

Figura 6.10 Meio diferencial. As colônias de bactérias no meio diferencial têm uma aparência diferente. Esse meio é o ágar hipertônico manitol, e as bactérias nas colônias capazes de fermentar o manitol do meio em ácidos levam a uma mudança na coloração. Na realidade, esse meio também é seletivo por causa da alta concentração de sal que previne o crescimento da maioria das bactérias, exceto os *Staphylococcus* spp.

P As bactérias capazes de crescer em pressão osmótica elevada poderiam crescer no muco encontrado no nariz?

reus. Esse meio salino também contém um indicador de pH que muda de cor se o manitol do meio é fermentado a ácido; as colônias fermentadoras de manitol de *S. aureus* são assim diferenciadas das colônias de bactérias que não fermentam o manitol. As bactérias que crescem em concentração elevada de sal e fermentam o manitol podem ser facilmente identificadas pela mudança de coloração (Figura 6.10). Provavelmente elas sejam colônias de *S. aureus*, e sua identificação pode ser confirmada por testes adicionais. A utilização de meio diferencial para identificar *E. coli* produtora de toxina é discutida no Capítulo 5, página 139.

Meios de enriquecimento

Como as bactérias em pequeno número podem ser perdidas, em particular se outras bactérias estiverem presentes em maior número, algumas vezes é necessário utilizar uma **cultura de enriquecimento**. Com frequência essa metodologia é empregada com amostras de solo ou fezes. O meio (meio enriquecido) para enriquecer uma cultura geralmente é líquido e fornece nutrientes e condições ambientais que favorecem o crescimento de um micro-organismo específico e não de outros. Nesse sentido, também é um meio seletivo, mas elaborado para amplificar até níveis detectáveis um número muito pequeno do micro-organismo de interesse.

Suponha que queremos isolar de uma amostra de solo um micro-organismo que pode crescer com fenol e que está presente em número menor que outras espécies. Se a amostra de solo é colocada em um meio líquido de enriquecimento no qual o fenol é a única

| Tabela 6.5 Meios de cultura | |
|------------------------------|---|
| Tipo | Finalidade |
| Quimicamente definido | Crescimento de quimioautotróficos e fotoautotróficos; ensaios microbiológicos. |
| Complexo | Crescimento da maioria dos organismos quimioheterotróficos. |
| Redutor | Crescimento de anaeróbicos obrigatórios. |
| Seletivo | Supressão de micro-organismos indesejados; favorecimento dos micro-organismos de interesse. |
| Diferencial | Diferenciação das colônias dos micro-organismos de interesse em relação aos outros. |
| Enriquecimento | Similar ao meio seletivo, mas elaborado para aumentar o número de micro-organismos de interesse até níveis detectáveis. |

fonte de carbono e energia, os micro-organismos incapazes de metabolizar o fenol não irão crescer. O meio de cultura é incubado durante alguns dias, e então uma pequena quantidade é transferida para outro frasco do mesmo meio. Após uma série de transferências, a população sobrevivente consistirá das bactérias capazes de metabolizar o fenol. As bactérias têm um determinado tempo para crescer no meio entre as transferências; esse é o estágio de enriquecimento (veja o quadro no Capítulo 28, página 801). Qualquer nutriente trazido pelo inóculo original é rapidamente eliminado por diluição com as transferências sucessivas. Quando a última diluição é semeada em um meio sólido com a mesma composição, somente as colônias do organismo capaz de utilizar o fenol poderão crescer. Um aspecto admirável dessa técnica é que o fenol normalmente é letal para a maioria das bactérias.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Os seres humanos poderiam se desenvolver em um meio quimicamente definido, pelo menos em condições de laboratório? **6-8**
- ✓ Louis Pasteur, nos anos de 1800, poderia ter crescido o vírus da raiva em cultura de células em vez de animais vivos? **6-9**
- ✓ Que nível de BSL o seu laboratório tem? **6-10**

* * *

A Tabela 6.5 resume os propósitos dos principais tipos de meios de cultura.

Obtenção de culturas puras

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

6-11 Definir colônia.

6-12 Descrever como culturas puras podem ser isoladas pelo método de semeadura por esgotamento.

