

# 1 Microrganismos e microbiologia

## microbiologiahoje

### A vida microbiana está presente em todo lugar

Ao embarcar nesta jornada pelo mundo microbiano, você será surpreendido ao descobrir onde os microrganismos vivem na natureza. Em resumo, eles vivem em todo lugar, incluindo locais muito extremos até para a sobrevivência de macro-organismos. Por exemplo, uma equipe de pesquisa que estuda o Lago Vida, nos vales secos McMurdo da Antártida (foto superior), que é permanentemente coberto de gelo, descobriu vida bacteriana imersa em uma solução salina de subcongelamento a  $-13^{\circ}\text{C}$ ! Esses corajosos microrganismos foram descobertos por microbiologistas que usavam roupas protetoras, para prevenir contaminação durante o processo de perfuração (fotos inferiores).

As bactérias do Lago Vida, um grupo metabólico chamado de psicrófilos (expressão que significa “amantes do frio”), demonstraram ser capazes de realizar várias reações metabólicas à temperatura ambiente do seu gélido hábitat natural. Genes específicos isolados de várias bactérias do Lago Vida foram utilizados para classificar os organismos, e estudos futuros de seus respectivos arcabouços genéticos – seus genomas – servirão de auxílio para desvendar os segredos genéticos que possibilitam a esses microrganismos prosperarem no frio constante.

O Lago Vida é incomum até mesmo para os demais lagos da Antártida, uma vez que a sua cobertura de gelo se estende por todo o caminho até a sua porção inferior. A luz do sol, disponível apenas durante seis meses por ano, não consegue penetrar profundamente no lago. Dessa forma, as bactérias do Lago Vida estão metabolizando e se multiplicando, ainda que de maneira extremamente lenta, por meio do carbono orgânico que ficou preso na camada de gelo no momento em que o lago foi selado, há milênios.

Os microbiologistas estudam bactérias de ambientes extremos a fim de desvendarem quais são os limites ambientais para a vida, e para procurar por produtos únicos que podem beneficiar os seres humanos e o planeta. Todavia, além de contribuir para os estudos de ciência básica e aplicada, as bactérias do Lago Vida são modelos para os tipos de formas de vida que poderiam habitar outros mundos gelados como Marte, ou a lua de Júpiter, Europa.

Murray AE, *et al.* 2012. Microbial life at  $-13^{\circ}\text{C}$  in the brine of an ice-sealed Antarctic lake. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 109: 20626–20631.



- I Introdução e temas principais da microbiologia 2
- II A microbiologia no contexto histórico 13

## II • A microbiologia no contexto histórico

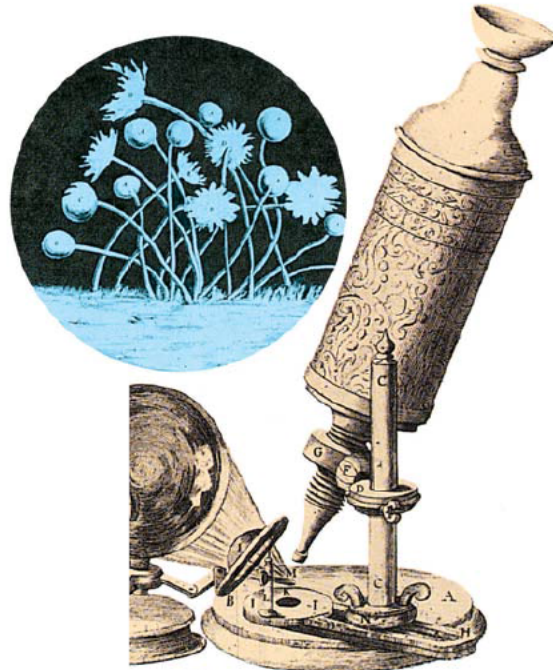
O futuro de qualquer ciência está enraizado em suas realizações passadas. Embora a microbiologia possua raízes muito antigas, a ciência na realidade não se desenvolveu de forma sistemática até o século XIX, devido ao fato de que tecnologias como microscópios e técnicas de cultura precisaram acompanhar a intensa curiosidade científica da época. Nos últimos 150 anos ou mais, a microbiologia avançou de forma sem precedentes sobre qualquer outra ciência biológica e tem gerado vários campos novos na biologia moderna. Serão apresentados alguns destaques da história da microbiologia hoje e descritos alguns dos seus principais contribuintes.

### 1.6 A descoberta dos microrganismos

Embora a existência de criaturas pequenas, invisíveis a olho nu, tenha sido especulada há muitos anos, sua descoberta está associada à invenção do microscópio. O matemático e historiador natural inglês Robert Hooke (1635-1703) era um excelente microscopista. Em seu famoso livro, *Micrographia* (1665), o primeiro livro dedicado às observações microscópicas, Hooke ilustrou, entre vários outros temas, as estruturas de frutificação de bolores (Figura 1.13). Essa foi a primeira descrição conhecida dos microrganismos.

A primeira pessoa a visualizar bactérias, as menores células microbianas, foi o comerciante holandês e microscopista amador Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723). Van Leeuwenhoek construiu microscópios extremamente simples, contendo uma única lente, para examinar o conteúdo microbiano de uma variedade de substâncias naturais (Figura 1.14). Esses microscópios eram rudimentares quando comparados aos padrões atuais, mas por meio da manipulação e focalização precisas, van Leeuwenhoek foi capaz de visualizar bactérias. Ele descobriu as bactérias em 1676 enquanto estudava infusões aquosas de pimenta, e relatou suas observações em uma série de cartas enviadas à influente Royal Society of London, que as publicou em 1684 em uma versão em inglês. Desenhos de alguns dos “pequenos animalculos” de van Leeuwenhoek, como ele se referia, estão ilustrados na Figura 1.14b, e uma foto tirada por um microscópio de van Leeuwenhoek é mostrada na Figura 1.14c.

Como as ferramentas experimentais para o estudo dos microrganismos eram rudimentares nesta época, pouco progresso no entendimento sobre a natureza e importância das bactérias foi feito nos 150 anos seguintes. No entanto, em meados do século XIX, a microbiologia despertou. Um dos principais contribuintes durante este período foi o cientista alemão-polonês Ferdinand Cohn (1828-1898), que especializou-se como botânico, e seus interesses na microscopia o conduziram ao estudo de algas unicelulares e posteriormente de bactérias, incluindo a grande bactéria sulfurosa *Beggiatoa* (Figura 1.15). Cohn estava particularmente interessado na resistência térmica apresentada por bactérias, o que o levou a descobrir que algumas bactérias formam *endósporos*. Atualmente, sabe-se que os endósporos bacterianos são formados por diferenciação da célula-mãe (vegetativa) e são estruturas extremamente resistentes ao calor. Cohn descreveu o ciclo de vida da bactéria formadora de endósporos *Bacillus* (célula vegetativa → endósporo → célula vegetativa) e descobriu que as



**Figura 1.13** Robert Hooke e um microscópio antigo. Ilustração do microscópio utilizado por Robert Hooke em 1664. As lentes objetivas eram adaptadas na extremidade de um fole ajustável (G), com a iluminação focalizada no espécime a partir de uma lente separada (1). Detalhe: o desenho de Robert Hooke de um bolor azulado que ele encontrou degradando uma superfície de couro; as estruturas arredondadas contêm os esporos do bolor.

células vegetativas de *Bacillus*, mas não seus endósporos, eram mortas pela água em ebulição.

