



Aplicação de técnicas de contagem de microrganismos: câmara de contagem

Letícia Alves da Silva *

Álvaro José Boareto Mendes **

Vanessa Cristina Rezende Melandri ***

Resumo

Por intermédio do Programa de Iniciação Científica do Instituto Militar de Engenharia, foi possível que oito bolsistas do ensino médio executassem uma pesquisa sobre microrganismos, desde a preparação do meio de cultura até a contagem. O projeto foi realizado em um dos laboratórios do IME, com leitura e estudos em casa ou no Colégio Militar do Rio de Janeiro, totalizando 8 horas semanalmente. Foi ensinado: esterilizar os materiais a serem utilizados, preparar os meios de cultura, manusear o microscópio, escrever relatório e protocolo, efetuar a coloração de gram e técnicas de contagem. Com foco na técnica de contagem na Câmara de Neubauer, este relatório tem por finalidade descrever como utilizar tal técnica com eficiência.

Palavras-chave: Câmara de Neubauer, contagem, microrganismo, biotecnologia.

Abstract

Through the Scientific Initiation Program of the Military Institute of Engineering, it was possible for eight high school scholarship holders to perform a research on microorganisms, from the preparation of the culture medium to counting. The project was carried out in one of the IME laboratories and reading and studies at home or at the Military College of Rio de Janeiro, totaling 8 hours weekly. It was taught: sterilize the materials to be used, prepare the culture media, handle the microscope, write report and protocol, perform gram staining and counting techniques. Focusing on the counting technique in the Neubauer Chamber, this report aims to describe how to use such technique efficiently

Keywords: Neubauer Chamber, counting, microorganism, biotechnology.

* Aluna do 3º ano do ensino médio (CMRJ).

**Cap R/1. Doutor em ciências na área de tecnologia de processos químicos e bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Atualmente, é professor da Seção de Engenharia Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Nuclear do Instituto Militar de Engenharia. Chefe do Laboratório de Processos Biotecnológicos do IME.

***1º Ten OTT. Doutora em ciências na área de biodiversidade e saúde pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Atualmente, é professora de biologia no CMRJ.



Introdução

Na natureza, as populações microbianas não são homogêneas. Elas contêm misturas de várias espécies de bactérias e demais microrganismos. No laboratório, tais culturas mistas podem ser separadas em culturas puras. Essas últimas, contendo um só tipo de bactéria, são indispensáveis para a identificação e o estudo das propriedades morfológicas, genéticas e bioquímicas da espécie estudada. No presente experimento, utilizaremos uma técnica com a finalidade de produzir colônias individuais.

Essas colônias, visíveis macroscopicamente, são massas de bactérias, que resultaram da multiplicação de uma única bactéria depositada na superfície do meio sólido no momento da semeadura. Uma vez que as colônias foram individualizadas e identificadas, elas podem ser transferidas assepticamente para outra placa com meio sólido e, assim, obtermos uma colônia ou uma cultura pura. Neste artigo, serão empregados dois métodos de isolamento de bactérias (Gabriel Padilla, 2018).

Biotecnologia é uma área de estudo que usa processos biológicos para desenvolver novos produtos e tecnologias que auxiliam a vida da humanidade. Esses processos podem envolver técnicas como, por exemplo, cultivos de células, transgênicos e biocombustíveis. A biotecnologia demanda conhecimentos interdisciplinares, como biologia, química, física e engenharia. Ela também segue questões legislativas e de segurança para o bem da sociedade e dos pesquisadores.

A Câmara de Neubauer é uma ferramenta muito utilizada na biotecnologia. Ela é utilizada na pesquisa de novos medicamentos, no desenvolvimento de vacinas e na produção de alimentos. O seu

funcionamento consiste em uma lâmina de vidro com uma grade demarcada em sua superfície. A amostra biológica é colocada na câmara, e as células são contadas manualmente com a ajuda de um microscópio. Ela é uma ferramenta indispensável para a contagem de células em amostras biológicas e é muito útil para a realização de testes clínicos e experimentais.

