

A fase de morte celular

O número de mortes finalmente ultrapassa o número de células novas formadas, e a população entra na **fase de morte** ou **declínio logarítmico**. Essa fase continua até que a população tenha diminuído para uma pequena fração da população da fase anterior ou morre totalmente. Algumas espécies passam por toda a sequência de fases em somente poucos dias; outras mantêm algumas células sobreviventes indefinidamente. A morte microbiana será discutida no Capítulo 7.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Se um casal de camundongos inicia uma reprodução em uma gaiola com um fornecimento de alimento fixo, a sua curva de população é similar a uma curva de crescimento bacteriano? **6-15**

Medida direta do crescimento microbiano

O crescimento de populações microbianas pode ser medido de diversas maneiras. Alguns métodos medem o número de células, outros medem a massa total da população, que muitas vezes é proporcional ao número de células. A quantificação de uma população normalmente é registrada como o número de células por mililitro de líquido ou grama de material sólido. Como as populações bacterianas geralmente são muito grandes, a maioria dos métodos de contagem tem como base enumerações diretas ou indiretas de amostras pequenas; um cálculo determina depois o tamanho total da população. Vamos assumir, por exemplo, que um milionésimo de mililitros (10^{-6} mL) de leite azedo contém 70 bactérias. Portanto, deve existir 70 vezes mais células, ou 70 milhões de células por mililitro.

No entanto, não é prático medir em um milionésimo de mililitro ou de grama de alimento. Assim, o procedimento é feito indiretamente em uma série de diluições. Por exemplo, se adicionamos 1 mL de leite em 99 mL de água, cada mililitro dessa diluição terá um centésimo das bactérias que um mililitro da amostra original tinha. Realizando uma série de diluições, podemos rapidamente estimar o número de bactérias da amostra original. Para contar as populações microbianas em alimentos sólidos (como um hambúrguer), uma parte do alimento será misturada com nove partes de água formando um homogenado. Amostras da diluição inicial de 100 vezes podem ser transferidas com uma pipeta para diluições posteriores ou contagem de células.

Contagem em placas

O método utilizado com mais frequência para medir populações bacterianas é a **contagem em placas**. Uma grande vantagem desse método é que ele mede o número de células viáveis. Uma desvantagem é que são necessárias 24 horas ou mais para que colônias visíveis sejam formadas. Isso pode ser um problema sério para certas aplicações, como o controle de qualidade do leite, quando não é possível manter um lote do produto durante esse tempo.

As contagens em placas consideram que cada bactéria viva cresce e se divide para produzir uma única colônia. Isso não é sempre verdadeiro, pois as bactérias frequentemente crescem unidas em agregados ou cadeias (veja a Figura 4.1, página 78). Por-