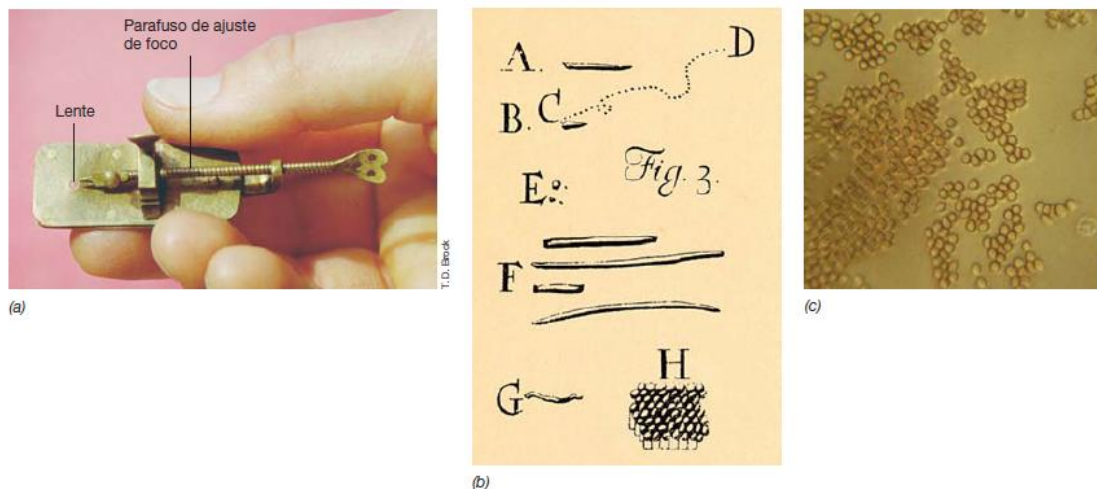
Cohn também introduziu os fundamentos para um sistema de classificação bacteriana e desenvolveu muitos métodos altamente eficazes para prevenir a contaminação de meios de cultura, como a utilização de algodão para fechar os frascos e tubos. Esses métodos foram posteriormente adotados por Robert Koch, o primeiro microbiologista médico, e o permitiram progredir rapidamente no isolamento e na caracterização de várias bactérias causadoras de doenças. Cohn também foi um contemporâneo de Louis Pasteur, e consideraremos as contribuições de Pasteur e Koch nas próximas duas seções.

#### MINIQUESTIONÁRIO

- O que impediu o desenvolvimento da ciência da microbiologia antes da era de Hooke e van Leeuwenhoek?
- Qual descoberta importante surgiu a partir dos estudos de Cohn sobre a resistência térmica dos microrganismos?

### 1.7 Pasteur e a geração espontânea

Grandes avanços em microbiologia foram feitos no século XIX devido ao interesse em duas questões principais da época: (1) a geração espontânea acontece? E, (2) qual é a natureza das doenças infecciosas? As respostas para essas perguntas surgiram



**Figura 1.14** O microscópio de van Leeuwenhoek. (a) Uma réplica do microscópio de Antoni van Leeuwenhoek. (b) Desenhos de van Leeuwenhoek representando bactérias, publicados em 1684. Mesmo a partir desses desenhos relativamente rudimentares, pode-se reconhecer vários tipos morfológi-

cos de bactérias comuns: A, C, F e G, bactérias em forma de bastonete; E, em forma esférica ou de cocos; H, grupos de cocos. (c) Fotomicrografia de um esfregaço de sangue humano tirada por meio de um microscópio de van Leeuwenhoek. As hemácias estão claramente aparentes.

a partir do trabalho de dois gigantes no até então novo campo da microbiologia: o químico francês Louis Pasteur e o médico alemão Robert Koch. Começaremos com o trabalho de Pasteur.

### Isômeros ópticos e fermentações

Pasteur especializou-se em química e foi um dos primeiros cientistas a reconhecer a importância dos *isômeros ópticos*. Uma molécula é opticamente ativa se uma solução pura, ou um cristal da molécula, desvia a luz em uma única direção. Pasteur estudou os cristais de ácido tartárico que separou manualmente naqueles que desviam um feixe de luz polarizada para a esquerda e naqueles que desviam o feixe para a direita.



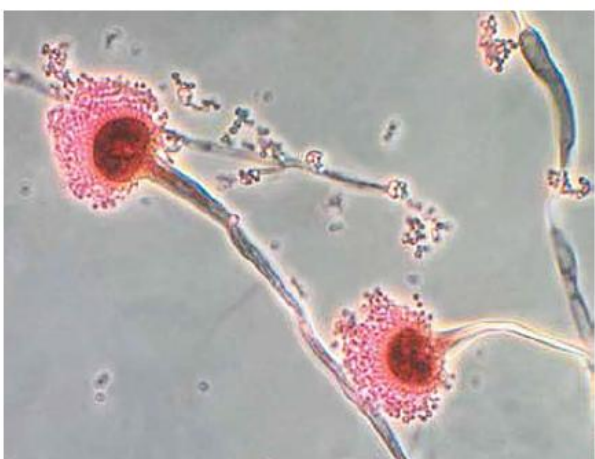
**Figura 1.15** Desenho feito por Ferdinand Cohn da grande bactéria filamentososa oxidante de enxofre, *Beggiatoa*. Os pequenos grânulos no interior da célula consistem em enxofre elementar, produzido a partir da oxidação do sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). Cohn foi o primeiro a identificar os grânulos de enxofre, em 1866. Uma célula de *Beggiatoa* apresenta cerca de  $15 \mu m$  de diâmetro. A *Beggiatoa* se locomove sobre superfícies sólidas por um mecanismo de deslizamento, e, fazendo isso, as células frequentemente se torcem umas sobre as outras. Compare esta ilustração de *Beggiatoa* com aquelas feitas por Winogradsky, na Figura 1.24b.

Pasteur descobriu que o bolor *Aspergillus* metaboliza o D-tartarato, que desvia o feixe de luz para a direita, mas não metaboliza o seu isômero óptico L-tartarato (Figura 1.16). O fato de que um organismo vivo poderia discriminar entre os isômeros ópticos não passou despercebido por Pasteur, e ele começou a suspeitar que algumas atividades químicas seriam realmente catalisadas por microrganismos, e que essas poderiam ser distintas de reações puramente químicas.

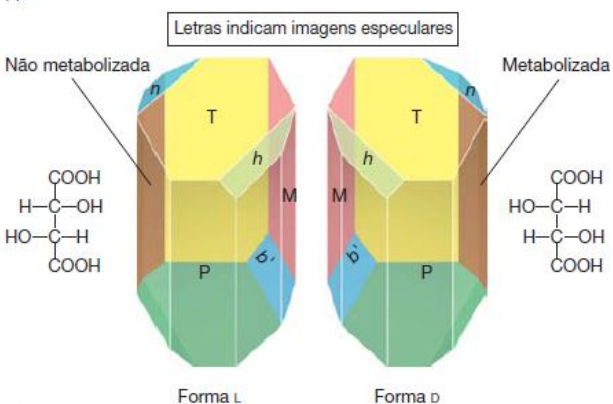
Pasteur iniciou estudos sobre o mecanismo de fermentação alcoólica, que em meados do século XIX era considerado um processo exclusivamente químico. As células de levedura presentes no caldo em fermentação correspondiam a um determinado tipo de substância química formada pelo processo de fermentação. No entanto, observações microscópicas e outros experimentos simples, porém rigorosos, convenceram Pasteur de que a fermentação alcoólica era catalisada por microrganismos vivos, as células de levedura. A partir desses estudos fundamentais, Pasteur iniciou uma série de experimentos clássicos abordando a geração espontânea, experimentos esses que serão eternamente vinculados a seu nome e à ciência da microbiologia.

