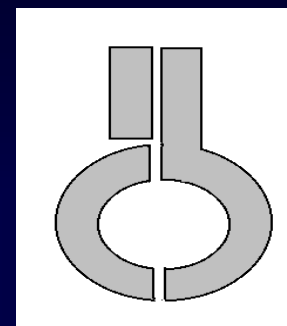




**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
LABORATÓRIO DE ANAERÓBIOS**

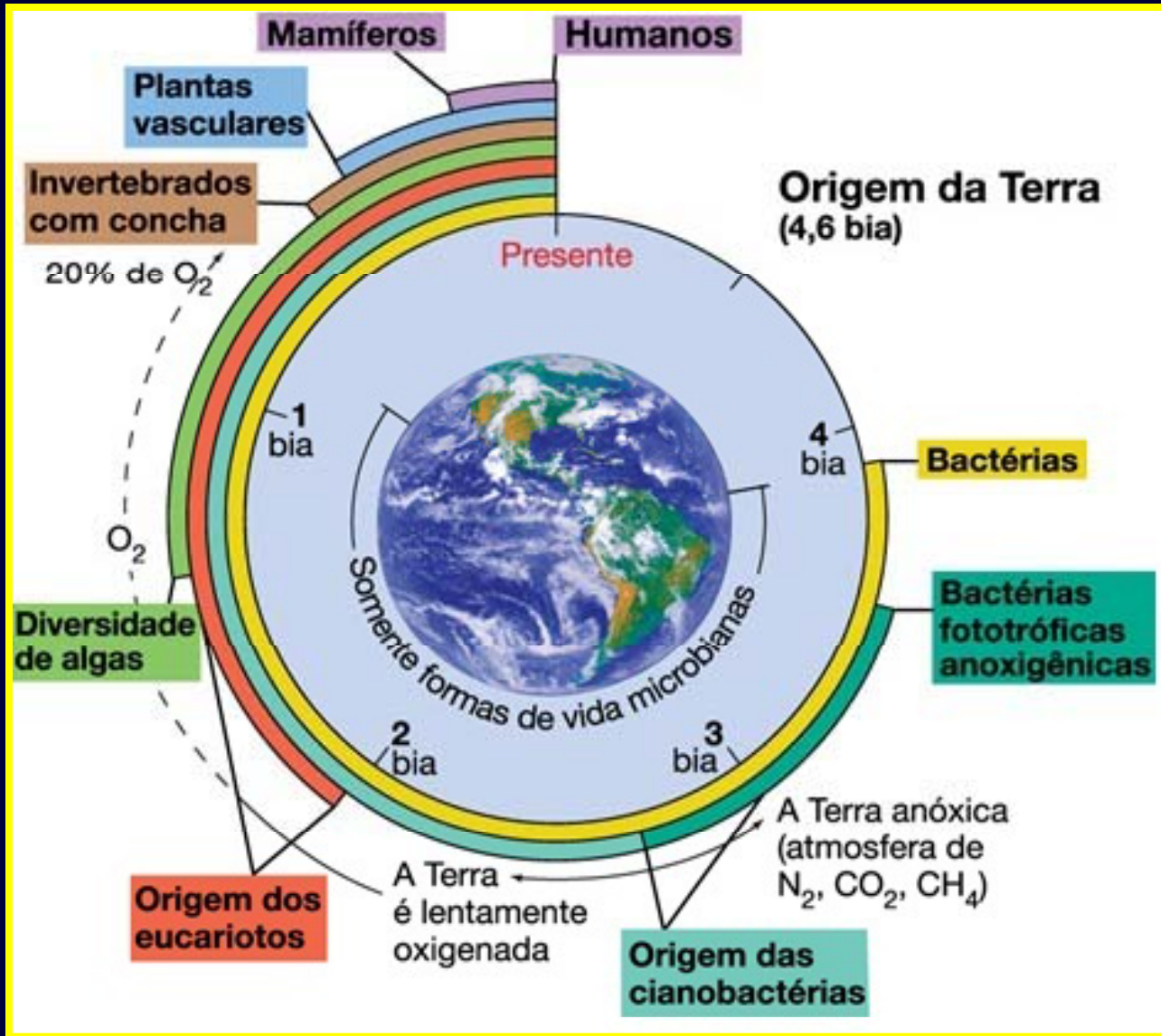


BACTERIOLOGIA DE ANAERÓBIOS

Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

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.

ANAERÓBIOS - HISTÓRIA

➤ Hipócrates (400 aC):

Descreve o Tétano, mas não o organismo

➤ Xenophon (400 aC):

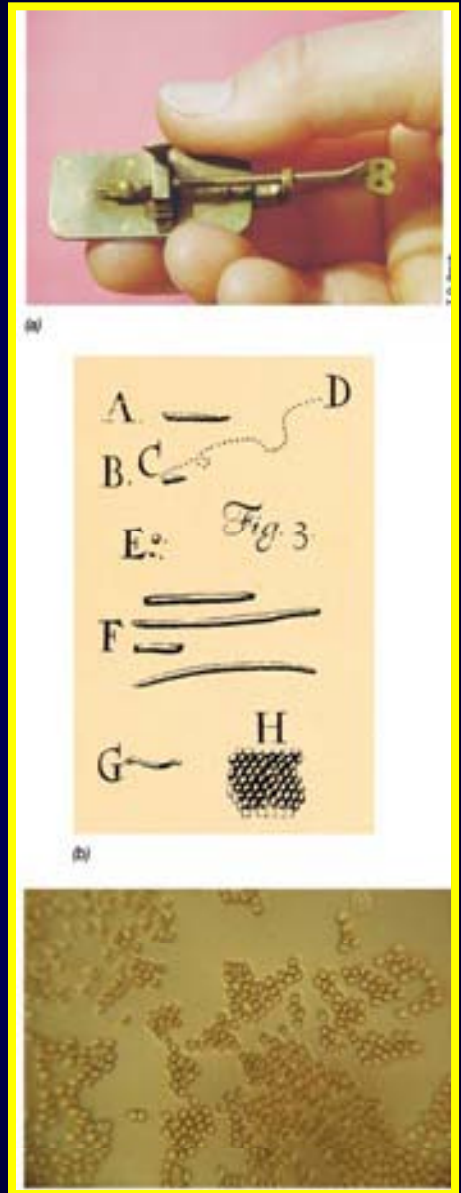
Descreve a gengivite úlcero-necrozante
(soldados gregos)

➤ **Langenbeck (1845):**

Descreve a actinomicose

➤ **Antony van Leewenhoek (1680):**

“Animálculos”



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

➤ Utiliza terminologia:

Aeróbio - Oxibionte

Anaeróbio - Anoxibionte

➤ **Pasteur & Joubert (1877): *Vibrion septique***

**1º patógeno humano
cultivado**



C. septicum



➤ **Israel (1878)**



Actinomyces

➤ **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.

- **Schmort (1891):** *Streptothix cunicuti*, hoje *Fusobacterium necrophorum*, em coelhos.
- **Veillon (1893):** relata *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.

» incapazes de crescer em Eh elevado.

» morrem em contato com o ar.

➤ **Loesche (1969):**

- **Anaeróbios estritos: incapazes de crescer em ágar e com mais de 0,5% de O₂.**
- **Anaeróbios moderados: capazes de crescer entre 2 e 8% de O₂, e sobreviver na presença de ar entre 60-90 minutos.**

➤ **Smith (1974):**

- **Microaerófilos: atmosfera enriquecida com 10% CO₂.**
- **Aerotolerantes: crescem em anaerobiose e permanecem viáveis na presença de ar por várias horas.**

➤ **Tally et al. (1975):**

- **Extremamente sensíveis ao O₂, destruídos em 10 minutos;**
- **Intermediariamente sensíveis ao O₂, sobrevivem de 10 minutos a 48h;**
- **Aerotolerantes: sobrevivem ≥ 72 horas na presença de O₂ .**

➤ **Rosenblatt (1976):**

» Não crescem na superfície de meios, nem em ambientes com ar ou ar + 10% CO₂.

» **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)

[O₂] → Organismo → MORTE

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

* A quê se deve a toxicidade desta substância?

