



Aplicação de técnicas de contagem de microrganismos – turbidimetria

Rebeca Mota de Mello *

Clara Lourenço Kronenberger **

Álvaro José Boareto Mendes ***

Vanessa Cristina Rezende Melandri ****

Resumo

O projeto apresentado visa a introdução de alunos do ensino médio do Colégio Militar do Rio de Janeiro nas práticas laboratoriais de biotecnologia como forma de suscitar o interesse nesse campo de estudos e oferecer a oportunidade de uma precoce imersão no meio científico. Sob tal viés, os alunos foram apresentados às principais metodologias de preparo e análise de cultura microbiana, as quais incluem:

- Noções elementares de segurança para os laboratórios didáticos de microbiologia (Padilla *et al.*, 2017);
- Coloração de Gram (Padilla *et al.*, 2017);
- Microscopia (Padilla *et al.*, 2017);
- Técnica de isolamento de culturas (Padilla *et al.*, 2017);

– Preparo de cultura em meio de ágar (Vermelho *et al.*, 2017);

– Utilização da câmara de Neubauer (Vermelho *et al.*, 2017);

– Técnicas de contagem (UFC, câmara de Neubauer e turbidimetria) – (Vermelho *et al.*, 2017);

– Entre outras.

Os estudantes, portanto, estiveram envolvidos nas mais diversas frentes de abordagem introdutória da microbiologia, braço da ciência responsável pelo estudo de microrganismos e suas utilizações industriais e médicas. Cada aluno focou, no entanto, em uma área específica do trabalho, de acordo com o esquema apresentado na **figura 1**.

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

**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. Professor da Seção de Engenharia Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Nuclear do Instituto Militar de Engenharia. Atualmente, é 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.

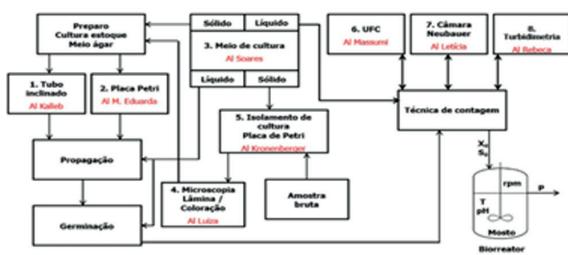


Figura 1 – Fluxograma do trabalho com o subtópico trabalhado por cada aluno

Fonte: A autora, 2023

Apresentação Introdução

O projeto de introdução à biotecnologia, orientado pelo Cap R/1 Álvaro José Boareto Mendes e pela Ten Vanessa Cristina Rezende Melandri, busca apresentar conhecimentos da área por meio de metodologias acessíveis e de fácil compreensão, de forma que estudantes do ensino básico possam entrar em contato com a ampla área da biotecnologia e assimilar noções básicas do assunto. As atividades de pesquisa são realizadas no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Seção de Engenharia Química do IME (LPB-SE/5-IME) e no Laboratório de Biologia do CMRJ.

Para tanto, o grupo de alunos participou de atividades relacionadas à produção, observação e análise de culturas microbianas, inicialmente em placas de Petri e, posteriormente, em outros meios. Primeiramente, os alunos coletaram amostras de diferentes locais (bancadas, solas de sapato, maçanetas, garrafas etc.) para verificar a presença de microrganismos e suas possíveis patologias. Tais amostras foram inoculadas em placas de Petri previamente esterilizadas e atentamente observadas pelos alunos.

Nesse processo, os alunos aprenderam a classificar e determinar concentrações microbianas e, acima de tudo, entrar em contato com as mais diversas técnicas biotecnológicas e recursos laboratoriais, aprendendo não só as normas do ambiente, mas as diversas aprendizagens contidas nele.

A técnica de análise por turbidimetria consiste em um método simples de análise da quantidade de microrganismos em uma solução a partir de seu grau de turbidez, sendo acessível e possível de ser realizado em escolas. A técnica, portanto, apresenta-se como importante meio de difusão do conhecimento biotecnológico, em especial no recente período pós-pandemia, em que organismos patogênicos entraram em destaque na mídia e na vida de cada pessoa.

Justificativa

A pesquisa buscou, inicialmente, analisar os microrganismos presentes em meios como a sola de um sapato, a maçaneta de uma porta, a bancada do laboratório de biotecnologia do IME e a tampa de uma garrafa, determinando o tipo e a quantidade de organismos presentes nesses locais. Com o avançar do projeto e o crescimento destes microrganismos nas seis placas de Petri preparadas pelos alunos, ficou claro, entretanto, que os organismos trabalhados colocavam em risco a segurança de todos os envolvidos no projeto, optando assim pela análise de organismos já conhecidos.

Dessa forma, o projeto apresentou um novo objetivo: a análise e o estudo de organismos amplamente utilizados no dia a dia da população mundial, que são os probióticos. Por intermédio desses estudos, os alunos puderam desenvolver sua



pesquisa de forma ampla e segura, contribuindo para o maior objetivo do projeto: a aprendizagem de técnicas laboratoriais relacionadas ao campo da microbiologia.

