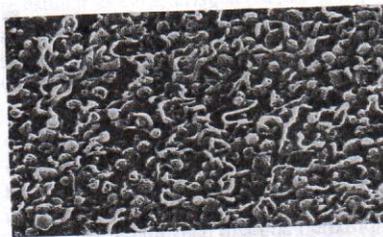


Os cientistas do USDA estão tentando formular meios complexos onde se possam criar organismos semelhantes aos micoplasmas, um grupo correlacionado de bactérias que também não possui parede celular. Estas bactérias causam centenas de doenças em plantações e geram milhões de dólares em perdas econômicas a cada ano. Elas são transferidas de planta a planta por insetos infectados. Um outro meio em desenvolvimento permitirá o cultivo da bactéria *Mycoplasma pneumoniae*, que é a causa de uma forma de pneumonia humana.



Espiroplasma  
(aumento de  
29.000×).

### Localização das Enzimas

A maioria dos microrganismos movimenta uma diversidade de pequenas moléculas através de suas membranas plasmáticas para posterior metabolização. Estas substâncias incluem a glicose, os aminoácidos, os pequenos peptídios, os nucleosídeos e os fosfatos, assim como vários íons inorgânicos. Além das endoenzimas produzidas para uso interno da célula (Cap. 5), muitas bactérias (e fungos) produzem *exoenzimas* e as liberam através da membrana plasmática. Estas enzimas incluem as **enzimas extracelulares**, geralmente produzidas por bastonetes Gram-positivos, que agem no meio existente ao redor do organismo, e as **enzimas periplasmáticas**, geralmente produzidas por organismos Gram-negativos, que agem no espaço periplasmático. A maioria das exoenzimas é do tipo hidrolase; elas adicionam água à medida que quebram grandes moléculas de carboidratos, lipídios ou proteínas em moléculas menores que podem ser absorvidas (Quadro 6.1). Embora os micróbios não possam transportar grandes moléculas através da membrana, na natureza eles utilizam grandes moléculas a partir de outros organismos, digerindo-as com exoenzimas antes de absorvê-las.

### Adaptação a Nutrientes em Quantidades Limitadas

Os microrganismos se adaptam a quantidades limitadas de nutrientes de várias maneiras:

1. Alguns sintetizam maiores quantidades de enzimas para a captação e o metabolismo de nutrientes limitados. Isto permite aos microrganismos obter e usar uma quantidade maior das poucas moléculas de nutrientes disponíveis.
2. Outros possuem a capacidade de sintetizar enzimas necessárias para a utilização de um nutriente diferente. Se, por exemplo, há pouco suprimento de glicose, alguns microrganismos podem produzir enzimas que permitem a absorção e a utilização de um nutriente mais abundante, como a lactose.
3. Muitos organismos ajustam a taxa com a qual metabolizam nutrientes e a velocidade com que sintetizam as moléculas necessárias para o crescimento, para ajustarem-se à disponibilidade dos nutrientes menos abundantes. Tanto o metabolismo quanto o crescimento tornam-se mais lentos, mas energia alguma é perdida na síntese de produtos que não podem ser usados. O crescimento será tão rápido quanto as condições o permitirem.

- ✓ O que significa o sufixo *filo*? Diferencie os termos *obrigatório* e *facultativo*.
- ✓ Quais enzimas os microrganismos anaeróbios obrigatórios não possuem? Como esta falta causa a morte deles na presença de oxigênio?
- ✓ A variedade de enzimas de microrganismos fastidiosos é maior ou menor do que a de micróbios com necessidades nutricionais mais simples? Por quê?