RADICAIS LIVRES TÓXICOS

(Espécies oxigênio reativas - ROS)

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

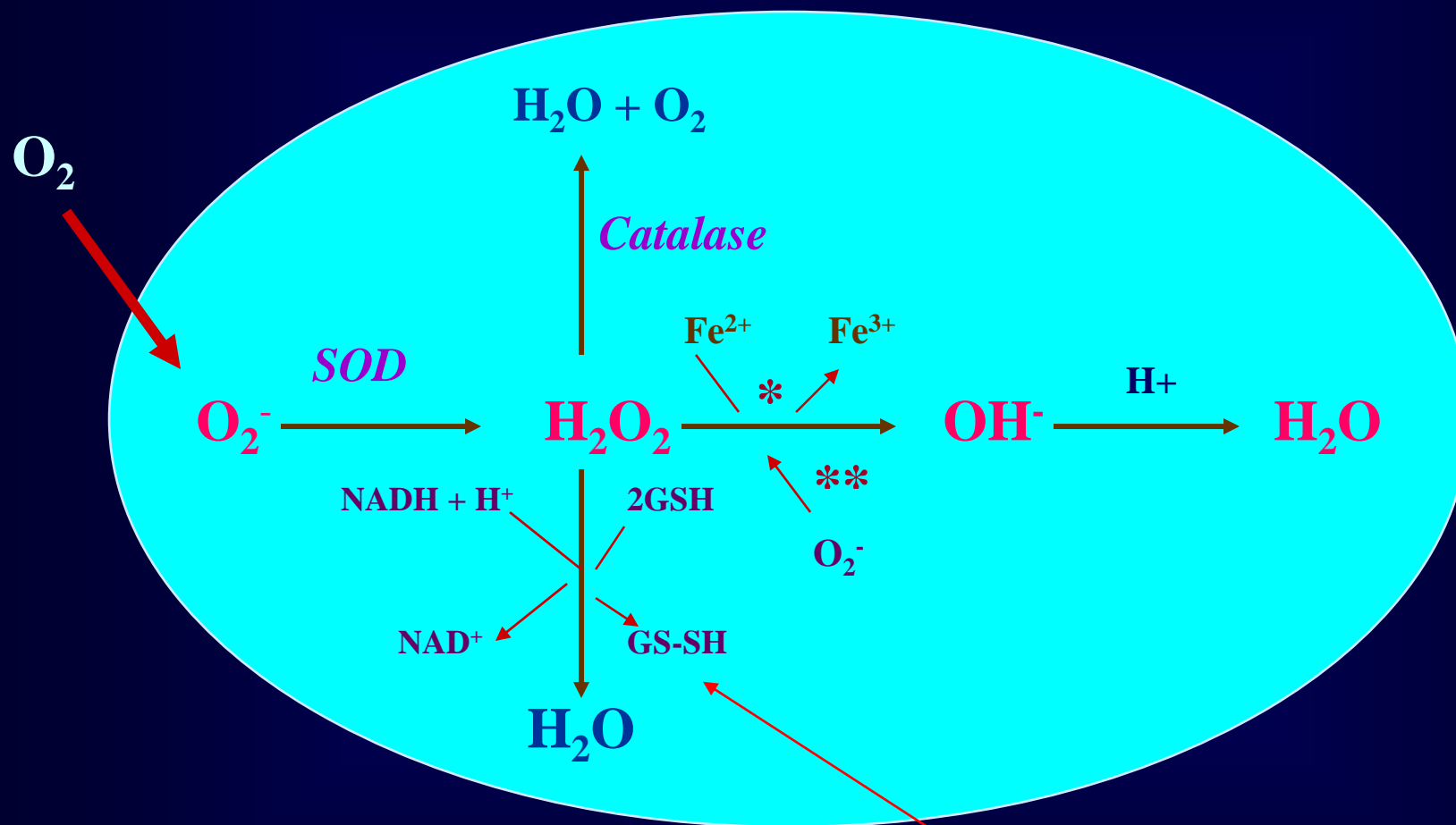
- Anion superóxido: O_2^-

- Radical hidroxila: OH^-

- Peróxido de hidrogênio: H_2O_2

- Óxido nítrico: NO

MECANISMOS DE DEFESA CELULAR



*Reação de Fenton

** Reação de Haber-Weiss

Glutathione peroxidase

- **Superóxido dismutase (SOD):**



- **Catalase:**



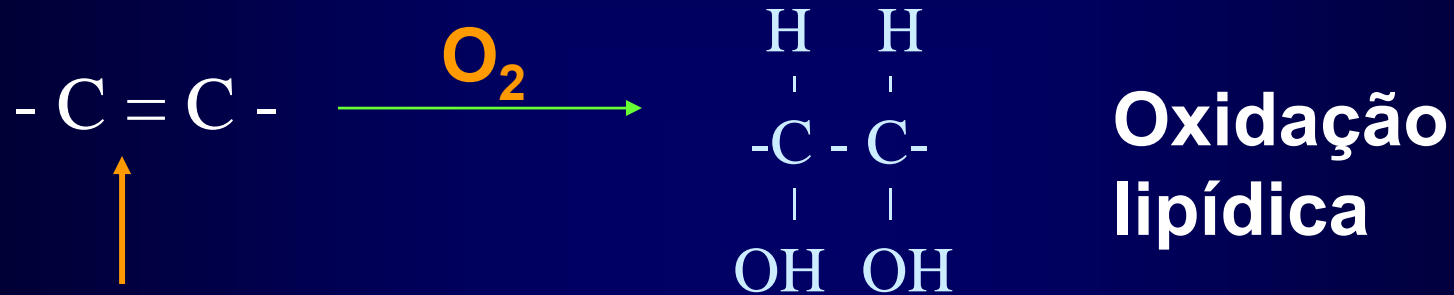
- **Superóxido reductase (SOR):** não há formação de O_2



“Enzima somente em anaeróbios”

TOXICIDADE DO OXIGÊNIO

✓ O_2 → Altera lipídeos M. C. → Lise



✓ Enzimas → Superóxido dismutase,
Catalase.

TOXICIDADE DO OXIGÊNIO

✓ Inibição metabólica
celular

O_2

Enzimas oxidadas
(Metabolismo inativo)

O_2

Enzimas reduzidas
(Metabolismo ativo)

✓ Potencial redox (Eh)

Baixo (-159/-400 mv).

Alto (+150 mv).

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 .**

Bactérias produtoras de SOD

Chlorobium thiosulfatophilum

Desulfotomaculum nigrificans

Clostridium acetobutylicum

C. bifermentans

C. beijerinckii

C. butyricum

C. pasteurianum

C. perfringens

C. sprogenes

Bacteroides fragilis

B. vulgatus

B. distasonis

B. thetaiotaomicron

Propionibacterium acnes

Bifidobacterium adolescentis

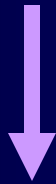
Butyrivibrio fibriosolvens

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 eletrons geralmente uma substância inorgânica como NO_3^- , SO_4^- , CO_3^{-2}**
- **Geração de ATP pela fosforilação em nível do substrato.**