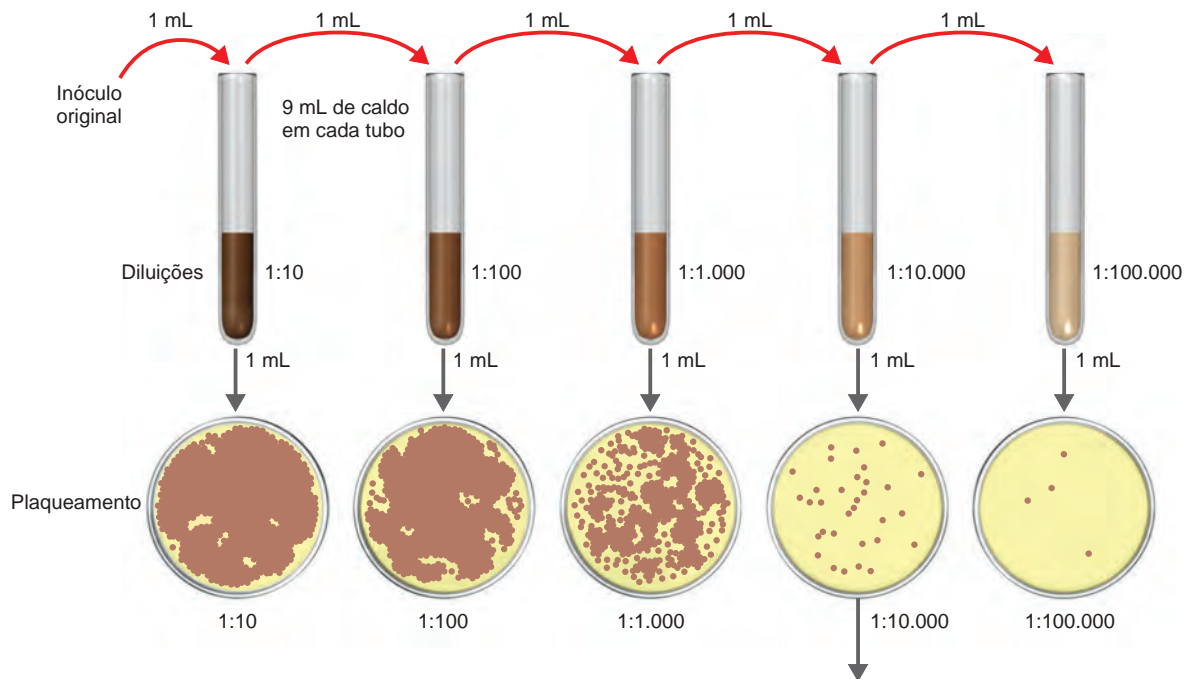
tanto, uma colônia muitas vezes resulta não de uma única bactéria, mas de um curto fragmento de uma cadeia ou de um agregado bacteriano. Para refletir essa realidade, as contagens em placas muitas vezes são denominadas **unidades formadoras de colônias (UFC)**.

Quando uma contagem em placas é feita, é importante que somente um número limitado de colônias se desenvolva na placa. Quando muitas colônias estão presentes, algumas células são reprimidas e não podem se desenvolver. Obviamente, isso não produz uma placa adequada para contagem; essas condições causam imprecisão na contagem. Uma recomendação da Food and Drug Administration é a contagem de placas com somente 25 a 250 colônias, mas muitos microbiologistas preferem placas com 30 a 300 colônias. Para assegurar que algumas contagens de colônias estejam nessa faixa, o inóculo inicial é diluído várias vezes, em um processo chamado de **diluição seriada** (Figura 6.16).

Diluições seriadas. Digamos, por exemplo, que uma amostra de leite tem 10.000 bactérias por mililitro. Se 1 mL dessa amostra fosse semeado em placa, teoricamente 10.000 colônias deveriam se formar no meio da placa de Petri. Obviamente, isso não produziria uma placa contável. Se 1 mL dessa amostra fosse transferido para um tubo contendo 9 mL de água estéril, cada mililitro do fluido dentro do tubo conteria 1.000 bactérias. Se 1 mL dessa amostra fosse inoculado em uma placa de Petri, ainda teriam colônias demais na placa para a realização da contagem. Portanto, outra diluição deveria ser feita. Um mililitro contendo 1.000 bactérias deveria ser transferido para um segundo tubo de 9 mL de água. Cada mililitro nesse tubo conteria agora somente 100 bactérias, e se 1 mL do conteúdo do tubo fosse inoculado em placa, 100 colônias potenciais seriam formadas, um número facilmente contável.

Incorporação em placas a espalhamento em placas. A contagem em placas é feita pelo método de incorporação em placas ou pelo método de espalhamento em placas. O método de **incorporação em placas** segue o procedimento mostrado na Figura 6.17a. Um mililitro ou 0,1 mL das diluições da suspensão bacteriana é introduzido em uma placa de Petri. O meio nutritivo, no qual o ágar é mantido líquido por aquecimento em banho-maria a 50°C, é vertido sobre a amostra, que é então misturada com o meio por agitação lenta da placa. Quando o ágar solidifica, a placa é incubada. Com a técnica de incorporação em placas, as colônias crescerão tanto dentro do ágar nutritivo (a partir de células que ficaram em suspensão no meio nutritivo assim que o ágar solidificou) quanto na superfície da placa de ágar.