### Geração espontânea

O conceito de *geração espontânea* existe desde os tempos bíblicos, e seu princípio básico pode ser facilmente compreendido. Se um alimento ou algum outro produto perecível for deixado de lado por algum tempo, apodrecerá. Quando examinado microscopicamente, o material putrefato estará repleto de microrganismos. De onde surgiram esses organismos? Algumas pessoas afirmavam que eles se desenvolveram a partir de sementes ou germes que penetraram no alimento pelo ar. Outras diziam que eles surgiram espontaneamente, a partir de matérias inanimadas, isto é, por *geração espontânea*. Quem estava correto? Essa controvérsia requeria uma percepção aguçada para sua solução, e este foi exatamente o tipo de problema que atraiu o interesse de Louis Pasteur.



(a)



(b)

**Figura 1.16** Louis Pasteur e os isômeros ópticos. (a) Micrografia óptica de células do bolor *Aspergillus*. (b) Ilustrações de Pasteur de cristais de ácido tartárico. Cristais levógiros (formas L) desviam a luz para a esquerda, e cristais dextrógiros (formas D) desviam a luz para a direita. Observe que os dois cristais correspondem a imagens especulares um do outro, uma marca de isômeros ópticos. Pasteur descobriu que apenas D-Tartarato foi metabolizado pelo *Aspergillus*.

Pasteur se tornou um oponente poderoso à teoria da geração espontânea. Após suas descobertas sobre o ácido tartárico e a fermentação alcoólica, Pasteur previu inicialmente que microrganismos em materiais putrefatos eram descendentes de células que entraram a partir do ar, ou de células que estariam depositadas em materiais em decomposição. Pasteur considerou que, se o alimento fosse tratado de modo a destruir todos os organismos vivos presentes – isto é, se fosse tornado **estéril** – e então protegido da contaminação adicional, ele não apodreceria.

Pasteur utilizou o calor para eliminar os microrganismos contaminantes e descobriu que o aquecimento extensivo de uma solução nutriente, seguido pela sua vedação, impediria que a mesma entrasse em putrefação. Os defensores da geração espontânea criticavam esses experimentos declarando que o “ar fresco” era necessário para a ocorrência do fenômeno. Em 1864, Pasteur contestou esta objeção de forma simples e brilhante, ao construir um frasco com pescoço de cisne, atualmente denominado *frasco de Pasteur* (Figura 1.17). Nesse

tipo de frasco, as soluções nutrientes podiam ser aquecidas até a ebulição, e, então, esterilizadas. No entanto, após o resfriamento do frasco, a reentrada de ar era permitida, porém as curvas no gargalo (o formato em “pescoço de cisne”) impediam a entrada de matéria particulada (incluindo microrganismos) na solução nutriente, o que causaria a putrefação. As soluções nutrientes presentes em tais frascos permaneciam estéreis indefinidamente.

O crescimento microbiano foi observado apenas após a matéria particulada do gargalo do frasco entrar em contato com o líquido no interior deste (Figura 1.17c), finalizando a controvérsia da geração espontânea para sempre. O trabalho de Pasteur sobre geração espontânea levou naturalmente ao desenvolvimento de procedimentos eficientes de esterilização, os quais foram eventualmente padronizados e estendidos às pesquisas microbiológicas, tanto básicas quanto aplicadas, bem como para a medicina clínica. A indústria alimentícia também se beneficiou do trabalho de Pasteur, uma vez que seus princípios foram rapidamente adaptados para a preservação do leite e muitos outros alimentos por tratamento térmico (pasteurização).

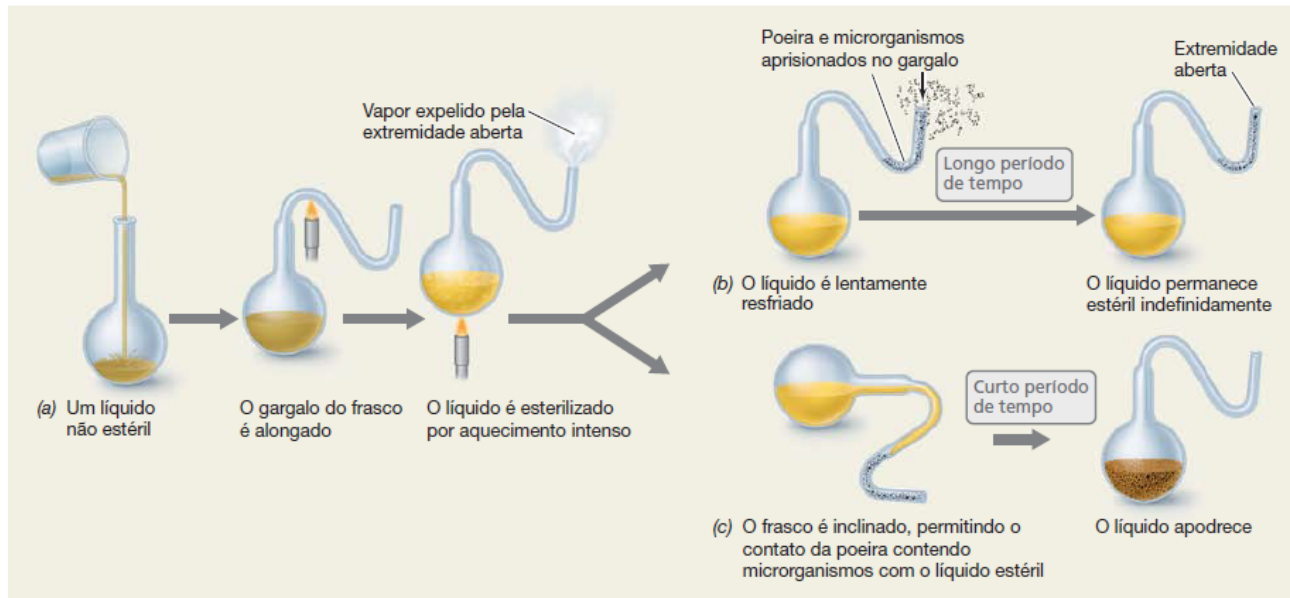
### Outras realizações de Louis Pasteur

Pasteur passou de seu famoso trabalho sobre a geração espontânea para muitos outros triunfos na microbiologia e medicina. Alguns destaques incluem o desenvolvimento de vacinas contra as doenças antraz, cólera aviária e raiva. O trabalho de Pasteur envolvendo a raiva foi seu êxito mais famoso, culminando em julho de 1885, com a primeira administração de uma vacina antirrábica em um ser humano, um jovem rapaz francês, Joseph Meister, que havia sido mordido por um cão raivoso. Naquela época, a mordida de um animal raivoso era invariavelmente fatal. A notícia sobre o sucesso da vacinação de Meister, e de uma administração pouco depois a um jovem pastor, Jean-Baptiste Jupille, se espalhou rapidamente (Figura 1.18a). No decorrer de um ano, milhares de pessoas mordidas por animais raivosos viajaram a Paris para serem tratadas com a vacina antirrábica de Pasteur.