A maioria dos materiais infecciosos, como pus, escarro e urina, contém diversos tipos de bactérias; da mesma forma que amostras

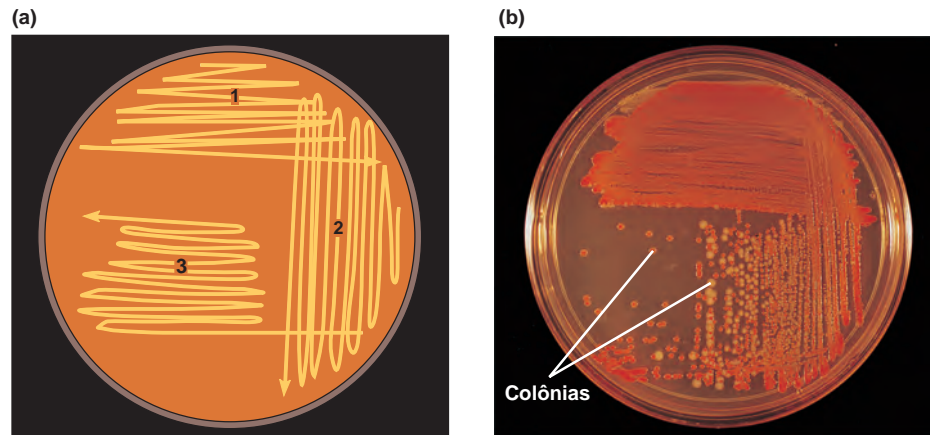


Figura 6.11 Método de esgotamento utilizado para isolar culturas puras de bactérias. **(a)** As setas indicam a direção da semeadura por esgotamento. A série de estrias 1 é feita com a cultura bacteriana original. A alça de inoculação é esterilizada após cada série de estrias. Nas séries 2 e 3, a alça retira bactérias da série anterior, reduzindo cada vez mais o número de células. Há inúmeras variações dessa técnica. **(b)** Na série 3, observe que foram obtidas colônias de bactérias bem isoladas de dois tipos diferentes, vermelho e amarelo.

P Uma colônia formada por esgotamento em placa é sempre derivada de uma única bactéria?

de solo, água ou alimento. Quando esses materiais são semeados na superfície de meio sólido, as colônias formam cópias exatas do organismo original. Uma **colônia** visível teoricamente vem de um único esporo ou célula vegetativa ou de um grupo dos mesmos micro-organismos juntos em agregados ou cadeias. As colônias microbianas frequentemente têm aparência diferente, o que permite distinguir um micro-organismo do outro (veja a Figura 6.10). As bactérias devem ser espalhadas de maneira suficientemente ampla na placa para que as colônias possam ser separadas umas das outras.

A maioria dos trabalhos de microbiologia requer culturas puras ou clones da bactéria. O método de isolamento mais comumente utilizado para obter culturas puras é o **método de esgotamento por estrias** (Figura 6.11). Uma alça de inoculação estéril é mergulhada dentro de uma cultura mista, que contém mais de um tipo de micro-organismo, e é semeada em estrias na superfície de um meio nutritivo. Ao longo da estria, as bactérias são depositadas quando a alça entra em contato com o meio. As últimas células depositadas na alça são afastadas o suficiente para crescer em colônias isoladas. Essas colônias podem ser repicadas com uma alça de inoculação e transferidas para um tubo de ensaio com meio nutritivo para a obtenção de uma cultura pura contendo somente um tipo de bactéria.

O método de esgotamento por estrias funciona bem quando o organismo a ser isolado está presente em grande número em relação à população total. Contudo, quando o micro-organismo a ser isolado está presente em um número muito pequeno, sua quantidade pode ser aumentada por enriquecimento seletivo antes do isolamento com o método de esgotamento por estrias.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Você pode pensar em alguma razão para uma colônia não crescer infinitamente, ou pelo menos preencher toda uma placa de Petri? **6-11**

- ✓ Uma cultura pura da bactéria poderia ser obtida pelo método de esgotamento por estrias se tivesse somente um micro-organismo de interesse em uma suspensão de bilhões de bactérias? **6-12**

Preservação de culturas bacterianas

OBJETIVO DO APRENDIZADO

- 6-13** Explicar como os micro-organismos são preservados por congelamento em baixas temperaturas e liofilização (congelamento-dessecação).