#### ► Quadro 6.1 Exemplos de exoenzimas

Enzimas	Ação
<b>Enzimas que agem em carboidratos complexos</b>	
Carboidrases	Quebram grandes moléculas de carboidratos em moléculas menores
Amilase	Quebra o amido em maltose
Celulase	Quebra a celulose em celobiose
<b>Enzimas que agem em açúcares</b>	
Sacarase	Quebra a sacarose em glicose e frutose
Lactase	Quebra a lactose em glicose e galactose
Maltase	Quebra a maltose em duas moléculas de glicose
<b>Enzimas que agem em lipídios</b>	
Lipases	Quebram gorduras em glicerol e ácidos graxos
<b>Enzimas que agem em proteínas</b>	
Proteases	Quebram proteínas em peptídios e aminoácidos
Caseinase	Quebra a proteína do leite em aminoácidos e peptídios
Gelatinase	Quebra a gelatina em aminoácidos e peptídios

### \* Esporulação

A **esporulação**, ou formação de endosporos, ocorre nos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e em alguns outros gêneros de microrganismos Gram-positivos, mas vem sendo estudada mais cuidadosamente no *B. subtilis* e no *B. megaterium*. As bactérias que formam endosporos geralmente o fazem durante a fase estacionária, em resposta a sinais ambientais, metabólicos e do ciclo celular.

Quando os nutrientes como o carbono ou o nitrogênio tornam-se limitados, são formados dentro das células-mães endosporos altamente resistentes. (Em raros casos, algumas bactérias formam endosporos mesmo quando há nutrientes disponíveis.) Apesar de os endosporos não serem metabolicamente ativos, eles podem sobreviver por longos períodos de seca e são resistentes a temperaturas extremas, à radiação e a algumas substâncias químicas tóxicas. Alguns endosporos podem suportar temperaturas bem mais altas do que as células vegetativas. O endosporo não pode se dividir, e a célula-mãe pode produzir apenas um endosporo, logo a esporulação é um mecanismo de proteção ou sobrevivência, não um meio de reprodução.

Endosporos aprisionados em âmbar por 25 milhões de anos germinam quando colocados em meios nutritivos.

Ao se iniciar a formação de endosporos, o DNA é replicado e forma um *nucleóide axial* longo e compacto (> Fig. 6.17). Os dois cromossomos formados por replicação se separam e se movem para diferentes locais na célula. Em algumas bactérias, o endosporo se forma próximo ao meio da célula e, em outras, forma-se em uma das extremidades (> Fig. 6.18). O DNA onde os endosporos irão se formar direciona a sua formação. Algumas moléculas de proteínas citoplasmáticas e a maioria do RNA da célula se reúnem ao redor do DNA para fazer o *cerne*, ou parte viva do endosporo. O cerne contém **ácido dipicolínico** e íons cálcio, os quais provavelmente contribuem para a termorresistência do endosporo, estabilizando a estrutura das proteínas. O **septo do endosporo**, que é formado pela membrana celular, mas que não possui parede celular, cresce ao redor do cerne, envolvendo-o em uma membrana de dupla camada. Ambas as camadas desta membrana sintetizam peptidoglicano e o liberam no espaço entre as membranas. Assim, se forma uma camada laminada chamada **córtex**. O córtex protege o cerne contra mudanças na pressão osmótica, tais como aquelas resultantes do ressecamento. Uma **capa de esporo** de proteína semelhante à queratina, que é impermeável a muitas substâncias químicas, é colocada ao redor do córtex pela célula-mãe. Finalmente, em alguns endosporos, a célula-mãe produz um **exosporo**, que é uma membrana lipoprotéica formada fora da capa. A função do exosporo é desconhecida. Em condições de laboratório, a esporulação leva em média 7 horas.

Voltando as condições favoráveis, o endosporo se torna uma célula vegetativa que não possui as propriedades de resistência dos endosporos. A **germinação**, o processo pelo qual o esporo retorna a seu estado vegetativo, ocorre em três estágios. O primeiro estágio, a **ativação**, geralmente requer algum agente traumático, tal como o baixo pH ou o calor, que danifica a capa. Sem tal dano,