A fama de Pasteur decorrente de sua pesquisa sobre a raiva foi legendaria, e levou o governo francês a construir o Instituto Pasteur, em Paris, em 1888 (Figura 1.18b). Originalmente concebido como um centro clínico para tratamento da raiva e de outras doenças contagiosas, o Instituto Pasteur é, atualmente, o principal centro de pesquisa biomédica voltado à pesquisa e produção de antisséptico e vacinas. As descobertas de Pasteur na medicina e na veterinária não foram importantes apenas por si só, mas também auxiliaram a solidificar o conceito da teoria que associava os germes às doenças, cujos princípios estavam sendo desenvolvidos nesse mesmo período por um segundo gigante dessa era, Robert Koch.

### MINIQUESTIONÁRIO

- Defina o termo estéril. Como o experimento com o frasco com pescoço de cisne de Pasteur demonstrou que o conceito de geração espontânea era inválido?
- Além de acabar com as controvérsias sobre a geração espontânea, que outras realizações podem ser creditadas a Pasteur?



**Figura 1.17** Derrota da geração espontânea: o experimento de Pasteur empregando o frasco com pescoço de cisne. Em (c) o líquido apodrece porque os microrganismos entram com a poeira. A curvatura da garrafa

permitiu a entrada de ar (uma objeção fundamental dos frascos selados de Pasteur), mas impediu a entrada de microrganismos.

## 1.8 Koch, doença infecciosa e culturas puras

A comprovação de que alguns microrganismos causam doenças foi o maior impulso no desenvolvimento da ciência da microbiologia como uma ciência biológica independente. Já no século XVI, acreditava-se que algo que causasse uma doença poderia ser transmitido de um indivíduo doente a um indivíduo sadio. Após a descoberta dos microrganismos, acreditava-se amplamente que eles eram os responsáveis, embora faltasse uma prova definitiva. Melhorias nas medidas sanitárias promovidas pelo médico húngaro Ignaz Semmelweis (tentativa de controlar as infecções associadas aos hospitais, 1847) e pelo médico britânico Joseph Lister (introdução de técnicas assépticas para cirurgias, 1867) forneceram evidências indiretas da importância dos microrganismos como agentes causadores de doenças humanas. Porém, somente após os trabalhos de um médico alemão, Robert Koch (1843-1910) (Figura 1.19), que o conceito de doenças infecciosas foi desenvolvido e recebeu uma fundamentação experimental direta.

### A teoria do germe da doença e os postulados de Koch

Em seu trabalho inicial, Koch estudou o antraz, uma doença do gado e, ocasionalmente, de seres humanos. O antraz é causado por uma bactéria formadora de endósporos, denominada *Bacillus anthracis*. A partir de análises microscópicas cuidadosas e utilizando corantes especiais, Koch verificou que as bactérias sempre se encontravam presentes no sangue de um animal que estava morrendo da doença. Entretanto, Koch ponderou que a mera *associação* da bactéria com a doença não era prova real de *causa e efeito*, assim, Koch aproveitou a oportu-

nidade para estudar a causa e o efeito experimentalmente, usando antraz e animais de laboratório. Os resultados desses estudos geraram o padrão a partir do qual as doenças infecciosas têm sido estudadas desde então.

Koch utilizou camundongos como animais experimentais. Empregando todos os controles apropriados, Koch demonstrou que, quando uma pequena quantidade de sangue de um camundongo doente era injetada em um camundongo sadio, este último rapidamente desenvolvia o antraz. Ele coletou sangue deste segundo animal e, após injetá-lo em outro, novamente verificou os sintomas característicos da doença. No entanto, Koch introduziu uma etapa adicional a esse experimento, a qual teve importância fundamental. Ele descobriu que as bactérias do antraz podiam ser cultivadas em fluidos nutrientes *fora do corpo do animal* e que, mesmo após várias transferências em meio de cultura laboratorial, as bactérias ainda causavam a doença quando inoculadas em um animal sadio.

Com base nesses experimentos e em experimentos relacionados com o agente causador da tuberculose, Koch formulou um conjunto de critérios rigorosos, atualmente conhecidos como **postulados de Koch**, para associar definitivamente causa e efeito em uma doença infecciosa. Os postulados de Koch, resumidos na Figura 1.20, salientaram a importância da *cultura laboratorial* do provável agente infeccioso, seguida pela introdução do agente suspeito em animais sadios, e a então recuperação do patógeno dos animais doentes ou mortos. Utilizando esses postulados como guia, Koch, seus alunos, e aqueles que os seguiram descobriram os agentes causadores da maioria das doenças infecciosas importantes de seres humanos e de animais domésticos. Essas descobertas também levaram ao desenvolvimento de tratamentos eficazes para a prevenção e cura de várias dessas



(a)



(b)

**Figura 1.18** Louis Pasteur e os símbolos de suas contribuições à microbiologia. (a) Uma cédula de cinco francos franceses em homenagem a Pasteur. O menino pastor, Jean-Baptiste Jupille, é ilustrado afugentando um cão raivoso que havia atacado um grupo de crianças. A vacina antirrábica de Pasteur salvou a vida de Jupille. Na França, o franco precedeu o euro como moeda. (b) Parte do Pasteur Institute, Paris, França. Atualmente, essa estrutura, construída para Pasteur pelo governo francês, abriga um museu onde estão expostos alguns dos frascos com pescoço de cisne originais utilizados em seus experimentos e uma capela contendo a cripta de Pasteur.

doenças, trazendo, assim, grande avanço às bases científicas da medicina clínica e à saúde e ao bem-estar dos seres humanos (Figura 1.8).

A era da genômica moderna também teve sua influência na questão da causa e efeito das doenças infecciosas por meio do desenvolvimento de métodos moleculares para a identificação de potenciais patógenos. Pela utilização desses métodos, um patógeno pode ser identificado mesmo se não puder ser cultivado, ou até mesmo se o próprio patógeno já estiver morto há muito tempo (ver Explore o mundo microbiano, “A Peste Negra decifrada”). Esses métodos têm revolucionado o diagnóstico e o tratamento das doenças infecciosas.

### Koch, culturas puras e taxonomia microbiana

O segundo postulado de Koch afirma que um patógeno suspeito deve ser isolado e crescido longe de outros microrganismos em uma cultura laboratorial (Figura 1.20); em microbiologia, se diz que tal tipo de cultura é *pura*. Para atingir esse importante objetivo, Koch e seus associados desenvolveram



