

Microbiologia: da Teoria a prática

LOT2053

Profa. Tatiane da Franca Silva

1

TESTE DE EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

☐ Métodos Padronizados:

☐ Método de Difusão em Discos em agar

- ✓ Discos com concentração conhecida do agente
- ✓ Ausência de halo – Resistência
- ✓ Presença de halo – algum nível de Sensibilidade

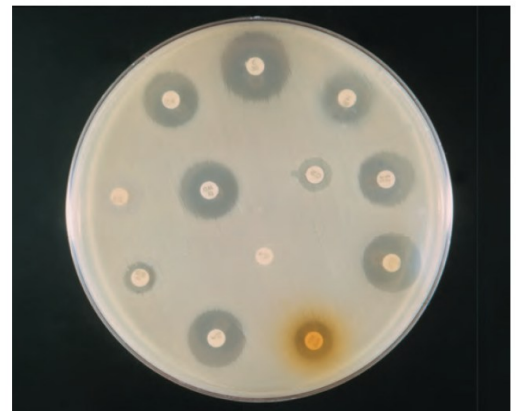
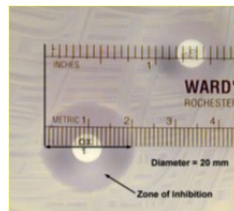
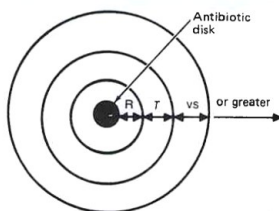
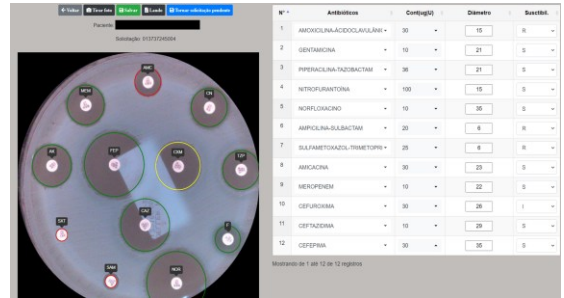


Figura 20.17 Método de disco-difusão para determinação da atividade de antimicrobianos. Cada disco contém um agente quimioterápico diferente que se difunde no agar que o circunda. As zonas claras indicam inibição do crescimento do micro-organismo inoculado na superfície do agar.

2

DIFUSÃO EM DISCO: ANTIBIOGRAMA

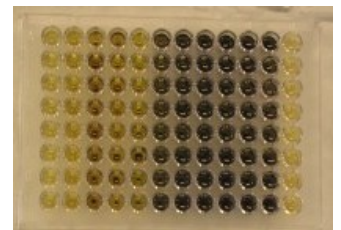
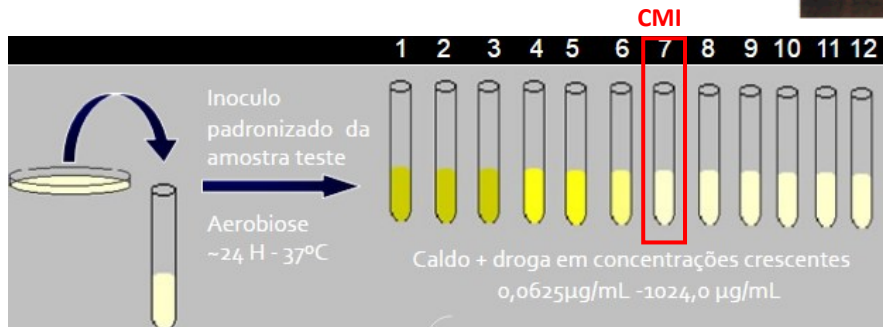


Antibiótico	Potência do disco (mcg)	Resistente (< ou =)	Intermediário	Sensível (> ou =)
Bactérias Gram Positivas (<i>Bacillus subtilis</i>)				
Penicilina (Pn)	10 (1)	≤ 28	-	≥ 29
Gentamicina (GM)	10	≤ 12	13-17	≥ 18
Ampicilina (AP)	10	≤ 28	-	≥ 29
Clorofenicol (C)	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Bactéria Gram Negativa (<i>Escherichia coli</i>)				
Penicilina (Pn)	10	≤ 28	-	≥ 29
Gentamicina (GM)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Ampicilina (AP)	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Clorofenicol (C)	30	≤ 12	13-17	≥ 18

3

TESTE DE EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

- ☐ Métodos Padronizados:
- ☐ Método de Concentração Mínima Inibitória (CMI)
- ✓ Teste de diluição em tubo



4

TESTE DE EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

❑ Métodos Padronizados:

❑ Método de Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Teste E (epsilômetro)

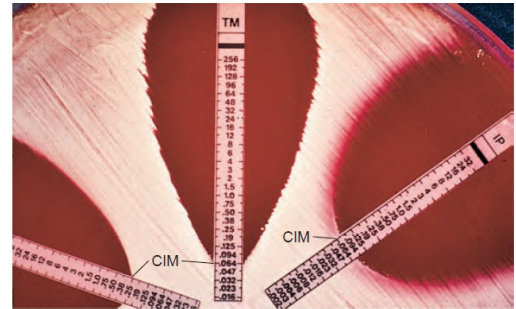
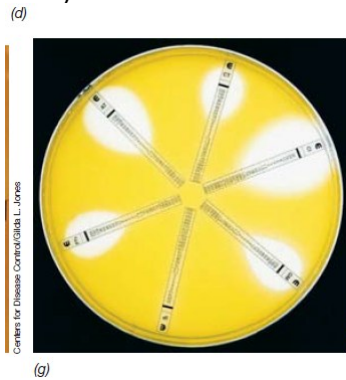
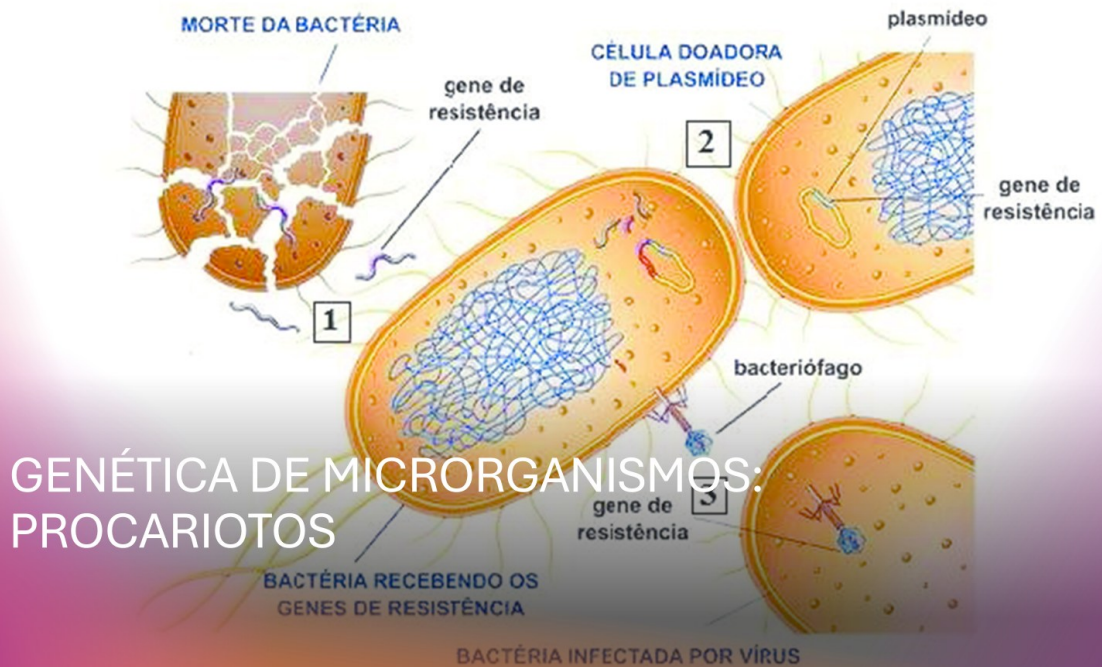


Figura 20.18 O teste E (epsilômetro), um método de difusão em gradiente que determina a sensibilidade e estima a concentração inibitória mínima (CIM). A tira plástica, colocada na superfície do ágar previamente inoculado com a bactéria-teste, contém um gradiente crescente de concentração do antibiótico. A CIM é claramente vista.

