

**Laboratório de Anaeróbios**

---

# **BACTERIOLOGIA DE ANAERÓBIOS**

**Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos**

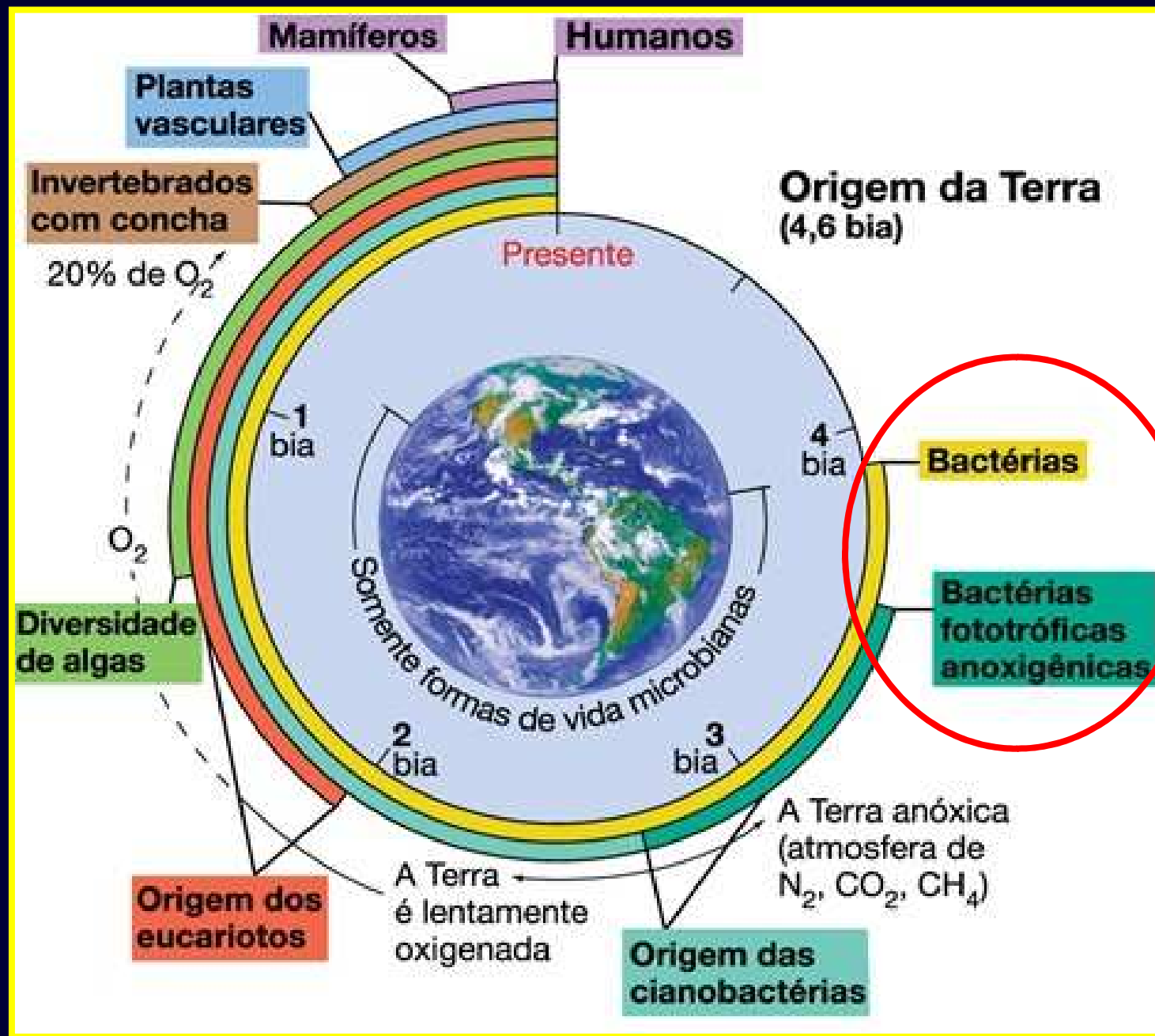
<http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac>

# **ANAERÓBIOS - HISTÓRIA**

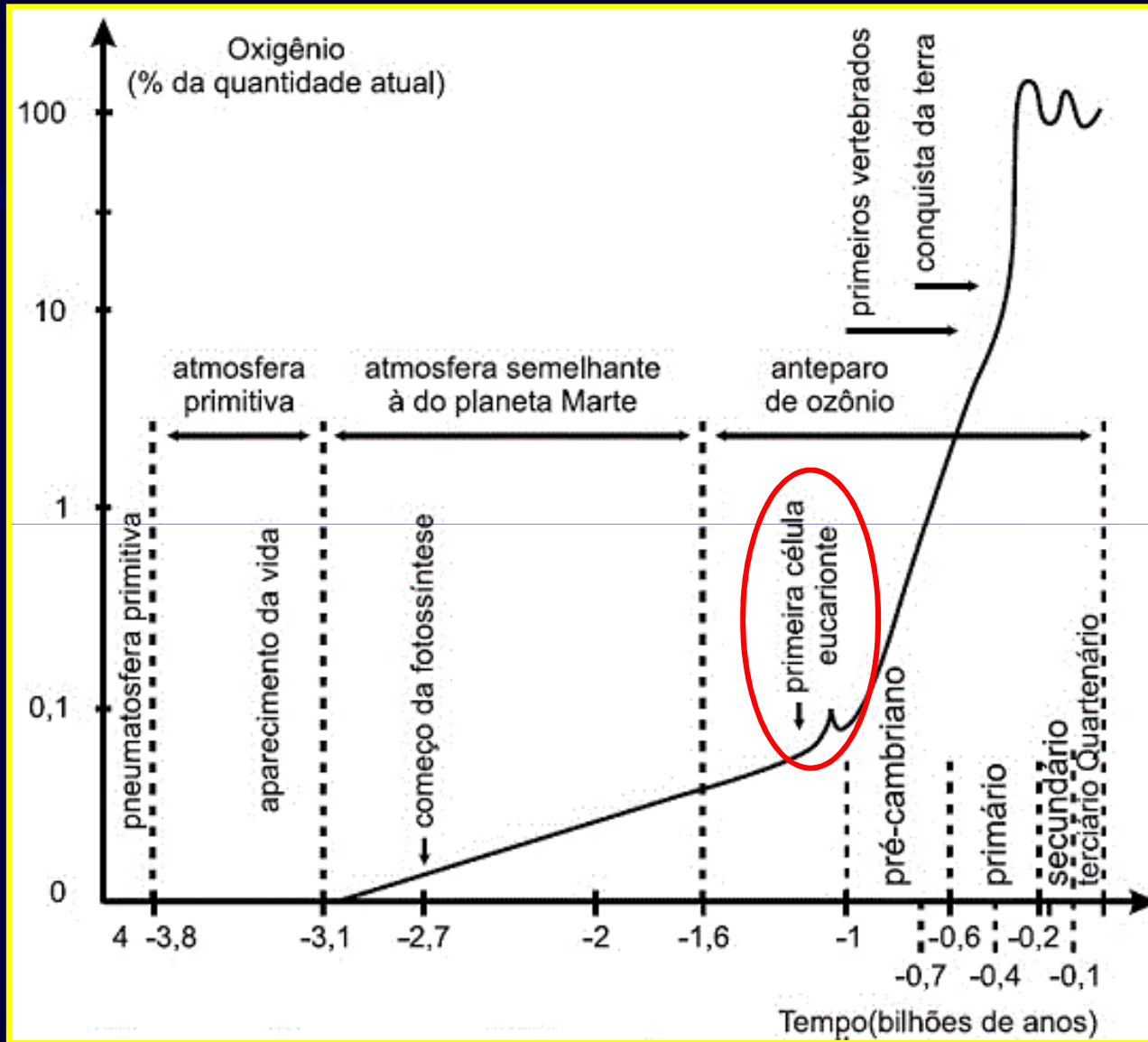
- **Origem da Terra - ambiente atmosférico era totalmente livre de oxigênio.**
- **Evidências filogenéticas sugerem que os organismos anaeróbios estritos seriam as primeiras formas de vida que emergiram em nosso planeta (Gest, 1980).**

## **ANAERÓBIOS - HISTÓRIA**

**- O sucessivo aumento da concentração de oxigênio na atmosfera terrestre causou a evolução dos sistemas biológicos no desenvolvimento de cadeias transportadoras de elétrons e de complexos enzimáticos capazes de utilizar eficientemente o oxigênio como acceptor final dos elétrons.**



# Concentração de oxigênio na origem da Terra



# HISTÓRICO

➤ **Hipócrates (400 aC):**

Descreve o quadro clínico do Tétano.