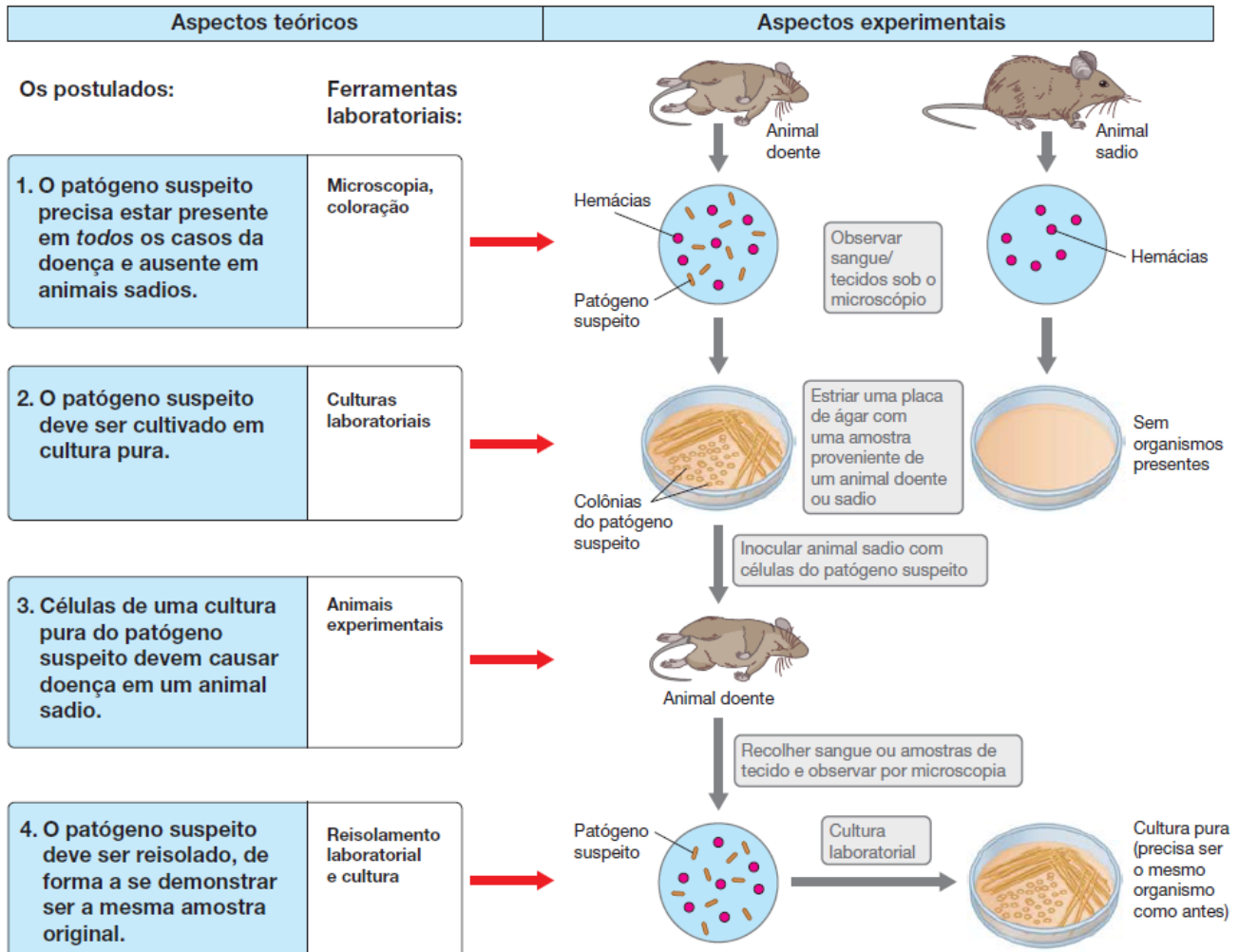
**Figura 1.19** Robert Koch. O médico microbiologista alemão recebe os créditos por fundar a microbiologia médica e formular seus famosos postulados.

uma série de métodos simples, mas engenhosos, para obtenção e crescimento de bactérias em **culturas puras**, e muitos desses métodos são utilizados até hoje.

Koch iniciou seus trabalhos utilizando superfícies naturais, como uma fatia de batata, para a obtenção de culturas puras, entretanto, rapidamente desenvolveu meios de cultura mais confiáveis e reproduzíveis utilizando soluções nutrientes líquidas solidificadas com gelatina, e posteriormente com ágar, um polissacarídeo de algas com excelentes propriedades para esses fins. Junto com seu colega Walther Hesse, Koch observou que, quando uma superfície sólida era incubada exposta ao ar, massas de células bacterianas, chamadas de *colônias*, se desenvolviam, cada uma exibindo cores e formas características (Figura 1.21). Ele deduziu que cada colônia teria surgido a partir de uma única célula bacteriana que cresceu, e assim uma massa de células foi obtida. Koch argumentou que cada colônia correspondia a uma população de células idênticas ou, em outras palavras, a uma *cultura pura*, e Koch rapidamente percebeu que meios sólidos forneciam uma maneira fácil de obtenção de culturas puras. Richard Petri, outro associado de Koch, desenvolveu as placas transparentes de dupla face chamadas de “placas de Petri” em 1887, e esta se tornou rapidamente a ferramenta-padrão para obtenção de culturas puras.

Koch estava consciente das implicações que seus métodos para a obtenção de culturas puras apresentavam no estudo da

## OS POSTULADOS DE KOCH



**Figura 1.20** Postulados de Koch para provar a causa e o efeito em doenças infecciosas. Observe que após o isolamento do patógeno suspeito em uma cultura pura, uma cultura laboratorial do organismo deve ser capaz

tanto de iniciar a doença quanto de ser recuperada do animal doente. O estabelecimento das condições corretas para o cultivo do patógeno é essencial, pois, do contrário, este será perdido.

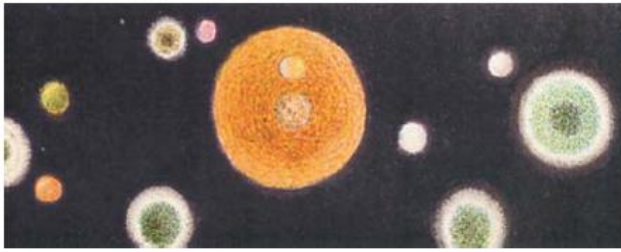
sistemática microbiana. Ele observou que colônias que diferiam na coloração e tamanho (Figura 1.21) eram puras e que estas células de diferentes colônias normalmente diferiam em tamanho e morfologia e, muito frequentemente, também em suas necessidades nutricionais. Koch percebeu que essas diferenças eram equivalentes aos critérios taxonômicos para a classificação de organismos superiores, como espécies de plantas e animais, e sugeriu que os diferentes tipos de bactérias deveriam ser considerados como “espécies, variedades, formas ou outra designação apropriada”. Essa observação criteriosa foi importante na aceitação relativamente rápida da microbiologia como uma ciência biológica independente, enraizada, assim como a biologia estava na classificação durante a era de Koch.

### Koch e a tuberculose

A realização científica que coroou Koch foi a sua descoberta do agente causador da tuberculose. Quando Koch iniciou esse

trabalho (1881), um sétimo de todas as mortes humanas notificadas era causado pela tuberculose (Figura 1.8). Havia uma grande suspeita de que a tuberculose era uma doença contagiosa, porém seu agente etiológico nunca havia sido detectado, nem em tecidos doentes, nem em meios de cultura. Após seus estudos bem-sucedidos de antraz, Koch estava determinado a demonstrar o agente causador da tuberculose e, para isso, empregou todos os métodos que havia cuidadosamente desenvolvido em seus estudos anteriores com o antraz: microscopia, coloração, isolamento em cultura pura e um sistema de modelo animal (Figura 1.20).

