

VI • Controle do crescimento microbiano

Até agora, neste capítulo, discutimos o crescimento microbiano, com foco na *promoção* do crescimento. Fechamos este capítulo considerando o lado oposto da moeda, o *controle do crescimento* microbiano. Muitos aspectos do controle do crescimento microbiano têm aplicações práticas significativas. Por exemplo, nós lavamos os produtos frescos para remover microrganismos ligados e inibimos o crescimento microbiano sobre as superfícies do corpo por meio de lavagem. No entanto, nenhum destes processos mata ou elimina todos os microrganismos. Apenas a **esterilização** – a morte ou a remoção de todos os microrganismos (incluindo vírus) – garante que este é o caso. Em certas circunstâncias, a esterilidade não é alcançável ou prática. Em outros, no entanto, a esterilização é absolutamente essencial. Revisaremos os métodos de controle de crescimento agora.

5.17 Princípios gerais e controle do crescimento pelo calor

Os microrganismos e seus efeitos podem ser controlados em muitos casos simplesmente pela limitação ou inibição do cres-

cimento das células. Os métodos para inibir o crescimento microbiano incluem a **descontaminação**, o tratamento de um objeto ou uma superfície, de modo a torná-los seguros à manipulação, e a **desinfecção**, um processo direcionado diretamente contra os patógenos, embora possa não eliminar todos os microrganismos. Descontaminação poderia ser tão simples como limpar os utensílios de cozinha para remover fragmentos de alimentos (e seus organismos ligados) antes de usá-los, ao passo que desinfecção requer agentes chamados de *desinfetantes*, os quais realmente matam microrganismos ou severamente inibem seu crescimento. Uma solução de branqueamento (hipoclorito de sódio), por exemplo, é um desinfetante eficaz para uma ampla variedade de aplicações.

Métodos físicos de controle do crescimento microbiano são frequentemente utilizados na indústria, medicina e em domicílio para promover a descontaminação microbiana, desinfecção e esterilização. O calor, a radiação e a filtração são capazes de destruir ou remover os microrganismos. Provavelmente, o método de controle do crescimento microbiano mais difundido consiste no uso do calor. Fatores que interferem na

suscetibilidade dos microrganismos ao calor incluem a temperatura e a duração do tratamento térmico, como também o tipo de calor, úmido ou seco, empregado.

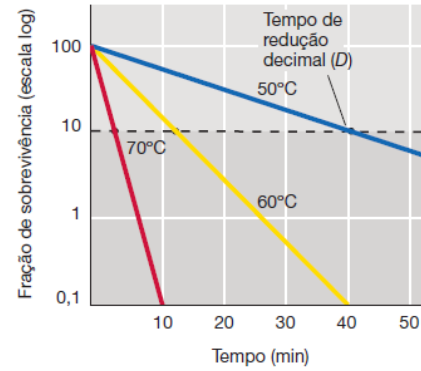
Esterilização pelo calor

Todos os microrganismos apresentam uma temperatura máxima de crescimento, acima da qual o crescimento é impossível, geralmente porque uma ou mais estruturas-chave celulares são destruídas ou uma proteína-chave é desnaturada (Figura 5.19). A eficácia do calor como agente esterilizante é medida pelo tempo requerido para uma redução de dez vezes na viabilidade de uma população microbiana, a uma dada temperatura. Esse período corresponde ao *tempo de redução decimal* ou *D*. A relação entre *D* e a temperatura é exponencial, quando o logaritmo de *D* é plotado em função da temperatura, obtém-se uma linha reta (Figura 5.32). A morte decorrente do aquecimento é uma função exponencial (de primeira ordem), ocorrendo mais rapidamente à medida que a temperatura eleva-se. O tipo de calor também é importante: o calor úmido tem maior poder de penetração que o calor seco e, em certa temperatura, promove uma redução mais rápida no número de organismos vivos.