Essa técnica tem algumas desvantagens, pois alguns micro-organismos relativamente sensíveis ao calor podem ser danificados pelo ágar fundido, sendo incapazes de formar colônias. Além disso, quando certos meios diferenciais são utilizados, a aparência diferenciada da colônia na superfície é essencial para diagnóstico. As colônias que se formam abaixo da superfície de uma placa por incorporação não são adequadas para esses testes. Para evitar esses problemas, o **método de espalhamento em placas** frequentemente é utilizado (Figura 6.17b). Um inóculo de 0,1 mL é adicionado à superfície de um meio de ágar previamente solidificado. O inóculo



Cálculo: número de colônias na placa \times índice de diluição da amostra = número de bactérias/mL (p. ex., se 32 colônias estão na placa de diluição 1:10.000, a contagem pode ser estimada em $32 \times 10.000 = 320.000$ bactérias/mL na amostra).

Figura 6.16 Diluições seriadas e contagens em placas. Nas diluições seriadas, o inóculo original é diluído em uma série de tubos de diluições. Nesse exemplo, cada tubo de diluição subsequente tem apenas um décimo do número de células microbianas do tubo anterior. Posteriormente, amostras de todas as diluições são utilizadas para inocular placas de Petri, nas quais as colônias crescem e podem ser contadas. Essa contagem é então utilizada para estimar o número de bactérias na amostra original.

P Por que as diluições 1:1.000 e 1:100.000 não foram contadas? Teoricamente, quantas colônias deveriam aparecer na placa 1:1.000?

é então espalhado de modo uniforme na superfície do meio com um bastão de vidro em L esterilizado. Esse método espalha todas as colônias na superfície e evita o contato entre as células e o ágar fundido.

Filtração

Quando a quantidade de bactérias é muito pequena, como em lagos ou correntes de água relativamente puras, as bactérias podem ser contadas pelo método de **filtração** (Figura 6.18). Nessa técnica, pelo menos 100 mL de água passam através de uma membrana filtrante fina com poros estreitos o suficiente para não deixar que as bactérias passem, ficando assim retidas na superfície do filtro. Esse filtro é transferido para uma placa de Petri contendo um suporte embebido em um meio líquido nutriente, que permite que as colônias se desenvolvam a partir das bactérias retidas na superfície do filtro. Esse método é aplicado frequentemente para a detecção e o registro de bactérias coliformes, que são indicadoras de contaminação fecal em alimento ou água (veja o Capítulo 27). As colônias formadas por essas bactérias podem ser identificadas quando um meio nutritivo diferencial é utilizado (as colônias mostradas na Figura 6.18b são exemplos de coliformes).

O método do número mais provável

Outro método para determinar o número de bactérias em uma amostra é o **método do número mais provável (MNP)**, ilustrado na Figura 6.19. Essa técnica estatística tem como base o seguinte princípio: quanto maior o número de bactérias em uma amostra, maior será o número de diluições necessárias para reduzir a densidade até um ponto no qual mais nenhuma bactéria esteja presente nos tubos de diluição seriada. O MNP é utilizado quando os micro-organismos não crescem em um meio sólido (como as bactérias quimioautotróficas nitrificantes). Também é prático quando o crescimento de bactérias em um meio líquido diferencial é utilizado para identificar micro-organismos (como bactérias coliformes em água, que fermentam seletivamente lactose produzindo ácido). O mnp fornece somente uma estimativa de 95% de probabilidade de a população bacteriana estar em uma faixa determinada e que o MNP obtido é estatisticamente o número mais provável.