➤ **Xenophon (400 aC):**

Descreve a gengivite úlcero-necrozante  
(soldados gregos)

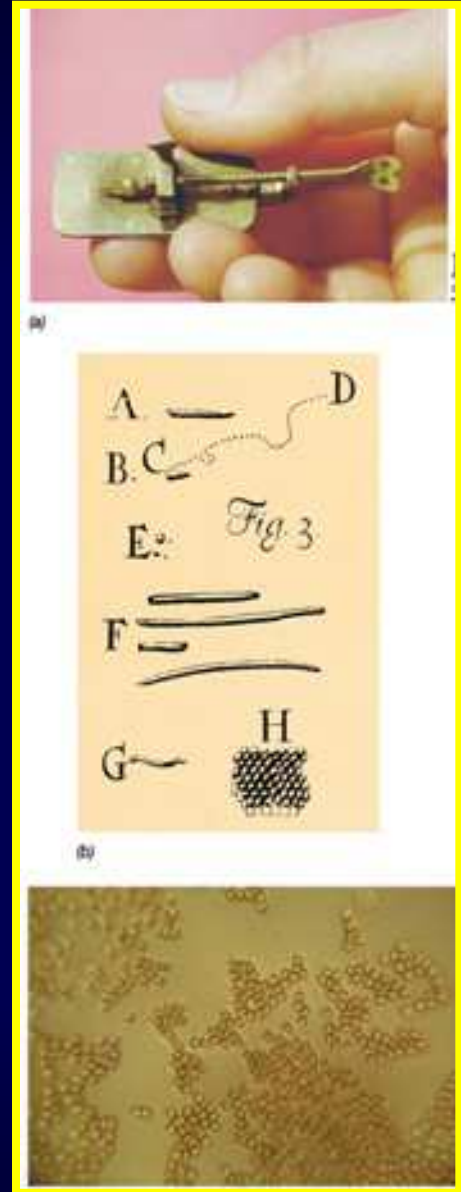
## HISTÓRICO

### ➤ **Langenbeck (1845):**

Descreve a actinomicose

### ➤ **Antony van Leewenhoek (1680):**

“Animálculos”



## HISTÓRICO

➤ **Louis Pasteur (1861):** “Animálculos”  
morrem na presença de oxigênio,  
denominando-os de anaeróbios.

➤ Utiliza terminologia:

**Aeróbio - Oxibionte**

**Anaeróbio - Anoxibionte**



➤ **Pasteur & Joubert (1877):**

*Vibrion septique* ↔ *C. septicum*



1º patógeno humano a ser cultivado

➤ **Israel (1878):** *Actinomyces*

## HISTÓRICO

- **Carle & Rattone (1884):** utilizam o coelho no estudo do tétano.
- **Kitasato (1889):** isola pela primeira vez o *Clostridium tetani*
- **Levy (1891):** primeiro estudo de infecção anaeróbia humana: pós-parto com abscesso gasoso.

## HISTÓRICO

- **Schmort (1891):** *Streptothix cunicuti*, hoje *Fusobacterium necrophorum*, em coelhos.
- **Veillon (1893):** relatou *Veillonella* e *S. pyogenes* de tósse convulsiva com pus.
- **Veillon & Zuber (1893):** cultura pura de *Veillonella* em gangrena pulmonar, abscesso cerebral, meningites, bacteremia, etc.

➤ **1898 - 1902:**

**Observa-se a presença de anaeróbios em vários processos infecciosos humanos, e o botulismo, a gangrena, e o tétano tornaram-se familiares entre os clínicos, sendo considerados como toxemias.**

# ANAERÓBIOS - CLASSIFICAÇÃO

## ➤ **Smith (1967):**

» crescem na ausência de ar.

» morrem em contato com o ar.

» incapazes de crescer em Eh elevado.

➤ **Loesche (1969):**

- **Anaeróbios estritos: incapazes de crescer em ágar e com mais de 0,5% de  $O_2$ .**
- **Anaeróbios moderados: capazes de crescer entre 2 e 8% de  $O_2$ , e sobreviver na presença de ar entre 60-90 minutos.**

➤ **Smith (1974):**

- **Microaerófilos: atmosfera enriquecida com 10% CO<sub>2</sub>.**
- **Aerotolerantes: crescem em anaerobiose e permanecem viáveis na presença de ar por várias horas.**

➤ **Tally et al. (1975):**

- **Extremamente sensíveis ao  $O_2$ , destruídos em 10 min.;**
- **Intermediariamente sensíveis ao  $O_2$ , sobrevivem de 10 min. a 48h;**
- **Aerotolerantes: sobrevivem  $\geq 72$  horas na presença de  $O_2$  .**



➤ **Rosenblatt (1976):**

» Não crescem na superfície de meios, nem em ambientes com ar ou ar + 10% CO<sub>2</sub>.

» **Observação:**

Anaeróbios podem ser classificados pela morfologia colonial ou celular (Gram) e pelo grau de susceptibilidade ao oxigênio, mas nenhum esquema de classificação tem sido adotado, causando confusão.

# SUSCEPTIBILIDADE AO OXIGÊNIO

“ O OXIGÊNIO EXCESSIVO É TÃO PERIGOSO QUANTO A SUA DEFICIÊNCIA” (Lavoisier, 1785)

[O<sub>2</sub>] → Organismo → MORTE

\* Por quê existem diferenças quanto à sensibilidade ao oxigênio entre os seres vivos?

\* A quem se deve a toxicidade desta substância?

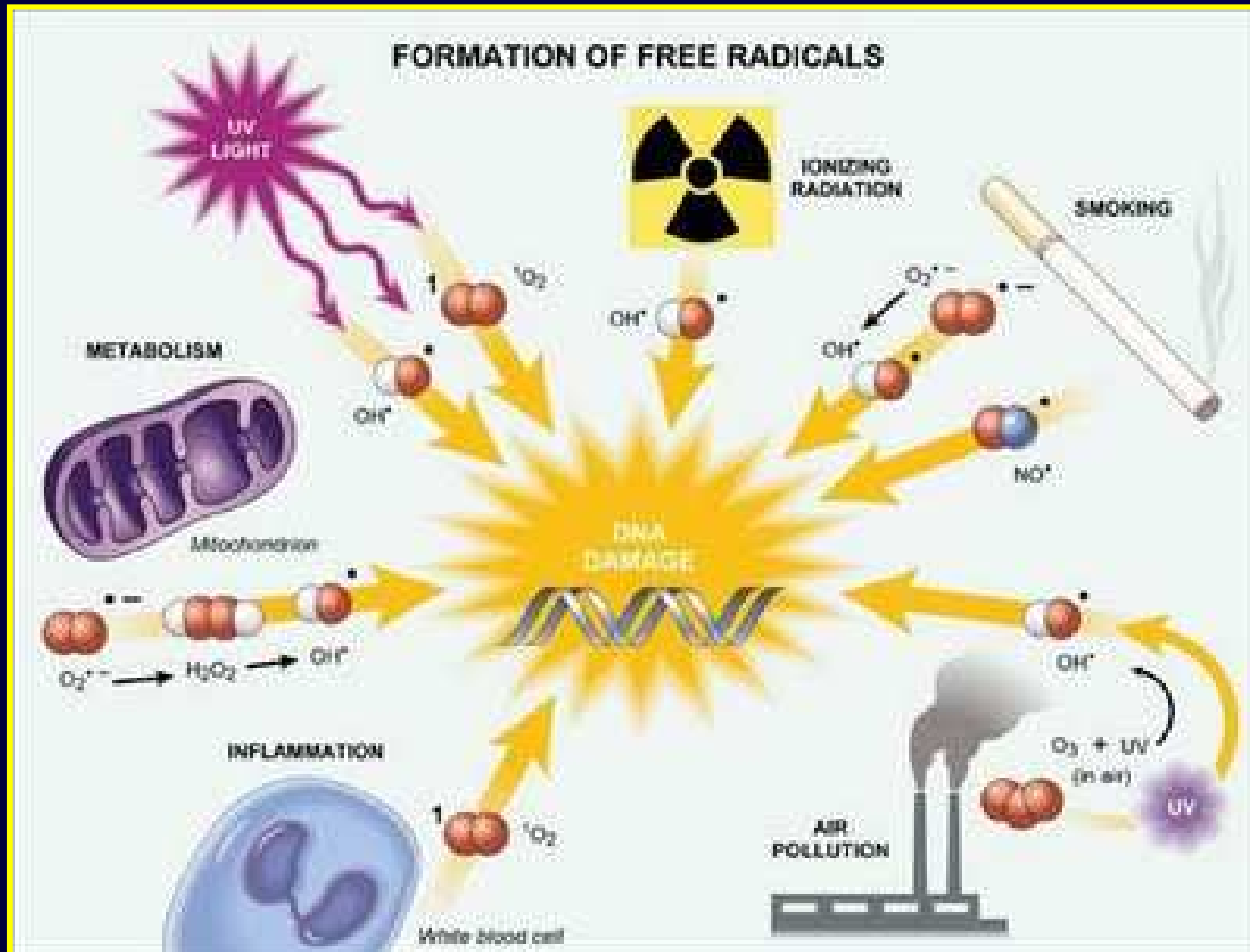
# Redução do oxigênio – Radicais Livres Tóxicos

(Espécies oxigênio reativas - ROS)

➤ Sub-produtos do metabolismo bacteriano e oxidam proteínas, lipídeos e DNA:

- Anion superóxido:  $O_2^-$
- Radical hidroxila:  $OH^-$
- Peróxido de hidrogênio:  $H_2O_2$
- Óxido nítrico:  $NO$

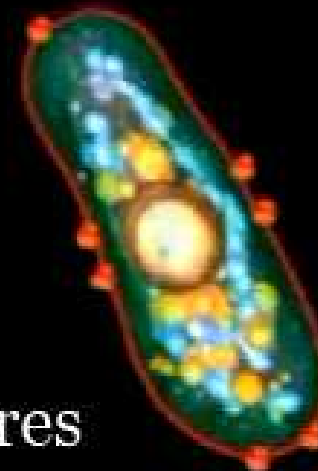
# Outras fontes de radicais livres





## RADICAL LIVRE

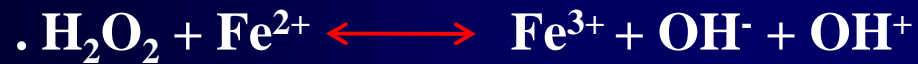
- Artrite
- Inflamação
- Câncer
- Envelhecimento Precoce
- Problemas Cardiovasculares



