilizam CO<sub>2</sub> como única fonte de carbono
- vivem em ambientes marinhos ou de água doce

Classificação :

São geralmente classificadas conforme as seguintes características :

1. natureza e propriedade de pigmentos - clorofila a, b, c; carotenóides; etc
2. natureza dos produtos de reserva e armazenamento - amido, gorduras, óleos, laminarina, crisolaminarina, paramilon
3. tipo, número de inserção e morfologia de flagelos
4. composição química e características físicas da parede celular - celulose, pectina, ácidos algínicos, compostos pécticos, ou sem parede celular
5. morfologia e características das células e flagelos

Divididas em 6 grupos principais :

1. Algas Verdes
2. Algas Marrons
3. Algas Vermelhas
4. Algas Douradas
5. Algas Dinoflageladas
6. Algas Euglenóides

Importância Econômica

- para a fertilidade do solo - assim como certas bactérias as algas verdes, marrons e vermelhas fixam o  $N_2$  atmosférico
- para a síntese de vitaminas - o caroteno produzido por algumas algas é o precursor da vitamina A. Os peixes que injerem algas produtoras de vitamina D lipossolúveis armazenam a vitamina nos seus órgãos, assim o peixe se torna fonte da vitamina direta ao homem e animal
- algas como alimentos - a alga vermelha é cultivada no Oriente como produto alimentar; o ágar é empregado em muitos alimentos comuns do homem, como agente de clarificação dos sucos de frutas
- algas e doenças - poucas são patogênicas, algumas liberam toxinas que são letais aos peixes; *Prototheca cauna* causam doenças ao homem e animal

Líquens

- são organismos compostos, resultantes da associação de algas e fungos
- crescem em rochas, cascas de árvores, podem crescer em baixas temperaturas existentes nas elevadas altitudes e nos ambientes polares
- a maior parte dos fungos liquenizados fazem parte dos Ascomycetes, e as algas liquenizadas da classe das Algas Verdes
- sempre é uma única espécie de fungo associada a uma única espécie de alga
- reproduzem-se predominantemente por processos vegetativos

A alga fornecem carboidratos e vitaminas ao fungo e fungo fornece água e sais minerais às algas

### 3. Protozoários

- são microrganismos com características semelhantes a animais, incluindo locomoção, ingestão de alimentos, e ausência de parede celular rígida
- presentes em água doce e marinhas, no solo, ou podem ser simbióticos dentro ou sobre hospedeiros

Exigências Nutricionais para a maioria dos protozoários :

pH :	limites: 3.2 - 8.7
------	--------------------

	ótimo: 6.0 - 8.0
Temperatura :	ótimo 16 - 25 °C
Luz :	alguns efetuam a fotossíntese

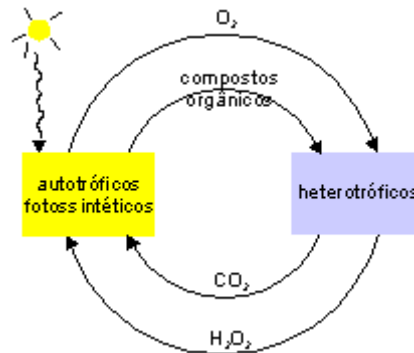
Os principais grupos de especial interesse na microbiologia :

1. Flagelados - reprodução assexuada por fissão binária, reprodução sexuada conhecida em alguns grupos, autotróficos e/ou heterotróficos, formas amebóides com ou sem flagelos, 1 ou muitos flagelos comensais, simbióticos e parasitas, ex. *Leishmania*, *Trypanosomas*, *Giardia*, *Trichomonas*
2. Amoeba - a maioria são de vida livre, corpos nus ou com esqueleto externo ou interno, movimento amebóide, alimentação por meio de pseudópodes, reprodução assexuada por fissão binária, reprodução sexuada, quando presente, por gametas flagelados, ex. *Amoeba*
3. Ciliados - o maior filo, todos possuem cílios como organela de locomoção, muitos possuem boca, presentes dois tipos de núcleos : macronúcleo, que controla o metabolismo, e micronúcleo que controla a reprodução, reprodução assexuada por fissão binária, reprodução sexuada nunca envolve a formação de gamentas livres, são amplamente distribuídos : águas doces, salgadas, em solos; 1/3 das espécies são parasitas, e as outras de vida livre, ex. *Didinium*, *Paramecium*

## CAPÍTULO 8: Metabolismo Microbiano

### Metabolismo de todos os organismos - crescimento e reprodução

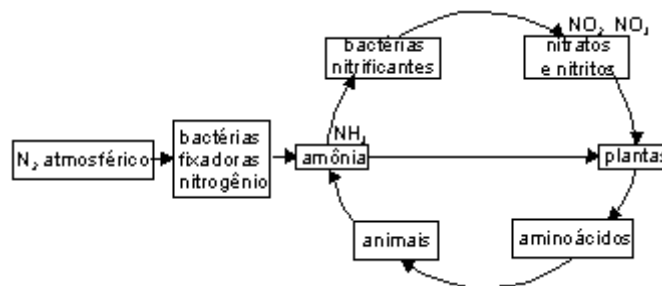
#### Ciclo do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e Oxigênio ( $\text{O}_2$ )



Autotróficos - podem usar o  $\text{CO}_2$  da atmosfera como única fonte de carbono (bactérias fotossintéticas e plantas), a partir da qual constroem todas as suas biomoléculas contendo carbono

Heterotróficos - não podem usar o  $\text{CO}_2$  da atmosfera, podem obter carbono a partir de um ambiente na forma de moléculas orgânicas complexas como a glicose (animais superiores e muitos microrganismos)

#### Ciclo do Nitrogênio na biosfera



As bactérias fixadoras de nitrogênio fixam aproximadamente 193.000.000 toneladas de nitrogênio por ano. São necessárias 10 moléculas de ATP (adenosina trifosfato) para fixar 1 molécula de nitrogênio