5



7

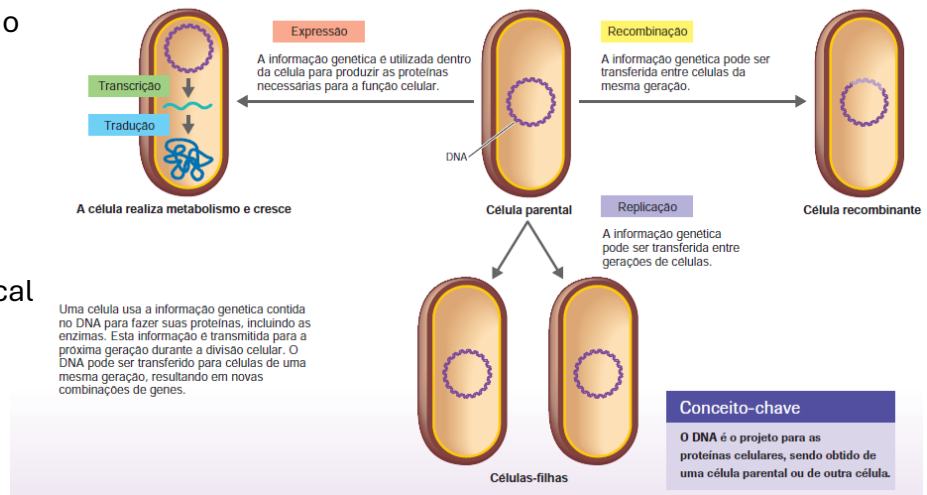
GENÉTICA DE MICRORGANISMOS: PROCARIOTOS

☐ Fluxo da informação genética

☐ Expressão (metabolismo)

☐ Transferência vertical (entre gerações)

☐ Transferência horizontal (mesma geração)



8

GENÉTICA DE MICRORGANISMOS

☐ Transferência vertical

✓ divisão celular

✓ Replicação bidirecional do DNA circular

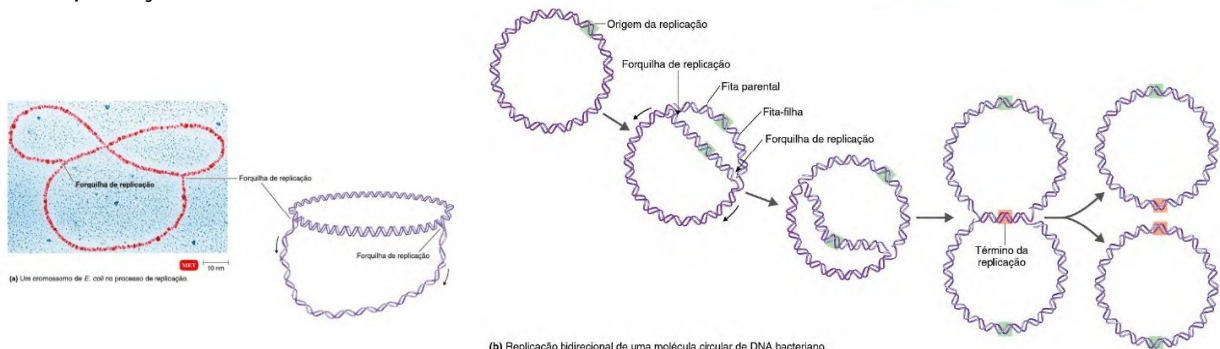
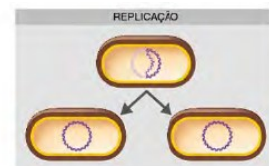
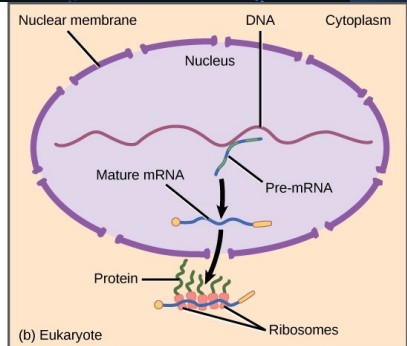
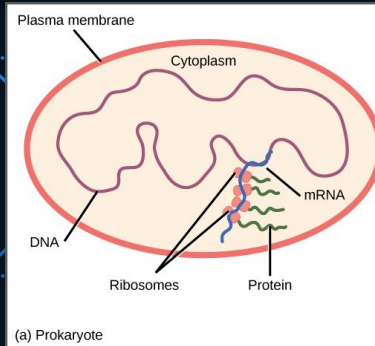
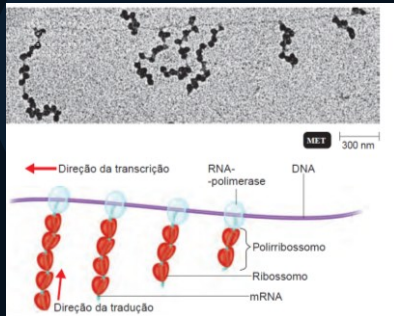
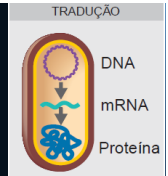


Figura 8.6 Replicação de DNA bacteriano.

9

GENÉTICA DE MICRORGANISMOS: EXPRESSÃO

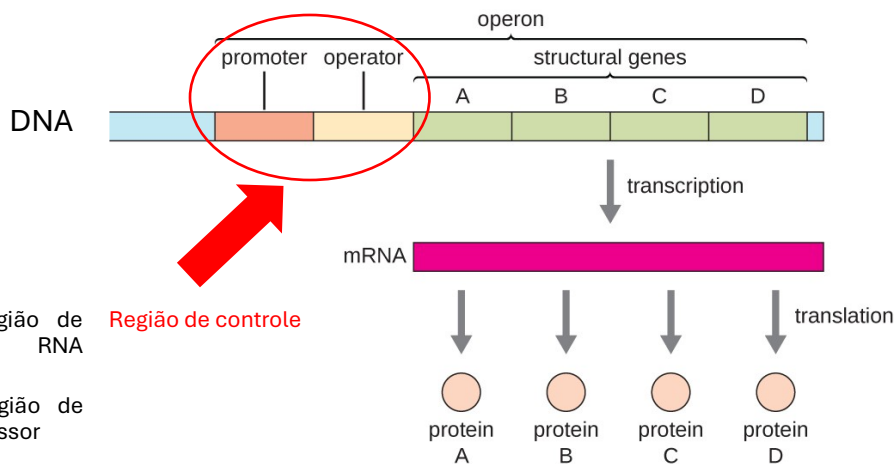
- Transcrição e Tradução
- Diferenças entre procarioto e eucarioto:
Temporal e espacial
RNAPolicistrônico e monocistrônico



10

CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO

- **Operon:** conjunto de genes transcritos em um único mRNA (policistrônico) relacionados a uma mesma via metabólica.