# MECANISMOS DE DEFESA CELULAR



## 2. Reação de Fenton (1894)

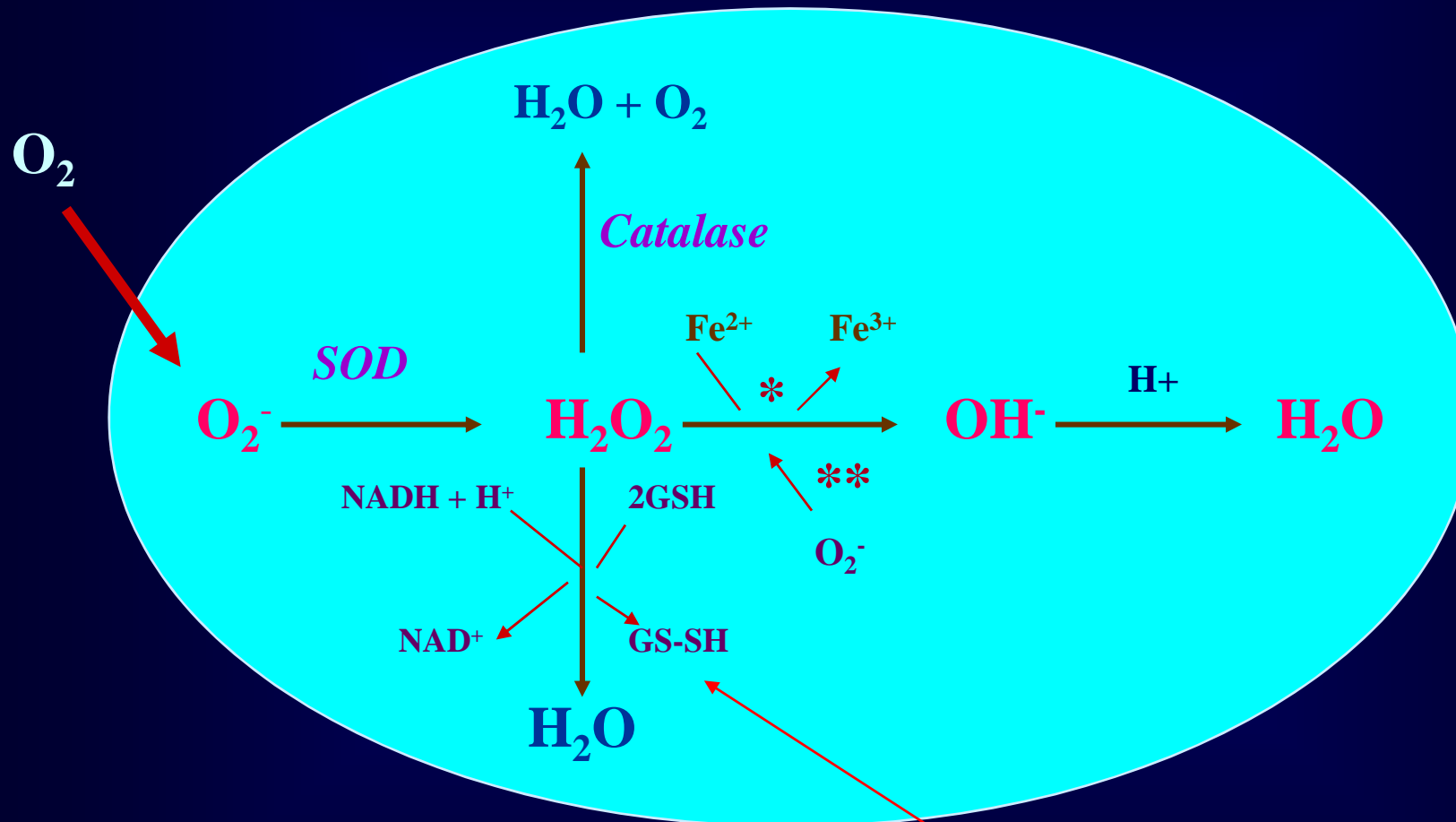


## 3. Reação de Haber-Weiss



*Glutathione peroxidase*

# MECANISMOS DE DEFESA CELULAR



\*Reação de Fenton

\*\* Reação de Haber-Weiss

Glutationa peroxidase

- **Superóxido dismutase (SOD):**



- **Catalase:**



- **Superóxido reductase (SOR):** *não há formação de O<sub>2</sub>*



**“SOR somente em anaeróbios”**

*Obs. Enzimas Oxireductases são observadas em células eucaróticas e bactérias aeróbias; ex. Ubiquinona oxidoreductase: 1a. Enzima de membrana na transferência de e<sup>-</sup> em muitos aeróbios: oxida NADH e reduz a ubiquinona.*



# TOXICIDADE DO OXIGÊNIO

✓ Enzimas → Superóxido dismutase,  
Catalase.

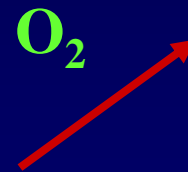
✓ Potencial redox (Eh) → Baixo (-159/-400 mv).  
→ Alto (+150 mv).

# TOXICIDADE DO OXIGÊNIO

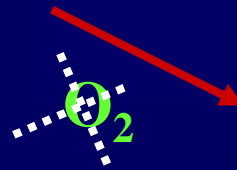


# TOXICIDADE DO OXIGÊNIO

✓ Inibição metabólica  
celular



Enzimas oxidadas  
(Metabolismo inativo)



Enzimas reduzidas  
(Metabolismo ativo)

# CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A SENSIBILIDADE AO OXIGÊNIO

- Anaeróbios estritos: não crescem  $O_2 > 0,5\%$
- Anaeróbios intermediários ou moderados: crescem 2 a 8%  $O_2$
- Microaerófilos: baixa tensão de  $O_2$
- Capnofílicos: adição de 5 - 10%  $CO_2$
- Aerotolerantes: crescem em anaerobiose e viáveis por várias horas na presença de  $O_2$ .

## Metabolismo anaeróbico

- Série de reações químicas que ocorrem dentro de um organismo vivo para obter e armazenar energia.
- Produz energia através da respiração anaeróbia.
- Aceptor final de elétrons geralmente uma substância inorgânica como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{CO}_3^{-2}$
- Geração de ATP pela fosforilação em nível do substrato.

# Metabolismo bacteriano

Catabolismo



Produção de  
energia

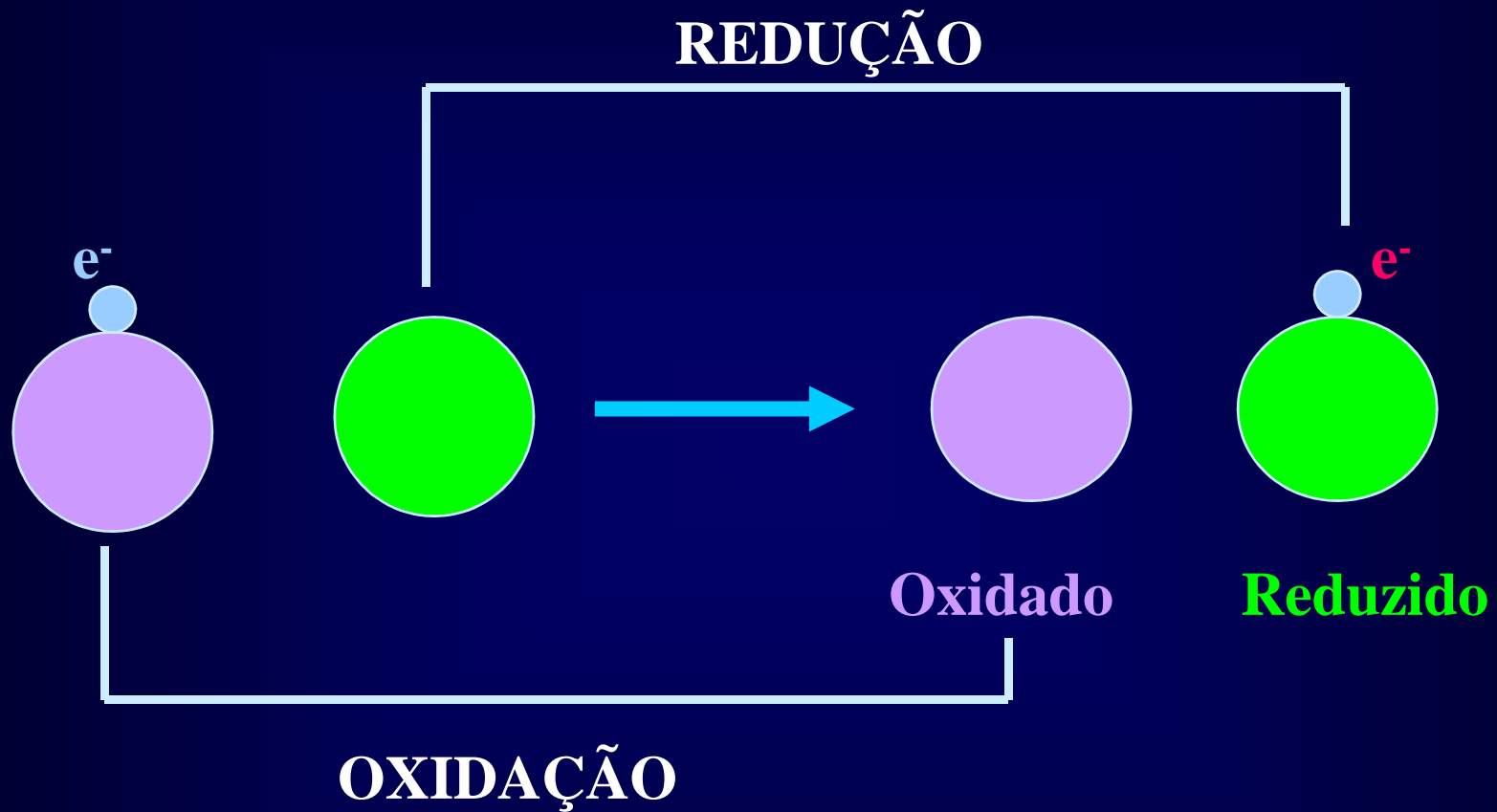
Anabolismo



Utilização de  
energia

REAÇÕES DE ÓXIDO - REDUÇÃO

# PROCESSOS DE ÓXIDO-REDUÇÃO



# Metabolismo Bacteriano Anaeróbio

## Produção de Energia Anaeróbia:

- Não existe participação do oxigênio
- Realizado por três processos:
  - » Respiração Anaeróbia
  - » Fermentação
  - » Fotossíntese