Lista de figuras, quadros, tabelas, abreviaturas, siglas e símbolos

Atividades	2022				2023							
	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
1. Noções básicas de segurança em laboratório de biotecnologia – segurança e biossegurança												
2. Conceitos básicos de metodologia científica												
3. Apresentação das principais bases de dados científicos												
4. Revisão bibliográfica bibliográfico												
5. Noções básicas para preparo e apresentação de relatório Técnico/científico												
6. Treinamento em cultura celular e contagem bacteriana básica em microbiologia												
7. Noções básicas em microscopia ótica												
8. Redação e apresentação do relatório parcial									31/03			
9. Entrega preliminar para preparo de cultura estoque de célula microbiana (não patogênica)												
10. Preparo de cultura estoque de célula microbiana em tubo Agar Inclinado (não patogênica)												
11. Avaliação de resultados												
12. Redação do relatório final e resumo												
13. Entrega final do trabalho de pesquisa para apresentação no Encontro de Iniciação Científica do IME												
14. Apresentação do relatório final e resumo										11/08		
15. Apresentação de trabalho científico no EIC											16 a 20/08	

Quadro 1 – Cronograma do Projeto PIBIC 2022/2023

Fonte: Produção interna

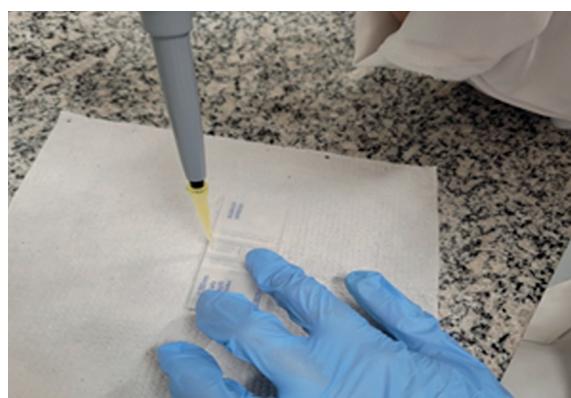


Figura 1 – Técnica de contagem por meio da Câmara de Neubauer

Fonte: Acervo pessoal



Figura 2 – Diluição seriada de 1:1000
Fonte: Acervo pessoal

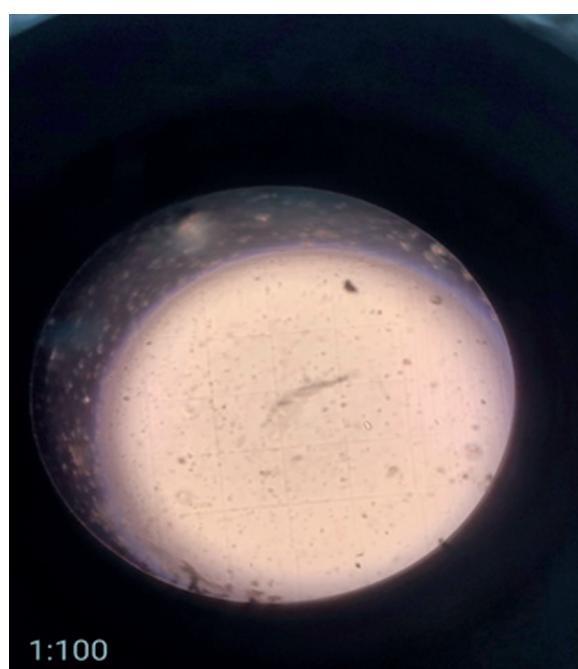


Figura 3: Diluição seriada de 1:100
Fonte: Acervo pessoal

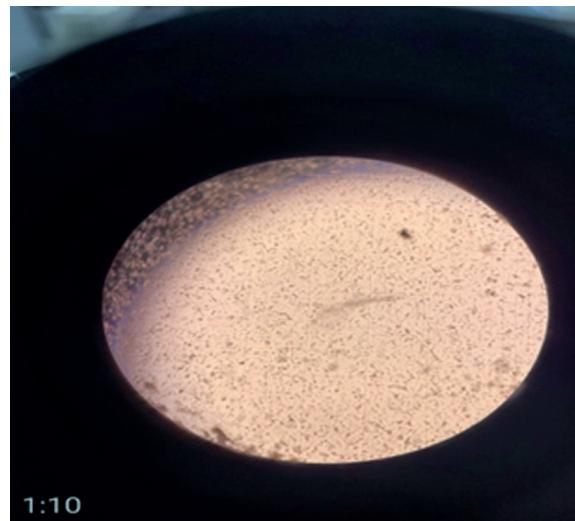


Figura 4 – Diluição seriada de 1:10
Fonte: Acervo pessoal

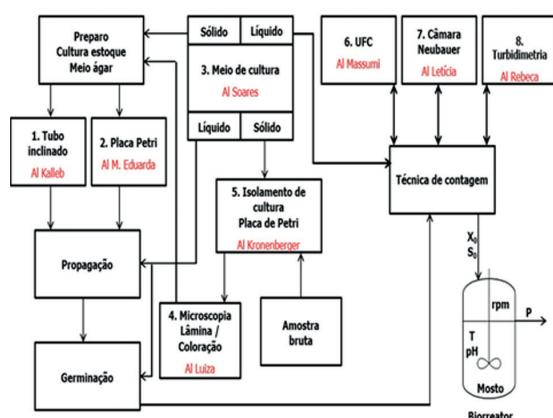


Figura 5 – Distribuição de tarefas
Fonte: Produção interna

Materiais e métodos

Para o desenvolvimento desta pesquisa, seguiram-se os seguintes passos metodológicos:

