

Introdução à Microbiologia

Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

A palavra Microbiologia deriva do grego: *mikros* (“pequeno”), *bios* (“vida”), e *logos* (“ciência”). Esta Ciência estuda os organismos microscópicos e suas atividades biológicas, isto é, verificam as diversas formas, estruturas, reprodução, aspectos bioquímico-fisiológicos, e seu relacionamento entre si e com o hospedeiro, podendo ser benéficos e prejudiciais. A Microbiologia trata os organismos microscópicos unicelulares, onde todos os processos vitais são realizados numa única célula.

Independente da complexidade de qualquer organismo, a célula é, e deve ser considerada, a unidade básica da vida. Todas as células vivas são basicamente estão compostas de: protoplasma (do grego: primeira substância formada), complexo orgânico coloidal constituído principalmente de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos; membranas limitantes ou parede celular; e um núcleo ou uma substância nuclear equivalente.

De forma geral, todos os sistemas biológicos possuem as seguintes características comuns: 1) habilidade de reprodução; 2) capacidade de ingestão ou assimilação de substâncias alimentares, visando a obtenção de energia e de crescimento; 3) habilidade de excreção de produtos tóxicos; 4) capacidade de reagir ou se adaptar às alterações do meio ambiente, e 5) susceptibilidade a mutações.

Os microrganismos apresentam sistemas específicos para estudo das reações fisiológicas, genéticas e bioquímicas, constituindo a base da vida. Seu crescimento reprodução é rápido e em ritmo elevado, sendo que algumas espécies bacterianas podem apresentar 100 gerações em menos de 24 horas. Os processos metabólicos microbianos são similares ao que ocorrem nos vegetais superiores e nos animais. As leveduras, por exemplo, utilizam a glicose, basicamente do mesmo modo que as células de mamíferos, mostrando que o mesmo sistema enzimático está presente nestes organismos tão diversos.

Em Microbiologia podem-se estudar os organismos em detalhes e observar seus processos vitais durante o crescimento, reprodução, envelhecimento e morte. Com a alteração das condições ambientais, se podem alterar as atividades metabólicas, regular o crescimento e, alterar o padrão genético, sem ocasionar a destruição microbiana. Os principais grupos de microrganismos são os protozoários, fungos, algas e bactérias. Os vírus, apesar de não serem considerados organismos vivos e sem partículas, têm algumas características de células vivas.

Posição dos microrganismos no mundo vivo

Em 1866, o zoólogo alemão E. H. Haeckel sugeriu que os microrganismos que não podiam ser classificados como vegetais ou animais, fossem denominados de protistas

formando o reino Protista, constituído unicamente por seres unicelulares. Assim, ao se falar de protistas, estariam envolvidas as bactérias, algas, fungos e protozoários, excluindo-se os vírus que não são organismos celulares. Posteriormente, com o desenvolvimento da microscopia eletrônica, foram analisadas as características ultra-estruturas, sendo os microrganismos divididos em: procariotos e eucariotos. Esta divisão é baseada nas diferenças de organização da maquinaria celular. As algas azuis (cianofíceas) e as bactérias são consideradas organismos procariotos.

Entre os microrganismos eucariotos estão incluídos os protozoários, fungos e demais algas (obs. as células animais e vegetais são, também, eucarióticas). Os vírus, isolados entre os microrganismos, são deixados de lado neste esquema de organização celular. Robert H. Whittaker (1969) criou outro sistema de classificação, constituído de cinco reinos, baseado no modo pelo qual o organismo obtém nutrientes de sua alimentação. Assim, os microrganismos, são encontrados em três dos cinco reinos: Reino Monera (bactérias e cianobactérias), Reino Protista (algas microscópicas e os protozoários) e Reino Fungi (leveduras e bolores).

Até 1977, prevalecia a idéia prevalecente que os procariotos, pela sua simplicidade estrutural, eram ancestrais de eucariotos mais complexos. Entretanto, os estudos de Carl Woese e colaboradores, comprovaram que os procariotos e eucariotos evoluíram por vias completamente diferentes a partir de um ancestral comum. Estes pesquisadores utilizaram a técnica que compara o arranjo nucleotídico do rRNA entre diferentes organismos. Assim, se as sequências de ribonucleotídeos de dois organismos diferem grandemente, a relação entre ambos seria muito distante; ou seja, esses organismos divergiram há muito tempo de um ancestral comum. Porém, se as sequências forem muito similares, os organismos estariam intimamente relacionados a um ancestral comum. Dentre todos procariotos, existe um terceiro tipo de sequência diferente dos anteriores, concluindo-se que há dois grupos principais de bactérias, denominados de arqueobactérias e eubactérias.