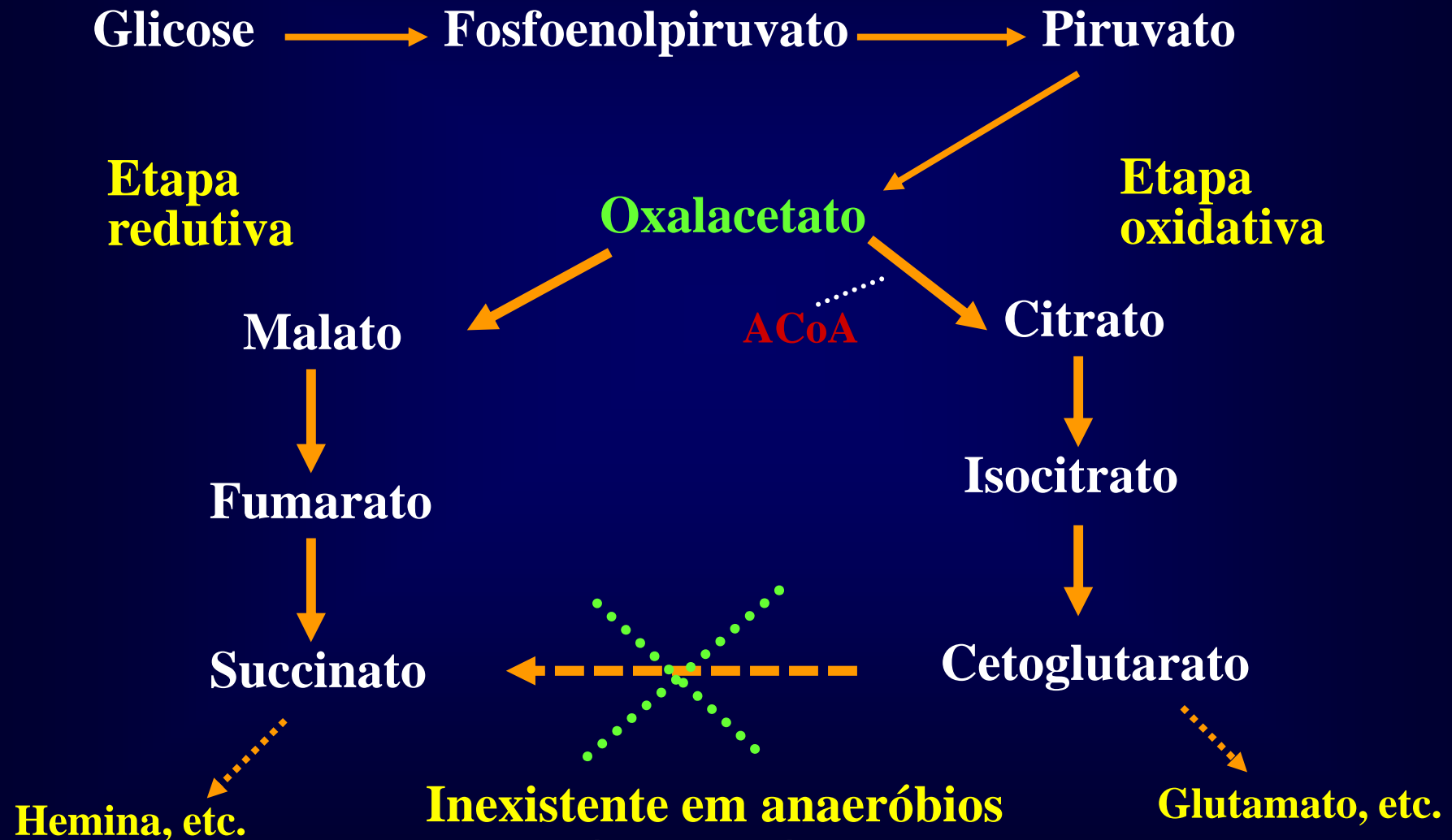


## Respiração anaeróbia

- » Processo de liberação de energia, onde o acceptor final de elétrons não é o oxigênio, mas sim um substrato inorgânico:  $\text{NO}_3$ ,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{CO}_3$ .
- » Não é observada a Cadeia Respiratória, nem Ciclo de Krebs, devido a que **A-CoA** em baixo Eh é *inativo*.
- » É um processo lento, há formação de 2 ATP.



# Ciclo de Krebs em *E. coli* Crescida em Anaerobiose



# Fermentação

- Não se observa aceptor final de elétrons, Cadeia Respiratória, nem transporte de elétrons.
- Há pequena liberação de energia pelo processo denominado Fosforilação ao nível do substrato.
- Compostos orgânicos funcionam como aceptores e doadores de elétrons.

## » Tipos de Fermentação:

### 1. Fermentação láctica: Acidifica produtos lácteos

- Fermentação homoláctica: produz só ác. láctico
- Fermentação heteroláctica: ác. láctico, acético, fórmico, etc.

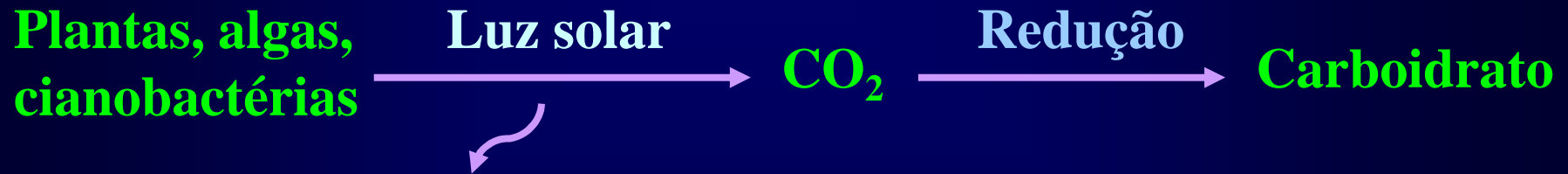
### 2. Fermentação alcoólica: Produz álcool

# Fermentação

- Qualquer processo metabólico que libere energia de um açúcar ou outra molécula orgânica; não requer oxigênio (anaeróbico) ou um sistema transportador de elétrons; uma molécula orgânica é o produto final do processo;
- Produz menos energia do que o metabolismo oxidativo (cadeia respiratória);
- Cada molécula de glicose gera 2 moléculas de ATP;
- O transportador de elétrons (NADPH) é reciclado após oxidação do receptor final de elétrons.

# Fotossíntese

- Processo dependente da luz solar, utilizado por plantas e algumas bactérias.
- A luz solar é transformada em Energia Química, utilizada para reduzir o CO<sub>2</sub> para carboidrato.



- Bacterioclorofila (Membrana plasmática)
- Clorofila (Cloroplastos)



# **PARTICIPAÇÃO DOS ANAERÓBIOS**

- Área Médica, Odontológica e Veterinária
- Área Industrial
- Microbiota endógena e exógena
- Infecções mistas (endógenas e exógenas)
- Intoxicações alimentares
- Digestão de alimentos em humanos e animais
- Solo, sedimentos, águas subterrâneas:  
redução  $\text{NO}_3$ , fixação  $\text{N}_2$ , redução  $\text{SO}_4$ ,  
metanogênese e biorremediação.

# **MICROBIOTA INDÍGENA, RESIDENTE OU AUTÓCTONE**

Laboratório de Anaeróbios

Sabe-se pouco da associação  
hospedeiro-microbiota indígena  
**Interação dinâmica**

**Para a microbiota, a interação fornece:**

nutrientes, ambiente estável,  
temperatura constante,  
proteção e transporte.

**Para o homem, a interação traz:**

benefícios nutricionais, estimulação  
do sistema imune, e regulação da  
colonização endógena e exógena.



# TIPOS DE MICROBIOTA

## 1. MICROBIOTA INDÍGENA, RESIDENTE OU AUTÓCTONE

- ✓ Bactérias indígenas:  $> 1\%$  da microbiota total
- ✓ Bactérias suplementares:  $< 1\%$  da microbiota total

## 2. MICROBIOTA EXÓGENA, ALÓCTONE OU TRANSITÓRIA

# MICROBIOTA INDÍGENA: COLONIZAÇÃO

**NASCIMENTO: MICROBIOTA  
CERVICAL MATERNA**



**GRUPO MICROBIANO DE  
CADA SÍTIO CORPORAL**



**Pele, C. bucal, T.  
gastrointestinal, T.  
respiratório**

**MICROBIOTA INDÍGENA,  
AUTÓCTONE, RESIDENTE**



**COMUNIDADE CLIMAX**



## Adquisição da Microbiota – Influência do tipo de nascimento

**Recém nascido**

**Parto normal**

**Organismos do canal vaginal**

**Predomínio de Anaeróbios**

**Início da colonização microbiana**

**Cesárea ?**

**Organismos ambientais, pessoal da saúde.**

**Predomínio de microaerófilos, facultativos e esporulados**



## Adquirição da Microbiota – Influência da alimentação

Recém nascido



Mamadeira ?  
Leite em pó ?  
Cabra?



