



Disciplina de Microbiologia

Ensino Remoto

Curso de Nutrição - Integral

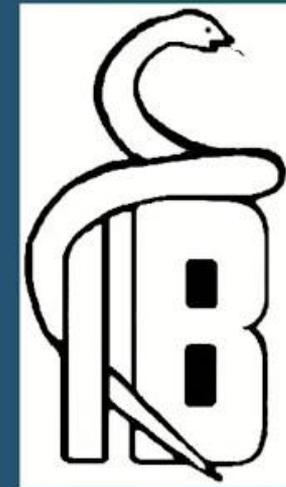
Professor Ministrante:

Renato Geraldo da Silva Filho

renato.geraldo.silva@unirio.br

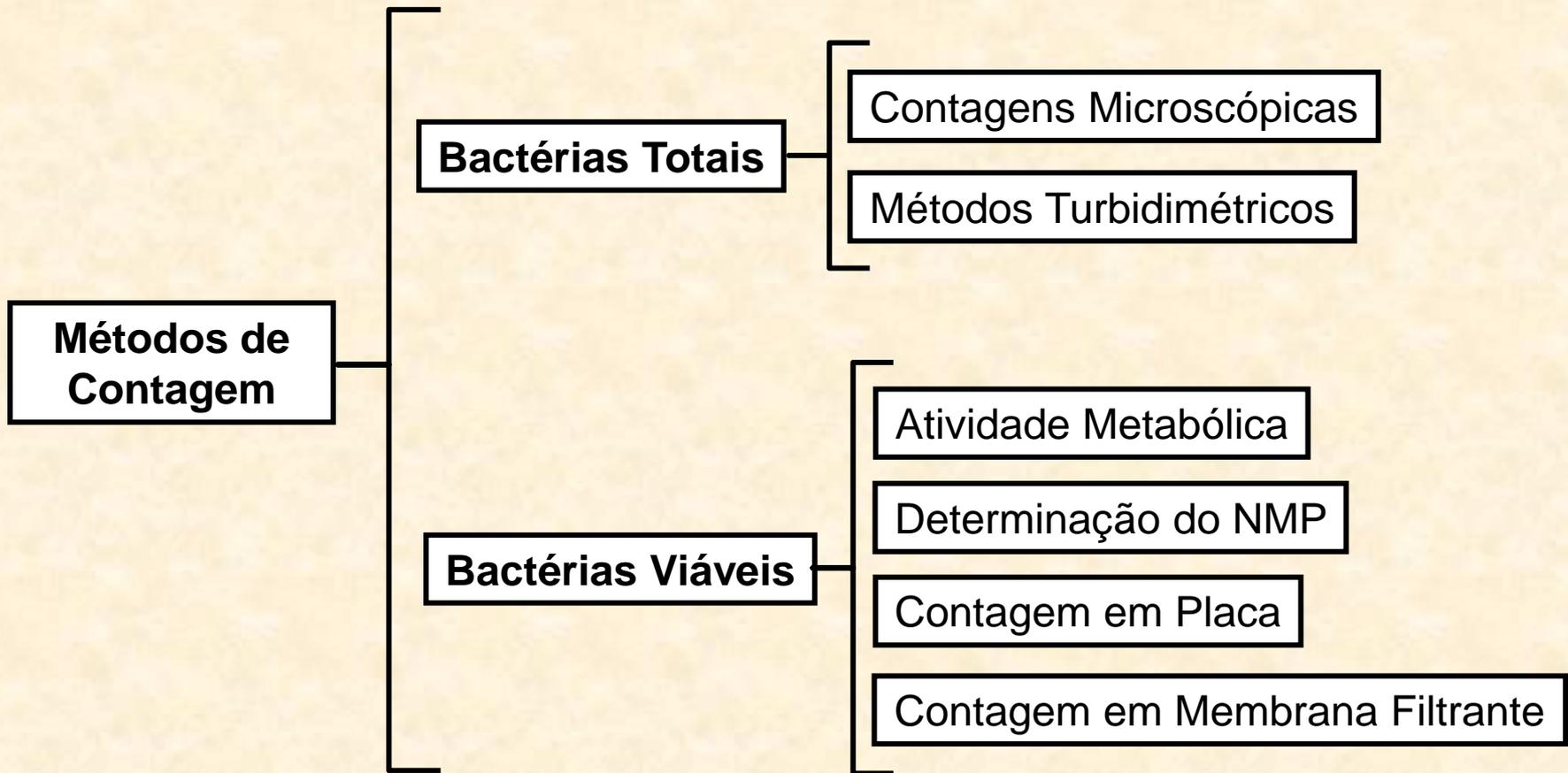
Aula: Métodos de Contagem de Bactérias

U N I R I O



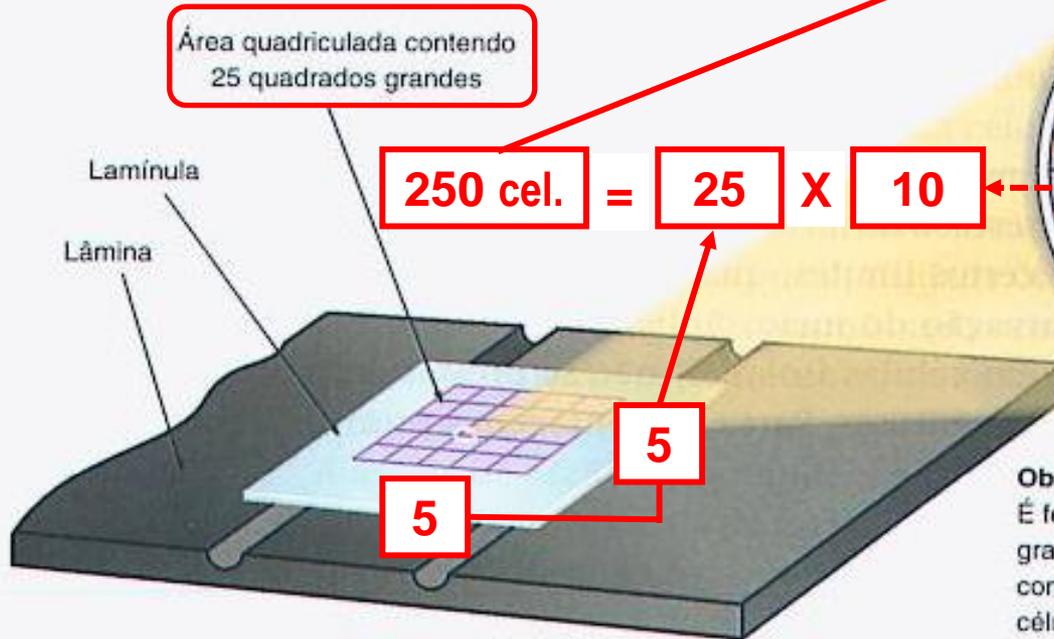
Instituto Biomédico

PRINCÍPIO BÁSICO DOS MÉTODOS



MÉTODOS DE CONTAGEM MICROSCÓPICA

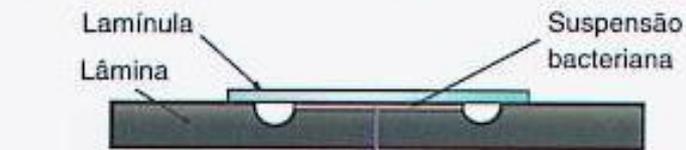
Câmara de contagem de células



$$\begin{aligned} 250 \text{ cel.} &\text{ ---- } 0,02 \text{ mm}^3 \\ 250 \text{ cel.} &\text{ ---- } 0,00002 \text{ mL} \\ x \text{ cel.} &\text{ ---- } 1 \text{ mL} \\ x &= 1,25 \times 10^7 \text{ cel./mL} \end{aligned}$$

12.500.000 cel./mL

Observação microscópica:
É feita a contagem em vários quadrados grandes e considerada a média de células contadas. No exemplo acima são 10 células no quadrado central



Poço contendo a suspensão bacteriana, com volume total de $0,02 \text{ mm}^3$ (0,02 mm de altura e 1 mm^2 de área quadriculada)

$0,02 \text{ mm}^3$

Contagem final:
10 células \times 25 quadrados grandes estão contidos em $0,02 \text{ mm}^3$, portanto existem $1,25 \times 10^7$ células/mL na suspensão bacteriana

MÉTODOS DE CONTAGEM MICROSCÓPICA

Principais Características:

→ É um método de contagem direto;

→ Contam células **vivas** e **mortas**;