A refrigeração pode ser utilizada para o armazenamento de culturas bacterianas por curtos períodos. Dois métodos comuns de preservação de culturas microbianas por longos períodos são o congelamento em baixa temperatura e a liofilização. O **congelamento em baixa temperatura** é um processo no qual uma cultura pura de micro-organismos é colocada em um líquido de suspensão e rapidamente congelada em uma faixa de temperatura de -50°C a -95°C . A cultura normalmente pode ser descongelada e cultivada mesmo após vários anos. Durante a **liofilização (congelamento-dessecação)**, uma suspensão de micro-organismos é rapidamente congelada em uma faixa de temperatura de -54°C a -72°C , e a água é removida por alto vácuo (sublimação). Ainda sob vácuo, o container é selado, derretendo o vidro com uma chama de alta temperatura. O pó obtido desse processo, contendo os micro-organismos sobreviventes, pode ser armazenado por anos. Os organismos podem ser reativados a qualquer momento por hidratação com um meio nutriente líquido apropriado.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Se a Estação Espacial em órbita na Terra sofresse uma ruptura repentina, os humanos a bordo morreriam instantaneamente pelo frio e pelo vácuo do espaço. Todas as bactérias na cápsula também seriam mortas? **6-13**

Crescimento de culturas bacterianas

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 6-14** Definir *crescimento bacteriano*, incluindo *fissão binária*.
- 6-15** Comparar as fases do crescimento microbiano e descrever sua relação com o tempo de geração.
- 6-16** Explicar quatro métodos diretos de medida do crescimento celular.
- 6-17** Diferenciar métodos diretos e indiretos na determinação do crescimento celular.
- 6-18** Explicar três métodos indiretos de medida do crescimento celular.

A possibilidade de representar graficamente as enormes populações resultantes do crescimento de culturas bacterianas é uma parte essencial da microbiologia. A determinação das quantidades de micro-organismos tanto diretamente, por contagem, quanto indiretamente, pela medida de sua atividade metabólica, também é um aspecto importante da microbiologia.

Divisão bacteriana

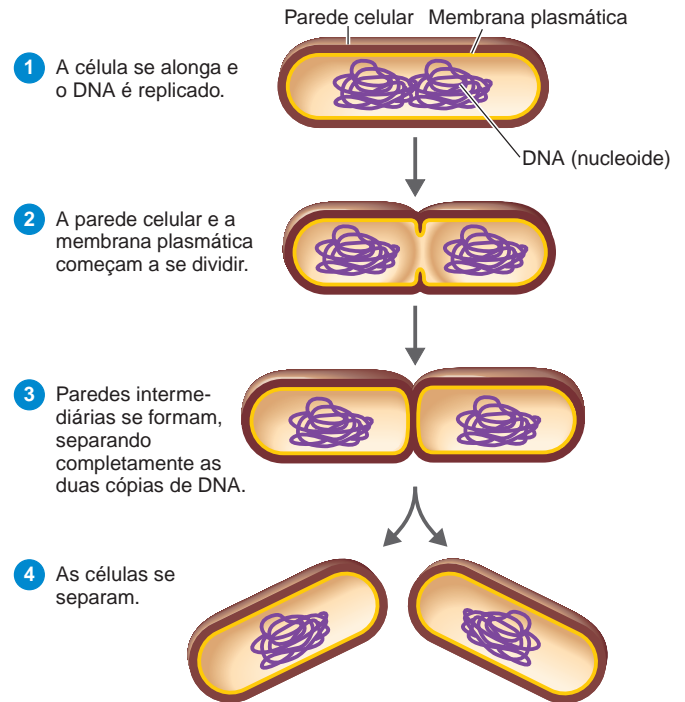
Como mencionado no início do capítulo, o crescimento bacteriano se refere ao aumento do número de bactérias e não a um aumento no tamanho das células individuais. As bactérias normalmente se reproduzem por **fissão binária** (Figura 6.12).

Algumas espécies bacterianas se reproduzem por **brotamento**; elas formam uma pequena região inicial de crescimento (o broto), que vai se alargando até atingir um tamanho similar ao da célula parental, e então se separam dela. Algumas bactérias filamentosas (certos actinomicetes) se reproduzem pela produção de cadeias de conidiósporos carregados externamente na ponta dos filamentos. Algumas espécies simplesmente se fragmentam, e os fragmentos iniciam o crescimento de novas células.