Contagem microscópica direta

No método conhecido como **contagem microscópica direta**, um volume conhecido de uma suspensão bacteriana é colocado em uma área definida da lâmina microscópica. Por considerações de

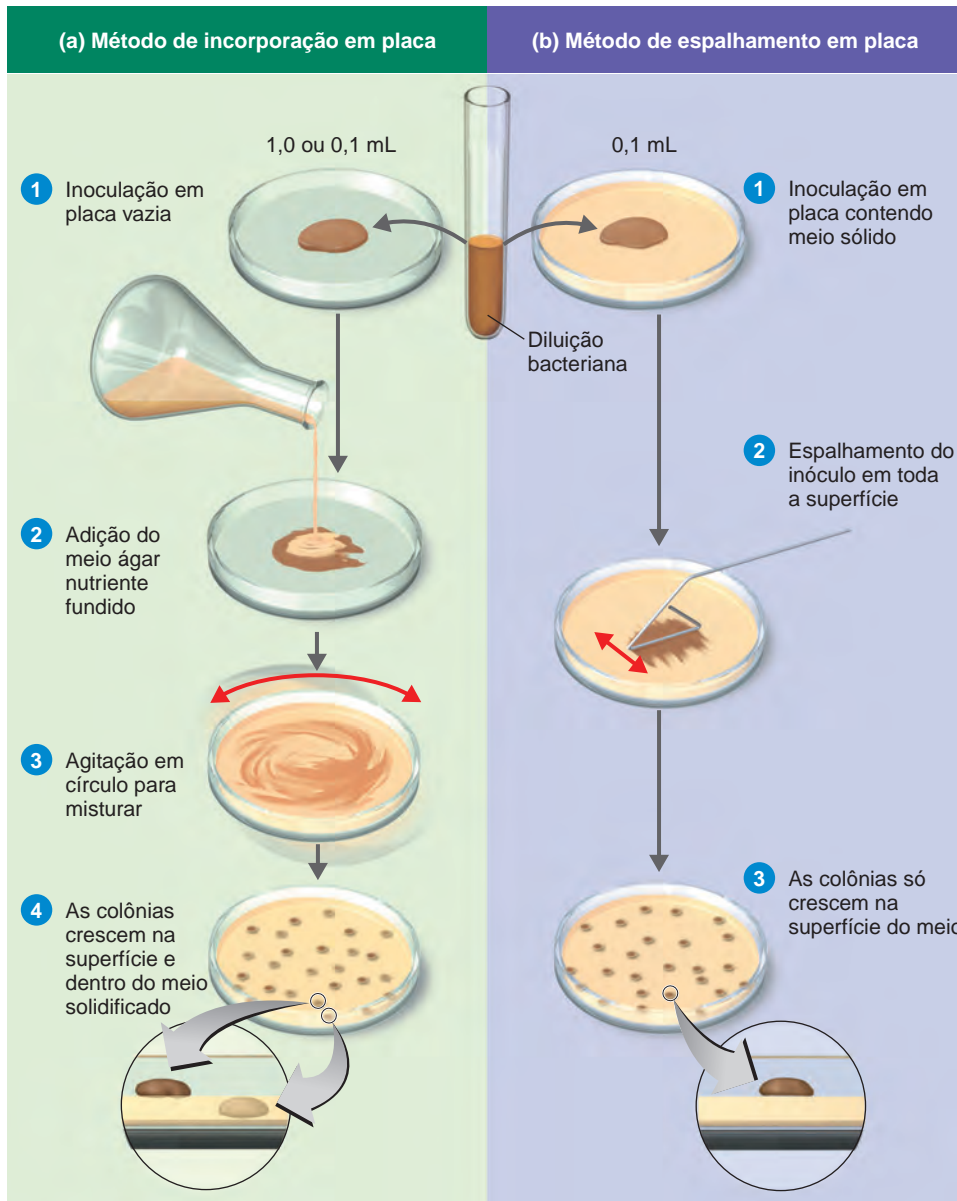


Figura 6.17 Métodos de preparação das placas para contagem. **(a)** Método de incorporação em placa. **(b)** Método de espalhamento em placa.

P Quais são as vantagens de cada método?

tempo, esse método frequentemente é utilizado para contar bactérias no leite. Uma amostra de 0,01 mL é espalhada em uma superfície de um centímetro quadrado da lâmina, um corante é adicionado para visualizar a bactéria, e a amostra é observada com óleo de imersão. Deve ser determinada a área de observação de cada região da lâmina. Após a contagem de diferentes regiões da lâmina, a média do número de bactérias por campo observado pode ser calculada. A partir desses resultados, o número de bactérias no centímetro quadrado contendo a amostra também pode ser calculado. Como essa área da lâmina continha 0,01 mL, o número de bactérias em cada mililitro da suspensão é o número de bactérias na amostra multiplicado por 100.