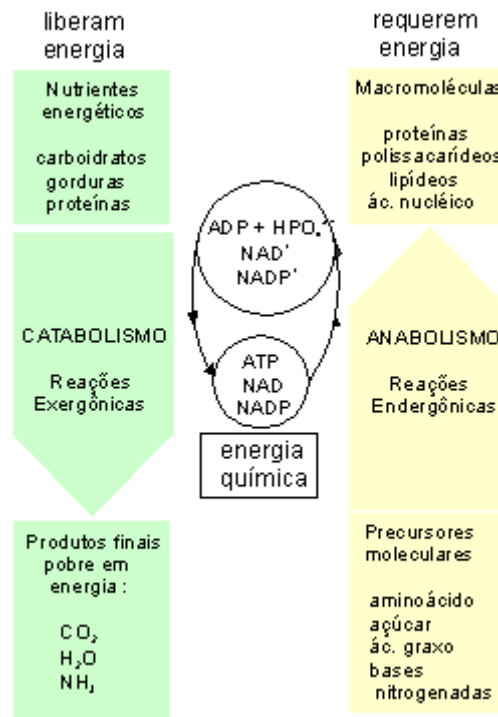
A amônia ( $\text{NH}_3$ ) é necessária para todos os seres vivos, que utilizam para a biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos

### Catabolismo e Anabolismo

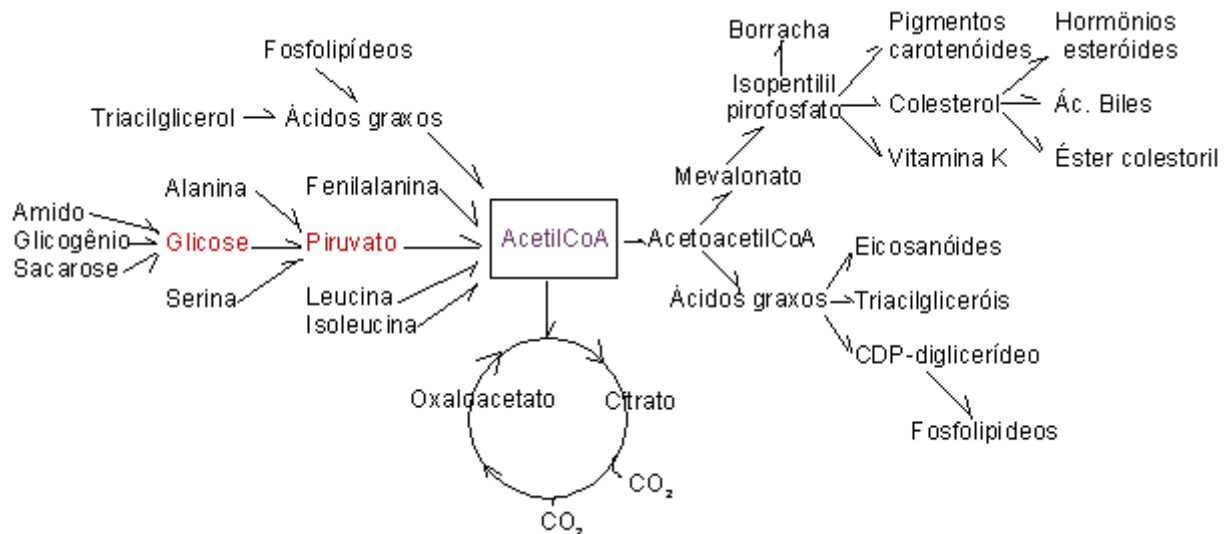
Catabolismo - a quebra de macromoléculas em pequenos compostos

Anabolismo ou Biossíntese - síntese de macromoléculas a partir de compostos pequenos





Esquema Geral



## Bioenergética

Termodinâmica Bioquímica - estudo das alterações energéticas que acompanham as reações bioquímicas

Os sistemas biológicos são essencialmente isotérmicos, e usam energia química para propulsionar os processos da vida, e os sistemas biológicos seguem as Leis Gerais da Termodinâmica :

1. a energia total de um sistema mais a energia de seu meio circundante permanece constante (lei da conservação da energia)
  2. a entropia total de um sistema deve aumentar se um processo ocorre espontaneamente. A entropia é a distribuição ao acaso do sistema, extensão desordem
- para manter os processos vitais todos os organismos devem obter energia livre do seu ambiente

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S \text{ onde ;}$$

$\Delta G$  = alteração de energia livre do sistema;

$\Delta G$  negativo - **reação exergônica** (perda de energia livre);

$\Delta G$  positivo - **reação endergônica** (anabolismo)

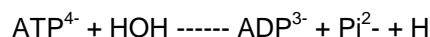
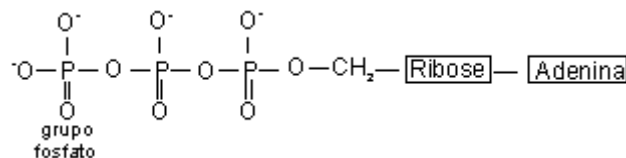
$\Delta E$  = alteração total na energia interna da reação - ENTALPIA

$\Delta S$  = alteração da ENTROPIA

T = temperatura absoluta

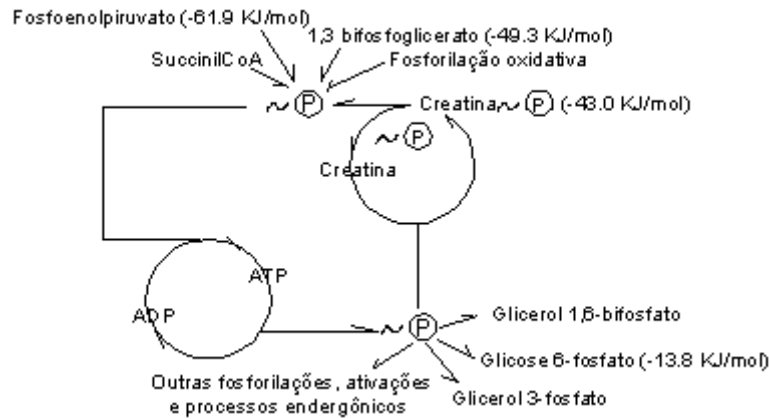
- nos autotróficos o processo exergônico é simples, a reação procede espontaneamente; p. ex. as plantas verdes utilizam energia da luz solar
- os heterotróficos obtêm energia livre do seu metabolismo ao desdobramento de moléculas orgânicas complexas de seu meio ambiente. Em todos esses processos o **ATP** desempenha um papel central na transferência de energia livre dos processos exergônicos (catabolismo) para os endergônicos (anabolismo)