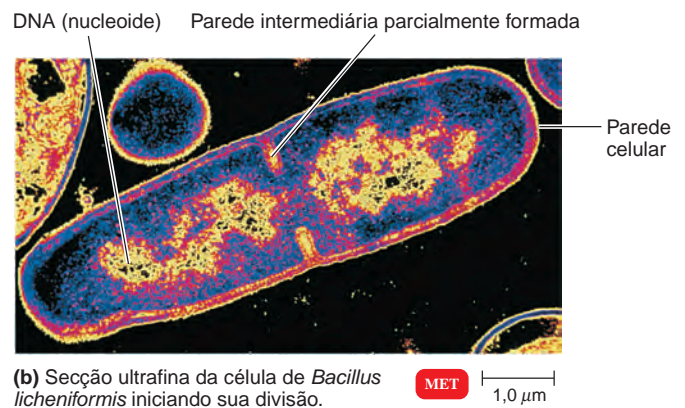
Tempo de geração

Para o cálculo do tempo de geração das bactérias, consideraremos somente a reprodução por divisão binária, que é o método mais comum. Como pode ser analisado na Figura 6.13, a divisão de uma célula produz duas células, a divisão dessas duas células produz quatro células, e assim por diante. Quando o número de células em cada geração é expresso na potência de 2, o expoente reflete o número de duplicações (gerações) que ocorreram.

O tempo necessário para uma célula se dividir (e sua população duplicar) é chamado de **tempo de geração**. Ele varia consideravelmente entre os organismos e com as condições ambientais, como a temperatura. A maioria das bactérias tem um tempo de geração de 1 a 3 horas; outras requerem mais de 24 horas por geração. (O método matemático para calcular os tempos de geração é apresentado no Apêndice B.) Se a fissão binária não é controlada, uma grande quantidade de células será produzida. Se a divisão ocorre a cada 20 minutos, que é o caso da *E. coli* em condições favoráveis, após 20 gerações, uma única célula inicial poderá ter gerado mais de um milhão de células. Esse aumento ocorrerá em cerca de 7 horas. Em 30 gerações, ou 10 horas, a população poderá ser de um bilhão, tendo atingido um número com 21 zeros em 24 horas. É difícil de representar graficamente variações de populações tão grandes utilizando números aritméticos. Essa é a razão pela qual



(a) Diagrama da sequência da divisão celular.



(b) Seção ultrafina da célula de *Bacillus licheniformis* iniciando sua divisão.

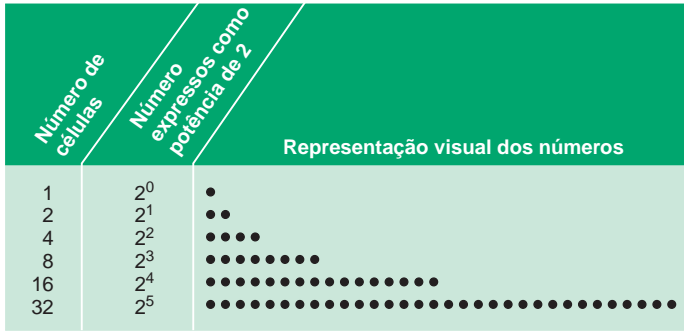
Figura 6.12 Fissão binária em bactéria.

P Todas as bactérias se reproduzem por fissão binária?

escalas logarítmicas em geral são utilizadas para representar graficamente o crescimento bacteriano. A compreensão das representações logarítmicas de populações bacterianas requer conhecimento em matemática, que é fundamental para os microbiologistas (veja o Apêndice B).

Representação logarítmica das populações bacterianas

Para ilustrar a diferença entre representação gráfica logarítmica e aritmética de populações bacterianas, analisaremos 20 gerações bacterianas. Em cinco gerações (2^5), haverá 32 células; em dez gera-



(a) Representação visual do aumento do número de bactérias durante cinco gerações. O número de bactérias dobra a cada geração. O número sobrescrito indica a geração, ou seja, $2^5 = 5$ gerações.

| Número de gerações | Número de células | \log_{10} do número de células |
|--------------------|----------------------|----------------------------------|
| 0 | $2^0 = 1$ | 0 |
| 5 | $2^5 = 32$ | 1,51 |
| 10 | $2^{10} = 1.024$ | 3,01 |
| 15 | $2^{15} = 32.768$ | 4,52 |
| 16 | $2^{16} = 65.536$ | 4,82 |
| 17 | $2^{17} = 131.072$ | 5,12 |
| 18 | $2^{18} = 262.144$ | 5,42 |
| 19 | $2^{19} = 524.288$ | 5,72 |
| 20 | $2^{20} = 1.048.576$ | 6,02 |