Metabolismo bacteriano

Catabolismo



**Produção de
energia**

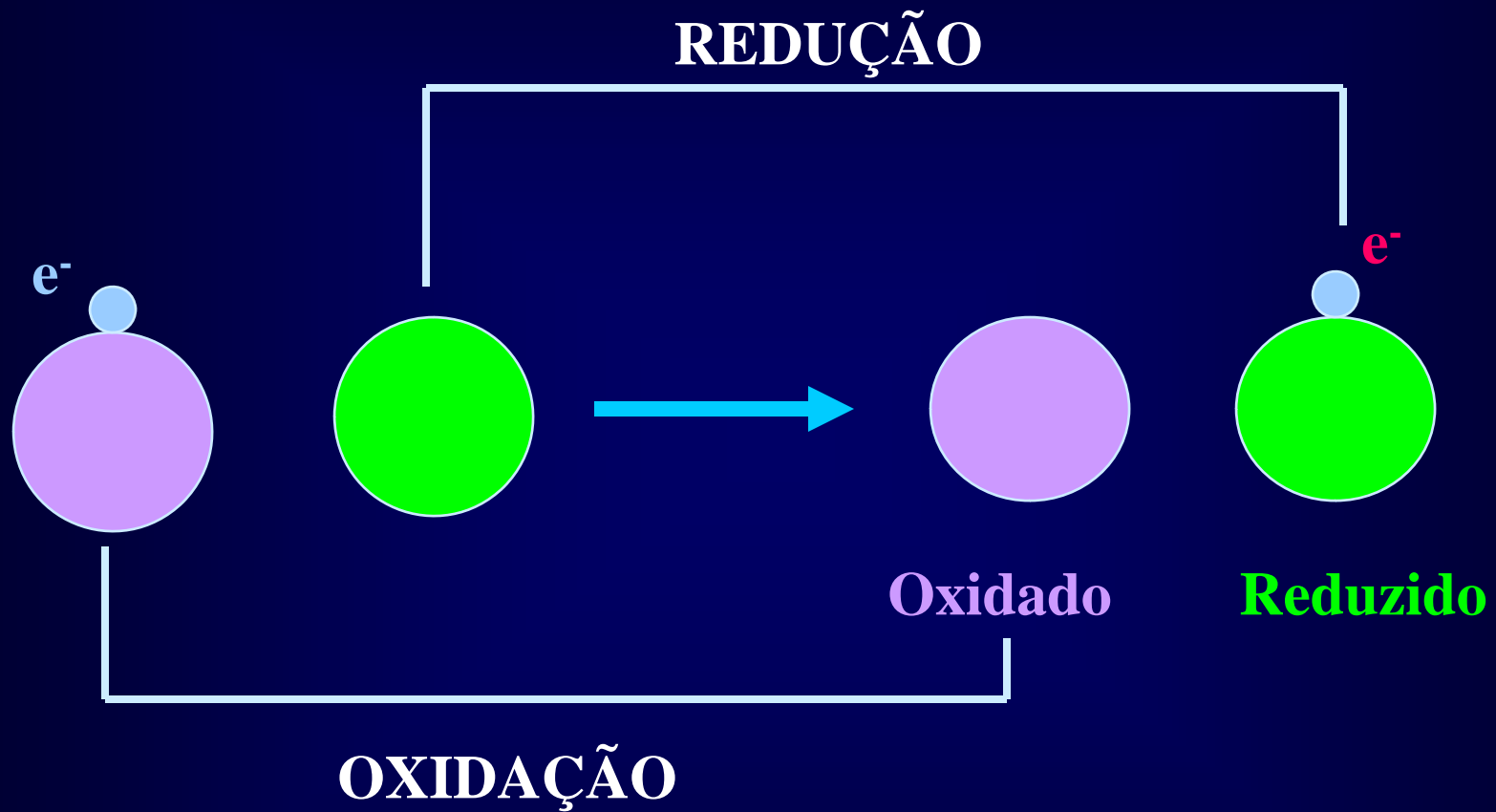
Anabolismo



**Utilização de
energia**

REAÇÕES DE ÓXIDO - REDUÇÃO

PROCESSOS DE ÓXIDO-REDUÇÃO



Metabolismo Bacteriano Anaeróbio

Produção de Energia Anaeróbia:

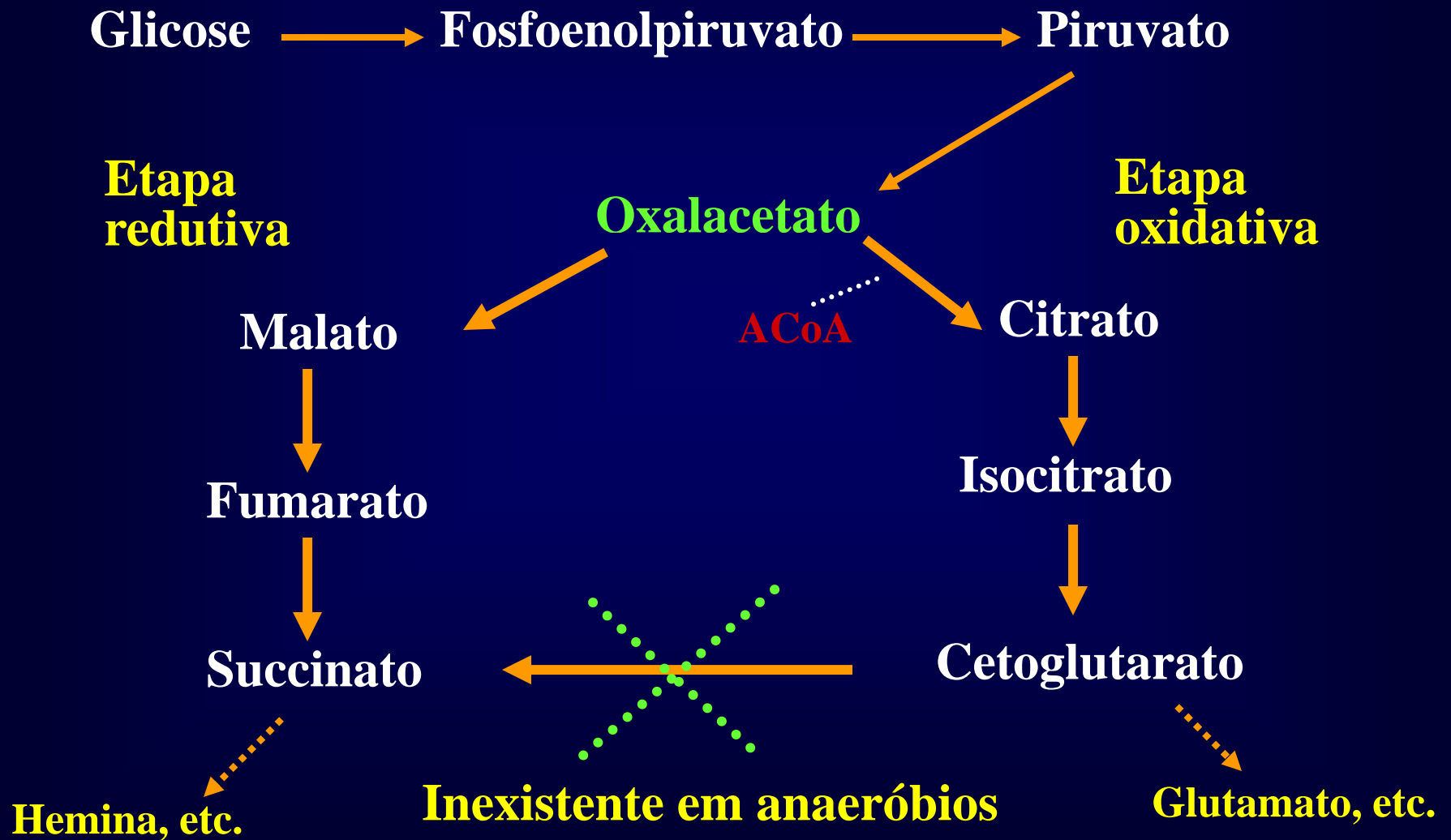
- Não existe participação do oxigênio**
- Realizado por três processos:**
 - » Respiração Anaeróbia**
 - » Fermentação**
 - » Fotossíntese**

Respiração anaeróbia

- » Processo de liberação de energia, onde o acceptor final de elétrons não é o oxigênio, mas sim um substrato inorgânico: NO_3 , SO_4 , 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, havendo formação de somente 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.

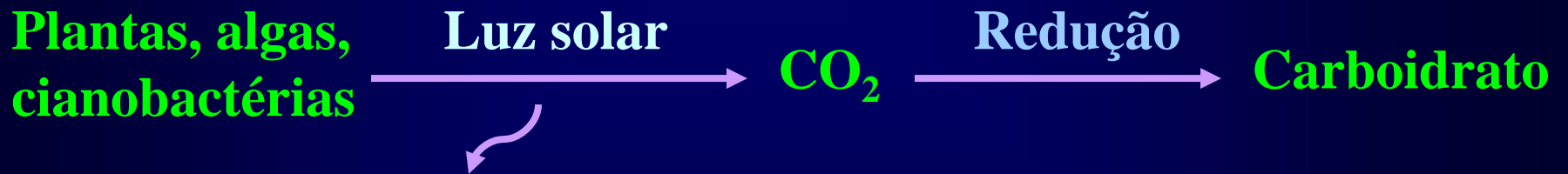
2. Fermentação alcoólica: Produz álcool

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_2 para carboidrato.



- Bacterioclorofila (Membrana plasmática)
- Clorofila (Cloroplastos)



PARTICIPAÇÃO DOS ANAERÓBIOS

- Área Médica, Odontológica e Veterinária
- Área Industrial
- Microbiota indígena e exógena
- Infecções mistas (endógenas e exógenas)
- Intoxicações alimentares
- Digestão de alimentos em humanos e animais
- Solo, sedimentos, águas subterrâneas:
redução NO_3 , Fixação N_2 , redução SO_4 ,
metanogênese e biorremediação.