Objetivos

O objetivo geral do projeto é a introdução de conceito de boas práticas laboratoriais e método científico em uma área não comumente abordada no ensino básico – a biotecnologia –, de tal maneira que os participantes possam compreender suas aplicações e possibilidades. Para atingir o objetivo geral proposto, foram seguidos os seguintes objetivos específicos:

- aprender a portar-se dentro de um laboratório;
- conhecer os materiais e métodos, particularmente na área de biotecnologia;
- aprender a escrever texto científico nos moldes atuais;
- preparar cultura estoque microbiana em placa de Petri;
- aplicar as metodologias disponíveis no campo da biotecnologia, para realizar a pesquisa.

Desenvolvimento Metodologia

– Escala de Mc Farland

Materiais

- Tubos contendo a suspensão bacteriana.
- Conjunto de tubos contendo suspensões de sulfato de bário em quantidade crescente.

Procedimentos

– O tubo contendo a amostra microbiana será comparado à escala de tubos contendo sulfato de bário, um sal insolúvel.

– Mede-se, então, o grau de turvação por contraste visual entre as amostras.

– Por fim, é realizada a equivalência entre a densidade óptica de cada tubo da escala e a concentração de bactérias presente na suspensão, de acordo com o indicado pelo fabricante.



Figura 2 – Escala de McFarland padrão

Fonte: A autora, 2023

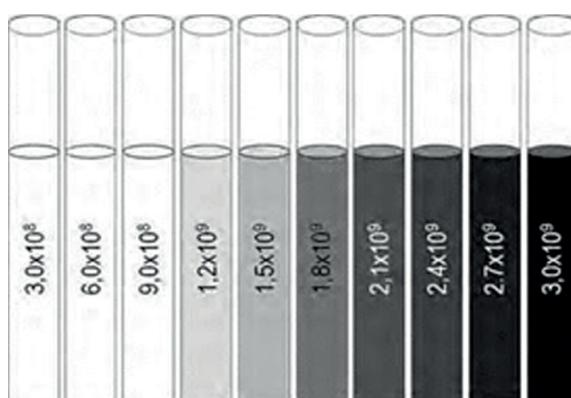


Figura 3 – Medidas de turbidez da escala

Fonte: A autora, 2023



- Espectrofotômetro

Materiais

- Tubos contendo a suspensão bacteriana.
- Colorímetro (ou espectrofotômetro).
- Célula fotoelétrica.

Procedimentos

- O colorímetro emitirá um feixe de luz que atravessará a suspensão bacteriana e atingirá a célula fotoelétrica.
- A quantidade de luz captada pela célula determinará o grau de turvação da amostra e, dessa forma, a densidade óptica.
- Com esse valor, é possível determinar a concentração de bactérias na amostra.



Figura 4 – Espectrofotômetro utilizado no projeto
Fonte: A autora, 2023

Resultados e análise

Com os experimentos realizados no período, não só foi possível especializar o conhecimento dos alunos na área de bioquímica, mas também alcançar resultados concretos por meio da metodologia científica posta em prática.

Os aprendizados incluem: técnicas de esterilização, de inoculação microbiana, de aplicação de meios de cultura em placa de Petri, de coloração de Gram, de diluição seriada, de isolamento de organismos, de contagem de células, de microscopia e de segurança em laboratório.

Apesar disso, não foi possível a plena realização das técnicas de turbidimetria em nossas amostras devido, sobretudo, ao tempo insuficiente para que o experimento pudesse ser concretizado em sua plenitude e com total aprendizagem por parte dos alunos.

Dessa forma, tanto a escala de McFarland quanto o espectrofotômetro (Vermelho *et al.*, 2017) foram pesquisados e estudados a partir da bibliografia disponibilizada e de testes experimentais.

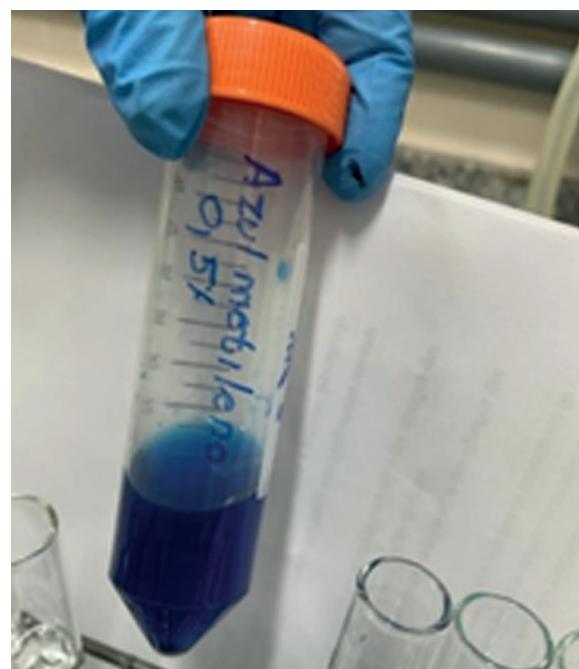


Figura 5 – Solução de azul de metileno para testagem de técnicas de turbidimetria
Fonte: A autora, 2023