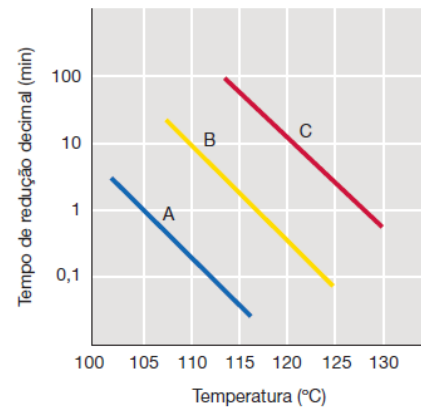
A determinação de um tempo de redução decimal requer um grande número de ensaios de contagem de células viáveis (Seção 5.9). Uma forma mais fácil de caracterizar a sensibilidade de um organismo ao calor consiste na determinação do seu *tempo de morte térmica*, o tempo necessário para matar todas as células, em uma dada temperatura. Para determinar-se o tempo de morte térmica, amostras de uma suspensão celular são aquecidas por diferentes tempos, misturadas a um meio de cultura e incubadas. Se todas as células forem mortas, não será observado crescimento nas amostras incubadas. No entanto, diferente da medida de tempo de redução decimal, que é independente do número original de células, o tempo de morte térmica é fortemente afetado pelo tamanho da população testada; um maior tempo é necessário para matar todas as células de uma população grande, do que para uma população pequena.

A presença de bactérias formadoras de endósporos em uma amostra tratada pelo calor pode influenciar tanto a redução decimal como o tempo de morte térmica. A resistência que as células vegetativas e os endósporos de um mesmo organismo apresentam ao calor varia consideravelmente. Lembre-se de que os endósporos maduros são altamente desidratados e contêm elementos químicos, como o cálcio dipicolinato, e proteínas, como as pequenas proteínas ácido solúveis do esporo (SASP, *small acid-soluble spore proteins*), que ajudam a conferir estabilidade frente ao calor da estrutura (↔ Seção 2.16). Não é possível assegurar que os endósporos foram mortos, a menos que temperaturas de autoclave (121°C) sejam mantidas por pelo menos 15 minutos. O tempo de redução térmica é também uma função inerente da resistência ao calor dos microrganismos presentes; conforme esperado, termófilos e hipertermófilos são mais resistentes que os mesófilos (Figura 5.32b).

O meio onde o aquecimento é realizado também influencia na morte tanto de células vegetativas como de endósporos. A morte microbiana é mais rápida em pH ácido, sendo os alimentos ácidos, como tomates, frutas e picles, mais facilmente esterilizados do que alimentos com pH neutro, como milho e feijões. Altas concentrações de açúcares, proteínas e gorduras dificultam a penetração do calor, geralmente aumentando



(a)



(b)

Figura 5.32 O efeito da temperatura na morte de microrganismos por calor. (a) O tempo de redução decimal (*D*) corresponde ao período de tempo em que apenas 10% da população original de um dado organismo (neste caso, um mesófilo) permanece viável, a uma determinada temperatura. A 70°C, *D* = 3 minutos; a 60°C, *D* = 12 minutos; a 50°C, *D* = 42 minutos. (b) Valores de *D* para um organismo-modelo das diferentes classes de temperatura: A, mesófilo; B, termófilo; C, hipertermófilo.

a termorresistência dos organismos, ao passo que altas concentrações de sais podem aumentar ou diminuir a resistência ao calor, dependendo do organismo. Células desidratadas e endósporos são mais resistentes ao calor do que as células úmidas; conseqüentemente, a esterilização térmica de objetos secos, como endósporos, sempre requer temperaturas mais elevadas e tempos mais longos do que a esterilização de objetos úmidos, como culturas bacterianas líquidas.