**MICROBIOTA INDÍGENA,
RESIDENTE OU AUTÓCTONE**

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.

RELAÇÃO MICROBIOTA - HOSPEDEIRO

✓ **Animal convencional:** Resistente à colonização por patógenos.

✓ **Animal germ-free ou gnotobióticos:** Susceptível à colonização por patógenos.

✓ **Participação no sistema imune de recém nascidos**

Mucosa lisa (sem receptores); Ig A (aparece após a 4a. semana de vida); Presença de fagócitos na mucosa, lactoferrina, lisozima, muco-glicoprotéico e fibronectina.

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

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



Adquisição da Microbiota

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.

ESTABELECEMENTO DA MICROBIOTA INDÍGENA

Recém nascido

Cavidade bucal

↓ 24 h

Aeróbios



Facultativos



↓ 6 meses

Anaeróbios

Trato intestinal

↓ 2 h **Eh-positivo**

Bactérias maternas/ambiente



E. coli/estreptococos
(10^8 - 10^{11} céls/g fezes)



↓ 7-15 dias **Eh-negativo**

Colonização-anaeróbios:
Bifidobacterium,
Clostridium, *Bacteroides*

Trato vaginal

↓ 24 h

Aeróbios:difteróides



-Estrógeno materno
-Glicogênio



Lactobacillus, pH ↓

↓ 15-30 dias

Microbiota~adulto

SUCESSÃO MICROBIANA

Gram-positivos

Bactérias

Facultativos

S. mutans; Lactobacillus

Actinomyces viscosus; A. naeslundii

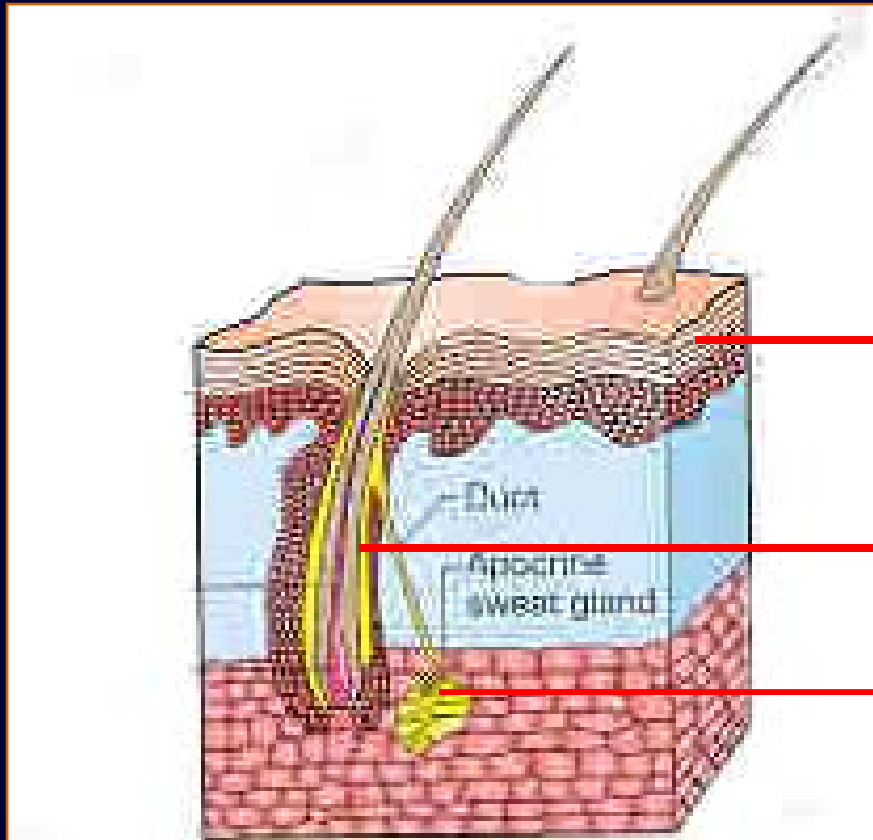
S. mitis; S. sanguis; A. viscosus

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

Gram-negativos

Anaeróbios

Microbiota da pele



Estrato córneo

Folículo piloso

Glândula sebácea

$10^4 - 10^6$ bactérias/cm²

S. epidermidis, *S. aureus*
Corynebacterium spp.
Streptococcus spp.
Propionibacterium spp.

FATORES QUE INFLUENCIAM A AQUISIÇÃO OU QUE INTERFEREM NO EQUILÍBRIO DA MICROBIOTA

✓ Físico-químico

✓ Hospedeiro

✓ Microbianos

Nenhum controle consciente do hospedeiro.