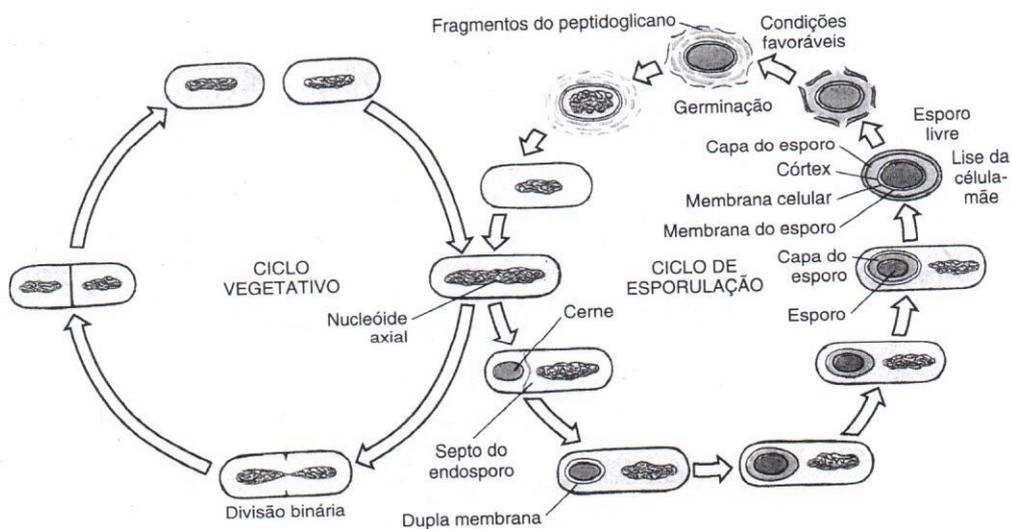
alguns endosporos germinam lentamente, ou simplesmente não germinam. O segundo estágio, a **germinação propriamente dita**, requer água e um agente de germinação (tal como o aminoácido alanina ou certos íons inorgânicos) que penetra na camada danificada. Durante este processo, grande parte do peptidoglicano cortical é quebrada, e seus fragmentos são liberados no meio. A célula viva (que ocupou o cerne) capta agora grandes quantidades de água e perde sua resistência ao calor e sua coloração, assim como sua **refringência** (capacidade de desviar os raios solares). Finalmente, o **crescimento** ocorre em um meio que contém nutrientes adequados. As proteínas e o RNA são sintetizados, e, em mais ou menos uma hora, se inicia a síntese do DNA. A célula é agora uma célula vegetativa e sofre divisão binária.

Assim, as células bacterianas capazes de sofrer esporulação exibem dois ciclos — o **ciclo vegetativo** e o **ciclo de esporulação** (> Fig. 6.17). O ciclo vegetativo é repetido em intervalos de 20 minutos ou mais, e o ciclo de esporulação é iniciado periodicamente. Tem-se observado que endosporos com mais de 300 anos germinam quando colocados em um meio favorável. Eles são uma boa forma de garantia contra a extinção.

## Outras Estruturas Bacterianas Semelhantes a Esporos

Certas bactérias, como o *Azobacter*, formam **cistos** resistentes, ou seja, células esféricas e de paredes espessas, que lembram endosporos. Como os endosporos, os cistos são metabolicamente inativos e resistem à desidratação. Ao contrário dos endosporos, os cistos não possuem ácido dipicolínico e possuem resistência limitada às altas temperaturas. Os cistos germinam em uma única célula, logo não são um meio de reprodução.

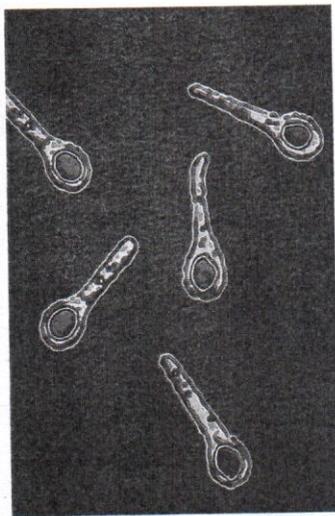
Algumas bactérias filamentosas, tais como a *Micromonospora* e o *Streptomyces*, formam **conídios** por reprodução assexuada, ou cadeias de esporos aéreos com paredes externas mais espessas. Estes esporos são temporariamente inativos, mas não são especialmente resistentes ao calor ou ao ressecamento. Quando os esporos, que são



> Fig. 6.17 Ciclos vegetativo e de esporulação em bactérias capazes de formar esporos.