(b) Conversão do número de células de uma população na expressão logarítmica desse número. Para obter os números da coluna central, utilize a função y^x da sua calculadora. Aperte o 2 e depois y^x ; aperte o 5 e depois o sinal =. A calculadora mostrará o número 32. Portanto, a população da quinta geração das bactérias totaliza 32 células. Para obter os números da coluna da direita, utilize a função log da sua calculadora. Aperte o número 32 e depois log. A calculadora mostrará, arredondando, que o \log_{10} de 32 é 1,51.

Figura 6.13 Divisão celular.

P Se uma única bactéria se reproduz a cada 20 minutos, qual o número de bactérias em duas horas?

ções (2^{10}), serão 1.024 células, e assim sucessivamente. (Utilizando uma calculadora com as funções y^x e log, pode-se duplicar os números da terceira coluna da Figura 6.13.)

Na Figura 6.14, observe que a curva utilizando os valores aritméticos (linha cheia) não mostra claramente as mudanças de população nos passos iniciais da curva de crescimento com essa escala. De fato, as dez primeiras gerações permanecem na linha de base. Além disso, a representação de mais uma ou duas outras gerações na mesma forma gráfica aumentaria os valores no eixo de y de modo que acabaria saindo da página.

A linha pontilhada na Figura 6.14 mostra como os problemas de representação gráfica podem ser evitados utilizando a representação no \log_{10} dos números das populações. O \log_{10} da população é

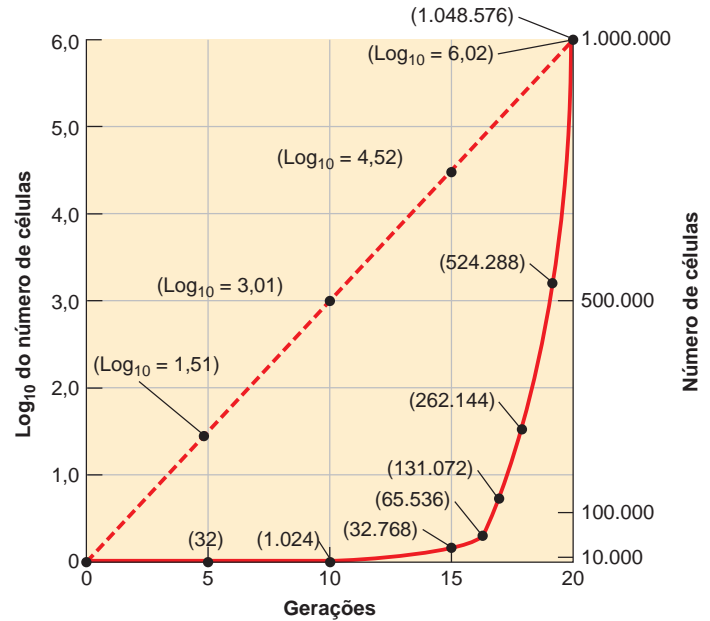


Figura 6.14 Curva de crescimento para uma população crescendo exponencialmente, representada logarítmica (linha pontilhada) e aritmeticamente (linha cheia). Essa figura demonstra porque, em vista do grande número das populações bacterianas, é necessária a mudança gráfica da representação aritmética para a logarítmica. Por exemplo, observe que, até a décima geração, a curva da representação aritmética ainda não se ergueu de maneira perceptível da linha de base, enquanto a curva logarítmica para a décima geração já está no meio do gráfico.

P Se os valores aritméticos (linha cheia) fossem aplicados para duas gerações suplementares, a curva ainda estaria dentro do gráfico?

representado pelas gerações 5, 10, 15 e 20. Observe que uma linha reta é obtida e que populações mil vezes maiores (1.000.000.000 ou $\log_{10} 9,0$) ainda poderiam ser acomodadas em um pequeno espaço complementar. Contudo, essa vantagem é obtida ao custo de uma distorção da nossa percepção intuitiva da real situação. Não estamos acostumados a raciocinar em termos de relações logarítmicas, mas elas são necessárias para uma compreensão apropriada dos gráficos das populações microbianas.