1. colocar a lamínula sobre a área de marcada na câmara de contagem. Usar lamínulas especiais que fornecem a profundidade correta da câmara de contagem. Não usar lamínulas comuns;



2. homogeneizar bem a suspensão celular e transferir com esterilidade 0,1ml para um pequeno tubo de ensaio;

3. adicionar 0,3ml de corante azul de tripâo 0,2% ao tubo, obtendo assim uma diluição 1/4.

4. Misturar os conteúdos e retirar uma alíquota de 0,5ml com a pipeta;

5. encostando a ponta da pipeta na borda da lamínula, preencher cuidadosamente a câmara de contagem. O líquido deve preencher apenas um lado da câmara e não deve chegar aos canais de cada lado da área de contagem (**figura 1**);

6. deixar as células sedimentarem por 2min;

7. focalizar a área demarcada da câmara de contagem com a objetiva de menor aumento (**figura 2**). Nas áreas 1, 2, 3 e 4, o volume com a lamínula colocada corresponde a 0,1mm³;

8. contar as células nas quatro áreas de um lado da câmara de contagem, seguindo o esquema da **figura 2** e dividir o valor por quatro para obter a média;

9. como a suspensão foi inicialmente diluída a 1/4, o número de células contadas será igual à média multiplicada pelo fator de diluição. No caso, quatro;

10. para obter o número de células/ml, multiplicar e corrigir o valor obtido por 10.000, pois: 1ml = 1cc e 1cc = 10 x 10 x 10mm = 1.000mm³. Na Câmara de Neubauer, obtemos o número celular por 0,1mm³. Então, devemos multiplicar por 10, portanto 10 x 1.000 = 10.000;

11. assim se tem:

$$\text{nº de células/ml} = \frac{\text{nº total de células}}{\text{nº de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

Critérios para a contagem (exemplificado na **figura 3**):

- enumerar células com núcleo bem visível;
- contar células isoladas como uma célula (a);
- contar grumos constituídos por células facilmente distinguíveis por seus núcleos e citoplasmas como grupos de células isoladas e contar cada célula (b).

Resultados

O **gráfico 1** apresenta o resultado do sistema para diversas medidas.