### Grupo Fosfato de Transferência e ATP



### Fosfatos de alta energia atuam como a "moeda energética" da célula

- a maioria dos organismos obtêm energia da degradação, isto é, da quebra de nutrientes ou substâncias químicas
- durante o catabolismo a energia é liberada das moléculas dos nutrientes e é armazenada temporariamente em um "**sistema de armazenamento de energia**" até sua utilização. Este sistema serve também como um "**sistema de transferência de energia**" quando ela é necessária para a síntese de constituintes da célula



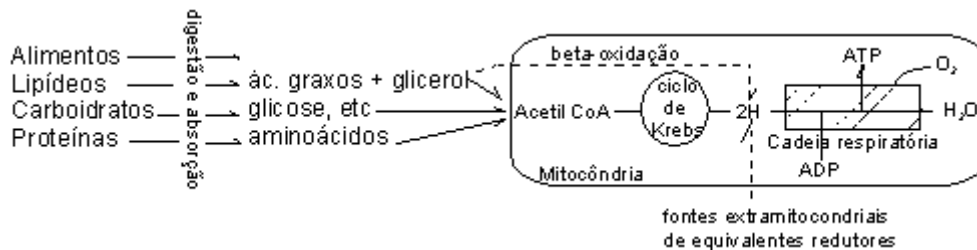
### Oxidação Biológica

- a respiração é o processo pelo qual as células obtêm energia na forma de ATP, a partir de reações controlada do hidrogênio com o oxigênio para formar a água.
- a maior parte da energia derivada da oxidação respiratória é capturada no interior da mitocôndria. Este sistema mitocondrial (geração de energia a partir de um intermediário de alta energia, o ATP) é chamado FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA
- a fosforilação oxidativa capacita os organismos aeróbios a captar uma porção muito maior de energia livre disponível dos substratos, em comparação com os anaeróbios

fosforilação oxidativa - síntese de ATP - transferência de elétrons para oxigênio - nos eucariótos ocorre na mitocôndria

fotofosforilação - síntese de ATP - luz - nos eucariótos ocorre nos cloroplastos

Transporte dos equivalentes redutores através da cadeia respiratória



### Principais fontes de energia dos microrganismos

1. quimiotróficos - obtêm energia por degradação de nutrientes ou substratos químicos ( a energia é liberada e armazenada, e os produtos finais acumulados)
2. quimioheterotróficos - são organismos quimiotróficos, que degradam **compostos orgânicos** para obter energia
3. quimioautotróficos - são organismos quimiotróficos, que degradam **compostos inorgânicos** para obter energia
4. fototróficos - utilizam luz como fonte de energia. Possuem certos pigmentos que absorvem a luz e armazenam sua energia

### Energia Química

A energia existe sob várias formas. A energia química é a utilizada universalmente pelos organismos vivos

Energia química é a energia contida em ligações químicas das moléculas de nutrientes especiais. Quando estas ligações são quebradas durante a degradação de um nutriente a energia química é liberada

- os compostos de transferência de energia mais utilizados pelas células são aqueles capazes de transferir grande quantidade de energia, chamados compostos de transferência de alto nível energético - o mais importante é a adenosina trifosfato (ATP)

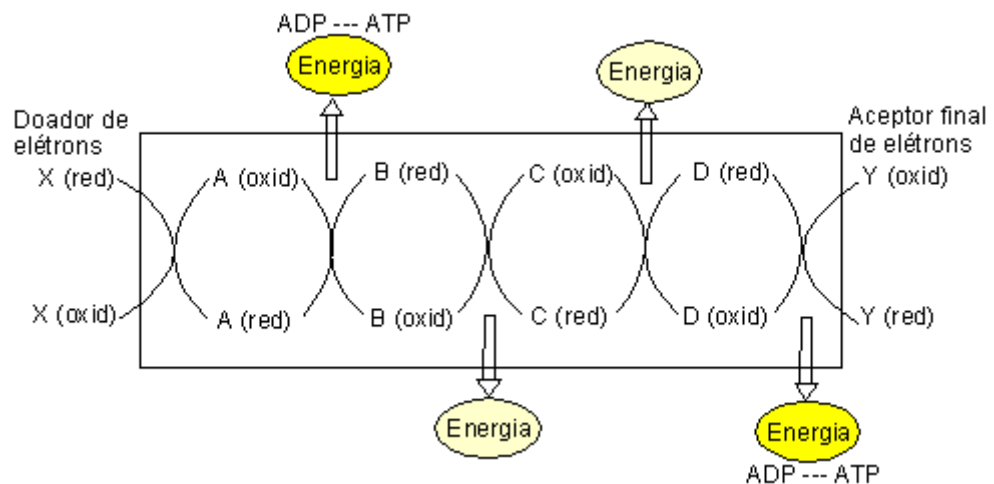
### Produção de ATP pelos microrganismos

Fosforilação é a adição de um grupo fosfato a um composto. O ATP é formado pela adição de um grupo fosfato ao ADP. Existe três vias gerais nas quais isto pode ocorrer :