A autoclave e a pasteurização

A autoclave é um dispositivo de aquecimento selado que usa vapor sob pressão para matar os microrganismos (Figura 5.33). A morte de endósporos termorresistentes requer o aquecimento a temperaturas acima do ponto de ebulição da água a 1 atm. A autoclave utiliza vapor a uma pressão de 1,1 kg/cm² (15 libras/polegada²), o que gera uma temperatura de 121°C. A 121°C, o tempo necessário para promover uma esterilização de pequenas quantidades de material contendo endósporos é de cerca de 15 minutos (Figura 5.33b). Se o objeto submetido à esterilização é volumoso, a transferência de calor a seu interior será lenta, devendo o tempo de aquecimento ser estendido. Observe que não é a pressão no interior da autoclave que mata os microrganismos, mas sim as altas temperaturas que podem ser atingidas quando o vapor é aplicado sob alta pressão.

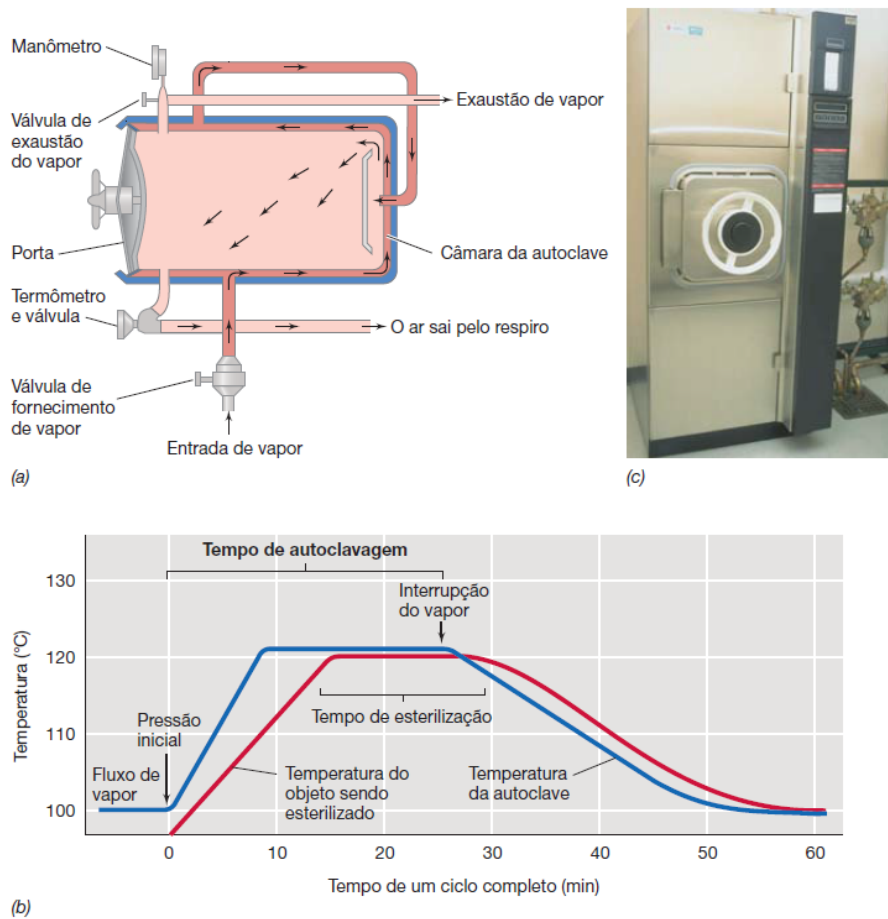


Figura 5.33 A autoclave e a esterilização pelo calor úmido. (a) O fluxo do vapor através de uma autoclave. (b) Um ciclo típico de autoclavagem. É apresentado o perfil temporal de aquecimento de um objeto relativamente volumoso. A temperatura do objeto aumenta e decresce mais lentamente do que a temperatura da autoclave. A temperatura do objeto deve atingir a tem-

peratura-alvo, sendo mantida por 10 a 15 minutos para garantir a esterilidade, independentemente da temperatura e do tempo registrados na autoclave. (c) Uma moderna autoclave de pesquisa. Observe a porta de travamento por pressão e os controles de ciclo automático no painel à direita. Os ajustes para a entrada de vapor e de exaustão localizam-se na lateral direita da autoclave.