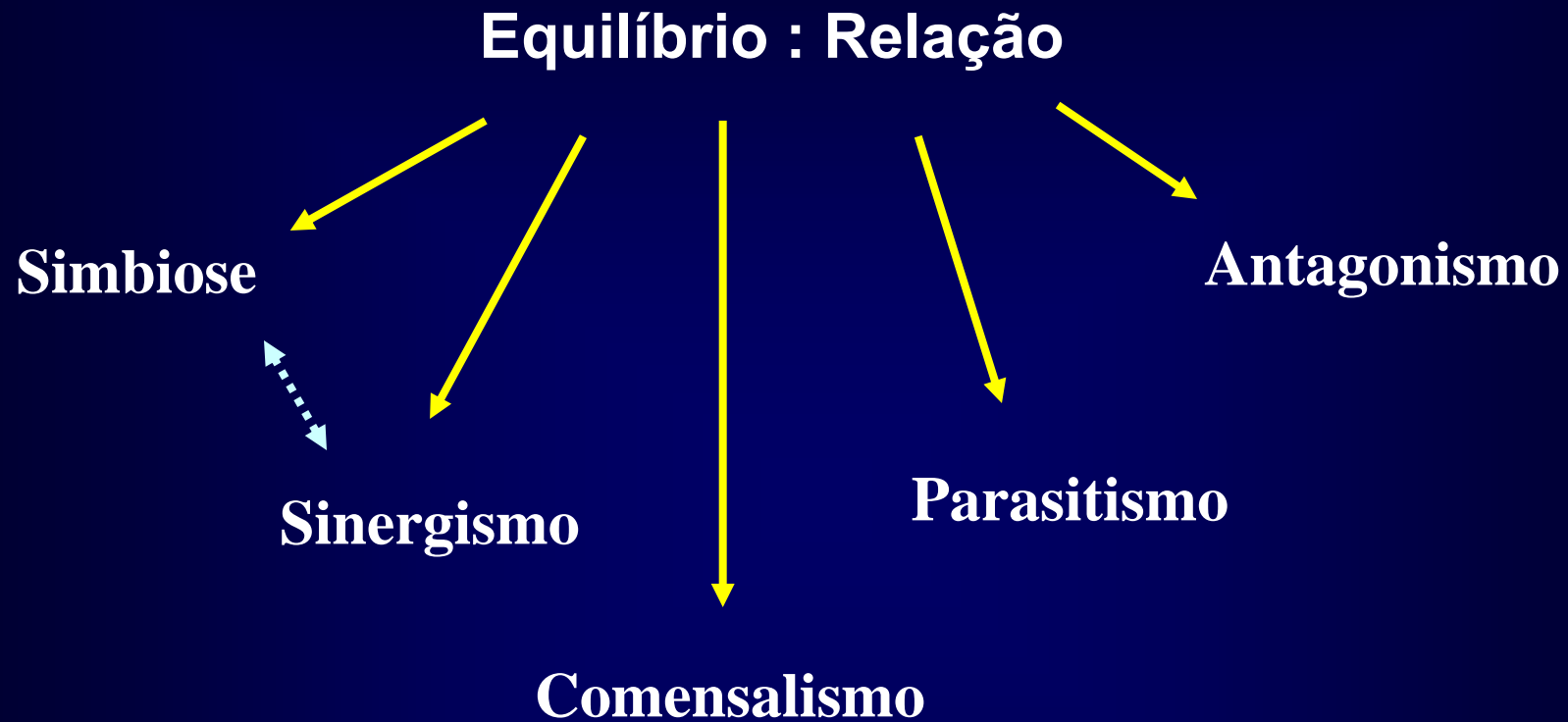
✓ Higiene

✓ Dieta

✓ Antimicrobianos

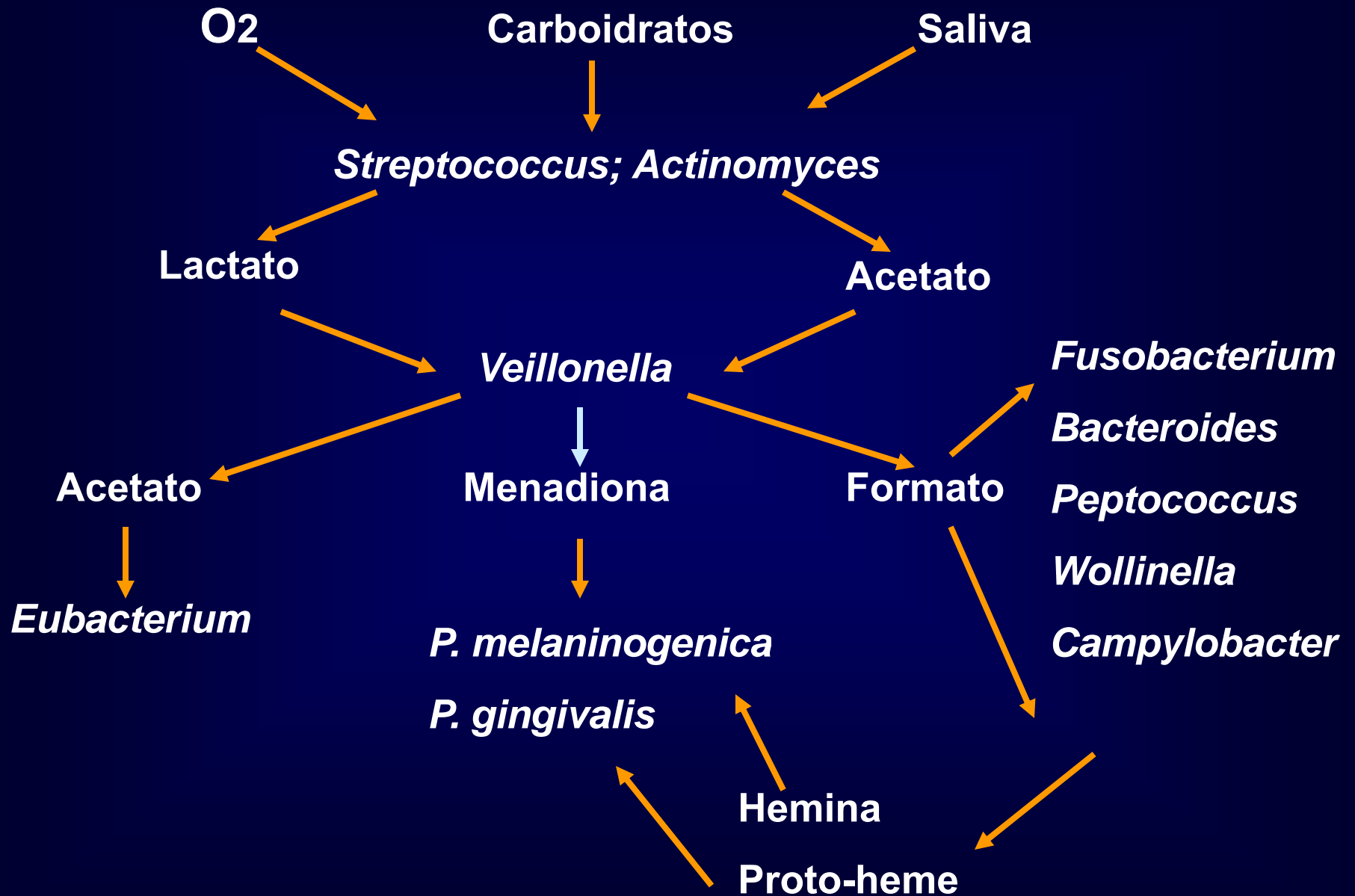
Controle do Hospedeiro.

RELAÇÕES BIOLÓGICAS DE MICRORGANISMOS

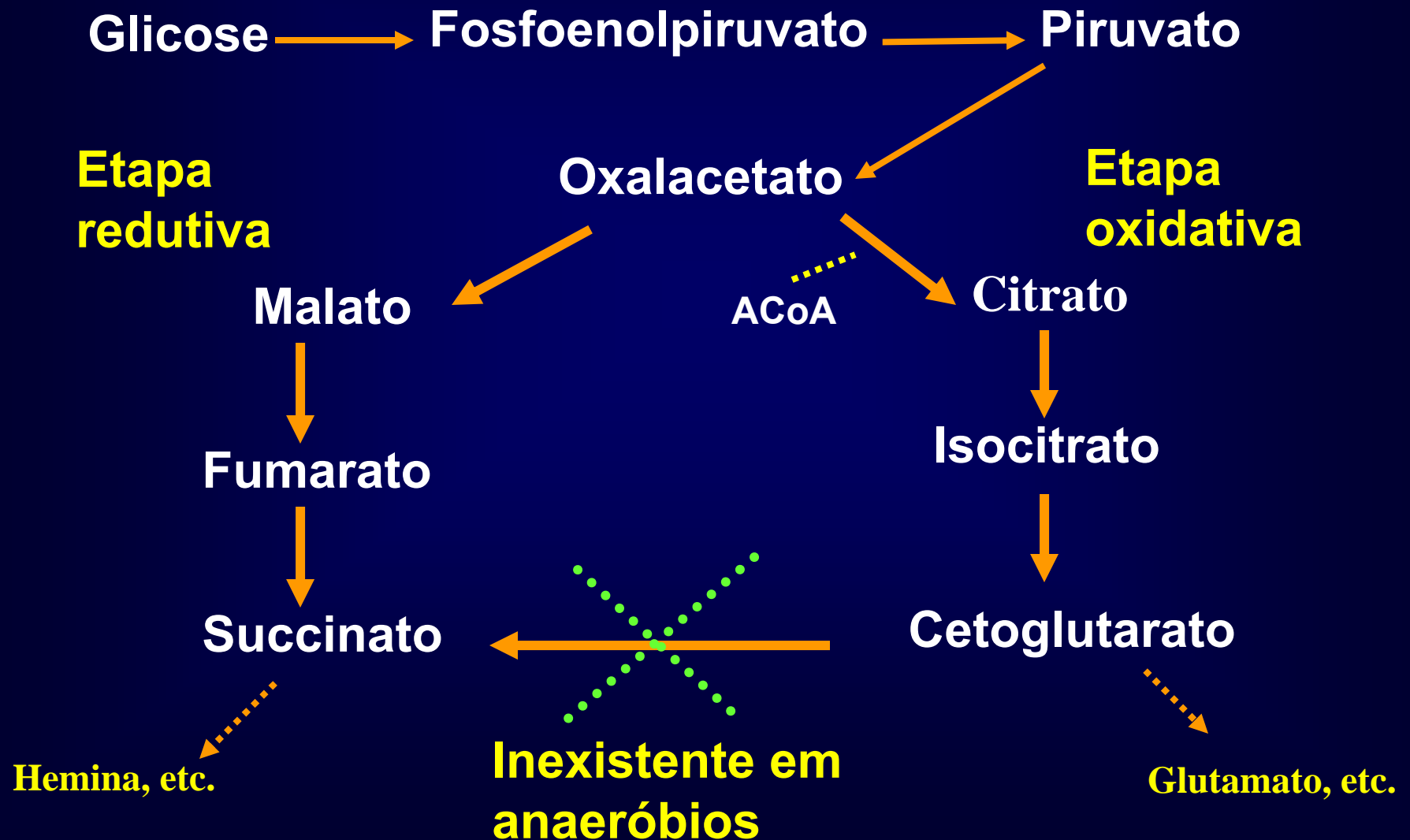


- ✓ **EFEITO REGULADOR:** mantém o equilíbrio entre as microbiotas nos diferentes habitats.
- ✓ **EFEITO PROTETOR:** Antagonismo bacteriano contra a microbiota exógena ou alóctone.