✓ **Leite materno:** *Streptococcus, Staphylococcus, Micrococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium.*

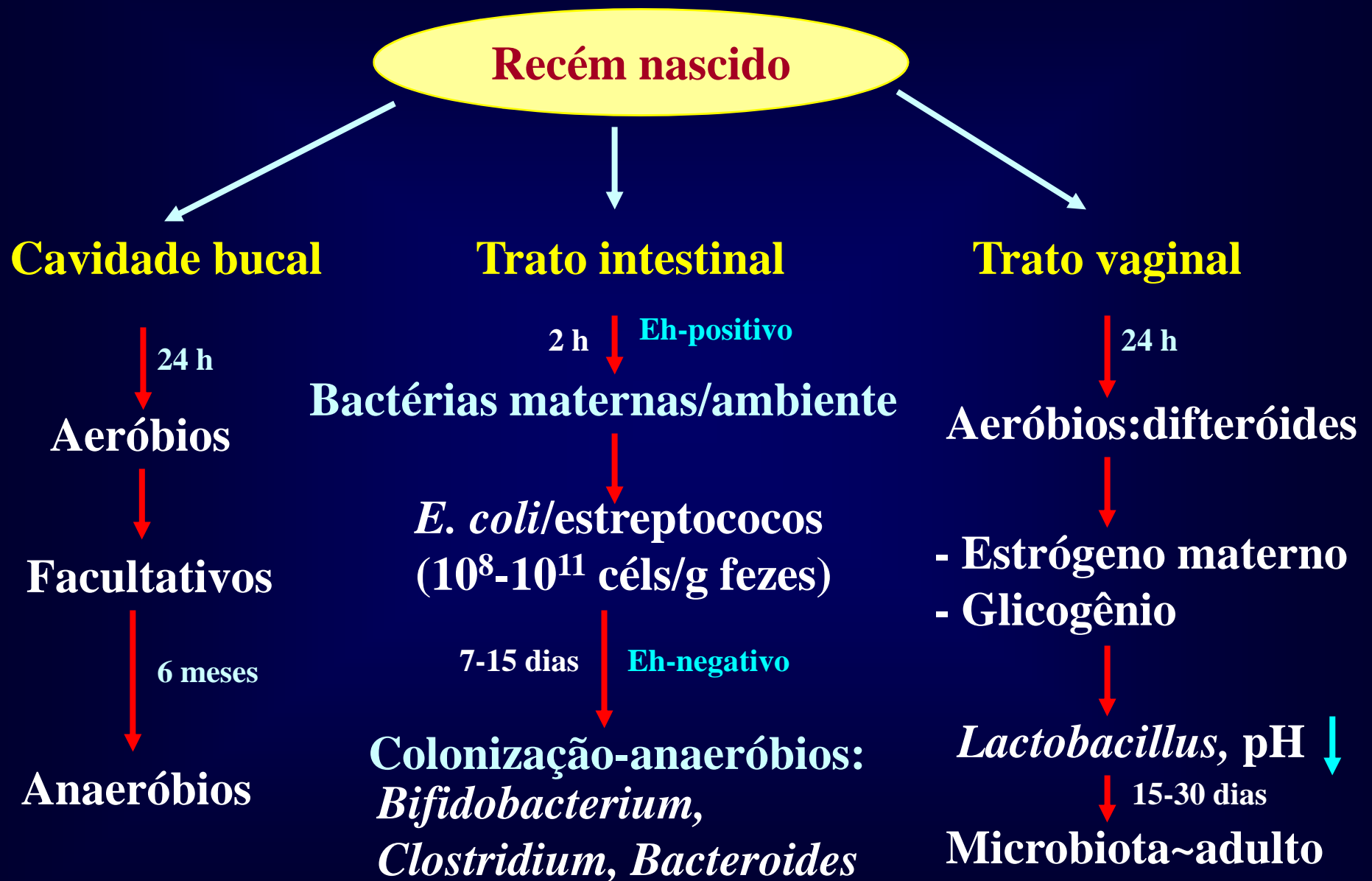
- Lactose (alta)

- Caseína (baixa)

- Fosfato de cálcio (baixo)

- Capacidade tamponante (baixo): pH ácido inibindo crescimento de *Bacteroides spp., Clostridium spp.* e *E. coli.*

# ESTABELECIMENTO DA MICROBIOTA INDÍGENA



# SUCESSÃO MICROBIANA

Gram-positivos

Bactérias

Facultativos

*S. mutans; Lactobacillus*

*Actinomyces viscosus; A. naeslundii*

*S. mitis; S. sanguis; A. viscosus*

*P. gingivalis; P. intermedia, F. nucleatum;  
Treponema spp.*

Gram-negativos

Anaeróbios

# Sucessão Microbiana Intestinal

## Pós-parto

Colonizadores secundários:  
*Bacteroides*, *Clostridia*,  
*Bifidobacterium*

## A partir dos 6 meses

Microbiota – mais diversa e  
complexa



## Nascimento

Colonizadores primários:  
*E. coli* e *Enterococcus*

## Até 6 meses

Microbiota sofre  
interferência do tipo  
alimentação

## Adulto

Redução gradual da  
diversidade – Bacteroidetes  
e Firmicutes e estabilidade

## Trato gastrointestinal humano

- Fluxo rápido de conteúdo;
- Secreções do I.D.

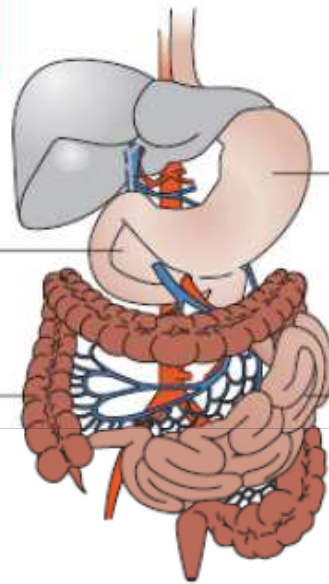
↓  
Restringem a colonização microbiana

↑  
Duodenum  
 $10^1 - 10^3$  cfu/ml

Colon  
 $10^{11} - 10^{12}$  cfu/ml

- ↓
- pH neutro;
  - Abundância relativa de nutrientes (CHO não-digeríveis e componentes alimentares que escaparam da digestão no TGI)

↓  
Ambiente propício para proliferação microbiana



Stomach  
 $10^1 - 10^3$  cfu/ml

Jejunum/ileum  
 $10^4 - 10^7$  cfu/ml

- ↑
- Fluxo rápido de conteúdo;
  - pH ácido;

↓  
Restringem a colonização microbiana

- ↓
- A motilidade intestinal é um pouco mais lenta

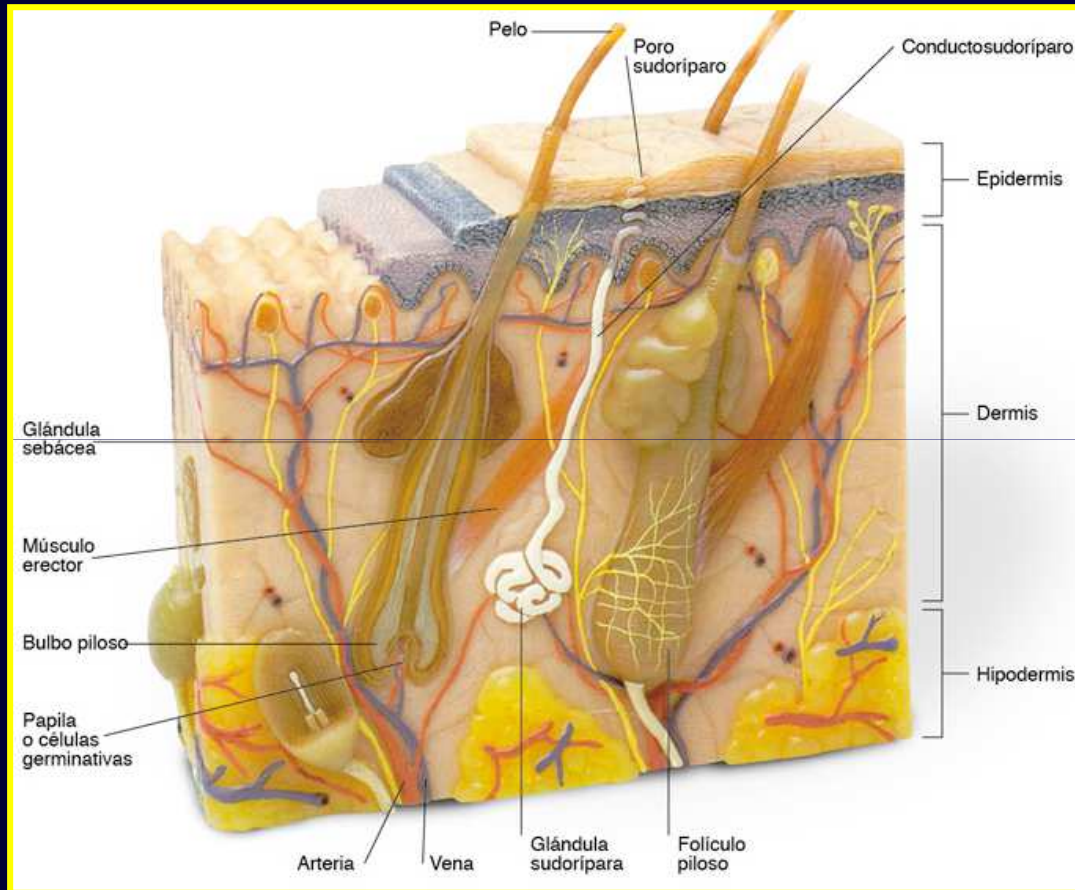
↓  
Favorece a colonização microbiana.