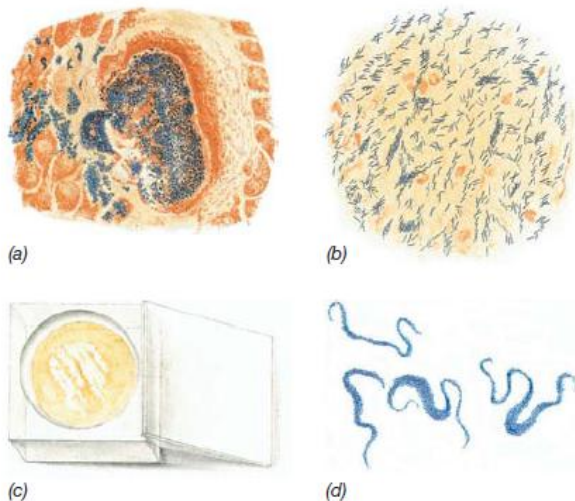
A bactéria causadora da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, é de difícil coloração devido ao fato de que as células de *M. tuberculosis* apresentam grandes quantidades de um lipídeo céreo em sua parede celular. Entretanto, Koch desenvolveu uma metodologia de coloração para as células de *M. tuberculosis* em amostras de tecidos pulmonares. Com esse método, ele observou as células azuis em forma de bastonetes de



**Figura 1.21** Fotografia colorida à mão, feita por Walther Hesse, de colônias formadas em ágar. As colônias incluem os bores e bactérias obtidas durante os estudos de Hesse, do teor microbiano do ar em Berlim, Alemanha, em 1882. De Hesse W. 1884. "Ueber quantitative Bestimmung der in der Luft enthaltenen Mikroorganismen". *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*. 2: 182–207.

*M. tuberculosis* nos tecidos tuberculosos, mas não em tecidos saudáveis (Figura 1.22). A obtenção de culturas de *M. tuberculosis* não foi uma tarefa simples, mas, finalmente, Koch obteve sucesso no desenvolvimento de colônias desse organismo em uma solução nutriente solidificada contendo soro. Nas melhores condições, *M. tuberculosis* cresce lentamente em cultura, porém a persistência e paciência de Koch eventualmente o levaram à obtenção de culturas puras desse organismo, a partir de fontes humanas e animais.

A partir disso, Koch utilizou dos seus postulados (Figura 1.20) para obter a prova definitiva de que o organismo que ele havia isolado correspondia à verdadeira causa da tuberculose. Cobaias podem ser facilmente infectadas com *M. tuberculosis* e, ocasionalmente, morrem de tuberculose sistêmica. Koch demonstrou que as cobaias doentes



**Figura 1.22** Desenhos de *Mycobacterium tuberculosis* feitos por Robert Koch. (a) Secção de tecido pulmonar infectado mostrando células de *M. tuberculosis* (em azul). (b) Células de *M. tuberculosis* em uma amostra de escarro obtida de um paciente com tuberculose. (c) Crescimento de *M. tuberculosis* em uma placa de vidro contendo soro coagulado, armazenado no interior de uma caixa de vidro para prevenir a contaminação. (d) Células de *M. tuberculosis* retiradas da placa (c) e observadas microscopicamente; as células aparecem como formas longas, semelhantes a cordas. Desenhos originais de Koch, R. 1884. "Die Aetiologie der Tuberkulose." *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* 2: 1-88.

apresentavam massas de células de *M. tuberculosis* em seus tecidos pulmonares, e que culturas puras obtidas a partir desses animais transmitiam a doença a animais não infectados. Dessa forma, Koch satisfaz plenamente seus quatro postulados e a causa da tuberculose foi então compreendida. Koch anunciou sua descoberta da causa da tuberculose em 1882, e por essa realização ele foi premiado em 1905 com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. Koch teve muitos outros triunfos no campo crescente das doenças infecciosas, incluindo a descoberta do agente causador da cólera (a bactéria *Vibrio cholerae*), e o desenvolvimento de métodos para diagnóstico da infecção por *M. tuberculosis* (o teste cutâneo da tuberculina).

#### MINIQUESTIONÁRIO

- Como os postulados de Koch asseguram que a causa e o efeito de uma determinada doença são claramente diferenciados?
- Quais vantagens o meio sólido oferece para o isolamento de microrganismos?
- O que é uma cultura pura?

## 1.9 A ascensão da diversidade microbiana

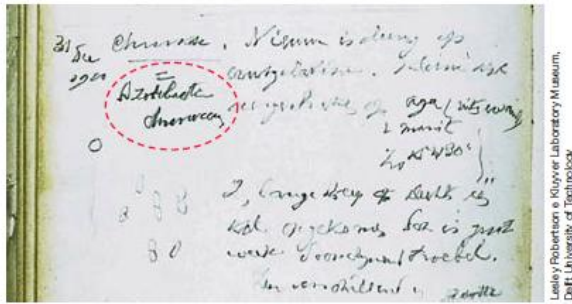
Com o avanço da microbiologia no século XX, o seu foco inicial nos princípios básicos, métodos e aspectos médicos foi ampliado, passando a incluir estudos sobre a diversidade microbiana do solo e da água, bem como dos processos metabólicos realizados pelos organismos nesses habitats. Os principais contribuintes dessa era foram o holandês Martinus Beijerinck e o russo Sergei Winogradsky.

### Martinus Beijerinck e a técnica de cultura de enriquecimento

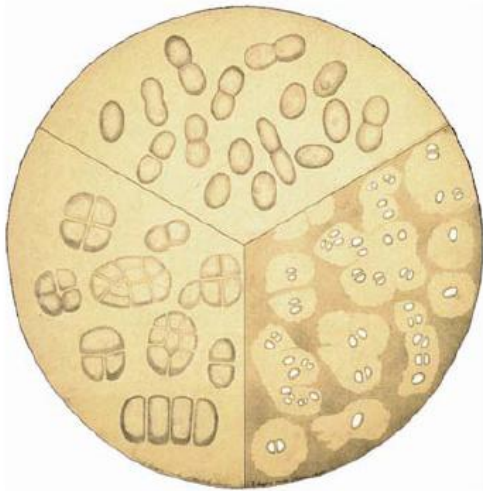
Martinus Beijerinck (1851–1931) era um professor na Delft Polytechnic School, na Holanda, especializou-se inicialmente em botânica, tendo começado sua carreira na microbiologia com o estudo das plantas. A maior contribuição de Beijerinck à microbiologia foi sua clara formulação do conceito da técnica de cultura de enriquecimento. Nas culturas de enriquecimento, os microrganismos são isolados a partir de amostras naturais, utilizando nutrientes e condições de incubação altamente seletivas para favorecer um grupo metabólico particular de organismos. A técnica de Beijerinck com o método de enriquecimento foi prontamente demonstrada quando, após a descoberta de Winogradsky do processo de fixação de nitrogênio, ele isolou a bactéria aeróbia fixadora de nitrogênio *Azotobacter* do solo (Figura 1.23). Bactérias fixadoras de nitrogênio podem utilizar nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) para a produção de substâncias nitrogenadas importantes na célula, como os aminoácidos para a produção de proteínas e os nucleotídeos para a produção de ácidos nucleicos.