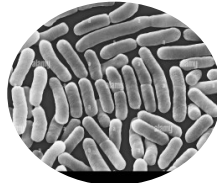


- Promotor: região de ligação da RNA polimerase
- Operador: região de ligação do repressor

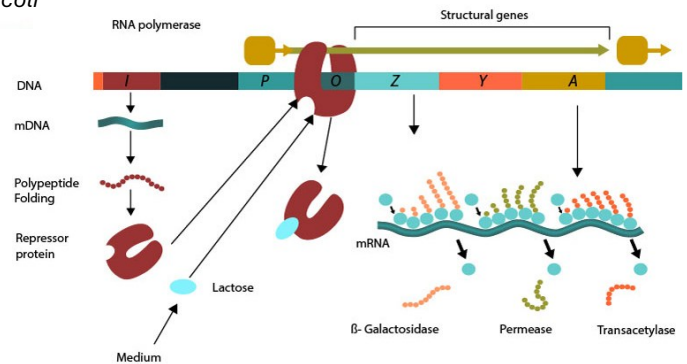
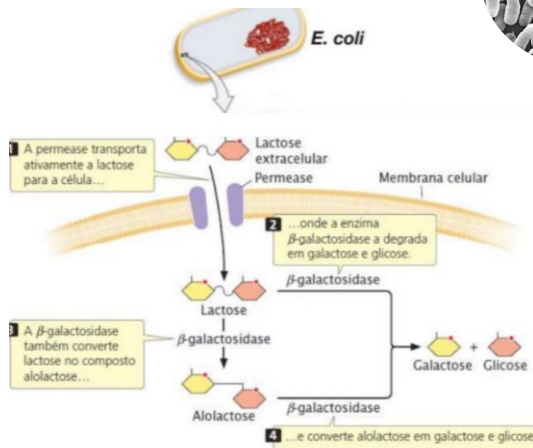
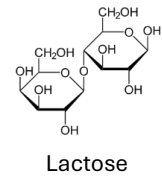
11

CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO

• Operon LAC: Metabolismo de lactose



E. coli



13

CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO: INDUÇÃO E REPRESSÃO

Operon LAC

Operon Indutível

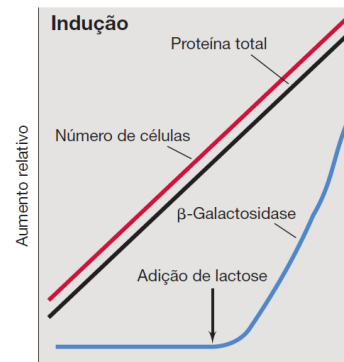
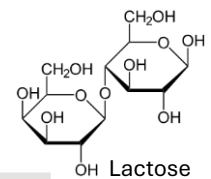
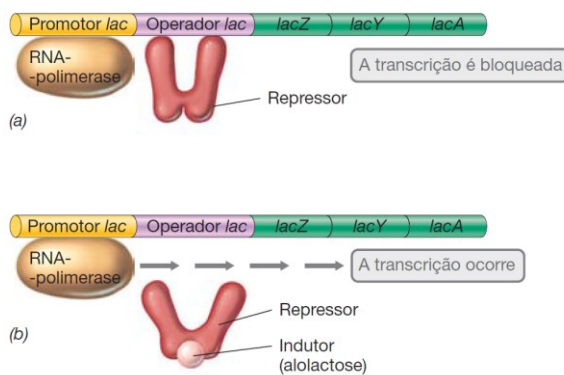


Figura 7.6 Indução enzimática. A adição de lactose ao meio i especificamente a síntese da enzima β -galactosidase. Observe que i proteica líquida permanece inalterada.

14

CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO: INDUÇÃO E REPRESSÃO

Operon Arginina

Operon Repressível

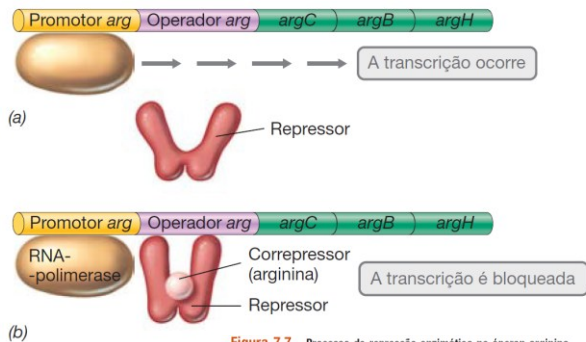
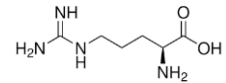


Figura 7.7 Processo de repressão enzimática no operon arginina. (a) O operon é transcrito porque o repressor não é capaz de se ligar ao operador. (b) Após a ligação de um correpresor (uma pequena molécula) ao repressor, o repressor se liga ao operador e bloqueia a transcrição; o RNA e as proteínas codificadas pelo operon não são sintetizados. No caso do operon *argCBH*, o aminoácido arginina é o correpresor que se liga ao repressor de arginina.



Arginina

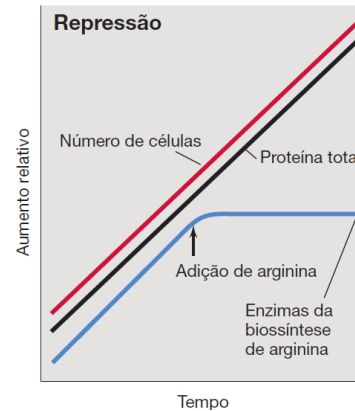


Figura 7.5 Repressão enzimática. A adição de arginina ao meio especificamente a produção das enzimas necessárias à biossíntese de arginina. A síntese proteica líquida permanece inalterada.

15

CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO: INDUÇÃO E REPRESSÃO

Glicose ou Lactose??

Repressão catabólica pela presença de Glicose

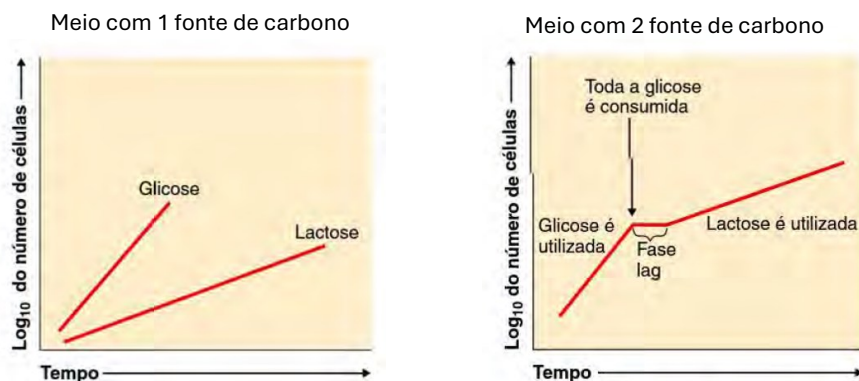


Figura 8.14 A taxa de crescimento da *E. coli* em glicose e lactose.