1. **Fosforilação ao nível do substrato** - processo no qual o grupo fosfato de um composto químico é removido e adicionado diretamente ao ADP
1. **Fosforilação Oxidativa** - processo no qual a energia liberada pela oxidação de compostos químicos (nutrientes) é utilizada para a síntese de ATP a partir de ADP. Todas as reações de oxidação liberam energia, e os microrganismos captam para a síntese do ATP
  1. a energia é liberada por uma série integrada de reações de oxidação sequenciais denominada *sistema de transporte de elétrons*
  2. a energia é armazenada temporariamente em forma de *força protomotiva*
  3. a força protomotiva fornece energia para a síntese de ATP a partir do ADP

### Sistema de Transporte de Elétrons

- é uma série integrada de reações de oxidações sequenciais que libera energia gradativamente, em várias etapas, as quais a célula vai utilizando

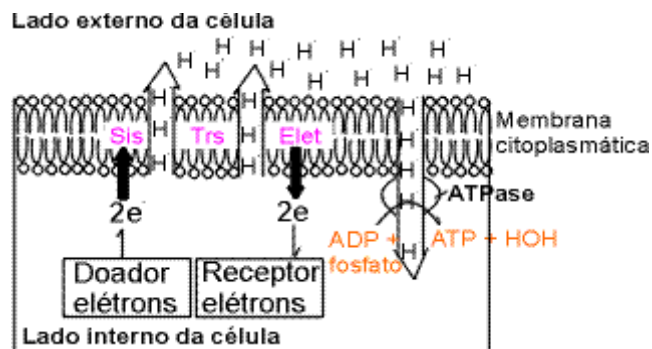


- O doador de elétrons ou composto reduzido pode ser um nutriente que foi absorvido pela célula ou um composto resultante da quebra de um nutriente, e aceptor final de elétrons ou composto oxidado, obtido do ambiente em que a célula está presente
- os organismos aeróbios utilizam o oxigênio; após receber os elétrons do último sistema O/R e o oxigênio é reduzido a água. Os organismos anaeróbios utilizam compostos químicos como o nitrato, o sulfato, ou ácido fumárico
- o sistema de transporte de elétrons está localizado na membrana citoplasmática nas bactérias e na membrana interna da mitocôndria nas células eucarióticas

Observe que a energia é liberada a cada passo na série sequencial de oxidação, porém apenas em algumas etapas a quantidade de energia liberada é suficiente para a produção de ATP. Mas esta energia ainda deve ser primeiramente estocada na forma de força protomotiva antes de ser utilizada para produzir ATP

### Força Protomotiva

8. a energia liberada do sistema de transporte de elétrons é utilizada pela célula para bombear prótons para fora da célula tornando assim o lado externo da membrana altamente ácido e o lado interno com cargas negativas (concentração de prótons pode ser 100 vezes maior de um lado da membrana)
9. esta distribuição desigual de prótons e cargas elétricas através da membrana representa uma importante forma de energia potencial - FORÇA PROTOMOTIVA - que é utilizada na síntese de ATP
10. existem canais dentro de moléculas das enzimas adenosina trifosfatase (ATPase), a qual atravessa a membrana, através dos quais os prótons fluem para o lado onde estão menos concentrados (como se abrisse uma barragem). Este fluxo de prótons pode ser utilizado pela célula para realizar trabalho de fosforilação do ADP para produzir ATP



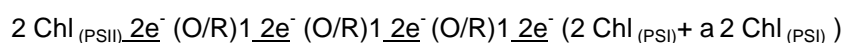
1. **Fotofosforilação** - processo no qual a energia da luz é utilizada para a síntese de ATP a partir de ADP. Utilizada pelas cianobactérias, algas e plantas verdes, de um modo geral, a fotofosforilação ocorre da seguinte maneira :
  1. a luz é utilizada para produzir a força protomotiva
  2. a força protomotiva promove então a síntese do ATP

Processo :

(1) quando a luz é absorvida pelas moléculas de clorofila presentes no fotosistema I (PSI), a energia luminosa conduz as moléculas a um estado de excitação - liberação de um elétron de cada molécula (os quais são utilizados para reduzir NADP (nicotinamida adenina difosfato) a NADPH<sub>2</sub>)



(2) similarmente a luz é absorvida pela clorofila de PSII, causando a liberação de elétrons desse fotosistema. Esses elétrons passam ao longo do sistema de transporte de elétrons e alcançam a Chl<sup>+</sup> de PSI :