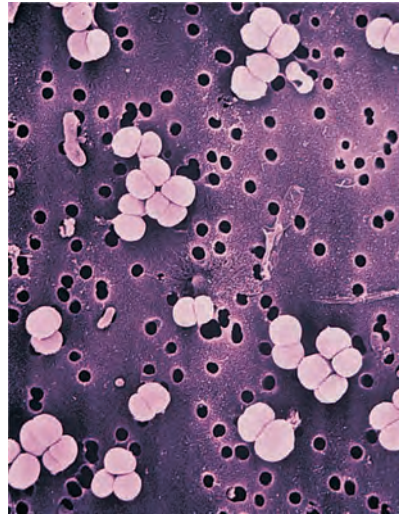
Uma lâmina especialmente desenvolvida chamada de *contador de células Petroff-Hausser* também é utilizado para contagens microscópicas diretas (Figura 6.20).

As bactérias móveis são difíceis de ser contadas com esse método e, como acontece com outros métodos microscópicos, as células mortas acabam sendo contadas como as vivas. Outra desvantagem é que é necessária uma concentração de células bastante elevada para permitir uma contagem satisfatória – em torno de um milhão de bactérias por mililitro. A maior vantagem das contagens microscópicas é que um tempo de incubação não é requerido, e elas geralmente são reservadas para situações nas quais o tempo é essencial. Esse é o caso dos *contadores de células eletrônicos*, também conhecidos como *contadores Coulter*, que contam automaticamente o número de células em um volume líquido determinado.

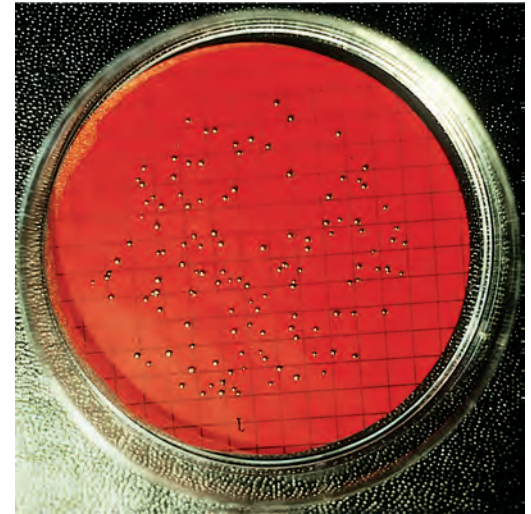
Esses instrumentos são utilizados em alguns laboratórios de pesquisa e em hospitais.

Figura 6.18 Contagem de bactérias por filtração.

P Poderia ser realizada uma contagem por incorporação em uma placa de Petri comum com um inóculo de 10 mL? Se não, por quê?



(a) As bactérias em 100 mL de água são retidas na superfície da membrana de filtro. Observe que os poros no filtro são menores que as bactérias.



(b) Um filtro como o mostrado na foto (a), com as bactérias bastante espalhadas, foi colocado sobre um suporte saturado com o meio líquido Endo, que é utilizado para enumeração de coliformes. As bactérias individuais cresceram como colônias visíveis. Foram contadas 124 colônias visíveis, sendo, portanto, possível estimar que existiam 124 bactérias em 100 mL da amostra de água.

Volume de inóculo para cada grupo de cinco tubos	Tubos de meio nutriente (Grupo de cinco tubos)	Número de tubos positivos por grupo
10 mL		5
1 mL		3
0,1 mL		1

(a) Série de diluições do método do número mais provável (MNP). Neste exemplo, são apresentados três grupos de tubos, cada grupo contendo cinco tubos. Cada tubo do primeiro grupo de cinco tubos recebe 10 mL do inóculo, como uma amostra de água. Cada tubo do segundo grupo de cinco tubos recebe 1 mL da amostra, e do terceiro grupo, 0,1 mL cada. Existiam bactérias o suficiente na amostra para que todos os cinco tubos do primeiro grupo apresentassem crescimento bacteriano, sendo considerados positivos. No segundo grupo, que recebeu somente um décimo do inóculo inicial, apenas três tubos foram positivos. No terceiro grupo, que recebeu um centésimo do inóculo inicial, somente um tubo foi positivo.