→ Mais adequado para **amostras líquidas**;

→ A amostra deve possuir **pouco material particulado**;

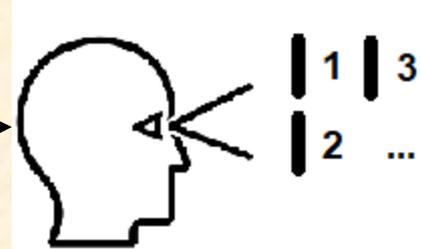
→ População deve ser **elevada**;

→ Mais fácil para **culturas mono-microbianas e de células isoladas**;

→ **Não** é adequado para **bactérias móveis**;

→ **Rápido** e com **resultados imediatos**;

→ Resultados podem bastante ser **influenciados pelo executor**;





MÉTODOS DE CONTAGEM TURBIDIMÉTRICOS

Métodos Turbidimétricos

Medida Direta da Turvação

→ A turvação da amostra bacteriana é **determinada espectrofotometricamente;**

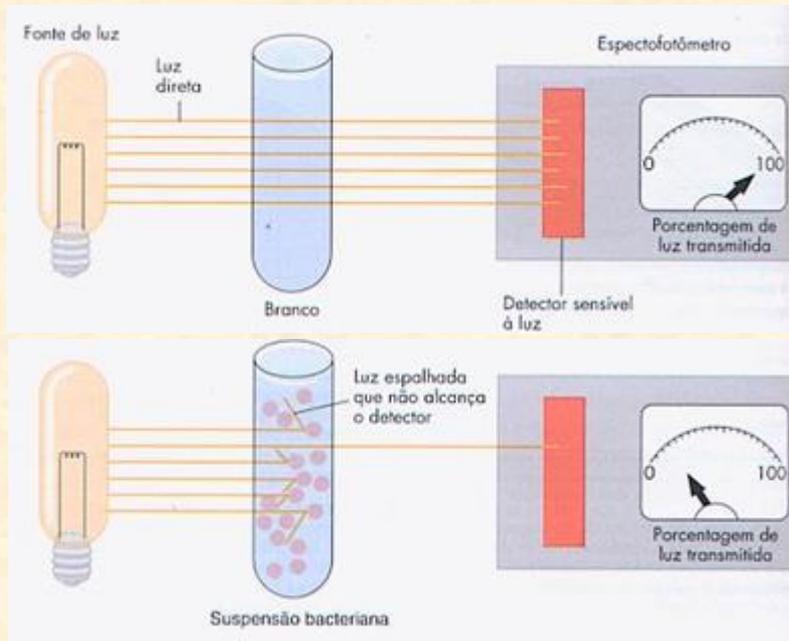
Medida da Turvação por Comparação com Escala Padrão

→ A turvação da amostra bacteriana é **comparada visualmente com padrões;**



MÉTODOS DE CONTAGEM TURBIDIMÉTRICOS - DIRETOS

Quanto **menor** a quantidade de bactérias



maior a transmitância (**T**)

menor a absorbância (**Abs**)