(a)



(b)

> **Fig. 6.18** Endosporos bacterianos em duas espécies de *Clostridium*. (a) Células com endosporos localizados centralmente. (b) TEM colorida de células com endosporos localizados na extremidade, o que confere ao organismo uma forma de clava.

produzidos em grandes quantidades, são dispersados em um meio favorável, formam novos filamentos. Ao contrário dos endosporos, estes esporos contribuem para a reprodução das espécies.

## Cultivo de Bactérias

O cultivo de bactérias em laboratório apresenta dois problemas. Primeiro, é preciso uma cultura pura de uma única espécie para

se estudar as características de um organismo. Em segundo lugar, é preciso encontrar um meio que permita o crescimento do organismo desejado. Veremos algumas maneiras de solucionar estes problemas.

## Métodos de Obtenção de Culturas Puras

Para o estudo de bactérias em laboratório, é importante se obter uma **cultura pura**, uma cultura que contenha apenas uma única espécie de organismo. Antes do desenvolvimento das técnicas de cultura pura, os cientistas estudavam *culturas mistas*, ou culturas contendo diversos tipos de organismos. Os pesquisadores conseguiram observar diferentes formas e tamanhos de organismos, mas descobriam pouco sobre as necessidades nutricionais ou sobre as características do crescimento de espécies individuais. Hoje, as culturas puras são obtidas através do isolamento dos descendentes (ou prole) de uma única célula.

Apesar de agora parecer simples, a técnica de isolar culturas puras foi difícil de ser desenvolvida. Tentativas de isolar células por diluição seriada foram freqüentemente malsucedidas, pois dois ou mais organismos de diferentes espécies estavam várias vezes presentes nas mais altas diluições. A técnica de Koch de espalhar poucas bactérias em uma superfície sólida foi mais eficiente, pois ela depositava uma única bactéria em alguns locais. Entretanto, ele tentou várias substâncias sólidas diferentes. Fazendo uso da descoberta de Angelina Hesse, esposa de um colaborador, ele estabeleceu o ágar como o agente solidificante ideal. Poucos organismos o digerem, e, preparado em uma solução de 1,5%, ele não se funde a uma temperatura inferior a 95°C. Além disso, depois de fundido, o ágar permanece líquido até esfriar a 40°C, temperatura fria o suficiente para permitir a adição de nutrientes e de organismos vivos que poderiam ser destruídos pelo calor.

### O Método do Esgotamento

Hoje, a maneira correta de preparar culturas puras é utilizar o **método do esgotamento** em placas de ágar. As bactérias são recolhidas com uma alça metálica estéril, e a alça é movida levemente na superfície do ágar, depositando as bactérias nas estrias resultantes. A alça de inoculação é flambada e algumas bactérias são retiradas da região já depositada e estriadas em uma nova região (> Fig. 6.19). À medida que o esgotamento continua, cada vez menos bactérias são depositadas, sendo a alça flambada após cada estriamento. Os organismos individuais são depositados na última região estriada. Depois de a placa ser incubada a uma temperatura de crescimento adequada ao organismo, aparecem pequenas colônias, cada uma derivada de uma única célula bacteriana. A alça metálica é usada para se retirar uma porção de uma colônia isolada e transferi-la para qualquer meio estéril apropriado, para estudos posteriores. O uso de técnicas estéreis (assépticas) assegura que o novo meio irá conter organismos de uma única espécie.

### O Método Pour Plate

Outra maneira de obter culturas puras é o **método pour plate**, que utiliza diluições em série (> Fig. 6.7a). São feitas diluições de modo que a diluição final contenha em média mil organismos. Então, coloca-se 1 ml do meio líquido da diluição final em 9 ml de ágar fundido (45°C) e o meio é rapidamente vertido em uma placa estéril. A placa resultante conterá um pequeno número de bactérias, algumas das quais formarão colônias isoladas no ágar. Este método permite que alguns organismos fiquem embebidos no meio. É par-