Sander et al., 2007





# Microbiota da pele



$10^4 - 10^6$  bactérias/cm<sup>2</sup>

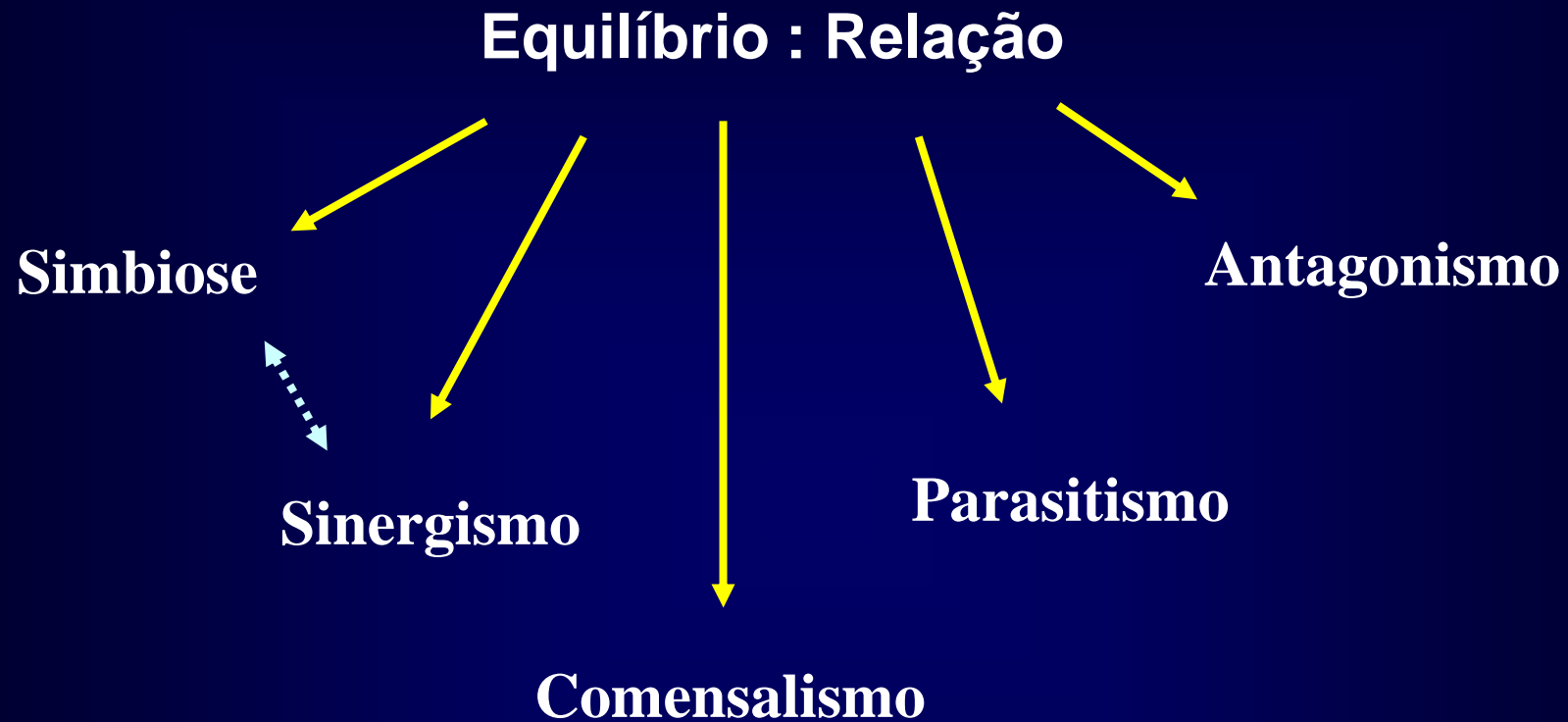
*S. epidermidis*, *S. aureus*

*Corynebacterium* spp.

*Streptococcus* spp.

*Propionibacterium* spp.

# RELAÇÕES BIOLÓGICAS DE MICRORGANISMOS



- ✓ **EFEITO REGULADOR:** mantém o equilíbrio entre as microbiotas nos diferentes habitats.
- ✓ **EFEITO PROTETOR:** Antagonismo bacteriano contra a microbiota exógena ou alóctone.

# RELAÇÕES MICROBIANAS

Flora Normal  
Microflora Normal  
Flora Residente

**Microbiota Residente**

**Relações  
microbianas**

**Microbioma**

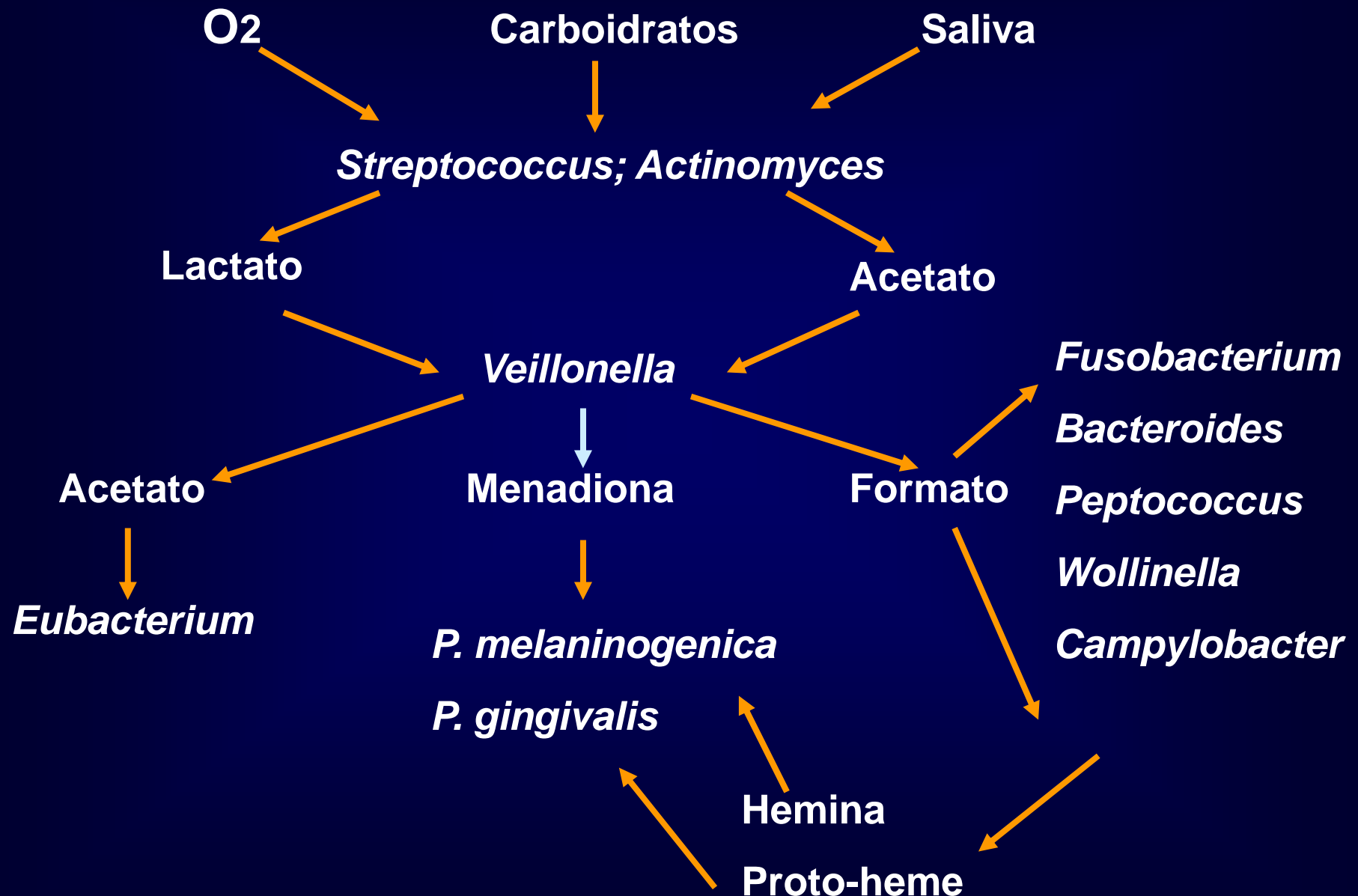
**Terminologia**

COMENSAL  
SIMBIOSE: *Obrigatório*  
MUTUALISMO: *Facultativo*  
↕  
PROTOCOOPERAÇÃO