Áreas de aplicação da Microbiologia

Existem numerosos aspectos no estudo da Microbiologia, que são divididos em duas áreas principais: a Microbiologia Básica e a Microbiologia Aplicada. A Microbiologia básica estuda a natureza fundamental e as propriedades dos microrganismos, enfatizando sobre as características morfológicas coloniais e celulares; características fisiológicas (necessidades nutricionais específicas e condições necessárias ao crescimento e reprodução); atividades fisiológico-bioquímicas (Metabolismo); características genéticas; características ecológicas e sua relação com outros organismos e com o hospedeiro; potencial de patogenicidade; e classificação taxonômica. Já a Microbiologia aplicada estuda como os microrganismos podem ser usados ou controlados com finalidades práticas, sendo os principais campos de aplicação a

medicina, agricultura, indústria, e meio ambiente. Certos microrganismos fermentam material orgânico animal e humano, produzindo gás metano que pode ser coletado e usado como combustível. Na indústria, são utilizados na síntese de uma variedade de substâncias químicas, desde o ácido cítrico até antibióticos. Na indústria do petróleo são utilizados exopolissacarídeos bacterianos, para aumentar a extração do petróleo de rochas reservatório; e na área ambiental, para degradar poluentes específicos, como herbicidas e inseticidas.

A Microbiologia Médica estuda os microrganismos causadores de doenças em humanos e animais. Por exemplo, pelo uso da engenharia genética, têm sido usadas enzimas bacterianas que dissolvam coágulos sanguíneos, vacinas humanas e testes rápidos para diagnóstico de várias infecções, entre outras. A Microbiologia de alimentos está relacionada com as doenças que podem ser transmitidas pelos alimentos, como por exemplo, infecções causadas por salmonelas, estafilococos e clostrídios.

A Evolução da Microbiologia

Considera-se o início da Microbiologia se deu quando se aprendeu a polir lentes de vidro, e ao combiná-las produzia aumentos suficientes para a visualização de microrganismos. No século XIII, Roger Bacon postulou que a doença era produzida por seres vivos invisíveis. Este postulado foi reforçado e defendido por Fracastoro de Verona (entre 1483-1553), e posteriormente por Von Plenciz (1762), mas nenhum deles apresentava provas.

Em 1665, Robert Hooke visualiza e descreve as células em um pedaço de cortiça, sugerindo que animais e plantas, por mais complexos que sejam, eram compostos de partes elementares repetidas. Entretanto, é muito provável que o primeiro a visualizar bactérias e protozoários, foi o holandês Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723), relatando suas observações, com descrições precisas e desenhos, denominando de pequenos "animálculos". Posteriormente, foi usada a palavra "bacterium", introduzida pelo alemão Ehrenberg, em 1828, que significa da palavra em grego "pequeno bastão". Em 1878, o cirurgião francês, Charles-Emmanuel Sedillot introduz a palavra micróbio.

Geração Espontânea vs Biogênese

A descoberta dos microrganismos incentivou o interesse científico sobre a origem dos seres vivos. Já entre 384 e 322 a.C., Aristóteles pensava que os animais podiam se originar, espontaneamente, do solo, plantas ou outros animais diferentes, e esta idéia ainda continuou até o século XVII. Tudo isto, devido a que, por exemplo, larvas podiam ser originadas pela decomposição da carne, embora o pesquisador Francesco Redi (1626-1697) já duvidava desse fato. Assim, ele realizou um experimento na qual colocou carne numa jarra coberta com gaze. Atraídas pelo odor da carne, as moscas puseram seus ovos sobre a cobertura e as larvas emergiam. Entre 1729 e 1799, Spallanzani ferveu caldo de carne durante uma hora, fechando

os frascos após fervura. Nenhum microrganismo apareceu, mas seus resultados, ainda que repetidos, não convenceram.

60 a 70 anos mais tarde dois pesquisadores responderam a este argumento. Franz Schulze (1815-1873) aerava infusões fervidas, fazendo o ar atravessar soluções fortemente ácidas, enquanto Theodor Schwann (1810- 1882) forçava o ar através de tubos aquecidos ao rubro. Em nenhum dos casos surgiram os micróbios. Os adeptos da geração espontânea não se convenceram, dizendo que o ácido e o calor é que não permitiram o crescimento dos micróbios. O conceito da geração espontânea foi revivido, pela última vez, por Pouchet (1859), que segundo ele tinha a prova da ocorrência. Pouchet foi rebatido por Louis Pasteur (1822-1895) onde pelo conhecido experimento, onde preparou um frasco com pescoço de cisne, as soluções nutritivas foram fervidas no frasco e o ar não-tratado e não-filtrado podia passar para dentro ou para fora. Os micróbios, porém, depositavam-se no pescoço de cisne e não apareciam na solução. Finalmente, John Tyndall (1820-1893) efetuou experiências numa caixa especialmente desenhada para provar que a poeira carrega os micróbios. Se não houver poeira, o caldo estéril ficará livre de crescimento microbiano por períodos indefinidos de tempo.