Leitura da ABS

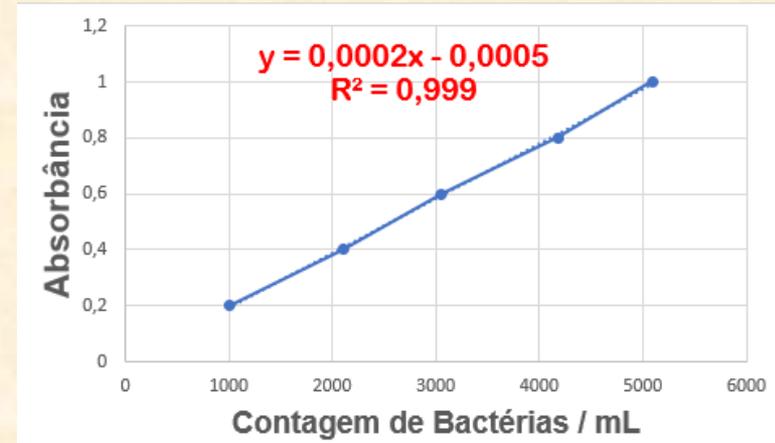
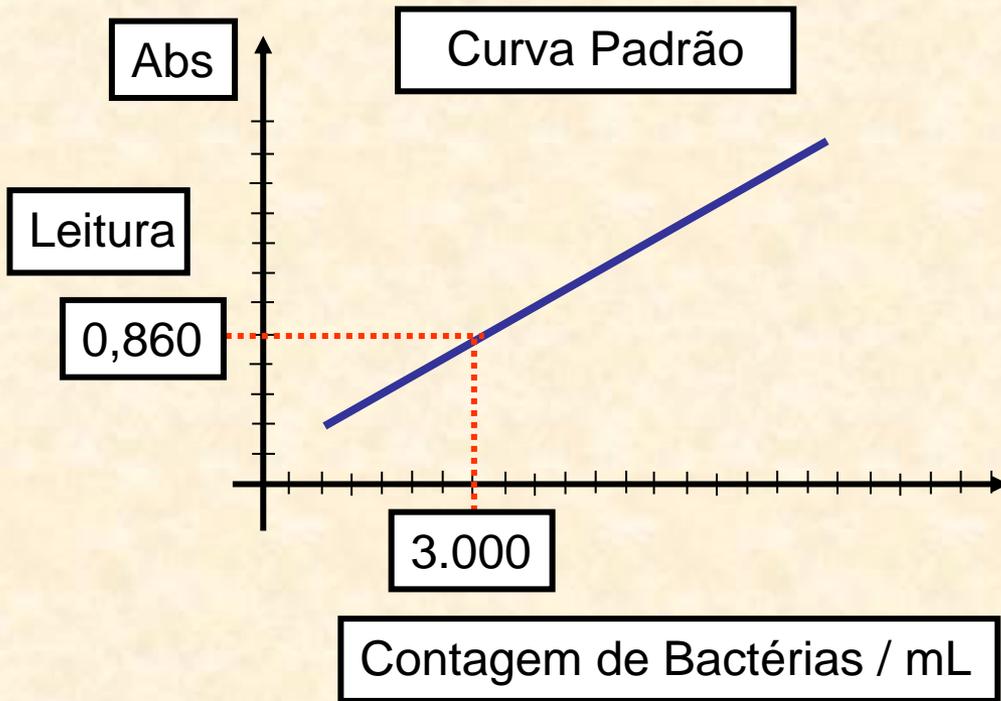
Curva Padrão

Quanto **maior** a quantidade de bactérias

maior a absorbância (**Abs**)

menor a transmitância (**T**)

MÉTODOS DE CONTAGEM TURBIDIMÉTRICOS - DIRETOS



MÉTODOS DE CONTAGEM TURBIDIMÉTRICOS

Principais Características:

→ É um método de contagem indireto;

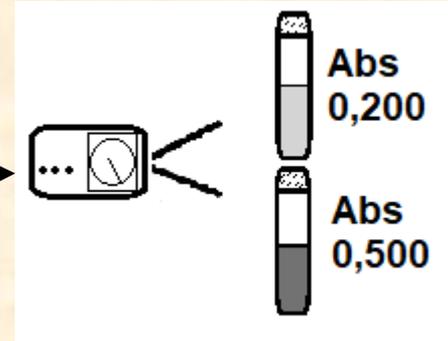
→ Contam células **vivas** e **mortas**;

→ Mais adequado para **amostras líquidas**;

→ A amostra “**não deve**” possuir **particulado**;

→ **População** deve ser **elevada** ($> 10^4$ - 10^5 bactérias/mL);

→ **Rápido** e com **resultados imediatos**;



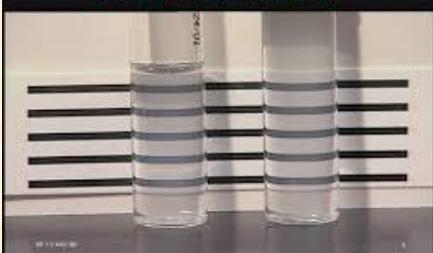
MÉTODOS DE CONTAGEM TURBIDIMÉTRICOS - POR COMPARAÇÃO

Escala de McFarland



Tubo da Escala	Quantidade de Bactérias x 10 ⁶ bactérias /mL
0,5	150 (1,5 x 10 ⁸)
1	300 (3,0 x 10 ⁸)
2	600 (6,0 x 10 ⁸)
3	900 (9,0 x 10 ⁸)
4	1200 (1,2 x 10 ⁹)
5	1500 (1,5 x 10 ⁹)
6	1800 (1,8 x 10 ⁹)
7	2100 (2,1 x 10 ⁹)
8	2400 (2,4 x 10 ⁹)
9	2700 (2,7 x 10 ⁹)
10	3000 (3,0 x 10 ⁹)