A **pasteurização** utiliza um aquecimento precisamente controlado para reduzir o número total de microrganismos presentes no leite e em outros líquidos que seriam destruídos se autoclavados. O processo, assim denominado em homenagem a Louis Pasteur (↔ Seção 1.7), foi primeiramente utilizado no controle da deterioração do vinho. A pasteurização não mata todos os organismos e, desse modo, não é sinônimo de esterilização. A pasteurização, no entanto, reduz a *carga microbiana*, o número de microrganismos viáveis presentes em uma amostra. Nas temperaturas e tempos utilizados para a pasteurização de alimentos, como o leite, todas as bactérias patogênicas que podem ser transmitidas pelo leite infectado, especialmente os organismos causadores da tuberculose, brucelose, febre Q e febre tifoide, são mortos. Além disso, pela redução da carga microbiana geral, a pasteurização retarda o crescimento de organismos deteriorantes, aumentando consideravelmente o prazo de validade de líquidos perecíveis (↔ Seção 31.6).

Para que a pasteurização seja realizada, o líquido passa através de um trocador de calor. O controle cuidadoso da taxa de fluxo, assim como do tamanho e da temperatura da fonte de calor, promove a elevação da temperatura do líquido para 71°C durante 15 segundos (ou mesmo temperaturas superiores por curtos períodos de tempo; ver Figura 5.32), e, então, é

rapidamente resfriado. O processo completo recebe a denominação *pasteurização rápida*. A pasteurização do leite em temperaturas ultraelevadas requer o aquecimento a 135°C por 1 minuto. O leite também pode ser pasteurizado em grandes cubas a 63 a 66°C por 30 minutos. Entretanto, este método de *pasteurização em massa* é menos satisfatório, uma vez que o leite se aquece e esfria lentamente, alterando, assim, o sabor do produto final, sendo um processo menos eficiente.

MINIQUESTIONÁRIO

- Por que o calor é um agente eficaz de esterilização?
- Quais as etapas necessárias para garantir a esterilidade de materiais que possam estar contaminados por endósporos bacterianos?
- Diferencie a necessidade de esterilizar meios microbiológicos da necessidade de pasteurizar produtos lácteos.

5.18 Outros métodos de controle físico: radiação e filtração

O calor é apenas uma das formas de energia capaz de esterilizar ou reduzir a carga microbiana. Radiação ultravioleta (UV), raios

X e raios gama também são agentes efetivos. No entanto, cada tipo de energia apresenta um mecanismo de ação e eficácia diferentes, assim sua aplicação pode variar significativamente.

Radiação ultravioleta e ionizante

A radiação UV de comprimento de onda entre 220 e 300 nm é absorvida pelo DNA e pode causar mutações ou outros sérios efeitos a ele, podendo levar à morte do organismo exposto (↔ Seção 10.4). A radiação UV é útil na desinfecção de superfícies e ar, e é amplamente utilizada para descontaminar e desinfetar a superfície de trabalho de fluxos laminares equipados com uma lâmpada UV “germicida” (Figura 5.34), e também para desinfetar o ar circulante em hospitais e salas de preparação de alimentos. No entanto, a luz UV tem baixo poder de penetração, limitando-se seu uso à desinfecção de superfícies expostas ou ar, em vez de objetos volumosos, como comidas enlatadas ou roupas cirúrgicas.

A radiação ionizante é uma radiação eletromagnética com energia suficiente para produzir íons e outras espécies moleculares reativas a partir das moléculas com as quais as partículas radioativas colidem. A radiação ionizante produz elétrons, radicais hidroxila (OH·) e radicais hidreto (H·), e cada um deles pode danificar macromoléculas e levar as células irradiadas à morte (Seção 5.16).