16

OPERON LAC: REGULAÇÃO GLOBAL

- ❑ Glicose no meio
- ❑ Repressão do Operon mesmo na presença de Lactose
- ❑ Segundo sistema de controle: AMPc

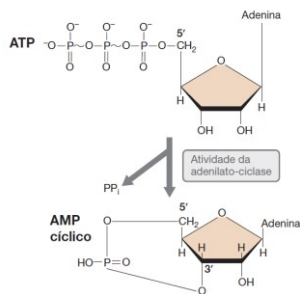
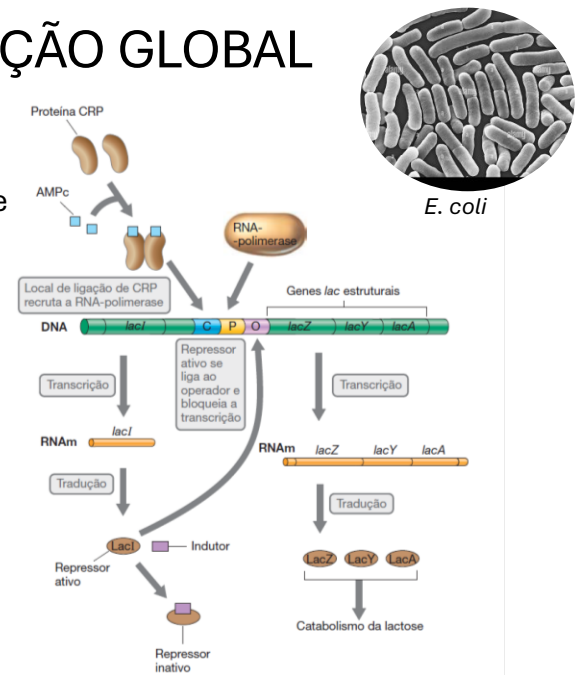


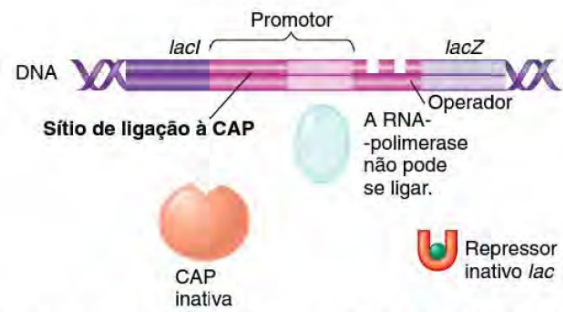
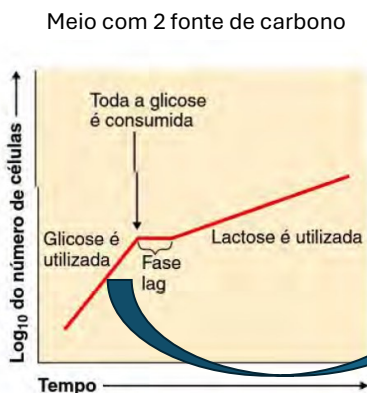
Figura 7.14 AMP cíclico. A adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico) é produzida a partir de ATP pela enzima adenilato-ciclase.



17

CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO: REPRESSÃO

Repressão catabólica pela presença de Glicose

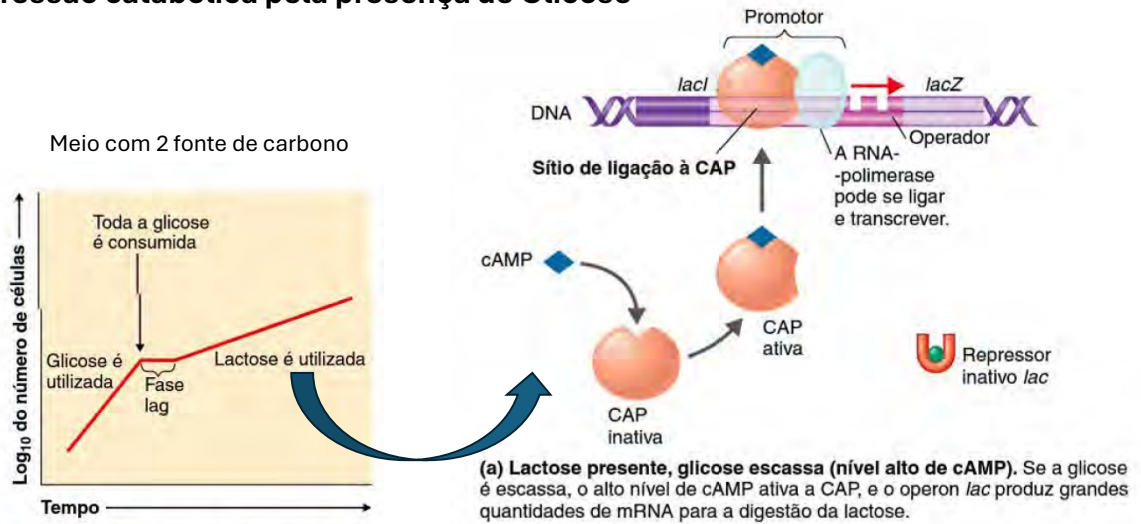


(b) Lactose presente, glicose presente (nível de cAMP baixo). Quando a glicose está presente, o cAMP está escasso, e a CAP não é capaz de estimular a transcrição.

19

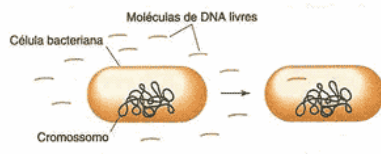
CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO: REPRESSÃO

Repressão catabólica pela presença de Glicose



20

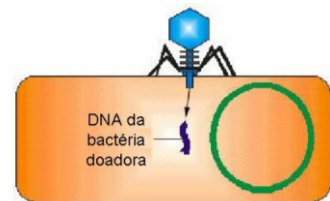
TRANSFERÊNCIA GENÉTICA HORIZONTAL



Transformação



Conjugação



Transdução

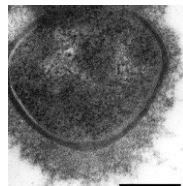
21

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA: TRANSFORMAÇÃO

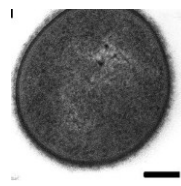
□ Célula doadora e célula receptora



Streptococcus pneumoniae



Cepa com cápsula
(virulenta)



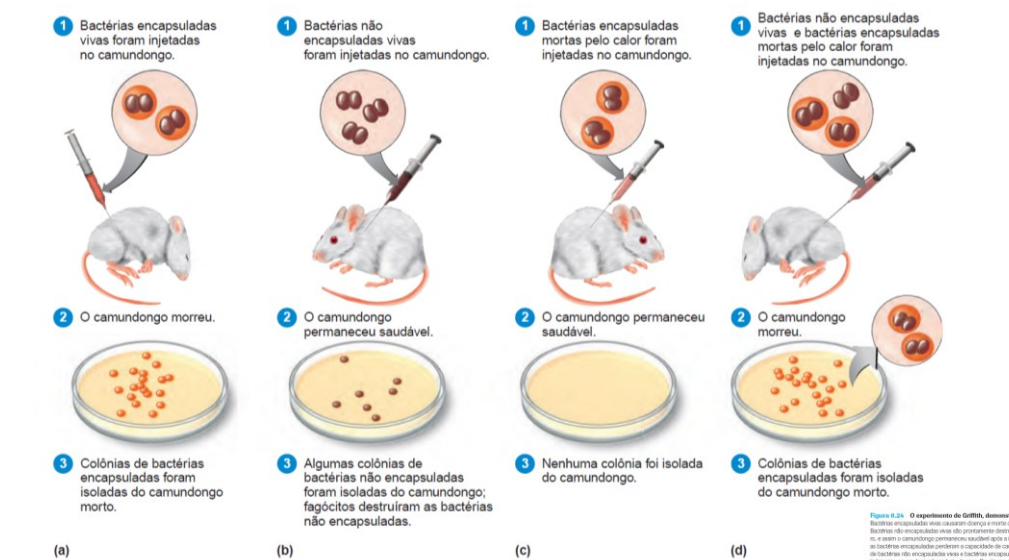
Cepa sem capsula
(não virulenta)