Teoria Microbiana das Doenças

Em 1762, Von Plenciz, afirmou que os seres vivos seriam as causas de doenças, e que microrganismos diferentes eram responsáveis por enfermidades diferentes. O médico Oliver W. Holmes (1809-1894) insistia que a febre puerperal era contagiosa e, provavelmente, causada por um germe transmitido de uma mãe para outra por intermédio das parteiras e dos médicos. Quase na mesma época, o médico húngaro Ignaz P. Semmelweis (1818-1865) introduzia o uso de antissépticos na prática obstétrica. Na França, Louis Pasteur estudou os métodos e processos envolvidos na fabricação de vinhos e cervejas. Observou que a fermentação de frutas e grãos resultava em álcool, e era produzido por micróbios. Pasteur sugeriu que os tipos indesejáveis de microrganismos deveriam ser eliminados pelo calor, não tão intenso que prejudicasse o gosto do suco de fruta, mas suficiente para tornar inócuo o micróbio. Assim, mantendo os sucos a uma temperatura de 62-63 °C, durante uma hora e meia, obtinha o resultado desejado. Este processo tornou-se conhecido como pasteurização e hoje é amplamente utilizado nas indústrias de fermentação, e dos derivados do leite, visando a destruição dos microrganismos patogênicos.

Na Alemanha, o médico Robert Koch (1843-1910) estudou o problema do carbúnculo hemático, que é uma doença do gado bovino, caprino e, às vezes, do homem. Ele descobriu os bacilos típicos com extremidades cortadas em ângulos retos, no sangue de animais mortos pela infecção carbunculosa. Inoculou as bactérias em meios de cultura, examinou-as ao

microscópio para verificar de que apenas uma espécie tinha se desenvolvido e injetou-as em outros animais para verificar se estes se tornavam doentes e desenvolviam os sintomas clínicos do carbúnculo. A partir destes animais experimentais, Koch isolou micróbios iguais aos que tinha encontrado originalmente nos animais infectados. Esta foi a primeira vez que uma bactéria foi comprovada como causa de doença animal.

A partir disto foram estabelecidos os postulados de Koch: 1) Um microrganismo específico pode sempre ser encontrado em associação com uma dada doença; 2) O organismo pode ser isolado e cultivado, em cultura pura, no laboratório; 3) A cultura pura produzirá a doença quando inoculada em animal sensível; e 4) É possível recuperar o microrganismo, em cultura pura, dos animais experimentalmente infectados.

Caracterização e Classificação dos Microrganismos

A caracterização e classificação dos organismos vivos são o principal objetivo nas diferentes áreas da Biologia. As comparações das características de grande número de microrganismos resultam, eventualmente, num sistema de agrupamento das espécies semelhantes. Por fim, cria-se um grupo com características muito semelhantes, que é considerado como uma espécie e recebe um nome específico. Uma cultura que consiste em uma única espécie de microrganismo, independentemente do número de indivíduos, é denominada de cultura axênica ou culturas puras. Se dois ou mais tipos (espécies) crescem juntos, como normalmente ocorre na natureza, passam a constituir uma cultura mista.

Antes de identificar e classificar um microrganismo, suas características devem ser determinadas com detalhes como seguem: 1) Características culturais: exigências nutricionais e atmosféricas ambientais; 2) Características morfológicas coloniais e celulares; 3) Características metabólicas: envolve reações químicas vitais para sua sobrevivência; 4) Características antigênicas: componentes especiais da célula que fornecem evidências de semelhança entre as espécies; e 6) Características genéticas: composição do ácido desoxirribonucléico (DNA).

BACTÉRIAS

Morfologia e Ultra-Estrutura das Bactérias. Entre as principais características das células bacterianas estão suas dimensões, forma, estrutura e arranjo. Estes elementos constituem a morfologia da célula, podendo ser: cocos, cocobacilos, bacilos, e que podem apresentar diferentes arranjos em pares ou cadeias. As bactérias espiraladas ocorrem como células isoladas. Cada forma celular individual de espécies diferentes exibe nítidas diferenças no comprimento, número, e amplitude das espirais e na rigidez das paredes celulares. A unidade de medida das bactérias é o micrômetro, que equivale a 10^{-3} mm. As bactérias mais

frequentemente estudadas em laboratório medem, aproximadamente, entre 0,5 e 1,0 μm e entre 2,0 e 5,0 μm .