Combinação de tubos positivos	Índice de MNP/100 mL	Limites com 95% de confiabilidade	
		Inferior	Superior
4-2-0	22	6.8	50
4-2-1	26	9.8	70
4-3-0	27	9.9	70
4-3-1	33	10	70
4-4-0	34	14	100
5-0-0	23	6.8	70
5-0-1	31	10	70
5-0-2	43	14	100
5-1-0	33	10	100
5-1-1	46	14	120
5-1-2	63	22	150
5-2-0	49	15	150
5-2-1	70	22	170
5-2-2	94	34	230
5-3-0	79	22	220
5-3-1	110	34	250
5-3-2	140	52	400

(b) A tabela do MNP. A tabela do MNP nos permite calcular para uma amostra o número de micro-organismo que estatisticamente são os mais prováveis de terem levado aos resultados obtidos. O número de tubos positivos é anotado para cada grupo: no exemplo sombreado, os tubos 5, 3 e 1. Se levarmos essa combinação para a tabela do MNP, concluiremos que o índice do MNP para 100 mL é 110. Estatisticamente, isso significa que 95% das amostras de água que apresentaram esse resultado contêm entre 34 e 250 bactérias, com 110 sendo o número mais provável.

Figura 6.19 Método do número mais provável (MNP).

P Em quais circunstâncias o MNP é utilizado para determinar o número de bactérias em uma amostra?

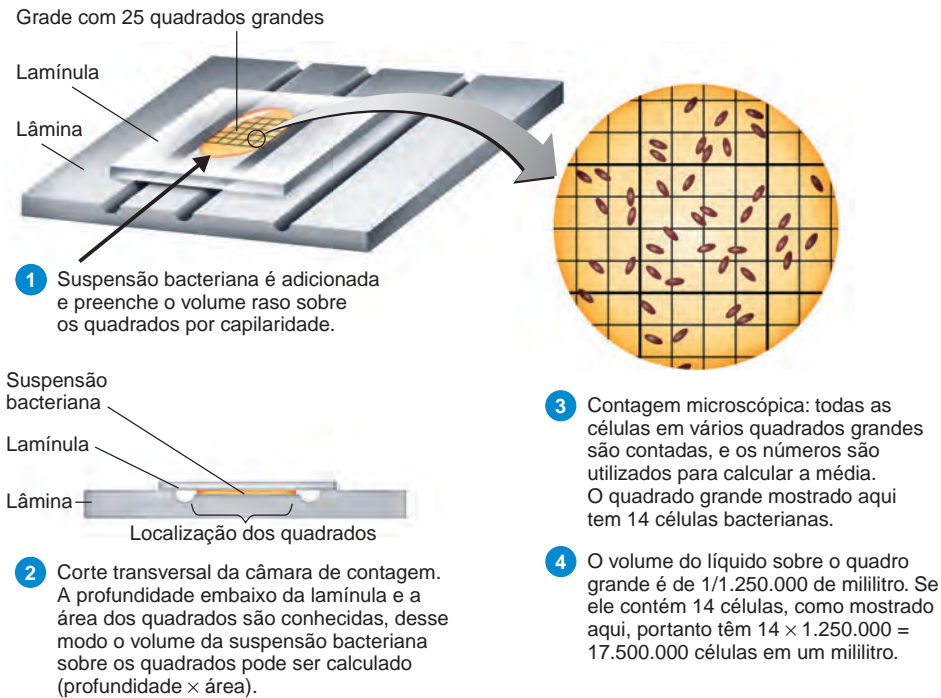


Figura 6.20 Contagem microscópica direta de bactérias com uma câmara de contagem Petroff-Hausser. O número médio de células no quadrado grande multiplicado pelo fator 1.250.000 fornece o número de bactérias por mililitro.