TESTE SEU CONHECIMENTO

✓ Um organismo complexo, como um besouro, pode se dividir por fissão binária? **6-14**

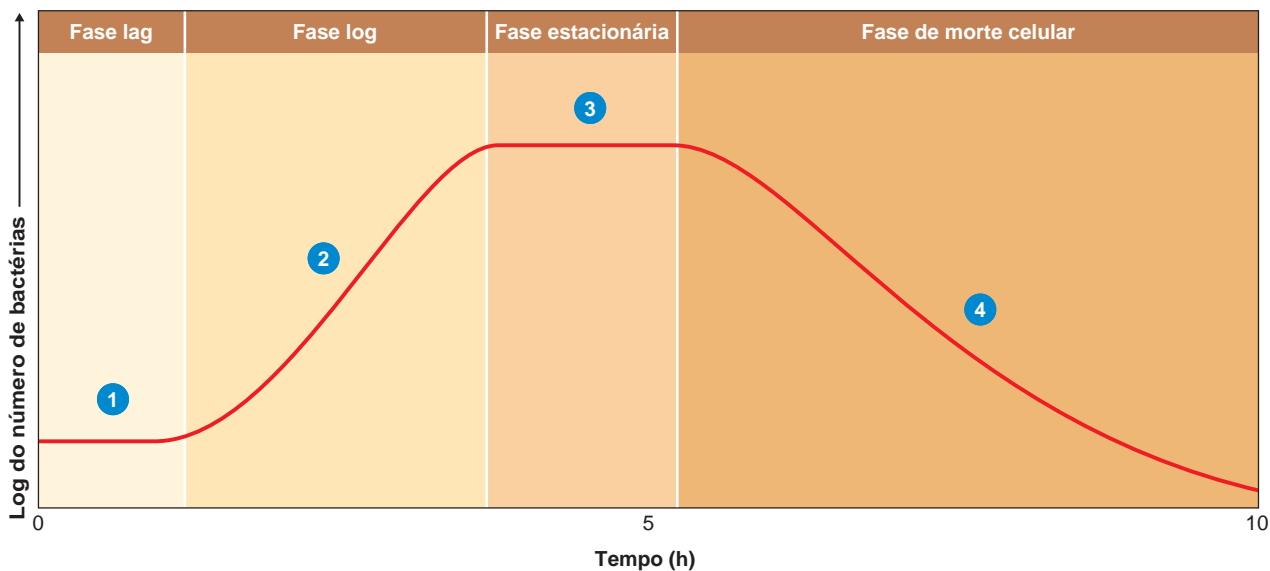
Fases do crescimento

Quando algumas bactérias são inoculadas em um meio líquido de crescimento e a população é contada em intervalos regulares, é possível representar graficamente a **curva de crescimento bacteriano**, que mostra o crescimento das células em função do tempo (Figura 6.15). Há quatro fases básicas de crescimento: a fase lag, a fase log, a fase estacionária e a fase de morte celular.

Figura 6.15

FIGURA FUNDAMENTAL A curva de crescimento bacteriano

O conceito da curva de crescimento bacteriano é fundamental para entendermos a dinâmica das populações e o controle durante, por exemplo, a preservação ou a deterioração de alimentos, a microbiologia industrial, como a produção de etanol, e o curso e o tratamento de doenças infecciosas.



- 1 Intensa atividade de preparação para o crescimento populacional, mas sem aumento da população.
- 2 Aumento logarítmico ou exponencial da população.
- 3 Período de equilíbrio; as mortes microbianas são equilibradas pela produção de novas células.
- 4 A população se reduz em uma taxa logarítmica.

Conceito-chave

As populações bacterianas seguem uma série de fases de crescimento: as fases lag, log, estacionária e de morte celular.

A fase lag

Durante um certo tempo, o número de células muda pouco, pois elas não se reproduzem imediatamente em um novo meio. Esse período de pouca ou nenhuma divisão é chamado de **fase lag**, podendo durar de uma hora a vários dias. Durante esse tempo, contudo, as células não estão dormentes. A população microbiana passa por um período de intensa atividade metabólica, envolvendo principalmente a síntese de enzimas e várias moléculas. (A situação é análoga a uma usina sendo equipada para produzir automóveis, ou seja, há atividade de preparação, mas não há produção imediata de automóvel.)