A unidade de radiação é denominada *roentgen*, e o padrão para aplicações biológicas, como a esterilização, corresponde à *dose de radiação absorvida*, medida em *rads* (100 erg/g) ou *grays* (1 Gy = 100 rad). A radiação ionizante é normalmente gerada por uma fonte de raios X ou pelos núclídeos radioativos ⁶⁰Co e ¹³⁷Cs, que são produtos relativamente baratos da fissão nuclear. Esses núclídeos produzem raios X ou gama (raios γ), e ambos apresentam energia e poder de penetração suficientes para matar os microrganismos em itens volumosos, como produtos alimentícios e suprimentos médicos.

A Tabela 5.6 mostra a dose necessária para uma redução de 10 vezes (*D*10) no número de microrganismos selecionados. O valor *D*10 é análogo ao tempo de redução decimal da esterilização por calor, e a curva de morte da radiação ionizante gera um gráfico similar (Figura 5.35; compare com a Figura 5.32). Assim como ocorre com o tratamento por calor, a destruição



Figura 5.34 Fluxo laminar de segurança biológica. Uma fonte de luz ultravioleta (UV) é utilizada para evitar a contaminação da cabine quando não está em uso. Quando a cabine está em uso, o ar externo à câmara é bombeado através do filtro HEPA. O ar presente no interior da câmara é deslocado através das ventilações que circundam a face anterior e retorna através do filtro HEPA. Assim, a câmara é desenvolvida de modo a propiciar uma área de trabalho livre de contaminantes para manipulação de microrganismos e culturas de tecidos.

Tabela 5.6 Sensibilidade à radiação de alguns microrganismos representativos

Tipo de microrganismo	Características	<i>D</i> 10 ^a (Gy)
Bactéria		
<i>Clostridium botulinum</i>	Gram-positiva, anaeróbia, esporulante	3.300
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Gram-negativa, coco resistente à radiação	2.200
<i>Lactobacillus brevis</i>	Gram-positiva, bastonete	1.200
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positiva, aeróbia, esporulante	600
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negativa, bastonete	300
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gram-negativa, bastonete	200
Fungo		
<i>Aspergillus niger</i>	Mofo comum	500
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermento de padaria e cervejaria	500
Vírus		
Febre aftosa	Patógeno de animais biungulados	13.000
Coxsackie	Patógeno humano	4.500

^a*D*10 corresponde à quantidade de radiação necessária para reduzir em 10 vezes (1 unidade logarítmica) a população inicial, ou nível de atividade. Gy, grays; 1 Gy é equivalente a 100 rads. A dose letal para seres humanos é de 10 Gy.

dos endósporos com radiação ionizante é mais difícil do que a de células vegetativas, e os vírus são mais difíceis de serem destruídos do que as bactérias (Tabela 5.6). Além disso, os microrganismos são muito mais resistentes à radiação ionizante do que os organismos multicelulares. Por exemplo, a dose de radiação letal aos seres humanos pode ser de apenas 10 Gy, quando utilizada por um curto período de tempo.

Nos Estados Unidos, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso de radiação para a esterilização dos mais diversos itens, como suprimentos cirúrgicos, materiais descartáveis de laboratório, fármacos e até mesmo tecidos para enxertos. Determinados alimentos e produtos alimentícios, como

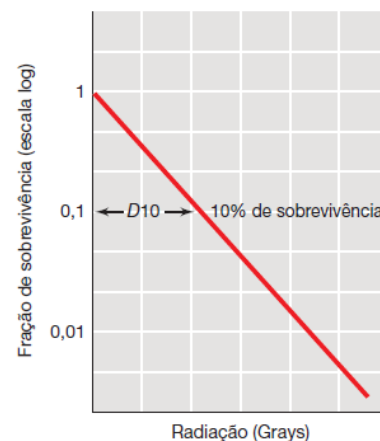


Figura 5.35 Relação entre a fração de sobrevivência e a dose de radiação de um microrganismo. A *D*10, ou dose de redução decimal, pode ser interpolada a partir dos dados, conforme apresentado.