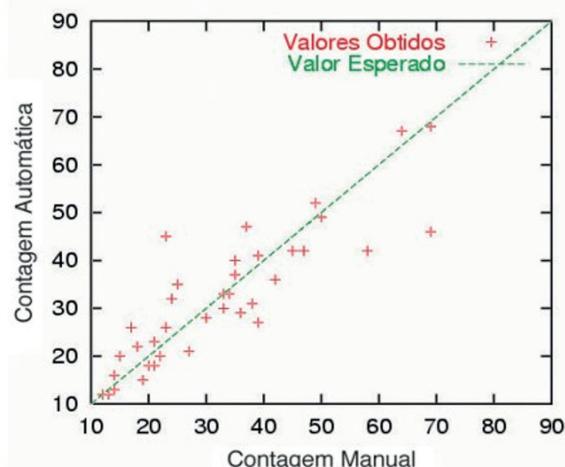


Gráfico 1 – Resultados obtidos pelo sistema

Fonte: Lucarini *et al.*, 2004, p. 5

O **gráfico 1** mostra a contagem realizada manualmente por um operador e a contagem realizada pelo sistema. A reta indica o que deveria ser o resultado teórico, em que a contagem manual deveria ser igual à do sistema. A partir desses dados, pode-se determinar o erro percentual médio para todas as amostras, que é de $17,6 \pm 18,0\%$. Outro gráfico interessante é o que mostra a distribuição do erro porcentual em relação à quantidade de microrganismos medidos (**gráfico 2**).

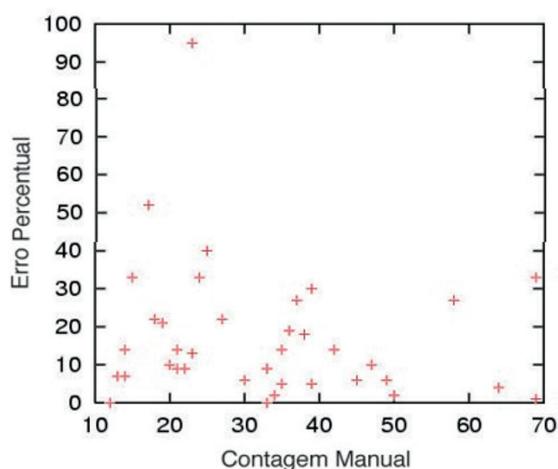


Gráfico 2 – Erro percentual das medidas realizadas

Fonte: Lucarini *et al.*, 2004, p. 5

O **gráfico 2** indica que o erro do sistema não depende da concentração de células, mas de outros fatores. Análises qualitativas permitiram concluir que o mais importante desses fatores é o agrupamento das células, que pode ocorrer em qualquer concentração.

Avançando, o **gráfico 3** mostra a relação entre o agrupamento percentual (definido como a quantidade de células agrupadas dividida pelo total de células). Pode-se observar que, quanto mais agrupadas as células, maior o erro percentual.

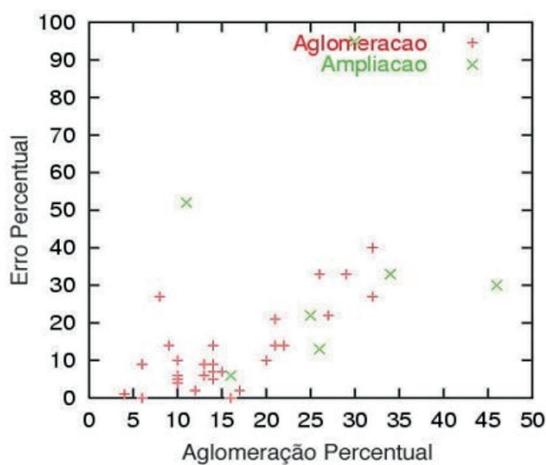


Gráfico 3 – Agrupamento percentual x erro percentual

Fonte: Lucarini *et al.*, 2004, p. 5

O **gráfico 3** apresenta também (sob a legenda “ampliação”) erros causados devido a uma ampliação demasiado grande. A ampliação exagerada faz com que as células fiquem com o centro muito claro, fazendo o sistema contar duas ou mais células onde só existe uma. A **figura 6** mostra um exemplo de ampliação exagerada.