Interações nutricionais



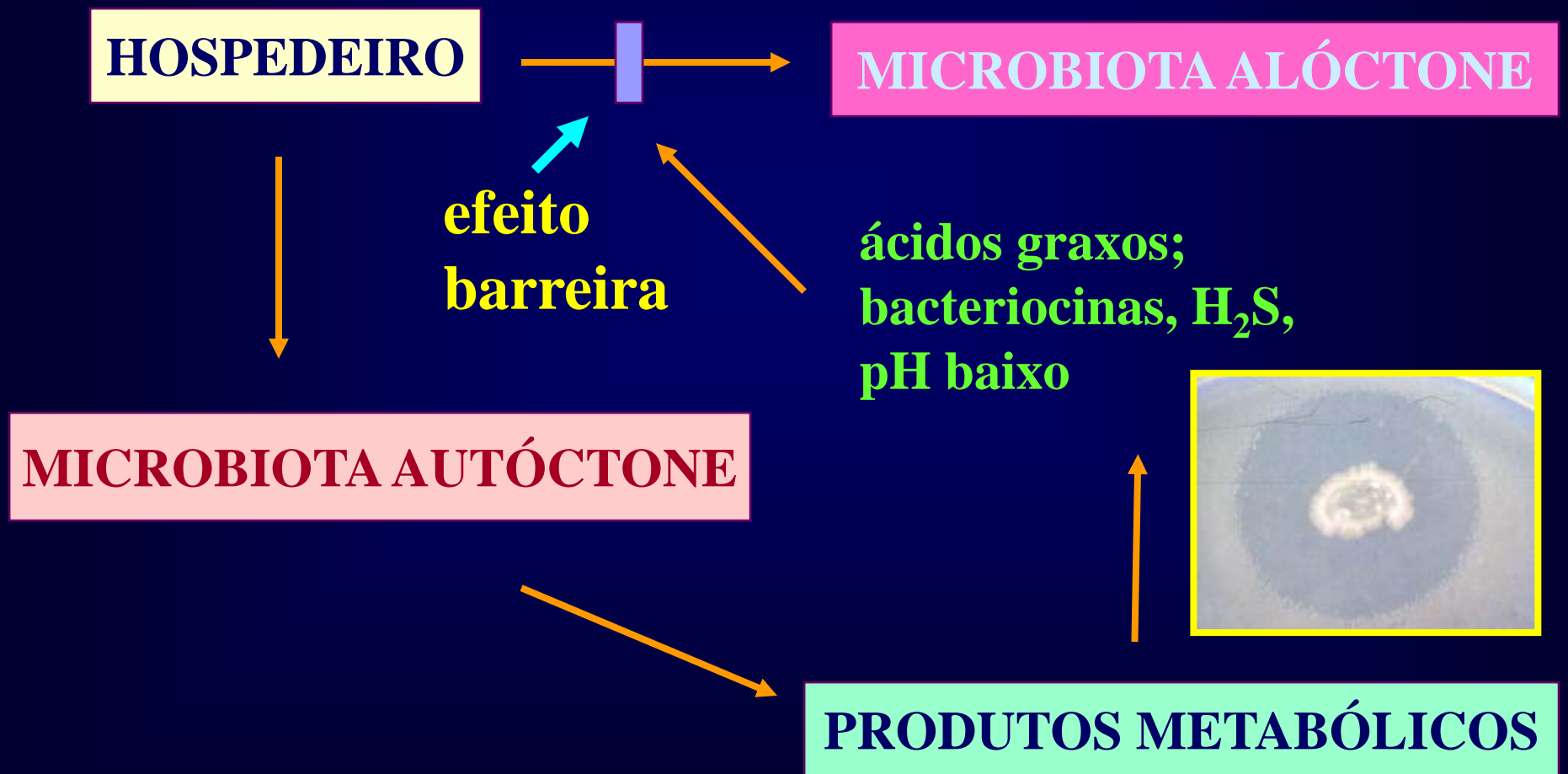
Intermediários do Ciclo de Krebs durante o Crescimento em Anaerobiose de *E. coli*



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



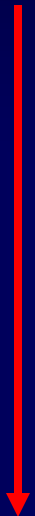
**MICRORGANISMOS
INDÍGENAS**



**HOSPEDEIRO
COMPROMETIDO**



**INFECCÃO
OPORTUNISTA**



**INFECCÃO
ENDÓGENA**

**MICRORGANISMOS
EXÓGENOS**



**PORTADOR
SAUDÁVEL**



**INFECCÃO
EXÓGENA OU
VERDADEIRA**



SUPERINFECCÃO

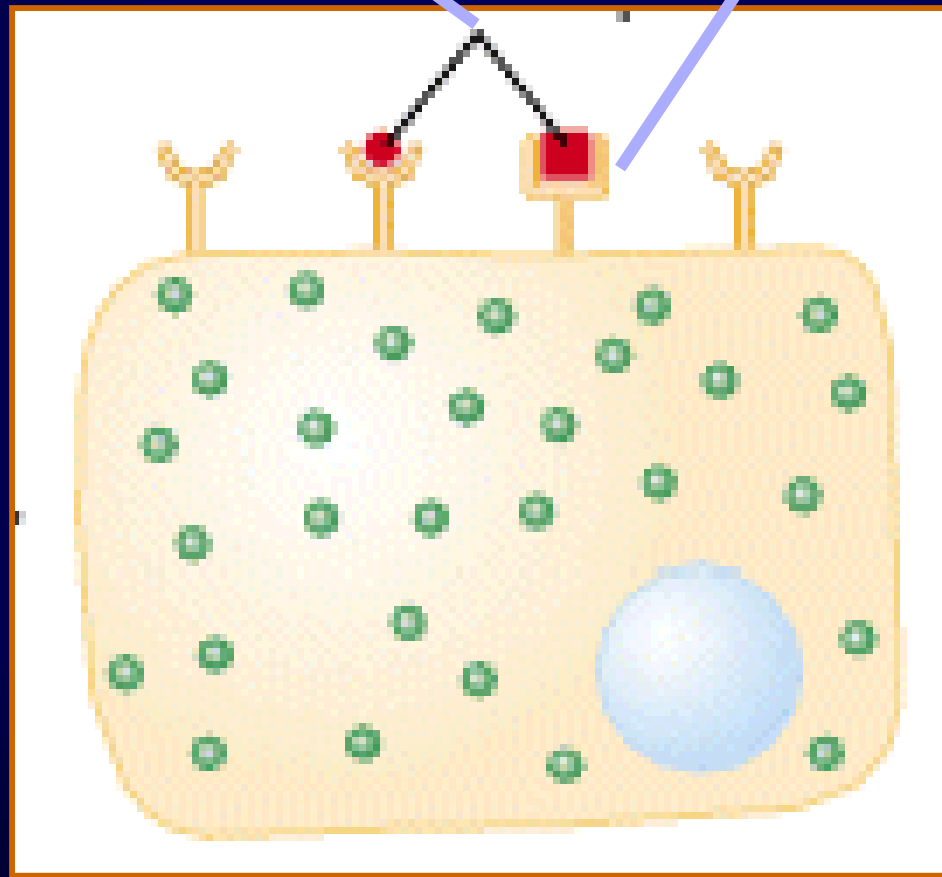
van Winkelhoff et al. (1996)

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.**

Ligantes ou adesinas bacterianas

Receptores do hospedeiro





Biofilme na superfície dental



Composição da Microbiota Anaeróbia Fecal no Homem e Animais

1. *Bacteroides* (10^{11} /g, peso seco fezes)
2. *Eubacterium* (10^{10} /g, p.s.f.)
3. *Peptococcaceae*: *Ruminococcus*, *Coprococcus* e *Peptostreptococcus* (10^9 - 10^{10} /g, p.s.f.)
4. *Bifidobacterium* (10^9 /g, p.s.f.)
5. *Clostridium* (10^8 - 10^9 /g, p.s.f.)
6. Outros: *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Veillonella*, *Butyrivibrio*, *Succinovibrio*, *Succinomonas*, *Selenomonas*, *Anaerovibrio*, *Lachnospira* e *Treponema*.
7. Facultativos: Coliformes, estreptococos e lactobacilos ($< 10^8$ /g, p.s.f.)