A partir do uso da técnica de culturas de enriquecimento, Beijerinck isolou as primeiras culturas puras de muitos microrganismos terrestres e aquáticos, incluindo bactérias redutoras de sulfato e oxidantes de enxofre, bactérias fixadoras de nitrogênio presentes nos nódulos radiculares (Figura 1.9), bactérias produtoras de ácido láctico, algas verdes, várias bactérias anaeróbias, e muitos outros microrganismos. Além disso, em seus estudos sobre a doença do mosaico do tabaco,





(a)



(b)

**Figura 1.23** Martinus Beijerinck e *Azotobacter*. (a) Parte de uma página do protocolo de laboratório de M. Beijerinck, datado de 31 de dezembro de 1900, descrevendo suas observações sobre a bactéria aeróbia fixadora de nitrogênio, *Azotobacter chroococcum* (nome assinalado pelo círculo vermelho). Compare os desenhos de Beijerinck dos pares de células de *A. chroococcum* com a fotomicrografia de células de *Azotobacter*, apresentada na Figura 14.32. (b) Uma pintura feita pela irmã de M. Beijerinck, Henriëtte Beijerinck, mostrando células de *Azotobacter chroococcum*. Beijerinck utilizou essas pinturas para ilustrar suas aulas.

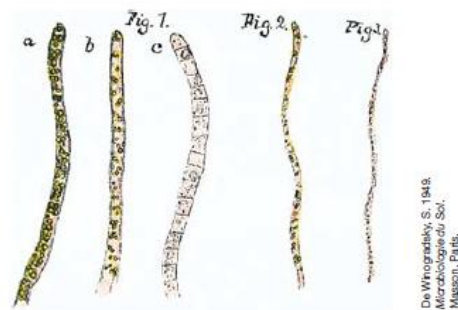
Beijerinck utilizou filtros seletivos para demonstrar que o agente infeccioso nesta doença (um vírus) era menor do que uma bactéria e que, de alguma forma, ele incorporava-se às células da planta hospedeira viva. Nesse importante trabalho, Beijerinck não somente descreveu o primeiro vírus, mas também os princípios básicos da virologia, os quais serão apresentados no Capítulo 8.

**Sergei Winogradsky, quimiolitotrofia e fixação de nitrogênio**

Assim como Beijerinck, Sergei Winogradsky (1856–1953) estava interessado na diversidade bacteriana dos solos e das águas, obtendo grande sucesso no isolamento de várias bactérias de importância a partir de amostras naturais. Winogradsky estava particularmente interessado nas bactérias que realizavam os ciclos de compostos nitrogenados e sulfurosos, como bactérias nitrificantes e bactérias sulfurosas (Figura 1.24). Ele demonstrou que essas bactérias catalisam transformações químicas específicas na natureza, e propôs o importante conceito de quimioli-



(a)



(b)

**Figura 1.24** Bactéria sulfurosa. Os desenhos originais foram feitos por Sergei Winogradsky no final de 1880, posteriormente copiados e coloridos à mão por sua esposa Hélène. (a) Bactéria fototrófica púrpura sulfurosa. As Figuras 3 e 4 mostram células de *Chromatium okenii* (compare com as fotomicrografias de *C. okenii*, nas Figuras 1.5a e 1.7a). (b) *Beggiatoa*, um quimiolitotrófico sulfuroso (compare com as Figuras 1.15 e 14.27).

totrofia, a oxidação de compostos inorgânicos para geração de energia. Posteriormente, Winogradsky demonstrou que esses organismos, os quais ele chamou de quimiolitotróficos (significando, literalmente, “comedores de terra”), estão disseminados na natureza e obtêm seu carbono do CO<sub>2</sub>. Winogradsky revelou ainda que, assim como os organismos fotossintéticos, as bactérias quimiolitotróficas são autotróficas.

Winogradsky realizou o primeiro isolamento de uma bactéria fixadora de nitrogênio, a bactéria anaeróbia *Clostridium pasteurianum*, e como já foi mencionado, Beijerinck utilizou essa descoberta para guiar o seu isolamento de bactérias aeróbias fixadoras de nitrogênio anos depois (Figura 1.23). Winogradsky viveu até quase os 100 anos, publicando muitos artigos científicos e uma importante monografia, *Microbiologie du Sol* (*Microbiologia do Solo*). Esse trabalho, um verdadeiro marco da microbiologia, contém desenhos de muitos dos organismos estudados por Winogradsky durante sua longa carreira (Figura 1.24).

**MINIQUESTIONÁRIO**

- O que significa o termo “cultura de enriquecimento”?
- O que significa o termo “quimiolitotrofia”? De que forma os quimiolitotróficos se assemelham às plantas?

## 1.10 Microbiologia moderna e genômica

No século XX, a microbiologia desenvolveu-se rapidamente, novas ferramentas de laboratório tornaram-se disponíveis, e a ciência amadureceu para a formação de novas subdisciplinas. A maioria dessas subdisciplinas apresentava ambos os aspectos, referentes às descobertas (básica), e os aspectos referentes à solução de problemas (aplicada) (Tabela 1.3). Em meados do século XX, uma nova ênfase emocionante surgiu na microbiologia com estudos das propriedades genéticas dos microrganismos. A partir dessas raízes na genética microbiana, os campos da biologia molecular, engenharia genética e genômica se desenvolveram. Essas subdisciplinas moleculares revolucionaram as ciências da vida, e originaram novas gerações de ferramentas experimentais para solucionar os mais persuasivos e complexos problemas da biologia.

Muitos avanços em microbiologia hoje são alimentados pela genômica, mapeamento, sequenciamento e análise de genomas. Novos métodos para sequenciamento de DNA e o aprimoramento das capacidades computacionais desencadearam enormes quantidades de dados genômicos a fim de solucionar problemas na medicina, agricultura e meio ambiente. O campo da genômica vem se desenvolvendo em ritmo acelerado e tem, por si só, gerado novas subdisciplinas altamente específicas, como *transcriptômica*, *proteômica* e

*metabolômica*; essas exploram os padrões de RNA, proteínas e vias metabólicas de expressão nas células, respectivamente. Os conceitos de genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e outras “ômicas” são apresentados no Capítulo 6.

A genômica hoje está muito próxima de definir o complemento mínimo de genes necessários para uma célula permanecer viva. Com tais informações, os microbiologistas devem ser capazes de definir os pré-requisitos bioquímicos para a vida em termos genéticos precisos. Quando esse dia chegar, e é provável que ele não esteja muito longe, a criação em laboratório de uma célula viva a partir de componentes não vivos – em essência, geração espontânea – deve ser possível. Obviamente, muitas outras descobertas científicas estão reservadas para a próxima geração de microbiologistas, e sua jornada contínua por este livro o fará compreendê-las e apreciá-las. Boa sorte e bem-vindo ao emocionante campo da microbiologia!

### MINIQUESTIONÁRIO

- Identifique a subdisciplina da microbiologia que trata de cada um destes temas: metabolismo, enzimologia, ácidos nucleicos e síntese de proteínas, microrganismos e seus ambientes naturais, classificação microbiana, herança de características, complementos gênicos de diferentes organismos.