Frederick Griffith
(1928)

22

O experimento de Griffith



23

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA: TRANSFORMAÇÃO

❑ Incorporação de DNA “nu” no meio

❑ Plasmídio ou DNA genômico (recombinação)

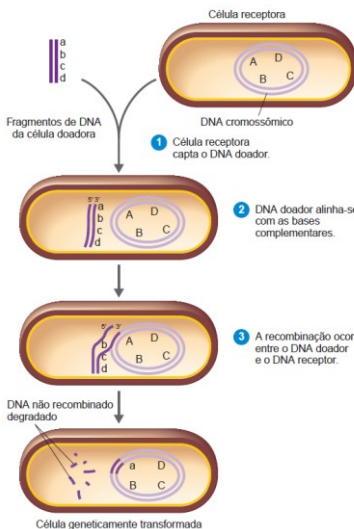


Figura 3.25 O mecanismo da transformação genética em bactérias. Alguma similaridade é necessária para o DNA doador e o DNA receptor se alinharem. Genes a, b, c e d podem ser mutações de A, B, C e D.

P Que tipo de enzima corta o DNA doador?

Recombinação

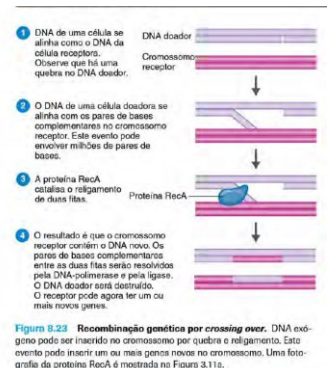
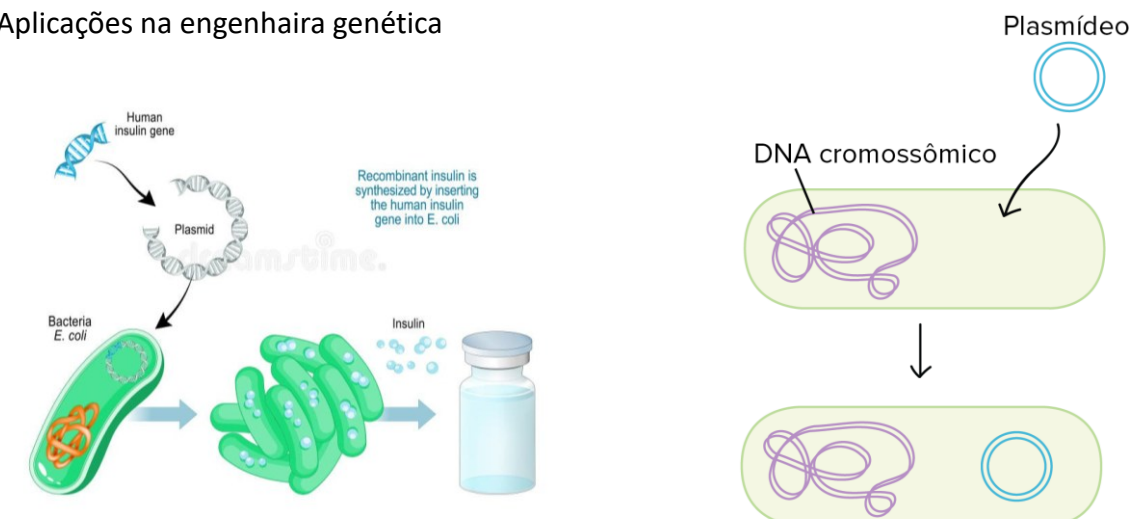


Figura 3.23 Recombinação genética por crossing over. DNA exógeno pode ser inserido no cromossomo por quebra e religamento. Este evento pode inserir um ou mais genes novos no cromossomo. Uma fotografia da proteína RecA é mostrada na Figura 3.11a.

24

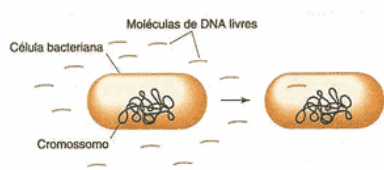
TRANSFERÊNCIA GENÉTICA: TRANSFORMAÇÃO

❑ Aplicações na engenharia genética



25

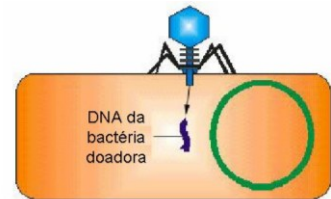
TRANSFERÊNCIA GENÉTICA HORIZONTAL



Transformação



Conjugação



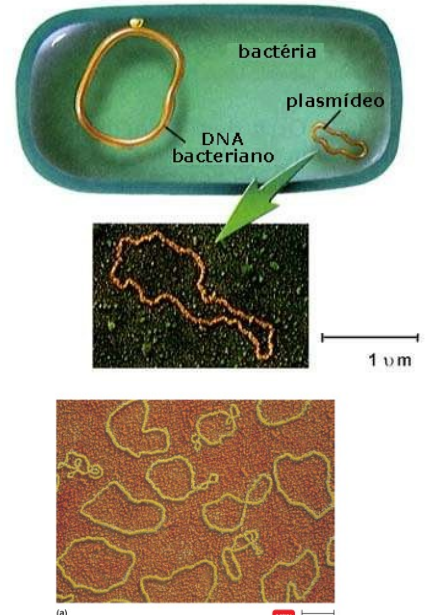
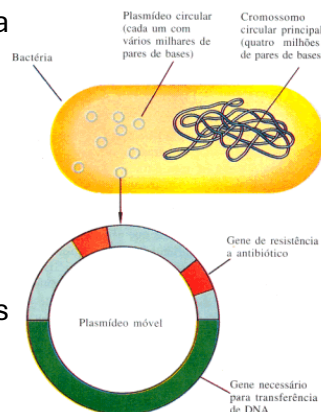
Transdução