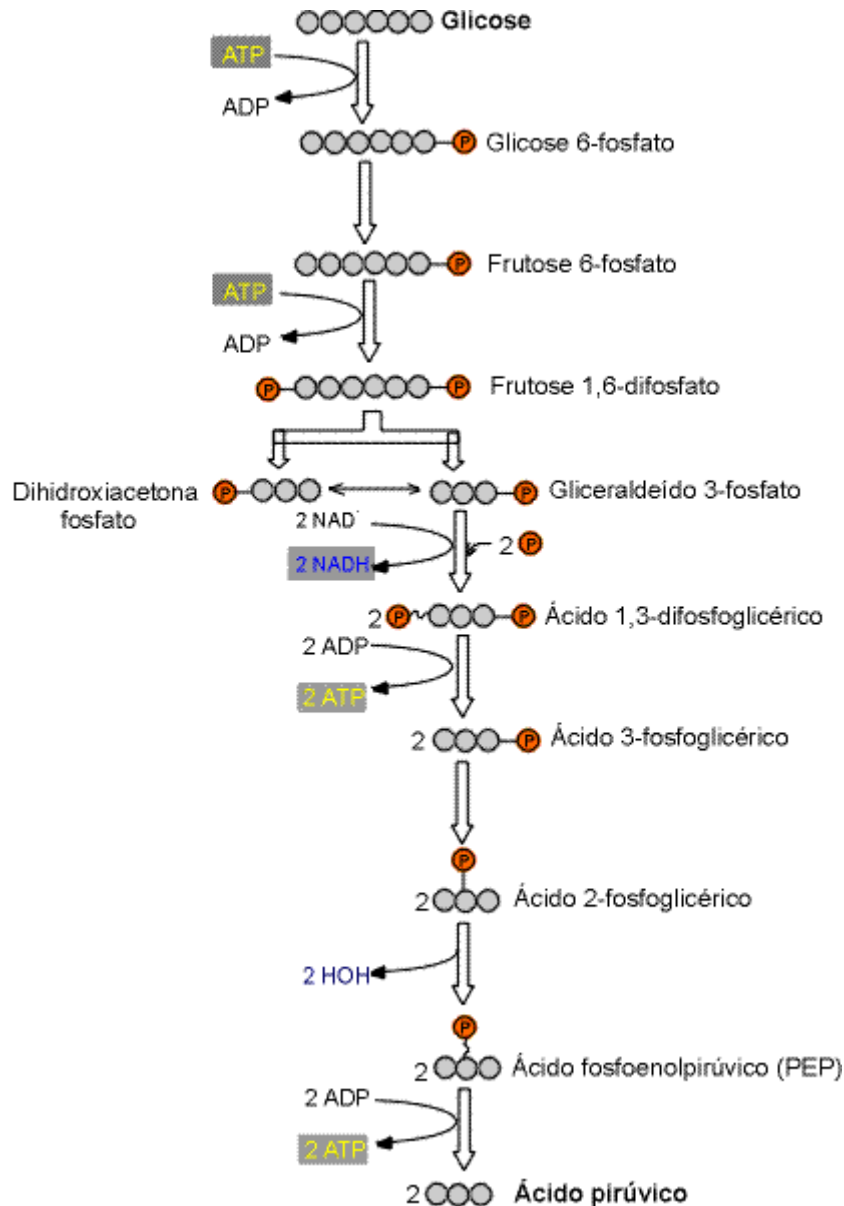


A diferença do sistema de transporte de elétrons descritos para a fosforilação oxidativa é que nesse sistema, o doador  $\text{Chl}_{(PSII)}$  e o receptor final de elétrons  $\text{Chl}_{(PSI)}^+$  são fornecidos pela própria célula e não pelo meio ambiente

## Vias de Degradação de Nutrientes

### Glicólise ou Via de Embden-Meyerhof

A oxidação de glicose a ácido pirúvico, é usualmente o primeiro estágio no catabolismo de carboidratos. Muitos microrganismos utilizam esta via, bem como os animais e as plantas.



A decomposição da glicose a ácido pirúvico pela via de Embden-Meyerhof apresenta algumas importantes características :

1. duas moléculas de ATP são necessárias para converter a glicose a frutose 1,6-difosfato
2. um total de 4 moléculas de ATP são produzidas por **fosforilação a nível do substrato**
3. a produção líquida de ATP por molécula de glicose = 2

4. no processo geral 1 molécula de glicose resulta em 2 de ácido pirúvico
5. **duas moléculas de NADH são formadas**

A última característica é um aspecto importante da glicólise, pois a célula possui quantidade limitada de NAD - utilizada para oxidar as moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. Assim que deve existir um meio de regenerar continuamente o NAD a partir de NADH para permitir que a glicólise continue.

Os seres vivos usam 2 métodos para regenerar o NAD a partir de NADH : FERMENTAÇÃO e RESPIRAÇÃO

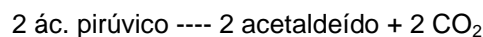
### **Fermentação**

É um processo independente do oxigênio, no qual o NADH<sub>2</sub> que é produzido durante a glicólise (ou outra via de degradação) é utilizado para reduzir um aceptor orgânico de elétrons produzido pela própria célula

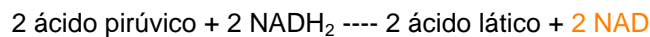
Exemplo :

Leveduras --- crescem em meio contendo glicose sob condições de anaerobiose ---  
fermentação alcóolica

Leveduras utilizam acetaldeído como aceptor final



*Streptococcus lactis* utilizam o próprio ácido pirúvico como aceptor final



A fermentação é um processo pouco eficiente na produção de energia pois os produtos finais ainda contém grande quantidade de energia química

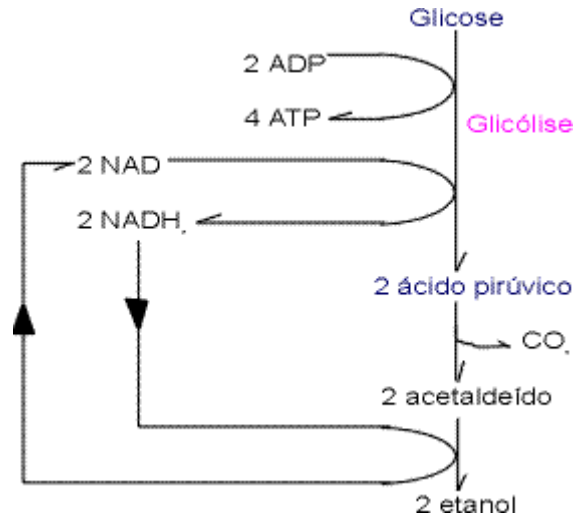
### **Respiração**

É um processo de regeneração de NAD utilizando o NADH<sub>2</sub> como doador de elétrons para um sistema de transporte de elétrons.