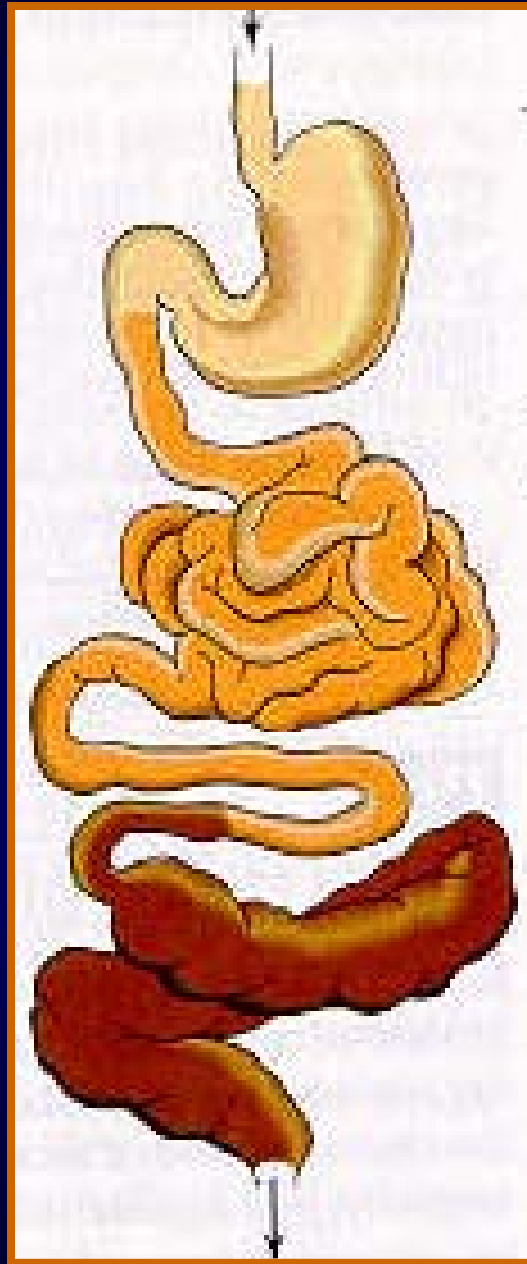
esôfago

Bactérias encontradas

Lactobacillus sp.
(*Helicobacter pylori*)

Enterococcus
Lactobacillus
Bacteroides
Coliformes

Coliformes
Bacteroides



Estômago – pH 2

Intestino delgado – pH 4-5

10^5-10^7

10^8

Intestino grosso – pH 7

10^{11}

ânus

Espécies Gram-negativas anaeróbias indígenas mais comumente isoladas de processos infecciosos

Sítio	Espécie
Fezes	<i>Bacteroides vulgatus</i> ; <i>B. distasonis</i> ; <i>B. thetaiotaomicron</i> ; <i>B. uniformis</i>
Vagina	<i>Prevotella bivia</i> ; <i>P. disiens</i> ; <i>P. melaninogenica</i>
Boca	<i>P. melaninogenica</i> ; <i>P. intermedia</i> ; <i>P. oralis</i> ; <i>F. nucleatum</i>
Outros	<i>B. fragilis</i> ; <i>B. thetaiotaomicron</i> ; <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Bacteroides ureolyticus</i> ; <i>F. necrophorum</i> .

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.



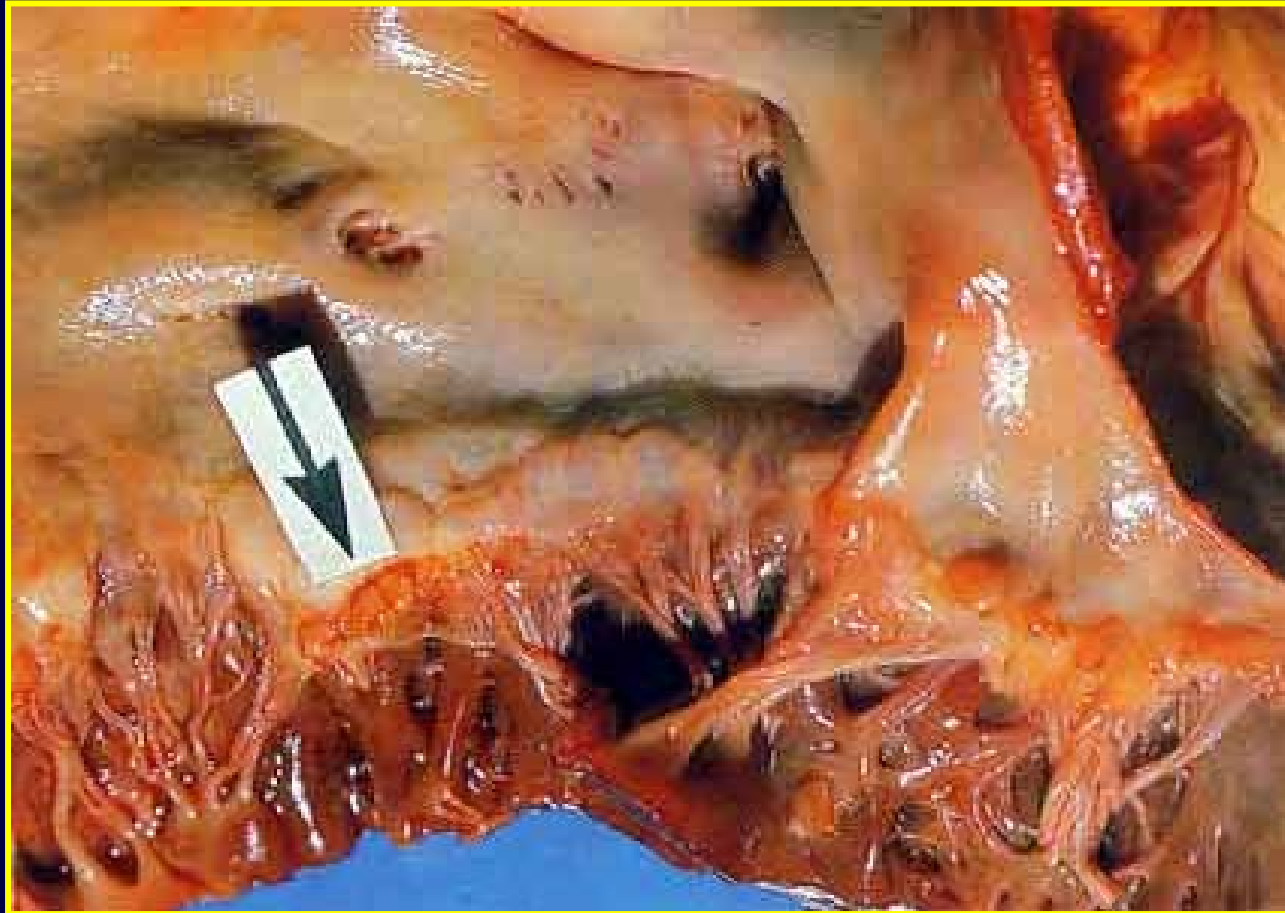
Sistema Nervoso Central e Cabeça: Infecções periodontais, otite média crônica, abscesso cerebral, sinusite crônica.

Tórax: endocardite, bacteremia, abscessos.

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

Participação de anaeróbios em processos infecciosos

Peptococcus spp. e *Peptostreptococcus* spp.