**Tabela 1.3** As principais subdisciplinas da microbiologia

Subdisciplina	Foco
<b>I. Ênfases básicas<sup>a</sup></b>	
Fisiologia microbiana	Nutrição, metabolismo
Genética microbiana	Genes, hereditariedade e variação genética
Bioquímica microbiana	Enzimas e reações químicas nas células
Sistemática microbiana	Classificação e nomenclatura
Virologia	Vírus e partículas subvirais
Biologia molecular	Ácidos nucleicos e proteínas
Ecologia microbiana	Diversidade microbiana e atividade em habitats naturais; biogeoquímica
Genômica	Sequenciamento genômico e análises comparativas
<b>II. Ênfases aplicadas<sup>a</sup></b>	
Microbiologia médica	Doenças infecciosas
Imunologia	Sistema imune
Microbiologia agrícola/do solo	Diversidade microbiana e processos no solo
Microbiologia industrial	Produção em larga escala de antibióticos, álcool e outros produtos químicos
Biotecnologia	Produção de proteínas humanas por microrganismos geneticamente modificados
Microbiologia aquática	Processos microbianos em águas e efluentes, segurança da água potável

<sup>a</sup>Nenhuma destas subdisciplinas é dedicada inteiramente a ciência básica ou aplicada. No entanto, as subdisciplinas listadas em I tendem a ser mais focadas nas descobertas em si, e aquelas listadas em II, mais focadas na resolução de problemas ou na produção de produtos comerciais.

## CONCEITOS IMPORTANTES

**1.1 •** Os microrganismos são organismos microscópicos unicelulares essenciais para o bem-estar e funcionamento de outras formas de vida, bem como do planeta. Como ciência, a Microbiologia possui componentes básicos e aplicados, capazes de gerar novos conhecimentos e solucionar questões, respectivamente.

**1.2 •** Como as casas, as células são formadas de muitas partes, de modo que todas interagem para produzir um organismo vivo intacto. Células procarióticas e eucarióticas diferem em sua arquitetura celular, e as características de um organismo são definidas pelo seu complemento de genes – seu genoma. Muitas atividades são realizadas por todas as células, incluindo metabolismo, crescimento e evolução.

**1.3 •** Populações microbianas diversas foram disseminadas na Terra bilhões de anos antes dos organismos superiores aparecerem, e as cianobactérias eram particularmente importantes por oxigenarem a atmosfera. *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* são as principais linhagens filogenéticas (domínios) das células.

**1.4 •** Microrganismos vivem em populações que interagem com outras populações formando comunidades microbianas. As atividades dos microrganismos em comunidades microbianas podem afetar consideravelmente as propriedades químicas e físicas de seus habitats. A biomassa microbiana na Terra excede aquela dos organismos superiores, embora a maioria das células microbianas surpreendentemente residir na subsuperfície profunda terrestre e oceânica.

**1.5 •** Os microrganismos podem ser tanto benéficos quanto prejudiciais para os seres humanos, embora a quantidade de microrganismos benéficos (ou até mesmo essenciais) seja bem maior do que os prejudiciais.

Agricultura, alimentação, energia e meio ambiente são todos impactados de diversas maneiras pelos microrganismos.

**1.6 •** Robert Hooke foi o primeiro a descrever os microrganismos, e Antoni van Leeuwenhoek foi o primeiro a descrever as bactérias. Ferdinand Cohn fundou o campo da bacteriologia e descobriu os endósporos bacterianos.

**1.7 •** Louis Pasteur criou experimentos engenhosos provando que organismos vivos não surgem espontaneamente a partir de matéria inanimada. Pasteur desenvolveu muitos conceitos e técnicas centrais para a ciência da microbiologia, incluindo a esterilização, além de ter desenvolvido um número fundamental de vacinas para seres humanos e outros animais.

**1.8 •** Robert Koch desenvolveu um conjunto de critérios denominados postulados de Koch para conectar causa e efeito nas doenças infecciosas. Koch também desenvolveu os primeiros meios confiáveis e reproduzíveis para obtenção e manutenção de microrganismos em cultura pura.

**1.9 •** Martinus Beijerinck e Sergei Winogradsky exploraram o solo e a água em busca de microrganismos capazes de realizar processos naturais importantes, como a ciclagem de nutrientes e a biodegradação de substâncias específicas. Fora do seu estudo veio a técnica de cultura de enriquecimento e os conceitos de quimiolitotrofia e fixação de nitrogênio.

**1.10 •** Da metade até a última parte do século XX, surgiram várias subdisciplinas básicas e aplicadas da microbiologia. Essas abriram caminho para a era contemporânea da microbiologia molecular, com as ciências genômicas atualmente no centro desse palco.

## REVISÃO DOS TERMOS-CHAVE

**Citoplasma** porção fluida de uma célula, limitada pela membrana celular.

**Comunicação** interação entre as células por meio de sinais químicos.

**Comunidade microbiana** duas ou mais populações de células que coexistem e interagem em um habitat.

**Crescimento** em microbiologia, um aumento no número de células com o tempo.

**Cultura pura** cultura contendo um único tipo de microrganismo.

**Diferenciação** modificação dos componentes celulares para formar uma nova estrutura, como um esporo.

**Domínio** uma das três linhagens evolucionárias principais das células: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*.

**Ecologia microbiana** estudo dos organismos em seus ambientes naturais.

**Ecossistema** associação entre os organismos e seu meio ambiente abiótico.

**Enzima** catalisador proteico (ou, em alguns casos, RNA) que atua aumentando a velocidade das reações químicas.

**Estéril** ausência de todos os organismos vivos (células) e vírus.

**Eucariota** uma célula contendo um núcleo envolvido por membrana e diversas outras organelas também envolvidas por membrana; *Eukarya*.

**Evolução** descendência com modificação que leva à geração de novas formas ou espécies.

**Extremófilos** microrganismos que habitam ambientes inóspitos para formas de vida superiores, como ambientes que são extremamente quentes ou frios, ou que são ácidos, alcalinos, ou extremamente salgados.

**Genoma** o conjunto completo dos genes de um organismo.

**Genômica** o mapeamento, sequenciamento e análise de genomas.

**Geração espontânea** hipótese de que os organismos vivos poderiam ser originados a partir de matéria inanimada.

**Habitat** ambiente onde uma população microbiana é encontrada.

**Intercâmbio genético** a transferência gênica ou o recebimento de genes entre células procarióticas.

**Macromoléculas** um polímero de unidades monoméricas que inclui as proteínas, os ácidos nucleicos, os polissacarídeos e os lipídeos.

**Membrana citoplasmática** barreira semipermeável que separa o interior da célula (citoplasma) do meio ambiente.

**Metabolismo** todas as reações bioquímicas que ocorrem em uma célula.

**Microrganismo** organismo microscópico, consistindo de única célula, ou conjunto de células, incluindo os vírus.

**Motilidade** o movimento das células por meio de alguma forma de autopropulsão.

**Núcleo** estrutura envolvida por membrana nas células eucarióticas que contém o DNA do genoma da célula.

**Nucleoide** massa agregada de DNA que compõe o cromossomo das células procarióticas.

**Organelas** estrutura envolvida por membrana dupla, como as mitocôndrias, encontrada nas células eucariotas.

**Parede celular** uma rígida parede presente fora da membrana citoplasmática; confere força estrutural à célula e previne a lise osmótica.

**Patógeno** microrganismo causador de doença.

**Postulados de Koch** conjunto de critérios para provar que um determinado microrganismo causa uma determinada doença.

**Procariota** célula que carece de uma membrana envolvendo o núcleo e outras organelas; bactéria ou arqueia.

**Quimiolitotrofia** forma de metabolismo na qual a energia é gerada por meio da oxidação dos compostos inorgânicos.

**Ribossomos** estruturas compostas por RNAs e proteínas, nos quais novas proteínas são sintetizadas.

**Técnica de cultura de enriquecimento** método de isolamento de microrganismos específicos a partir da natureza, utilizando-se meios de cultura e condições de incubação específicas.