26

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA: CONJUGAÇÃO

Plasmídeos

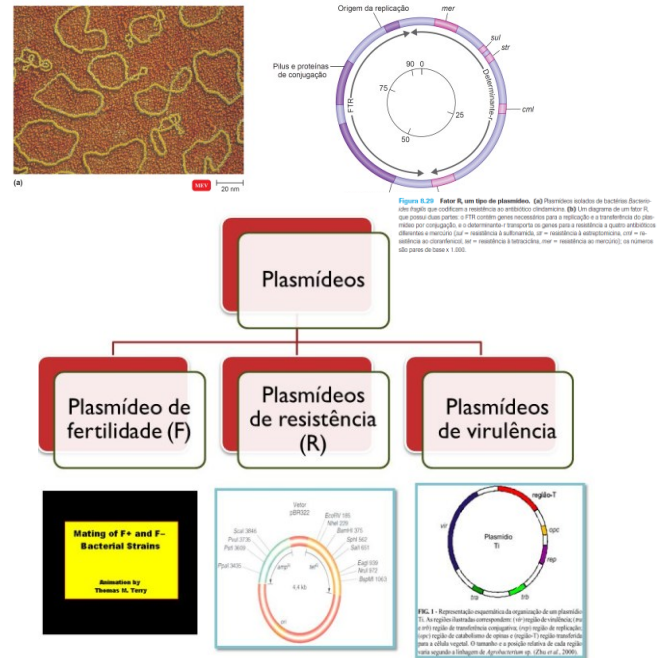
- ❑ Material genético extra cromossômico
 - ❑ DNA circular
 - ❑ Replicação autônoma
 - ❑ Carrega genes acessórios
- Ex: resistência antibiótico; fatores de virulência e de conjugação



27

Tabela 4.2 Exemplos de características atribuídas por plasmídeos em procariotos

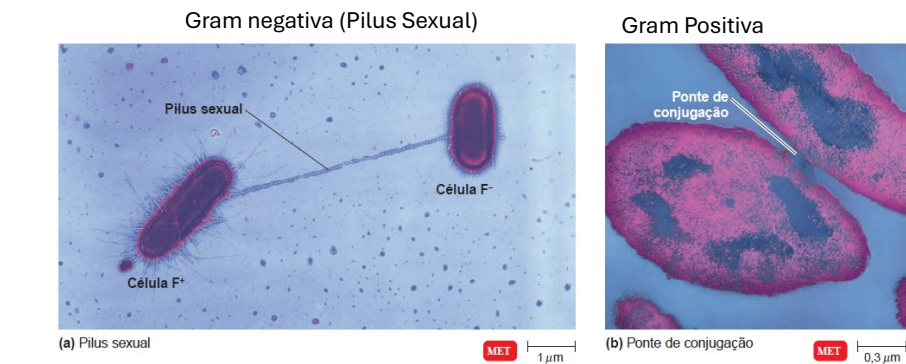
Características	Organismos
Produção de antibiótico	<i>Streptomyces</i>
Conjugação	Vasta variedade de bactérias
Funções metabólicas	
Degradação de octano, cânfora, naftaleno	<i>Pseudomonas</i>
Degradação de herbicidas	<i>Alcaligenes</i>
Formação de acetona e butanol	<i>Clostridium</i>
Utilização de lactose, sacarose, citrato ou ureia	Bactérias entéricas
Produção de pigmento	<i>Erwinia</i> , <i>Staphylococcus</i>
Produção de vesícula de gás	<i>Halobacterium</i>
Resistência	
Resistência a antibiótico	Vasta variedade de bactérias
Resistência a metais tóxicos	Vasta variedade de bactérias
Virulência	
Produção de tumor em plantas	<i>Agrobacterium</i>
Nodulação e fixação de nitrogênio simbiótica	<i>Rhizobium</i>
Produção de bacteriocina e resistência	Vasta variedade de bactérias
Invasão de célula animal	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Yersinia</i>
Coagulase, hemolisina, enterotoxina	<i>Staphylococcus</i>
Toxinas e cápsula	<i>Bacillus anthracis</i>
Enterotoxina, antígeno K	<i>Escherichia coli</i>



28

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA: CONJUGAÇÃO

- ❑ Requer o contato direto célula a célula
- ❑ células doadoras devem transportar o plasmídeo, e as células receptoras normalmente não

**Figura 8.26** Conjugação bacteriana.

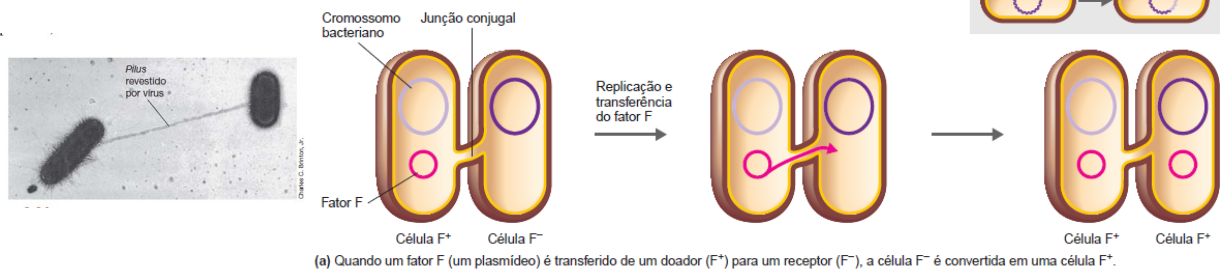
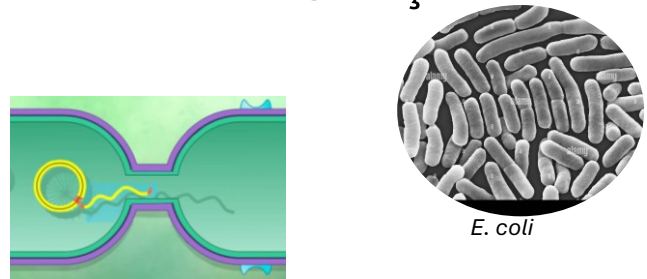
29

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA: CONJUGAÇÃO

❑ 1º Plasmídeo observado a ser transferido
Fator F (fertilidade)

❑ Plasmídeo F replica

❑ Células doadoras (F⁺) transferem
o plasmídeo aos receptores (células F⁻)



30

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA: CONJUGAÇÃO

❑ Fator F pode se integrar no genoma (Hfr- *High Frequency of recombination*)

❑ fita parental do cromossomo e transferida para a célula receptora

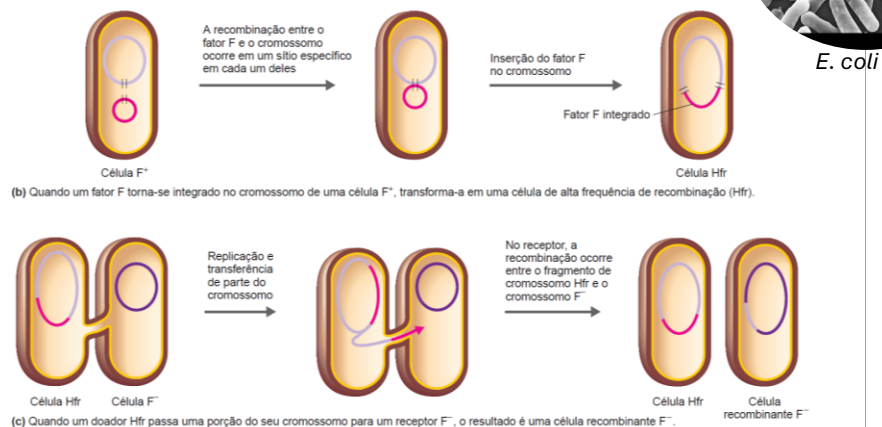
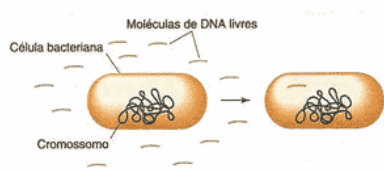


Figura 8.27 Conjugação em *E. coli*.