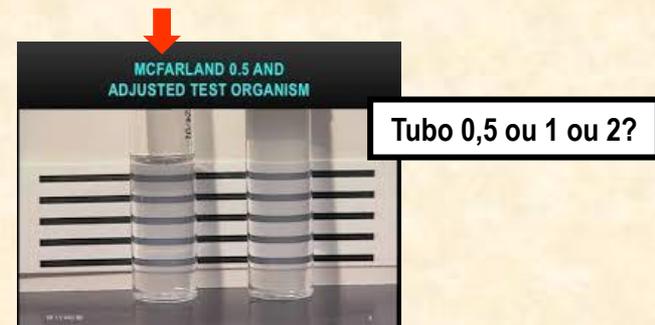
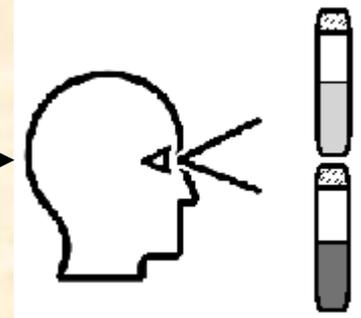
MCFARLAND 0.5 AND ADJUSTED TEST ORGANISM



MÉTODOS DE CONTAGEM TURBIDIMÉTRICOS - POR COMPARAÇÃO

Principais Características:

- É um método de contagem indireto;
- Contam células **vivas** e **mortas**;
- Mais adequado para **amostras líquidas**;
- A amostra “**não deve**” possuir **particulado**;
- **População** deve ser **elevada**;
- **Rápido** e com **resultados imediatos**;
- Resultados **dependem do executor**;
- **Resultados imprecisos**;





Disciplina de Microbiologia

Ensino Remoto

Curso de Nutrição - Integral

U N I R I O



Instituto Biomédico

**Este vídeo possui
uma continuação.**

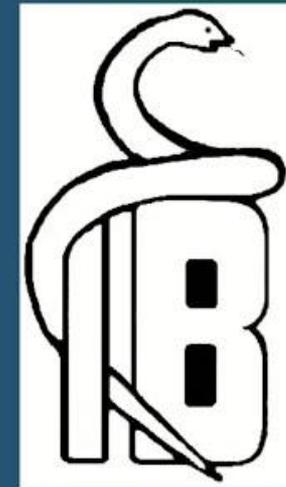


Disciplina de Microbiologia

Ensino Remoto

Curso de Nutrição - Integral

U N I R I O



Instituto Biomédico

**Este vídeo é a continuação
do vídeo anterior.**

MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA

Reagentes + Cultura (**ATP**) = **Bioluminescência**

Dosagem da Luz Emitida
proporcional a quantidade
de bactérias



Luciferina

+

Luciferinase

ATP

=

LUZ

Quantidade de **ATP** é
DIRETAMENTE
PROPORCIONAL a
quantidade de bactérias
e a quantidade de luz
emitida



OUTROS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA

Geralmente Utilizados em Biotecnologia

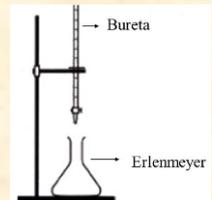
Vitamina + Cultura = Crescimento

Biomassa



Carboidrato + Cultura = Fermentação

Dosagem de Ácidos



Principais Características dos Métodos de Determinação da Atividade Metabólica:

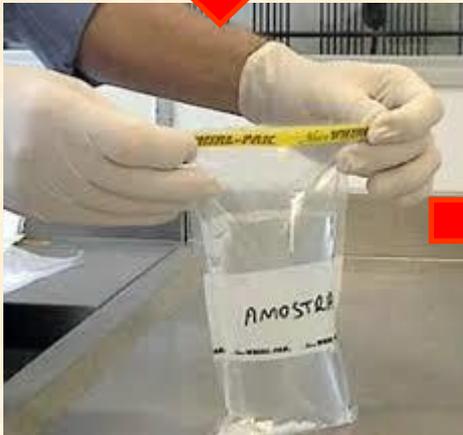
→ É um método de contagem indireto;