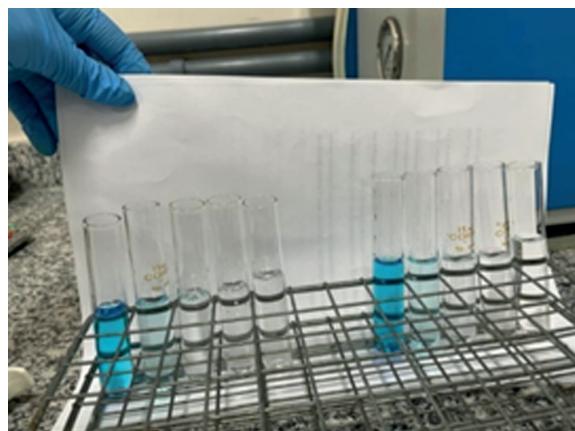


Figura 6 – Diferentes concentrações de azul de metileno para a análise da variação de turbidez

Fonte: A autora, 2023

	Plate1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.098	-0.003	-0.011	-0.007	-0.011	0.000	0.001	0.092	-0.003	-0.009	-0.008	-0.002
B	0.097	-0.006	-0.008	-0.011	-0.011	-0.001	-0.003	0.083	0.002	-0.009	-0.013	-0.012
C	0.093	-0.005	-0.012	-0.006	-0.005	0.001	0.002	0.097	-0.002	-0.011	-0.011	-0.012
D	0.110	-0.003	-0.009	-0.012	-0.010	-0.002	-0.002	0.099	-0.001	-0.007	-0.009	-0.013
E	0.100	-0.004	-0.011	-0.011	-0.011	0.002	0.000	0.091	-0.000	-0.011	-0.017	-0.012
F	0.100	-0.006	-0.012	-0.010	-0.011	-0.001	-0.001	0.100	-0.003	-0.012	-0.008	-0.011
G	0.102	-0.005	-0.004	-0.012	-0.002	0.001	0.003	0.092	-0.005	-0.010	-0.010	-0.002
H	0.081	-0.006	-0.011	-0.014	-0.014	-0.001	-0.000	0.094	-0.004	-0.011	-0.011	-0.008

Tabela 2 – Comparação entre a turbidez dos tubos preparados com a utilização da micropipeta com os preparados utilizando a pipeta comum

Fonte: A autora, 2023

Conclusão

Ainda que não tenha sido possível abordar de forma prática todos os tópicos propostos, os componentes do grupo puderam desenvolver as técnicas de forma experimental e cumprir o objetivo principal e inicial do projeto: a introdução às técnicas laboratoriais e de biotecnologia.

Por conseguinte, o desenvolvimento do trabalho por si só foi de grande relevância para a formação estudantil de cada participante e para o despertar do interesse de um grupo inteiro de jovens para o ramo da biotecnologia.

	Plate2											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.072	0.046	0.053	0.071	0.047	0.042	0.042	0.047	0.056	0.046	0.050	0.055
B	0.060	0.057	0.051	0.044	0.042	0.041	0.039	0.053	0.051	0.045	0.046	0.045
C	0.044	0.042	0.040	0.062	0.052	0.042	0.042	0.048	0.043	0.042	0.045	0.039
D	0.042	0.043	0.052	0.040	0.046	0.043	0.039	0.046	0.043	0.046	0.041	0.042
E	0.047	0.042	0.043	0.043	0.052	0.046	0.043	0.043	0.045	0.043	0.035	0.040
F	0.049	0.041	0.041	0.043	0.044	0.040	0.040	0.058	0.043	0.040	0.052	0.041
G	0.046	0.042	0.047	0.040	0.056	0.041	0.041	0.044	0.041	0.043	0.057	0.048
H	0.046	0.040	0.045	0.040	0.039	0.040	0.039	0.044	0.045	0.040	0.040	0.045

Tabela 1 – Valores obtidos através do espectrofotômetro para as diferentes concentrações de azul de metileno

Fonte: A autora, 2023

Referências

- ALENCAR, A., et al. Detecção de microrganismos em caixas de delivery à luz da coloração de Gram. Braz. J. Hea. Rev., Curitiba, v. 3, n. 3, 2020.
- HAMMER, A., et al. Análise de microrganismos em superfícies distintas da Faculdade São Paulo de Rolim de Moura. Revista Unioeste, vol. 4, 2016.
- PADILLA, Gabriel, et al. Apostila das Aulas Práticas Microbiologia Básica para Farmácia. São Paulo, 2018.
- VERMELHO, A., et al. Práticas de microbiologia. Editora Guanabara Koogan, 2017.