31

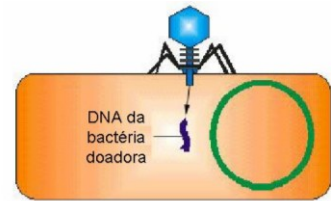
TRANSFERÊNCIA GENÉTICA HORIZONTAL



Transformação



Conjugação



Transdução

32

TRANSFERÊNCIA GENÉTICA: TRANSDUÇÃO

- DNA bacteriano é transferido de uma célula para outra dentro de vírus (fago ou bacteriófago)

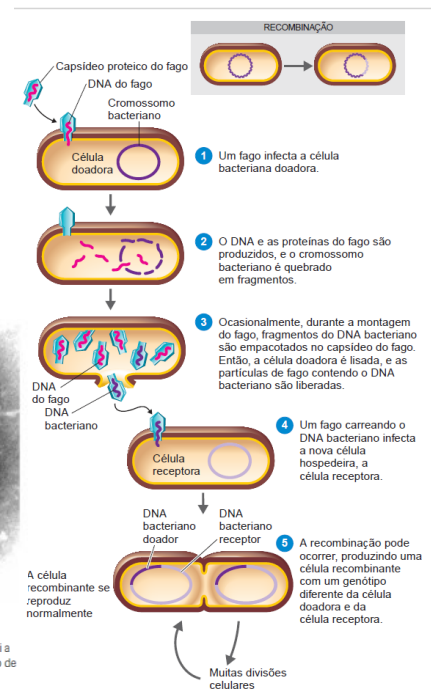


Figura 8.28 Transdução por um bacteriófago. É mostrada aqui a transdução generalizada, na qual o DNA bacteriano pode ser transferido de uma célula à outra.

33

VÍRUS BACTERIANOS

❑ Bacteriófagos (“bactéria” e “fagein” devorar, em grego)

❑ Maioria de DNA dupla fita

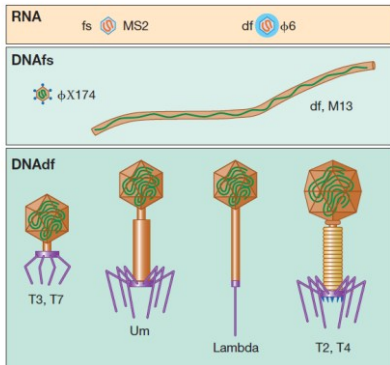
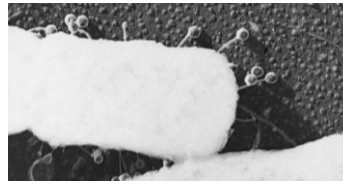


Figura 8.19 Representações esquemáticas dos principais tipos de vírus bacterianos. Os tamanhos estão em escala aproximada. O nucleocapsídeo do bacteriófago φ6 é circulado por uma membrana (azul).



Bacteriófago Lambda

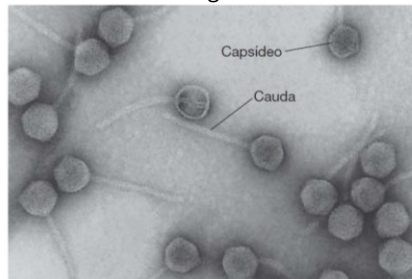


Figura 8.16 Bacteriófago lambda. Micrografia eletrônica de transmissão de vírus do fago lambda. A cabeça de cada vírus tem diâmetro de aproximadamente 65 nm e contém DNAfs linear.



E. coli

Bacteriófago T4

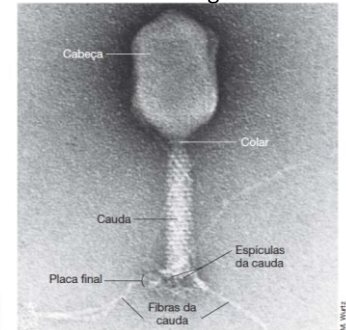


Figura 8.20 Estrutura de T4, um bacteriófago complexo. Micrografia eletrônica de transmissão de bacteriófago T4 de *Escherichia coli*. Os componentes da cauda estão na ligação do vírus ao hospedeiro e na ligação do sítio reprodutivo (ver Figura 8.11). A cabeça T4 tem cerca de 85 nm de diâmetro.

34

VÍRUS BACTERIANOS: CICLO LÍTICO

❑ Resulta na Lise celular

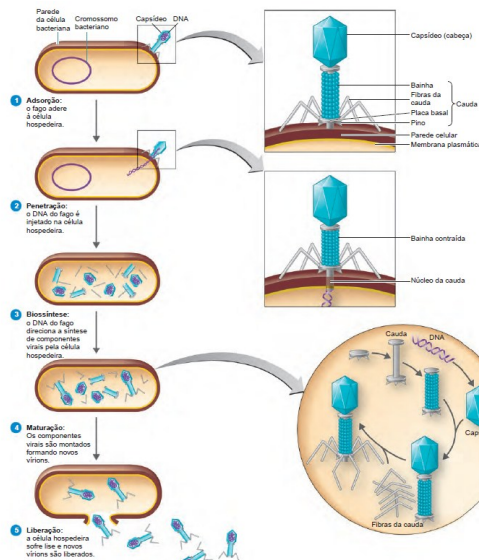


Figura 13.11 O ciclo lítico de um bacteriófago T-pac.

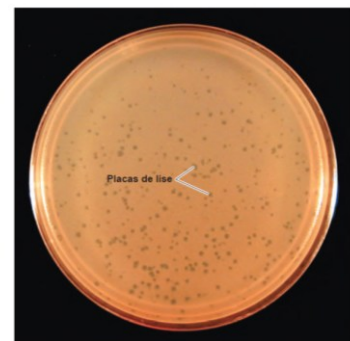
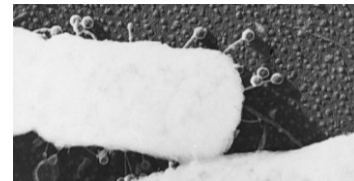


Figura 13.6 Placas de lise formadas por bacteriófagos. Placas de lise de diferentes tamanhos formadas pelo bacteriófago λ (lambda) em uma monocamada de *E. coli*.

35

VÍRUS DE BACTERIANOS: CICLO LÍTICO

- ☐ Fagoterapia
- ☐ Bacteriófagos no controle bacteriano
- ☐ Tratamento de desintéria, peste bubônica e epidemia de cólera (década de 20)

Fagoterapia: como matar bactérias sem utilizar antibióticos?