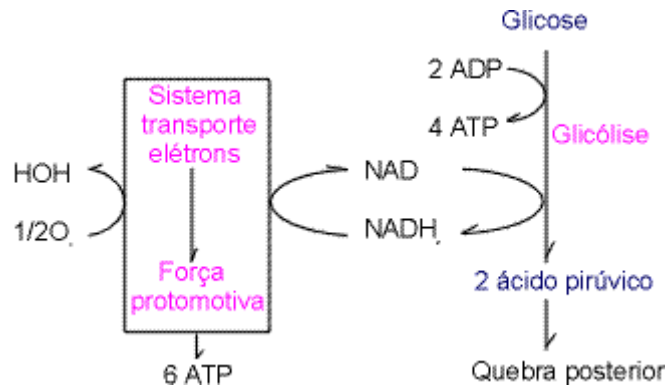
Se o O<sub>2</sub> é o aceptor final de elétrons então temos uma RESPIRAÇÃO AERÓBIA. E se o NO<sub>3</sub> ou SO<sub>4</sub> forem os aceptores finais de elétrons então temos a RESPIRAÇÃO ANAERÓBIA

A respiração apresenta uma grande vantagem sobre a fermentação : não somente o NAD é regenerado mas o sistema de transporte de elétrons produz uma força protomotiva que pode ser dirigida para a síntese adicional de moléculas de ATP

### **Fermentação alcóolica por leveduras**



### Respiração aeróbica por leveduras



### Vias Alternativas

Muitas bactérias utilizam outras vias em adição a glicólise para a oxidação de glicose. As vias alternativas mais comuns são : (1) Via das Pentoses Fosfato; (2) Via de Entner-Doudoroff

#### Via das Pentoses

- a glicose também pode ser oxidada via ciclo das pentoses, com liberação de um par de elétrons que podem entrar na cadeia respiratória.
- primeiras reações do ciclo das pentoses :

Glicose  $\xrightarrow{\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}}$  Glicose 6-fosfato  $\xrightarrow{-2\text{H}}$  6-fosfo-glicônico  $\xrightarrow{-2\text{H} \text{ e } \text{CO}_2}$  Ribulose 6-fosfato

- um fator importante desta via é que se produz importantes intermediários usados na síntese de ácidos nucleicos; glicose, a partir de dióxido de carbono em fotossíntese; e certos aminoácidos. Também importante pela produção da coenzima reduzida NADPH a partir de NADP. Apenas uma molécula de ATP é produzida para cada molécula de glicose oxidada
- algumas bactérias que utilizam a via das pentoses - *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Enterococcus faecalis*



#### Via de Entner-Doudoroff

- para cada molécula de glicose a via de Entner-Doudoroff produz 2 moléculas de NADPH e uma molécula de ATP para ser utilizada nas reações de biossíntese
- encontrada em algumas bactérias Gram-negativas, incluindo *Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Agrobacterium*. Geralmente não é encontrada entre as Gram-positivas

#### Transporte de Nutrientes para o interior das Células

A maioria dos nutrientes são transportados através da membrana citoplasmática por proteínas especiais : proteínas carreadoras.

No entanto moléculas de água e alguns nutrientes solúveis em lipídeos (constituintes da membrana) podem passar livremente através da membrana por um processo chamado difusão simples. Mais a maioria não entra na célula por este tipo de transporte. Existem 2 transportes mediados por carreadores : difusão facilitada e transporte ativo. Os 3 tipos de transporte de nutrientes para o interior da célula :

1. Difusão Simples - entra livremente até um equilíbrio do meio externo com o meio interno. Não requer energia metabólica
2. Difusão Facilitada - as moléculas dos nutrientes se ligam inicialmente à proteína carreadora. Não requer energia metabólica e também ocorre um movimento de moléculas de uma maior concentração para uma menor, até que a concentração do lado interno e do lado externo estejam em equilíbrio
3. Transporte Ativo - a maioria dos nutrientes são transportados para dentro da célula assim. Ocorre no sentido de uma baixa para uma alta concentração - a célula pode concentrar altos níveis de nutrientes que são adequados para as atividades metabólicas, níveis que podem ser centenas de vezes maior dentro da célula que aqueles existentes fora dela. Requer consumo de energia metabólica

#### Utilização da Energia para processos Biosintéticos

Em geral :

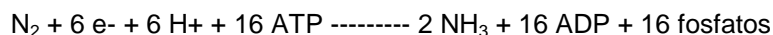
- as vias biosintéticas começam com a síntese das unidades estruturais necessárias para a produção de substâncias mais complexas
- as unidades estruturais são então ativadas, usualmente com a energia de moléculas de ATP. Esta energia é necessária para estabilizar as ligações covalentes que subsequentemente irão ligar as unidades estruturais
- as unidades estruturais ativadas são unidas uma a outra para formar substâncias complexas que se tornam parte estrutural ou funcional da célula

Utilização da Energia :

##### 1. Biossíntese de Compostos Nitrogenados

- Aminoácidos e Proteínas - um dos mais importantes aminoácidos que um microrganismo necessita produzir é o ácido glutâmico
- Nucleotídeos e Ácidos Nucléico

Fixação de N<sub>2</sub> :



## 2. Biossíntese de Carboidratos

- Polissacarídeos - peptidoglicano, celulose, amido,....

## 3. Biossíntese de Lipídeos

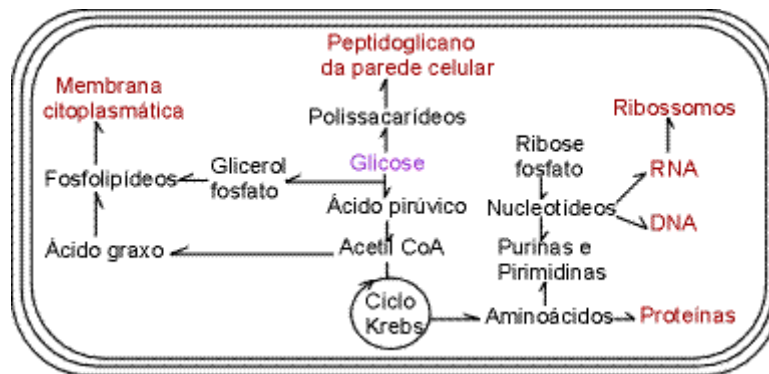
- Ácidos graxos de cadeia longa
- Fosfolipídeos