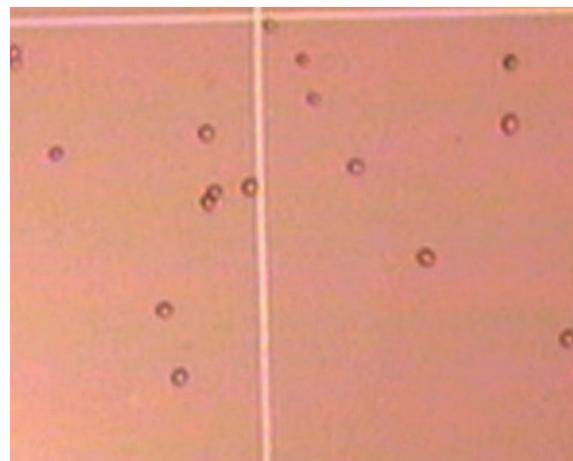


Figura 6 – Grande ampliação gerando erros

Fonte: Lucarini *et al.*, 2004, p. 5

Finalmente, outros dois problemas que geram erros de contagem são a concentração de células sobre as linhas de marcação e a falta de foco (**figura 7**).

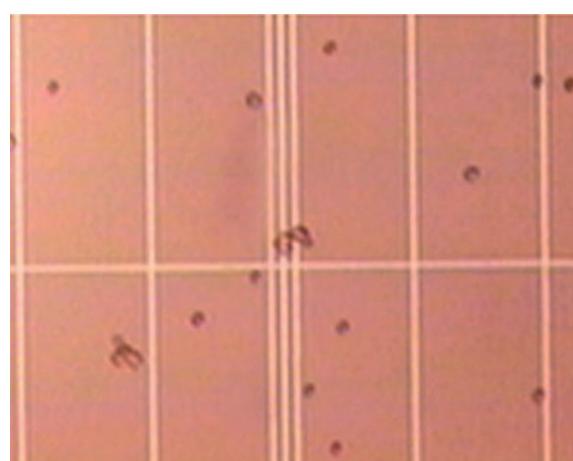


Figura 7 – Aglomeração sobre linhas e falta de foco

Fonte: Lucarini *et al.*, 2004, p. 5



Refazendo o cálculo do erro percentual médio, levando em conta apenas as amostras que não apresentam problemas de aglomeração nem ampliação exagerada, chega-se a um resultado de $5,2 \pm 8,8\%$. Vale lembrar que essa situação não é impossível de se atingir no laboratório, bastando apenas o controle por parte do usuário sobre a escolha das imagens a serem analisadas (Adriana C. Lucarini; Leandro A. da Silva; Reinaldo A. C. Bianchi, 2004)

Diluição seriada – procedimento

- Numerar os 4 eppendorfs e pipetar 9ml de solução salina em cada um.
- Retirar, com o auxílio de uma pipeta, uma amostra de 1ml da cultura bacteriana não diluída e transferi-la para o eppendorf 1, contendo 9ml de solução salina (diluição de 10-1). Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 1ml do eppendorf 1 e transferi-la para o eppendorf 2, de modo a obter uma diluição de 10-2. Homogeneizar bem.

• Retirar uma amostra de 1ml do eppendorf 2 e transferi-la para o eppendorf 3, de modo a obter uma diluição de 10-3. Homogeneizar bem.

• Retirar uma amostra de 1ml do eppendorf 3 e transferi-la para o eppendorf 4, de modo a obter uma diluição de 10-4. Homogeneizar bem.

Discussão e conclusões

Desse modo, conclui-se que a Câmara de Neubauer é essencial para a biotecnologia e que, para realizar sua técnica corretamente e, assim, conseguir resultados mais claros, é necessário fazer a diluição seriada.

Na contagem, é importante prestar atenção na quantidade de células agrupadas e na ampliação do microscópio, que são diretamente proporcionais ao erro percentual.

Referências

LUCARINI, Adriana C.; SILVA, Leandro da; BIANCHI, Reinaldo A. C. Um sistema para a contagem semiautomática de microrganismos. **Revista Pesquisa e Tecnologia FEI**, n. 26, p. 36-40, 2004.

PADILLA, Gabriel. **Apostila das Aulas Práticas de Microbiologia Básica para Farmácia**. Apostila Prática, USP, São Paulo, ago/2008.