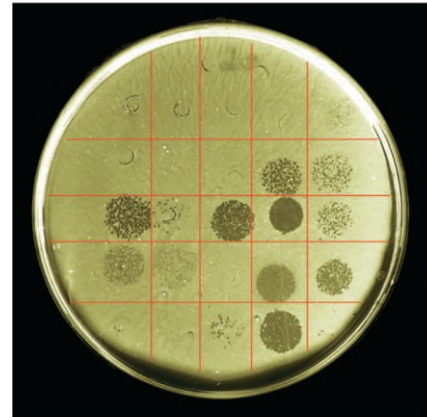
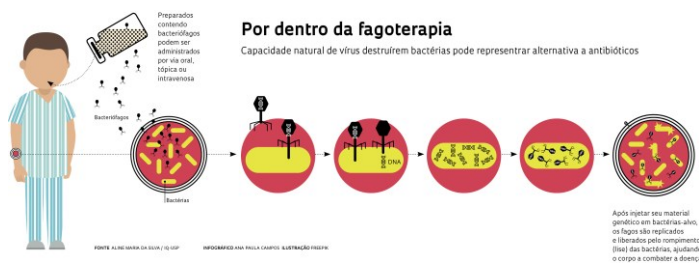


Figura 10.13 Fagotipagem de uma linhagem de *Salmonella enterica*. A linhagem testada foi cultivada por toda a placa. Falhas, ou áreas de lise, foram produzidas pelos bacteriófagos, indicando que a linhagem era sensível à infecção por esses fagos. A fagotipagem é utilizada para distinguir sorotipos de *S. enterica* e tipos de *Staphylococcus aureus*.

36

VÍRUS DE BACTERIANOS: CICLO LÍTICO

- ☐ Titulação viral
- ☐ Contagem das placas de lise

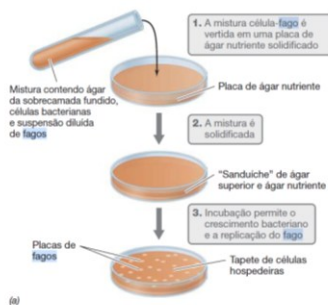
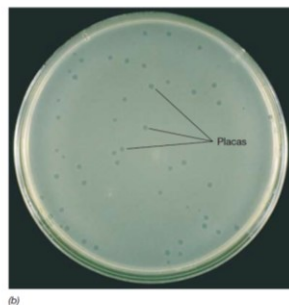
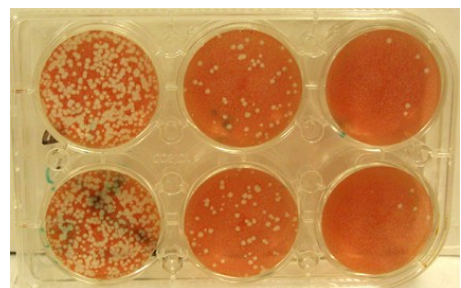


Figura 8.8 Quantificação de vírus bacterianos utilizando o ensaio de formação de placas de lise. (a) "Agar superior" contendo uma diluição de vírus homogeneizada com uma célula bacteriana hospedeira é vertida sobre



uma placa de agar. (b) Placas (cerca de 1 a 2 mm de diâmetro) formadas pelo bacteriófago T4.



37

VÍRUS DE BACTERIANOS: CICLO LÍSOGENICO

❑ Incorporação do genoma viral no cromossomo bacteriano

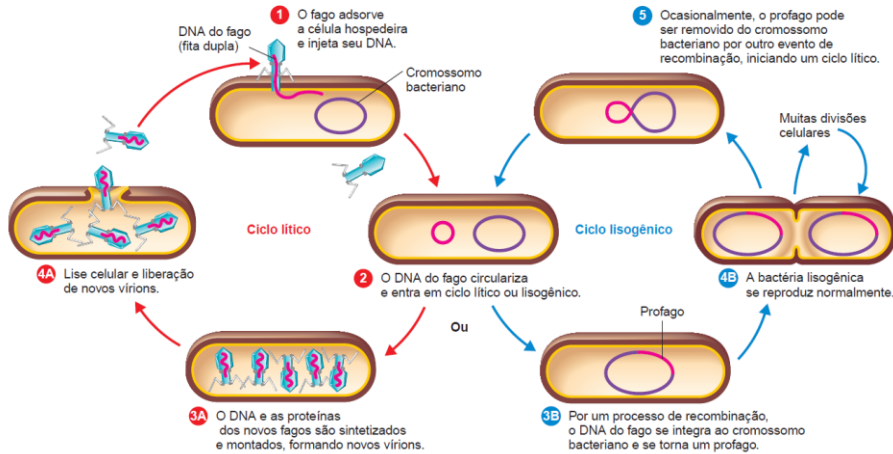
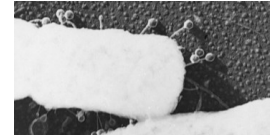


Figura 13.12 O ciclo lisogênico do bacteriófago λ em *E. coli*.



38

VÍRUS DE BACTERIANOS: DEFESA

❑ Defesa : Enzimas de Restrição

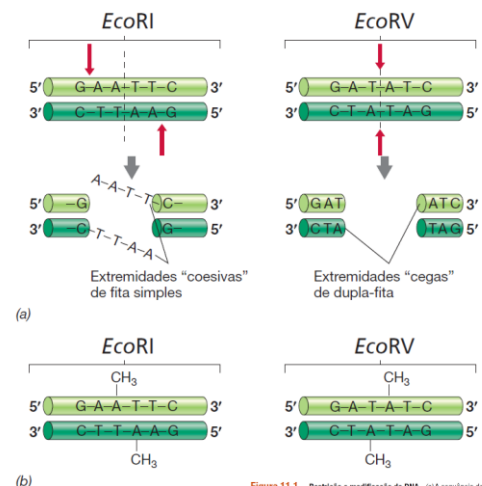
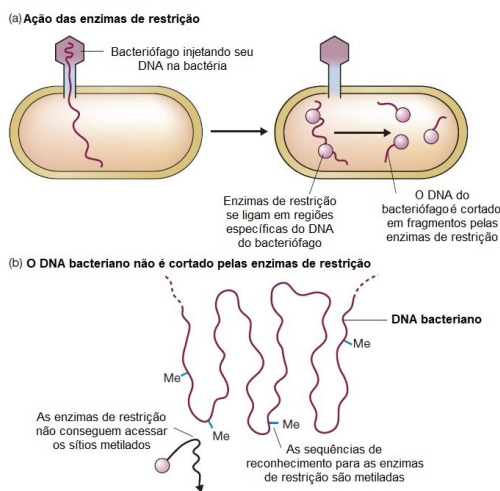


Figura 11.1 Restrição e modificação do DNA. (a) A sequência de DNA reconhecida pela endonuclease de restrição EcoRI (painel superior). As setas em vermelho indicam as ligações clivadas pela enzima. A linha tracejada indica o eixo de simetria da sequência. Aparenta-se o DNA após a clivagem da enzima EcoRI (painel inferior). Observe as "extremidades coesivas" de fita simples. (b) A mesma sequência após a modificação pela EcoRI metilase. Os grupos metil adicionados pela enzima estão indicados. Eles protegem o sítio de restrição da clivagem por EcoRI.

39

ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

❑ Ferramenta da Engenharia Genética

Tabela 11.1 Sequências de reconhecimento de algumas endonucleases de restrição

Organismo	Nome da enzima ^a	Sequência de reconhecimento ^b
<i>Bacillus globigii</i>	BglII	A↓GATCT
<i>Brevibacterium albidum</i>	BalI	TGG↓C*CA
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	G↓AA*TTC ^c
<i>Escherichia coli</i>	EcoRV	GAT↓A*TC ^c
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	HhaI	GC↓G↓C
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII	A↓AGCTT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KpnI	GGTAC↓C
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	NotI	GC↓GGC*CGC
<i>Proteus vulgaris</i>	PvuI	CGAT↓CG
<i>Serratia marcescens</i>	SmaI	CCC↓GGG
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	T↓CGA*