A fase log

Finalmente, as células começam a se dividir e entram em um período de crescimento, ou aumento logarítmico, chamado de **fase log** ou **fase exponencial de crescimento**. A reprodução celular é mais ativa durante esse período, e o tempo de geração atinge um valor constante. Como o tempo de geração é constante, uma repre-

sentação logarítmica do crescimento durante a fase log gera uma linha reta. A fase log é o momento de maior atividade metabólica, sendo o preferido para fins industriais, pois o produto precisa ser produzido de maneira eficiente.

A fase estacionária

Se a fase de crescimento continua sem controle, ocorre a formação de um grande número de células. Por exemplo, uma única bactéria (com peso de $9,5 \times 10^{-13}$ g por célula) se dividindo a cada 20 minutos por somente 25,5 horas pode teoricamente produzir uma população equivalente em peso a de um avião de carga de 80.000 toneladas. Na realidade, isso não ocorre. No final do crescimento, a velocidade de reprodução se reduz, o número de mortes microbianas é equivalente ao número de células novas, e a população se estabiliza. Esse período de equilíbrio é chamado de **fase estacionária**.

A causa da interrupção do crescimento exponencial não é sempre clara. O esgotamento dos nutrientes, o acúmulo de resíduos e mudanças no pH danosas à célula podem ser os motivos.

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-

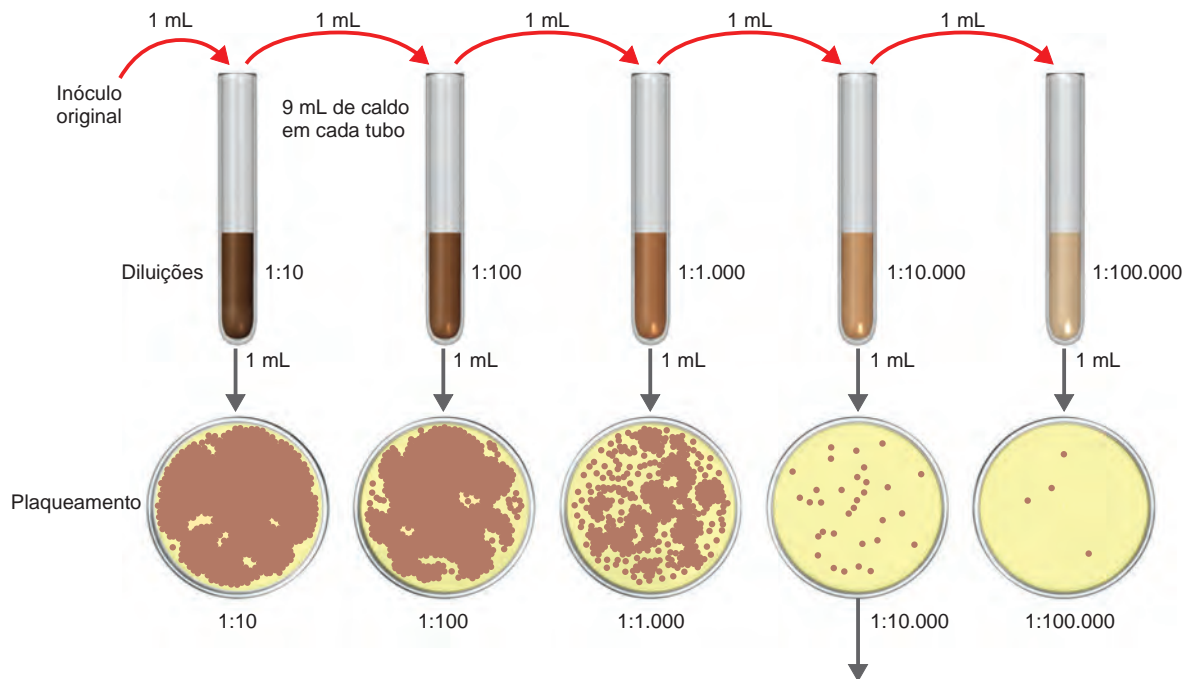
tanto, uma colônia muitas vezes resulta não de uma única bactéria, mas de um curto fragmento de uma cadeia ou de um agregado bacteriano. Para refletir essa realidade, as contagens em placas muitas vezes são denominadas **unidades formadoras de colônias (UFC)**.

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