## 4. Outros Processos

- Transporte de nutrientes para o interior da célula
- Motilidade

Esquema geral de como uma bactéria pode sintetizar as macromoléculas

(em um meio com glicose +  $\text{NH}_3\text{SO}_4$  + outros sais inorgânicos)



## CAPÍTULO 9: Genética Microbiana

A genética é o estudo das semelhanças - Hereditariedade - e diferenças - Variabilidade

### Cromossomos de Células Procarióticas e Eucarióticas

Um cromossomo é uma estrutura densa no interior da célula que carrega fisicamente informações hereditárias de uma geração para outra

Diferenças entre os cromossomos de células procarióticas e eucarióticas :

Células Procarióticas	Células Eucarióticas
<ol style="list-style-type: none"><li>1. contém somente um cromossomo</li><li>2. consiste de uma única molécula de DNA de fita dupla na forma circular</li><li>3. não possui membrana nuclear</li><li>4. é enrolado, espiralado e de forma altamente compacta - é cerca de 1200 vezes maior que o tamanho da célula</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. há mais do que um cromossomo por célula</li><li>2. cada cromossomo consiste em uma única molécula longa de DNA de fita dupla enrolado em agregados de proteínas histonas em intervalos regulares</li><li>3. possui membrana nuclear</li><li>4. apresenta forma linear, e a molécula de DNA é cerca de 10 vezes mais longa</li></ol>

Além do cromossomo uma célula bacteriana pode conter uma ou mais estruturas de DNA chamados PLASMÍDIOS - moléculas de DNA de fita dupla menores que os cromossomos e que podem replicar-se independentemente destes

Uma célula que contém somente um de cada tipo de cromossomo é um organismo chamado HAPLÓIDE. Já que as bactérias tem 1 único cromossomo, elas necessariamente são haplóides. Já a maioria das células eucarióticas são DIPLÓIDES - contém 2 de cada tipo de cromossomo

### Replicação do DNA

#### Nas Bactérias

1. cromossomo circular (molécula de DNA de dupla fita)
2. as duas fitas são desenroladas pela enzima DNA girase (em um local específico da molécula de DNA) formando duas forquilhas de replicação. Cada fita (separadas) serve de modelo para a fita nova, que se forma em complementariedade com a célula parental: Adenina com Timina (A-T); Guanina com Citosina (G-C). A enzima DNA polimerase assegura esta complementariedade pela adição de nucleotídeos à fita nova complementar à parental
3. a medida que vai desenrolando vai formando as outras fitas
4. as duas fitas novas já estão quase separadas
5. as duas fitas se separam

#### Nos Eucariótos

A diferença é que a replicação do DNA se inicia em vários pontos do DNA linear

## O Gene

Um segmento de DNA que contém a sequência de nucleotídeos para a produção de uma determinada proteína. Uma vez que as células produzem milhares de proteínas, uma molécula de DNA contém milhares de genes, um para cada proteína - **um gene uma enzima**

### A forma pela qual as células usam a informação no gene para produzir uma determinada proteína :

1. a informação no gene (DNA) é copiada para uma molécula de ácido ribonucléico (RNA mensageiro - mRNA) por um processo chamado transcrição
2. o mRNA carrega as informações transcritas da região nuclear da célula para os ribossomos no citoplasma
3. os ribossomos então executam a tradução, um processo em que a informação no mRNA é utilizada para sintetizar uma proteína correspondente a partir de aminoácidos

## Variabilidade nos Microrganismos

Variabilidade está associada com duas propriedades fundamentais de um organismo :

1. Seu Genótipo - representa o potencial hereditário total de uma célula, refere-se a toda capacidade genética de um organismo encontrado no DNA - célula bacteriana (DNA cromossômico e DNA plasmídico); células eucarióticas (DNA cromossômico e DNA das mitocôndrias; no caso de algas e plantas DNA dos cloroplastos)
2. Seu Fenótipo - representa a parte do potencial genético que está atualmente sendo expressa por uma célula com determinadas condições - uma cor particular, ou o tamanho de uma colônia bacteriana, utilização de compostos químicos específicos (fonte de energia pelas leveduras); presença de cápsulas que pode ou não ser produzidas por certas bactérias dependendo de seu meio ambiente

**1 único genótipo pode resultar em muitos fenótipos**

## Alterações Fenotípicas

O fenótipo de um organismo pode ser influenciado tanto por : (1) condições ambientais; (2) pelo genótipo

Exemplo :

Bactérias do gênero *Azomonas* :

- na presença de sacarose ---- formam grandes colônias viscosas
- na ausência de sacarose ---- formam pequenas colônias não viscosas

Embora a bactéria seja "sempre" potencialmente capaz de produzir o material viscoso - a presença ou ausência do açúcar é que determina se esta característica será expressa

## Alterações Genotípicas

Pode ser resultante da (1) Mutação; ou (2) Recombinação

*Mutação*

- mutante - é a célula ou o organismo que carrega o gene mutante
- tipo selvagem - é o organismo parental com o gene normal
- para selecionar o mutante p.ex. pode-se adicionar antibióticos ao meio - os selvagens morrerão e os mutantes (resistentes ao antibiótico) sobreviverão

Os tipos de mutações mais comuns :

1. Mutação Pontual - resulta de uma substituição de um nucleotídeo por outro em um gene (num ponto só)
2. Mutação por Deslocamento - ocorre com a adição ou perda de um ou mais nucleotídeos no gene - mutação de inserção e de deleção

### *Recombinação*

Leva a uma nova combinação de genes nos cromossomos. Nas bactérias este processo pode ocorrer devido à transferência de genes cromossômicos de uma célula para outra. Há três tipos diferentes de transferência de gene bacteriano :

1. Transformação - a célula receptora adquire os genes de uma molécula de DNA livre presente no meio
2. Transdução - o DNA da célula doadora é transportado por um vírus (bacteriófago) para a célula receptora
3. Conjugação - é dependente do contato célula-célula; pode envolver a transferência de um plasmídeo, como o plasmídeo F em *Escherichia coli*