Endocardite

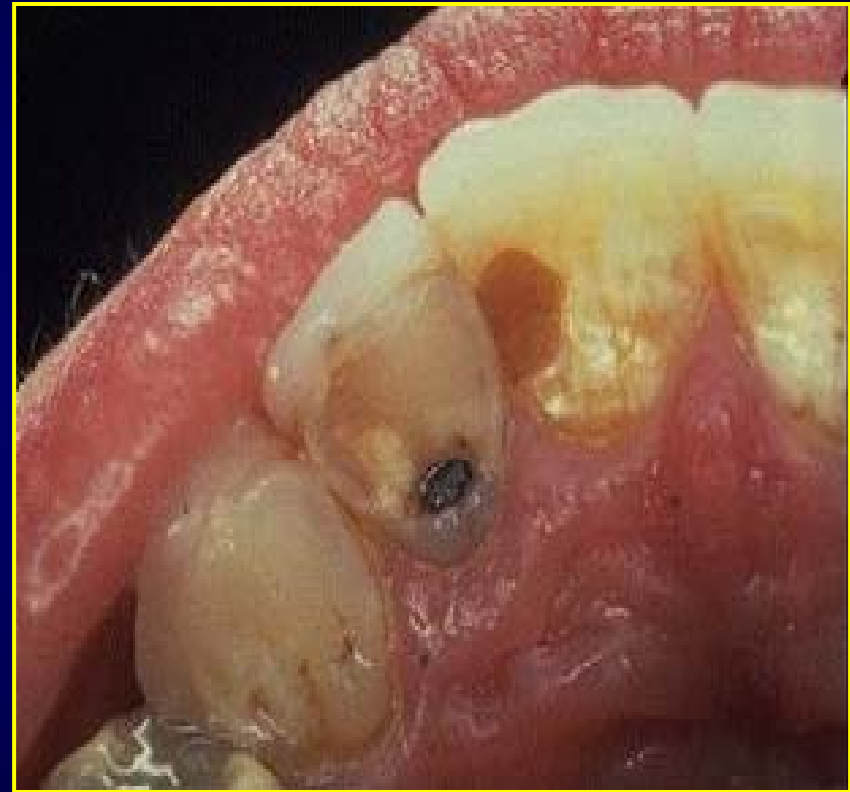
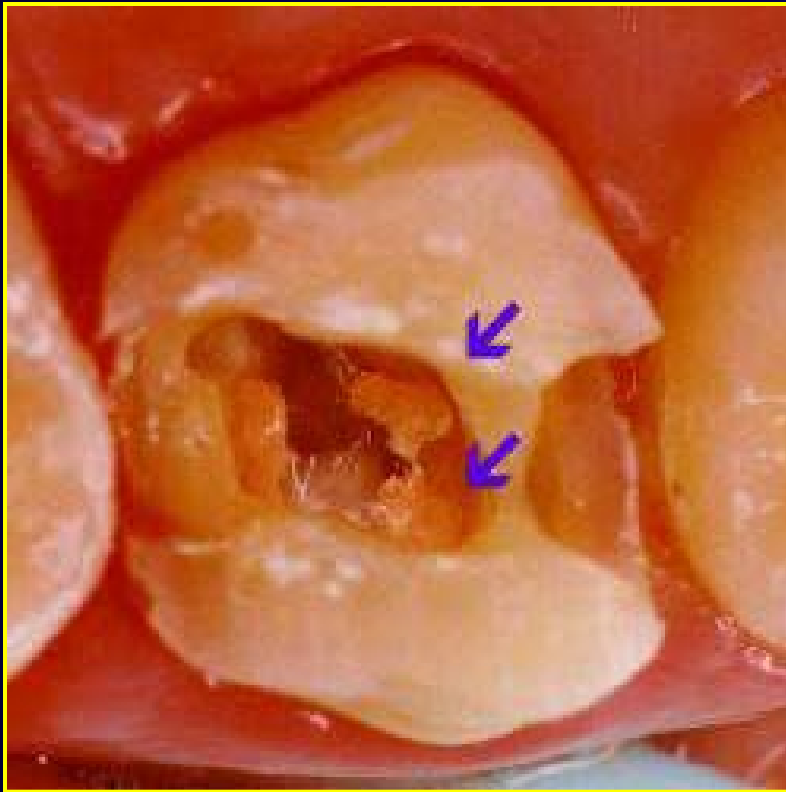


Gengivite
Veillonella spp.



Periodontite
Porphyromonas spp. e
Treponema spp.

Prevotella spp. e *Porphyromonas* spp.



Infecção endodôntica

Bacteroides fragilis

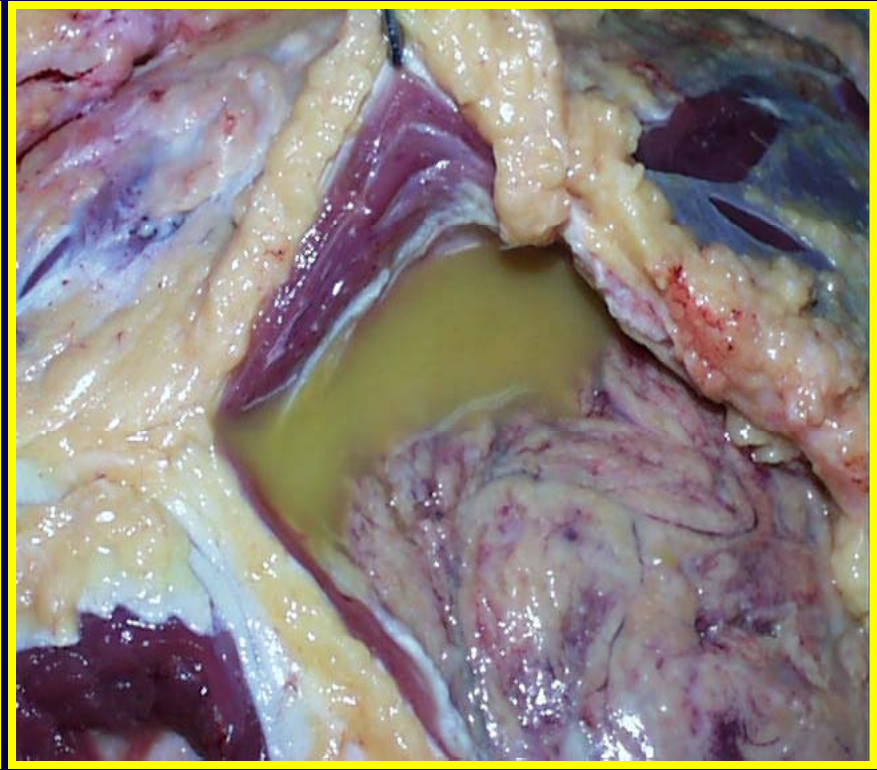
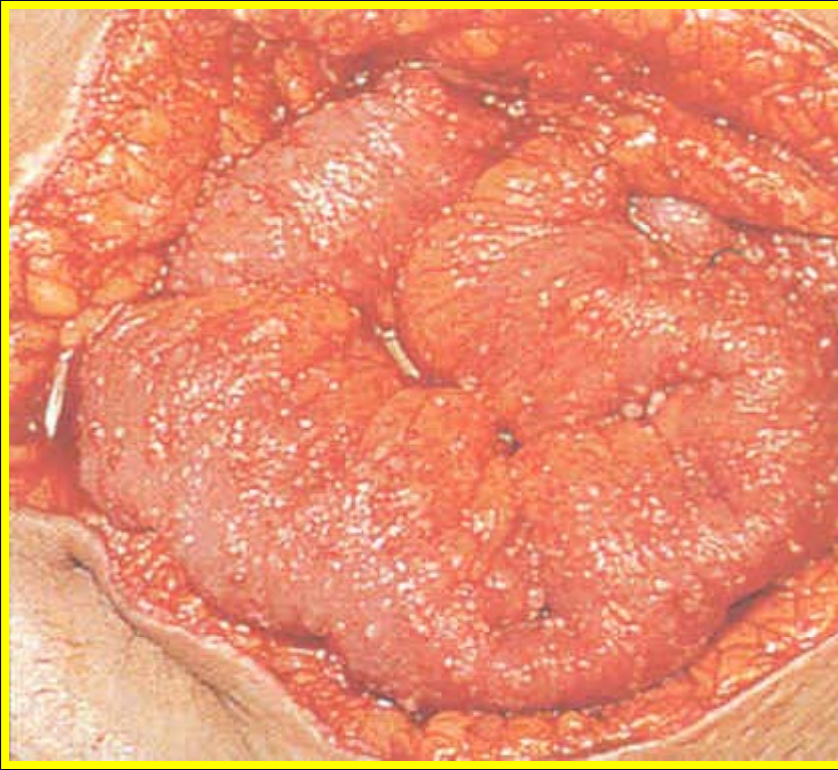


Fascite necrosante



Celulite

Bacteroides fragilis



Peritonite

Bacteroides fragilis



Faringite Aguda



Abscesso hepático



Mico estrela (sagui):
Callithrix penicillata



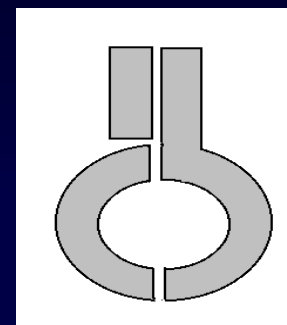
Cão

QUESTÕES

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
LABORATÓRIO DE ANAERÓBIOS



Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

Tel. (11) 3091-7344

E-mail: mariojac@usp.br

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