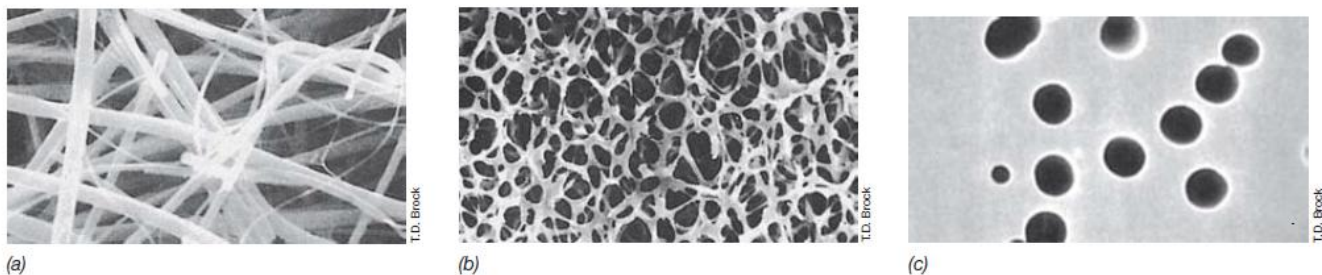


Figura 5.36 Filtrros microbiológicos. Micrografia eletrônica de varredura mostrando a estrutura de (a) um filtro de profundidade, (b) uma membrana filtrante convencional e (c) um filtro nucleoporo.

produtos cárneos frescos, hambúrgueres e frango e especiarias, também são rotineiramente irradiados para garantir que eles estão estéreis, ou pelo menos livres de patógenos e de insetos.

Esterilização por filtração

O calor corresponde a uma forma eficaz de descontaminação da maioria dos líquidos, entretanto, gases ou líquidos sensíveis ao calor devem ser esterilizados por outros métodos. Para isso, o líquido ou gás passa através de um filtro, um dispositivo contendo poros de dimensões muito pequenas que impedem a passagem de quaisquer células que possam estar presentes. Para esterilização, um filtro com poros de diâmetro médio de $0,2 \mu\text{m}$ é desejável; no entanto, mesmo poros tão pequenos não irão impedir a passagem da maioria dos vírus. Em geral, para esterilização de pequenos volumes, como soluções de laboratório, são utilizados filtros com poros de $0,45 \mu\text{m}$ e $0,2 \mu\text{m}$.

Vários tipos de filtros são utilizados rotineiramente na microbiologia, incluindo filtros de profundidade, membranas filtrantes e filtros nucleoporos. Um filtro de profundidade é uma lâmina ou camada fibrosa, confeccionada por um conjunto aleatório de fibras de papel ou de borossilicato (vidro) sobrepostas (Figura 5.36a). Os filtros de profundidade são importantes para fins de biossegurança. Por exemplo, as manipulações de culturas celulares, culturas microbianas e meios de cultura requerem a minimização da contaminação, tanto do manipulador como dos materiais experimentais. Essas operações podem ser realizadas de maneira eficiente em um fluxo laminar de biossegurança, com o fluxo de ar para dentro e para fora da câmara passando através de um filtro de profundidade, denominado **filtro HEPA** (do inglês, *high-efficiency particulate air* [filtro de alta eficiência para ar particulado]), (Figura 5.34). Os filtros HEPA geralmente removem partículas-teste de $0,3 \mu\text{m}$, ou maiores, com eficiência maior que 99,9%.

As membranas filtrantes são o tipo mais comum de filtros utilizados para a esterilização de líquidos em laboratórios de microbiologia (Figura 5.36b e Figura 5.37). Membranas filtrantes são compostas por polímeros que suportam altas tensões, como acetato de celulose, nitrocelulose ou polissulfona, produzidos de forma a apresentarem inúmeros poros diminutos. Dispositivos contendo membranas filtrantes estéreis, destinadas à esterilização de volumes pequenos ou medianos de líquidos, como meios de cultura, são rotineiramente utilizados em laboratórios de pesquisa ou clínicos. A filtração é realizada com o auxílio de seringa, compressor ou bomba de vácuo, para forçar a passagem do líquido através do aparato de filtração até um recipiente coletor estéril (Figura 5.37).