**Plasmídeo** - É uma pequena molécula de DNA normalmente circular, auto-replicativa, que não faz parte do cromossomo bacteriano. Alguns carregam genes para resistência a antibióticos, ou para enzimas que degradam substâncias químicas complexas, ou ainda são bacteriocinogênicos

### **Regulação da Expressão Gênica**

Uma célula contém mais de 1000 enzimas diferentes, e cada uma com efetiva atividade catalítica para algumas reações químicas. O controle próprio do metabolismo celular é acompanhado pela regulação das enzimas - regulando a atividade das enzimas ou a síntese delas

1. Indução Enzimática - uma proteína repressora (ligada à região operadora de um operon) é inativada na presença de um indutor (lactose) - permitindo a ligação da RNA polimerase ao promotor e a transcrição do operon
2. Repressão pelo produto final - neste caso o repressor é inativo e não impede a transcrição do operon; entretanto se o produto final da via metabólica particular está presente, o repressor é ativado, ligando-se na região do operon e impedindo a transcrição do operon

## CAPÍTULO 10: Vírus

---

São entidades infecciosas não celulares cujo genoma pode ser DNA ou RNA. Replicam-se somente em células vivas, utilizando toda a maquinaria de biossíntese e de produção de energia da célula para a síntese e transferências de cópias de seu próprio genoma para outras células

### Principais Características

- estão largamente distribuídos na natureza
- são 100 vezes menores que as bactérias - 0.02 - 0.3  $\mu\text{m}$
- todos são parasitas obrigatórios - infectam células animais, vegetais e de microrganismos
- possuem corpúsculos de inclusões - estruturas intracelulares associadas com infecções a vírus - ao redor das lesões variolosas representam agregados ou colônias de vírus em multiplicação no citoplasma da célula hospedeira
- quanto a forma podem ser icosaédrico ou helicoidais

### Estrutura e Composição

1. Capsídio e envelope - o virião é composto de ácido nucléico, sede de sua infectividade, circundado por uma capa protéica chamada capsídio responsável pela especificidade viral. A partícula completa é conhecida pela denominação **virião**
2. Ácidos nucléicos - o vírus pode ter DNA ou RNA, mas nunca são encontrados os dois juntos no mesmo virião, o que estabelece um contraste com todas as formas celulares de vida, as quais, sem exceção, contêm os dois tipos de ácidos nucléicos. A estrutura dos ácidos nucléicos nas partículas virais pode ser linear ou circular
3. Em adição ao ácido nucléico e proteína, os viriões mais completos possuem lipídeos, carboidratos, traços de metais e alguns deles substâncias semelhantes à vitaminas

### Replicação dos Vírus

Os vírus não têm atividade metabólica independente e são incapazes de reprodução por cissiparidade, gemulação ou outros processos observados entre as bactérias e outros microrganismos. Ao contrário a multiplicação se faz por replicação, na qual as porções protéicas e nucléicas aumentam no interior das células hospedeiras

As informações obtidas a partir do estudo do mecanismo de replicação dos bacteriófagos (vírus que ataca bactérias), servem em geral como modelo básico para estudo semelhante sobre os vírus que infectam as células eucarióticas

### Bacteriófagos ou Fagos

- vírus que infectam as bactérias. Há três tipos morfológicos básicos : icosaédricos sem cauda, icosaédricos com cauda, filamentosos
- há dois tipos principais de fagos : líticos e temperados

Etapas da infecção viral, a nível celular, comuns a todas as infecções :

1. Adsorção - participação de receptores específicos na superfície da célula hospedeira e das macromoléculas do virião. Compreende de duas fases, a primeira uma adsorção preliminar por ligações iônica, facilmente reversível por alteração do pH ou concentração salina do meio; a segunda fase parece ser mais firme e irreversível

2. Penetração e Desnudamento - os vírus nus parecem penetrar por fagocitose
3. Replicação Bioquímica - a replicação ativa do ácido nucléico e a síntese de proteínas virais começam após a dissociação do capsídeo e do genoma. Além do ATP celular os vírus requerem o uso dos ribossomos da célula, do RNA de transferência, de enzimas e de certos processos biossintéticos para sua replicação
4. Acoplamento - os vírus são capazes de dirigir a síntese dos componentes essenciais para sua progênie e de acoplar estes materiais sob formas de viriões maduros no núcleo e/ou no citoplasma da célula infectada
5. Liberação - varia com o agente viral. Em alguns casos a lise celular resulta na liberação concomitante das partículas virais; em outros a maturação e a liberação são relativamente lentas e os viriões são liberados sem a destruição da célula hospedeira

Líticos - que realizam o ciclo lítico, o qual compreende as seguintes etapas :

1. adsorção do vírus
2. penetração do seu genoma
3. conversão da célula hospedeira em uma fábrica produtora de fagos
4. produção do ácido nucléico e proteínas do fago
5. montagem e liberação de partículas do fago maduros

Temperados - podem realizar tanto o ciclo lítico como o ciclo lisogênico, que consiste :

1. adsorção
2. entrada do genoma
3. síntese de mRNA do fago para formar uma proteína repressora
4. inserção do DNA fágico no cromossomo bacteriano
5. replicação do profago como parte do cromossomo bacteriano

### **Isolamento e Identificação dos Vírus**

A melhor e mais comumente forma de isolar bacteriófagos é a partir do habitat do hospedeiro (bactéria). Condições ótimas de crescimento das células hospedeiras constituem a melhor maneira de isolamento e cultivo dos fagos específicos. Os primeiros trabalhos sobre crescimento dos vírus foram realizadas em hospedeiros vivos

### **Cultivo dos Vírus**

Os principais métodos : (1) Técnica do Embrião de Galinha (2) Coágulos de Plasma (3) Culturas de Tecidos

### **Patogenicidade**

Causa doenças no homem : encefalite, hepatite, sarampo, raiva, varíola, febre amarela, câncer, AIDS....