CONJUNTO DE  
MICROBIOTAS  
ASPECTOS GENÉTICOS  
GENES

COMENSAIS  
SIMBIONTES  
PATÓGENOS  
**PATOBIÓNTICOS**  
ANFIBIÓNTES  
DÍSBIOSE

# Interações nutricionais

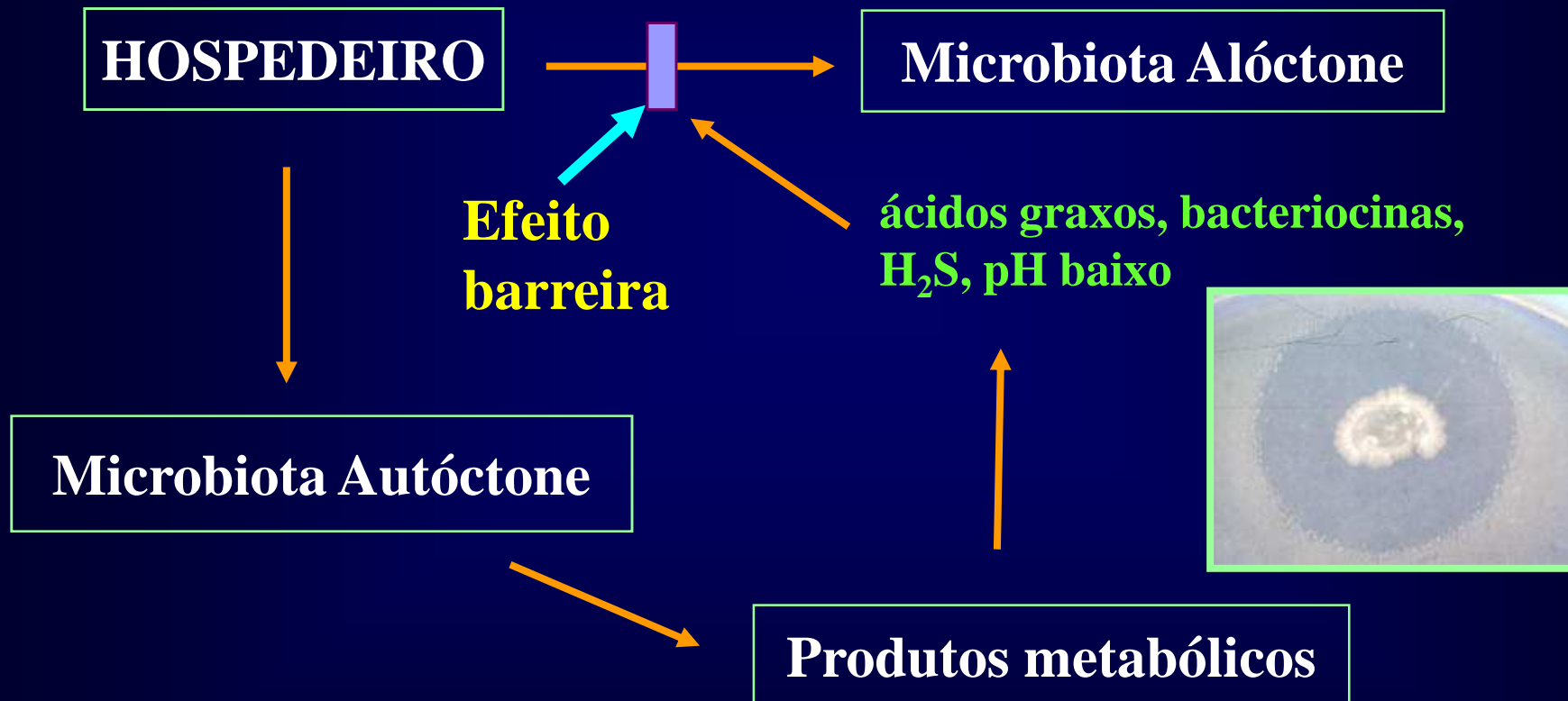


# **Funções da microbiota indígena**

- 1. Compete por nutrientes**
- 2. Compete por receptores celulares**
- 3. Produz bacteriocinas**
- 4. Estimula sistema imune**
- 5. Estimula produção de anticorpos naturais**



# MICROBIOTA RESIDENTE: REGULAGEM



# **DETERMINANTES NA COLONIZAÇÃO MICROBIANA ÀS SUPERFÍCIES CELULARES**

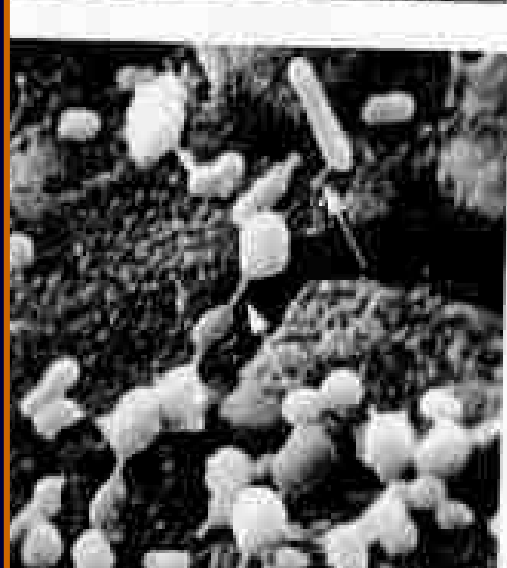
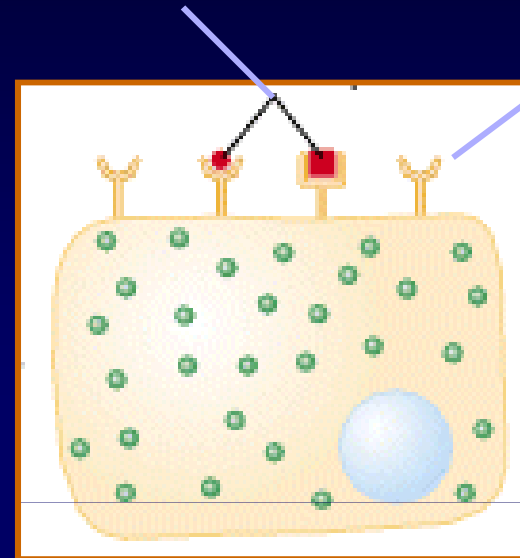
- **Habilidade de aderir**
- **Disponibilidade de nutrientes: qualidade e quantidade**
- **Disponibilidade do oxigênio**
- **Fluxo de fluídos da superfície epitelial**
- **Sistema de limpeza muco-ciliar**
- **Movimento celular-epitelial**
- **Sistema imune local**
- **Receptores análogos**
- **Interação microbiana: competição e cooperação**
- **Antimicrobianos não específicos do hospedeiro**
- **Variação do pH e Eh.**



# Biofilme na superfície dental

Ligantes ou adesinas bacterianas

Receptores do hospedeiro



**Aparelho Respiratório:**

Infecções do aparelho respiratório superior, pneumonia necrotizante, abscesso pulmonar, pneumonia aguda.

**Abdômen:** abscessos intra-abdominais, abscesso hepático, peritonite.

**Pele e Tecidos Moles:**

feridas profundas infectadas, abscessos profundos, septicemia, gangrena, celulite.



**Sistema Nervoso Central e Cabeça:** Infecções periodontais, otite média crônica, abscesso cerebral, sinusite crônica.

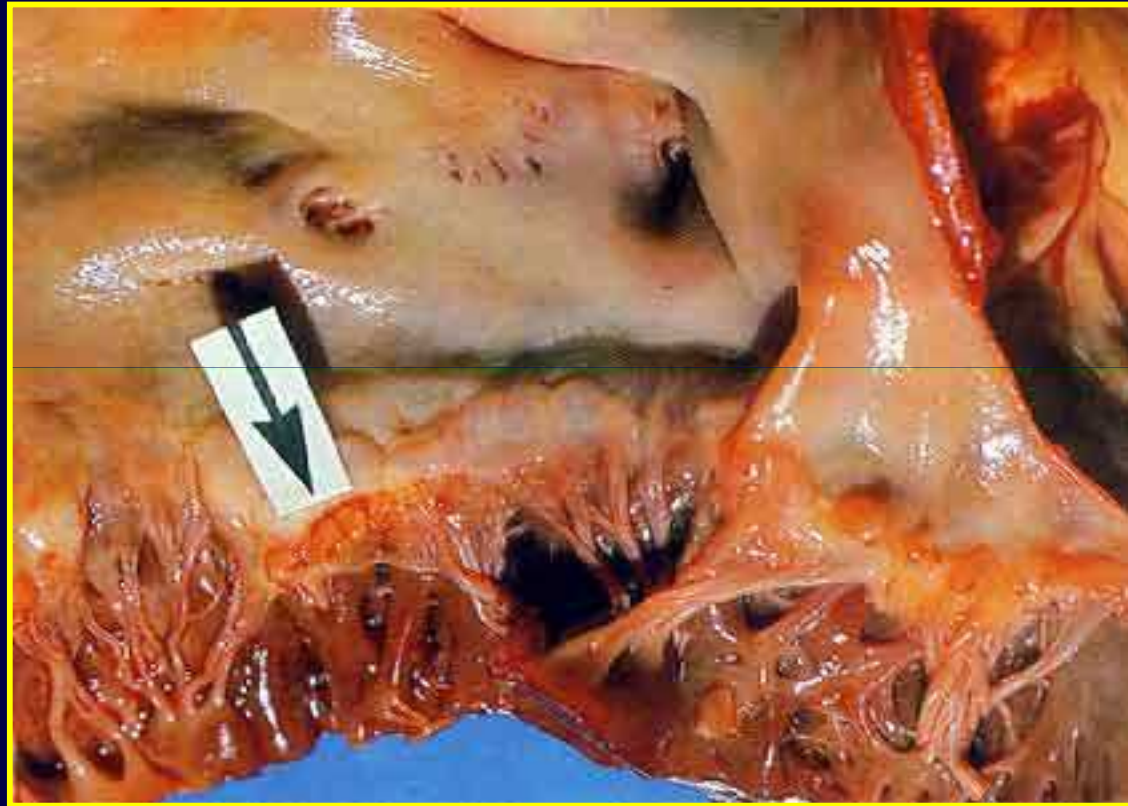
**Tórax:** endocardite, bacteremia, abscessos.