Outro tipo de membrana filtrante comumente utilizada é o filtro nucleoporo (Figura 5.38). Esses filtros são confeccio-

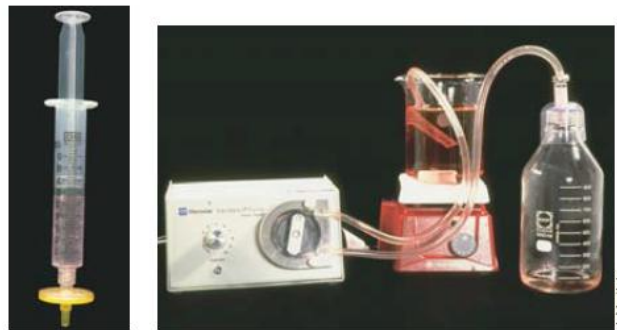
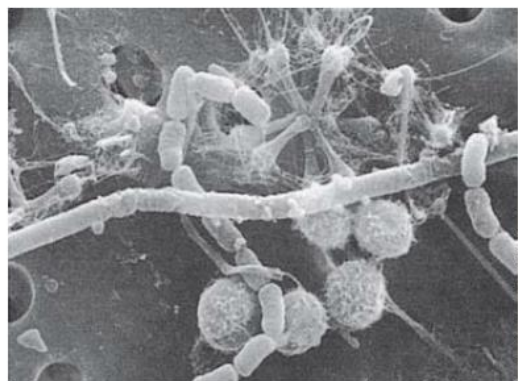
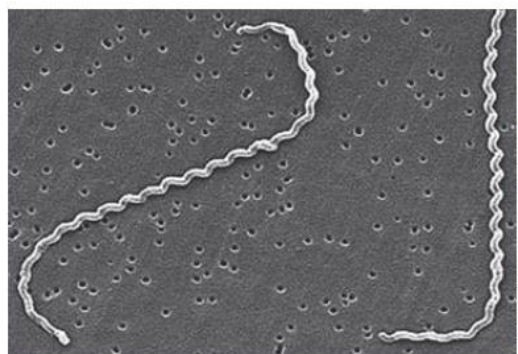


Figura 5.37 Membranas filtrantes. Unidades de membranas filtrantes descartáveis, pré-esterilizadas e montadas. À esquerda: um sistema de filtração projetado para pequenos volumes. À direita: um sistema de filtração projetado para volumes maiores.



(a)



(b)

Figura 5.38 Micrografia eletrônica de varredura de bactérias retidas em membranas filtrantes nucleoporos. (a) Bactérias e algas aquáticas. O tamanho do poro é de $5 \mu\text{m}$. (b) *Leptospira interrogans*. A bactéria tem diâmetro aproximado de $0,1 \mu\text{m}$ e até $20 \mu\text{m}$ de comprimento. O tamanho do poro é de $0,2 \mu\text{m}$.

nados por filmes com espessura de 10 μm de policarbonato tratados com radiação, sendo, em seguida, cauterizados com um produto químico, gerando poros muito uniformes (Figura 5.36c). Os filtros nucleoporos são geralmente utilizados no isolamento de espécimes para microscopia eletrônica de varredura. Os microrganismos são removidos de um líquido ou amostra natural, como a água de um lago, e concentrados em um único plano no filtro, onde podem ser observados ao microscópio (Figura 5.38a).

MINIQUESTIONÁRIO

- Defina D_{10} e explique por que a dose letal de radiação (Tabela 5.6) não é a mesma para todas as bactérias.
- Por que a radiação ionizante é mais efetiva que a radiação UV para a esterilização de produtos alimentícios?
- Diferencie os principais tipos de filtros de esterilização utilizados em laboratórios de microbiologia.