P Esse tipo de contagem, apesar das suas desvantagens óbvias, frequentemente é utilizado para estimar a população bacteriana em laticínios. Por quê?

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Por que é difícil medir de maneira realista o crescimento de um fungo micelial pelo método de contagem em placas? **6-16**

Determinação do número de bactérias por métodos indiretos

Não é sempre necessário contar as células microbianas para estimar seu número. Na pesquisa e na indústria, o número e a atividade dos micro-organismos também são determinados por alguns dos métodos seguintes.

Turbidimetria

Para alguns tipos de experimentos, estimar a **turbidimetria** é uma maneira de monitorar o crescimento bacteriano. À medida que as bactérias se multiplicam em um meio líquido, o meio se torna turvo ou opaco com as células.

O instrumento utilizado para medir a turbidez é um *espectrofotômetro* (ou colorímetro). No espectrofotômetro, um feixe de luz passa através de uma suspensão de bactérias até um detector fotossensível (**Figura 6.21**). Com o aumento do número de bactérias, menos luz atingirá o detector. Essa alteração da luz será registrada na escala do instrumento como *porcentagem de transmissão*. Também será registrada a expressão logarítmica chamada de *absorbância* (algumas vezes denominada *densidade ótica*, ou DO, que é calculada como $Abs = 2 - \log$ de % da transmissão). A absorbância é utilizada para representar graficamente o crescimento bacteriano. Quando as bactérias estão em crescimento logarítmico ou em declínio, o gráfico da absorbância em função do tempo será uma linha quase reta. Se as leituras de absorbância forem combinadas com contagens em placas da mesma cultura, essa correlação poderá ser

utilizada para estimativas futuras do número de bactérias obtidas pela medida de turbidimetria.

Mais de um milhão de células por mililitro devem estar presentes para que os primeiros sinais de turbidez sejam visíveis. Em torno de 10 milhões a 100 milhões de células por mililitro são necessários para que uma suspensão seja turva o suficiente para possibilitar uma leitura no espectrofotômetro. Portanto, a turbidimetria não é uma medida útil de contaminação de líquidos por um número relativamente pequeno de bactérias.

Atividade metabólica

Outra maneira indireta de estimar o número de bactérias é medir a *atividade metabólica* de uma população. Esse método assume que a quantidade de um produto metabólico determinado, como um ácido ou CO_2 , é diretamente proporcional ao número de bactérias presentes. Um exemplo de aplicação prática de um teste metabólico é o ensaio microbiológico no qual a produção de ácido é utilizada para determinar quantidades de vitaminas.

Peso seco

Para bactérias e fungos filamentosos, os métodos comuns de medida são menos satisfatórios. Uma contagem em placas não poderia medir esse aumento em massa micelial. Nas contagens em placas de actinomicetes (veja a Figura 11.22, página 321) e fungos, o número de esporos assexuados é mais frequentemente contado como alternativa, mas essa não é uma boa medida do crescimento. Uma das melhores maneiras de medir o crescimento de organismos filamentosos é pelo *peso seco*. Nesse procedimento, o fungo é removido do meio de crescimento, filtrado para remover outros materiais e seco em dissecador, sendo então pesado. Para bactérias, o mesmo procedimento básico é seguido.