**Trato Genital Feminino:** abscesso tubo-ovariano, abscesso pélvico, aborto séptico, endometrite

**Participação de anaeróbios em processos infecciosos**

# Participação de anaeróbios em processos infecciosos

*Peptococcus spp. e Peptostreptococcus spp.*



**Endocardite**

# Participação de anaeróbios em processos infecciosos



*Gengivite*

*Veillonella spp.*

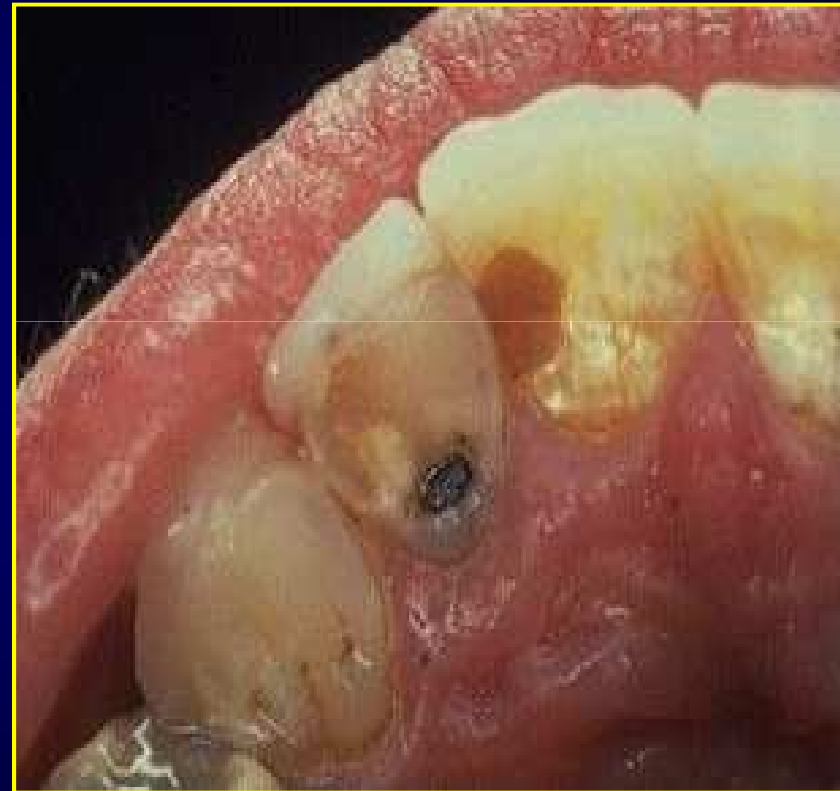
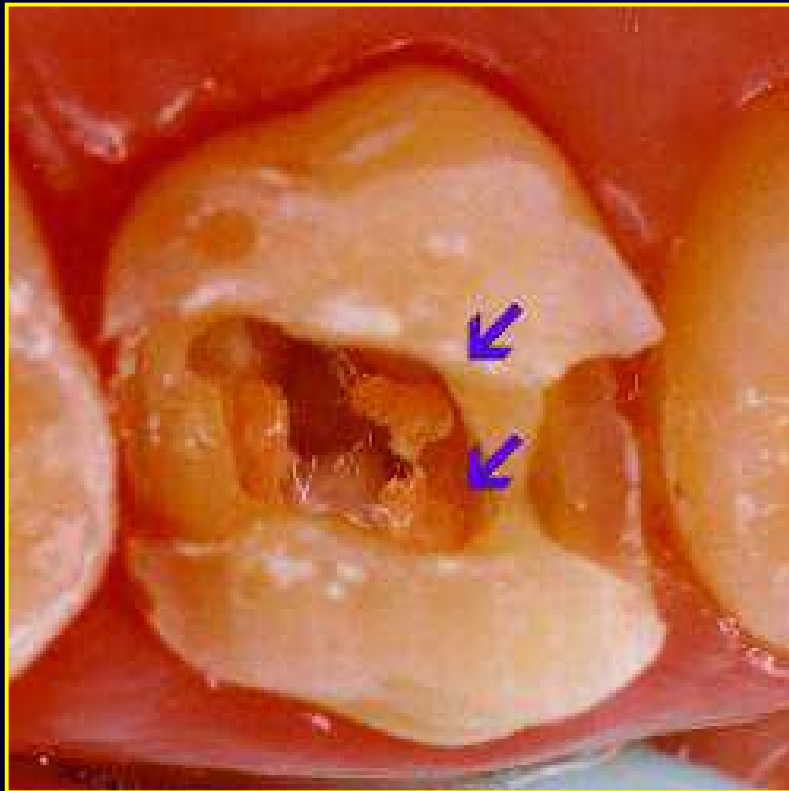


*Periodontite*

*Porphyromonas spp. e  
Treponema spp.*

# Participação de anaeróbios em processos infecciosos

*Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp.



**Infecção endodôntica**

Laboratório de Anaeróbios



# Participação de anaeróbios em processos infecciosos

*Bacteroides fragilis*



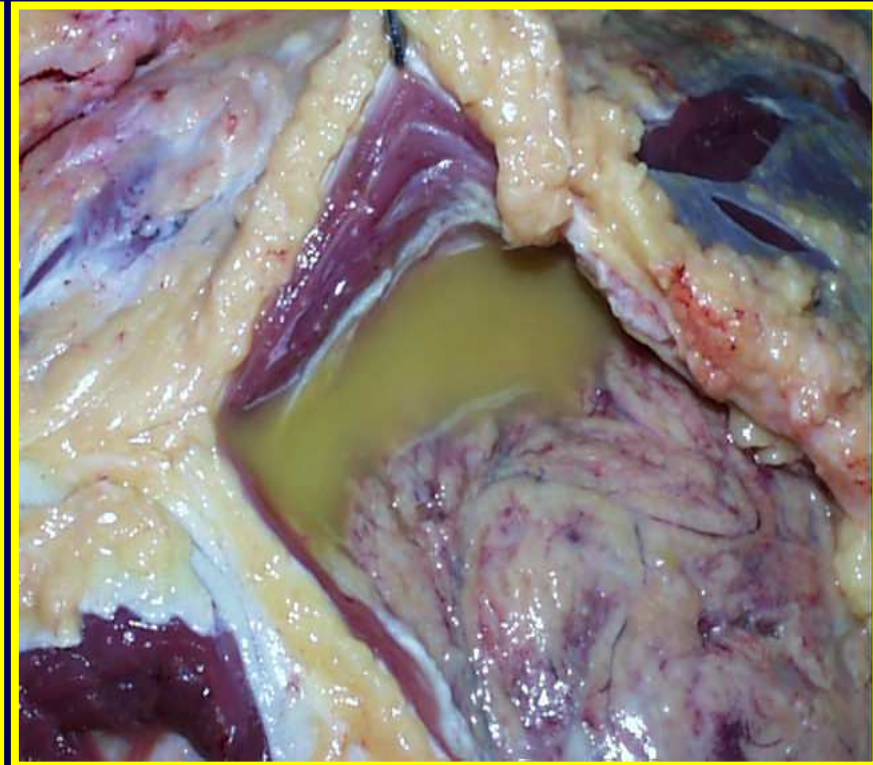
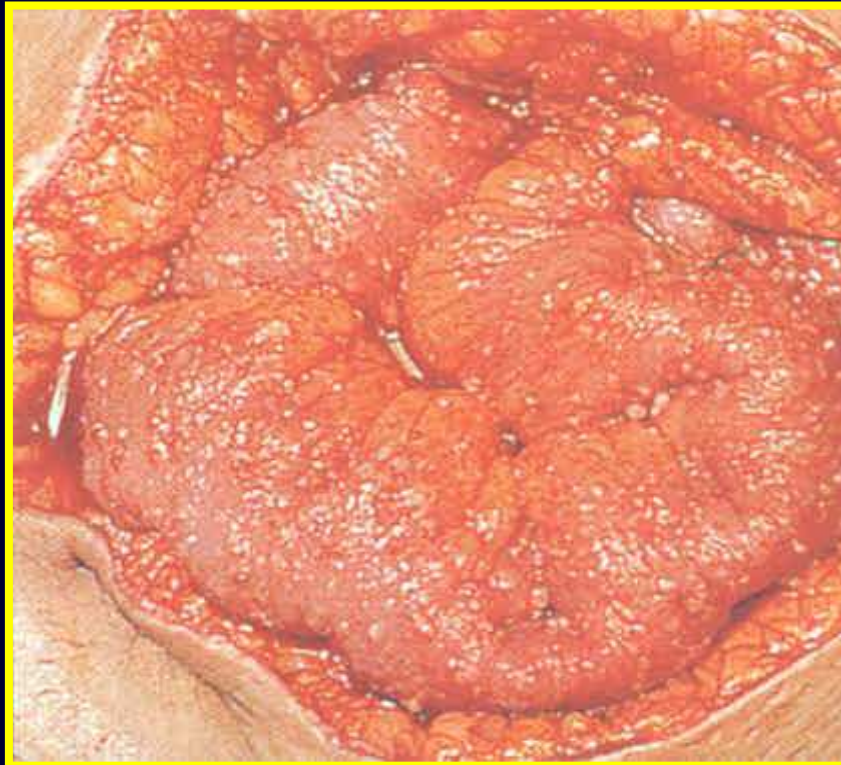
**Fascite necrosante**



**Celulite**

# Participação de anaeróbios em processos infecciosos

*Bacteroides fragilis*



**Peritonite**

# Participação de anaeróbios em processos infecciosos

*Bacteroides fragilis*



**Faringite Aguda**



**Abscesso hepático**



# Participação de anaeróbios em processos infecciosos



**Mico estrela (sagui):**  
*Callithrix penicillata*



**Cão**

# QUESTÕES

- Como ocorre a sucessão microbiana? Quais são os fatores que favorecem este processo?
- Bactérias indígenas de crianças, adultos e animais, são similares?
- O sistema imunológico age contra a microbiota indígena?
- Organismos indígenas de um indivíduo podem ser implantados em outro?
- Como são formadas as diferentes microbiotas? Quais os fatores limitantes?