Estruturas Bacterianas

Flagelos: apêndices muito finos, semelhantes a cabelos, que se exteriorizam através da parede celular e se originam de uma estrutura granular denominada de corpo basal, localizada imediatamente abaixo da membrana citoplasmática, no citoplasma. O flagelo apresenta três partes: a estrutura basal, estrutura semelhante a um gancho, e um longo filamento externo à parede celular. O seu comprimento é, usualmente, várias vezes o da célula, mas seu diâmetro é uma pequena fração do diâmetro celular (entre 10 e 20 nm).

fímbrias: apêndices filamentosos menores, mais curtos e mais numerosos que os flagelos e que não formam ondas regulares. Estão presentes em muitas bactérias gram-negativas. São encontrados tanto nas espécies móveis como nas imóveis e, portanto, não desempenham papel relativo à mobilidade. Podem funcionar como sítios de adsorção de vírus bacterianos, como mecanismo de aderência às superfícies e como porta de entrada de material genético durante a conjugação bacteriana atuando como pêlo sexual.

Glicocálice: formado de uma substância viscosa, que forma uma camada de cobertura ou envelope ao redor da célula. Se o glicocálice estiver organizado de maneira definida e acoplado firmemente à parede celular, é denominado de cápsula; entretanto, se estiver desorganizado e sem qualquer forma e estiver frouxamente acoplado à parede celular, é denominado de camada limosa. O glicocálice pode ter natureza polissacarídica, formado por um ou vários açúcares como, galactose, ramnose, glicana, etc.; ou polipeptídica como o ácido glutâmico.

A principal função do glicocálice é a aderência sobre superfícies; ele pode evitar o dessecamento das bactérias, fornece um envoltório protetor e pode servir, também, como reservatório de alimentos, além de evitar a adsorção e lise celular por bacteriófagos.

Parede Celular: dá forma à célula e situa-se abaixo das substâncias extracelulares (glicocálice) e externamente à membrana que está em contato imediato com o citoplasma. Sua espessura varia, em média, de 10 a 25 nm. A função da parede celular é a de proporcionar um envelope rígido, que suporta e protege as estruturas protoplasmáticas; evita a evasão de certas enzimas, assim como o influxo de certas substâncias que poderiam causar dano à célula. A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída por ácido teicóico, além do peptideoglicano, que corresponde à uma fração maior que a encontrada na parede das bactérias Gram-negativas. A parede das bactérias gram-negativas é mais complexa que a das gram-positivas porque possui uma membrana externa cobrindo uma camada fina de peptideoglicano. Esta membrana externa é constituída por fosfolípídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (LPS).

Estruturas internas à parede celular:

Protoplastos: quando se remove a parede celular bacteriana, a bactéria se torna um corpo arredondado, por não contar com a rígida limitação da parede. Então, a bactéria recebe o nome de protoplasto, que pode ser caracterizado como: imóvel, esférico, não se divide, não forma nova parede celular e não é susceptível, de modo geral, às infecções por bacteriófagos.

Membrana citoplasmática: fina membrana situada abaixo da parede celular. A espessura de aproximadamente 7,5 nm e é composta de fosfolípidos (20 a 30%), que formam uma bicamada que envolve as proteínas (50 a 70%). A membrana é o sítio da atividade enzimática específica e do transporte de moléculas para dentro e para fora da célula. Em alguns casos, a membrana se estende no citoplasma formando o mesossomo, que participa do metabolismo e da replicação celular.

Citoplasma: o material celular pode ser dividido em área citoplasmática, que é a porção fluida contendo substâncias dissolvidas e partículas tais como ribossomos, e material nuclear ou nucleóide, rico em DNA.

Inclusões citoplasmáticas: depósitos concentrados de certas substâncias, insolúveis, chamados de grânulos, e que podem servir como fonte de material nutritivo de reserva. Os grânulos podem ser constituídos de polissacarídeos (amido, glicogênio), lípidos, fosfatos e até enxofre, como é o caso das bactérias sulfuradas.

Material nuclear: as células bacterianas não contêm o núcleo típico das células animais e vegetais. O material nuclear consiste de um cromossomo único e circular e ocupa uma posição próxima do centro da célula. Podendo ser denominado de corpo cromatínico, nucleóide, ou cromossoma bacteriano.

Endósporos: esporos que se formam dentro da célula. São como um corpo oval de parede espessa, altamente resistente e refrateis. Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* produzem endósporos. São constituídos de ácido dipicolínico e de grande quantidade de cálcio. Os esporos representam uma fase latente da célula bacteriana; comparados com as células vegetativas, são extremamente resistentes aos agentes físicos e químicos adversos.