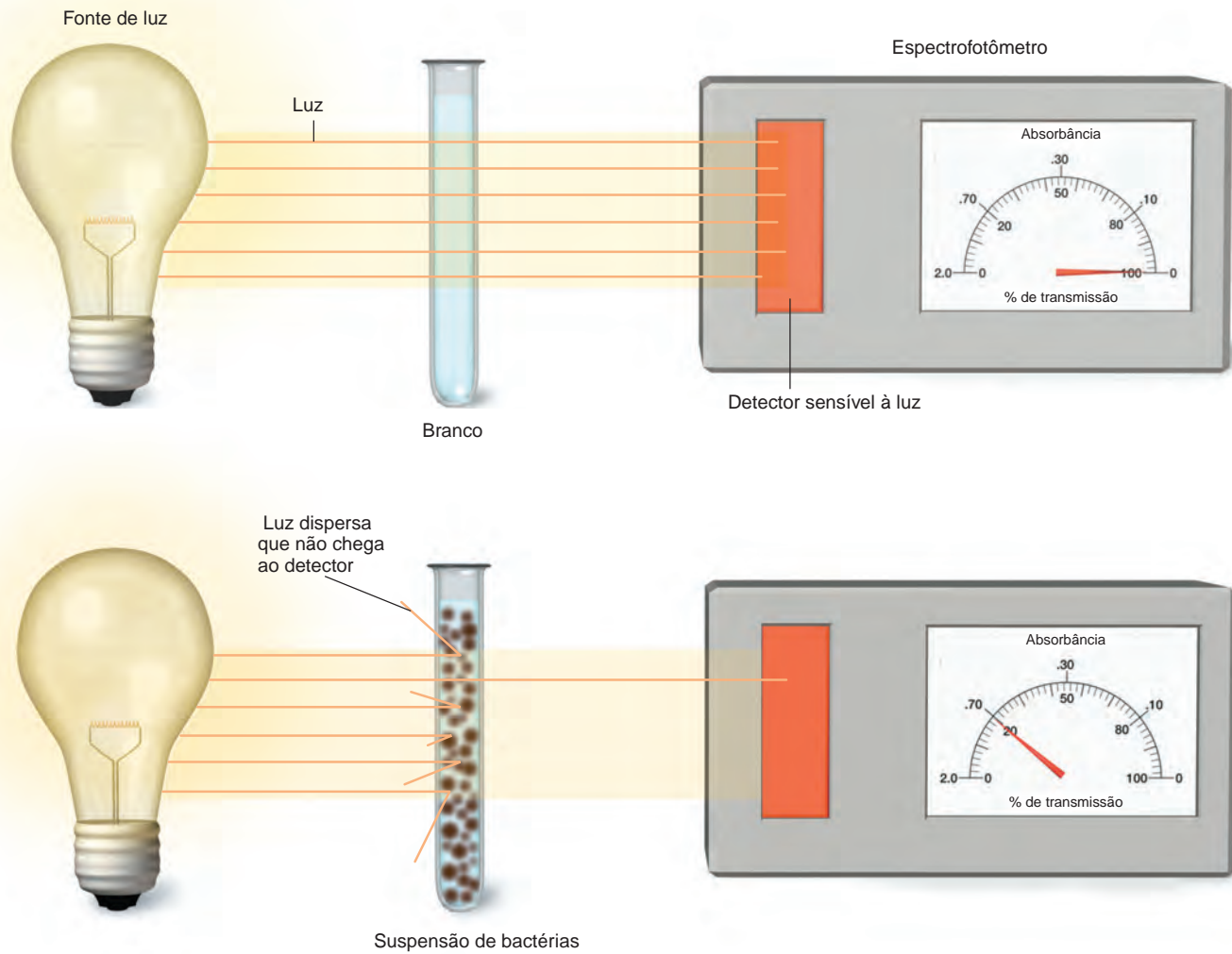


Figura 6.21 Determinação do número de bactérias por turbidimetria. A quantidade de luz que chega ao detector sensível à luz no espectrofotômetro é inversamente proporcional ao número de bactérias sob condições padronizadas. Quanto menos luz é transmitida, mais bactérias estão presentes na amostra. A turbidez da amostra pode ser expressa como sendo de 20% de transmissão ou de 0,7 de absorvância. As leituras de absorvância são uma função logarítmica e algumas vezes úteis para a realização de um gráfico.

P A turbidimetria é um método direto ou indireto de medir o crescimento bacteriano?

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Métodos diretos geralmente requerem um tempo de incubação para obter colônias. Por que isso não é sempre viável para a análise de alimentos? **6-17**
- ✓ Se não existe um método adequado para analisar a quantidade de vitamina de um produto, qual então seria o melhor método para determinar essa quantidade? **6-18**

Você adquiriu um conhecimento básico sobre os fatores para o crescimento microbiano e como ele pode ser medido. No Capítulo 7, analisaremos como este crescimento é controlado em laboratórios, hospitais, indústrias e em nossas casas.