→ A população é determinada a partir da **Atividade Metabólica** das células;

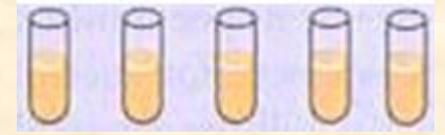
→ Contam somente células **vivas ativas metabólicamente**;

→ Aplicações bastante específicas;

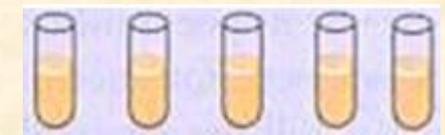
MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL



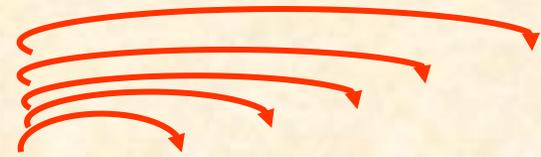
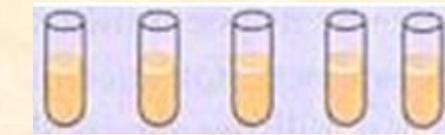
10 ml



1 ml



0,1 ml



→ Resultado Positivo



→ Resultado Negativo

Incubar

MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL

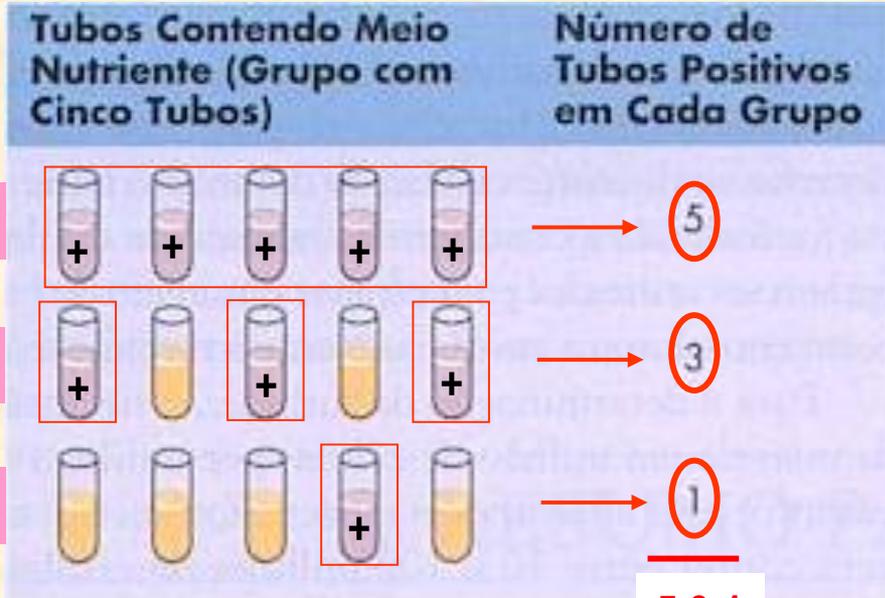
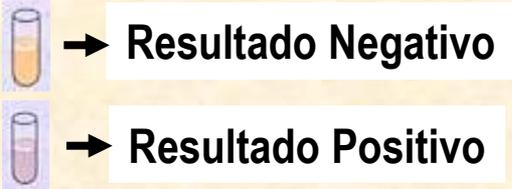


TABELA ESPECÍFICA para:

- Número de tubos (3 series 5 tubos);
- Volumes utilizados (10, 1 e 0,1 mL)

Combinações de Tubos Positivos	Índice de NMP/100 mL	Limites com 95% de Confiabilidade	
		Inferior	Superior
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360

5 3 1



NMP = 110 bactérias / 100 ml

5-3-1 110

MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL

Principais Características:

→ Contam células vivas;

→ É um método de contagem estatístico;

→ É um método **TRABALHOSO**;

→ É um método **DISPENDIOSO**;

→ É um método **MUITO ÚTIL PARA BACTÉRIAS ESTRESSADAS**;

↓
Alimentos: refrigerados, congelados, com alta acidez ou osmolaridade, com conservantes, ...

CONTAGEM DE VIÁVEIS EM PLACA

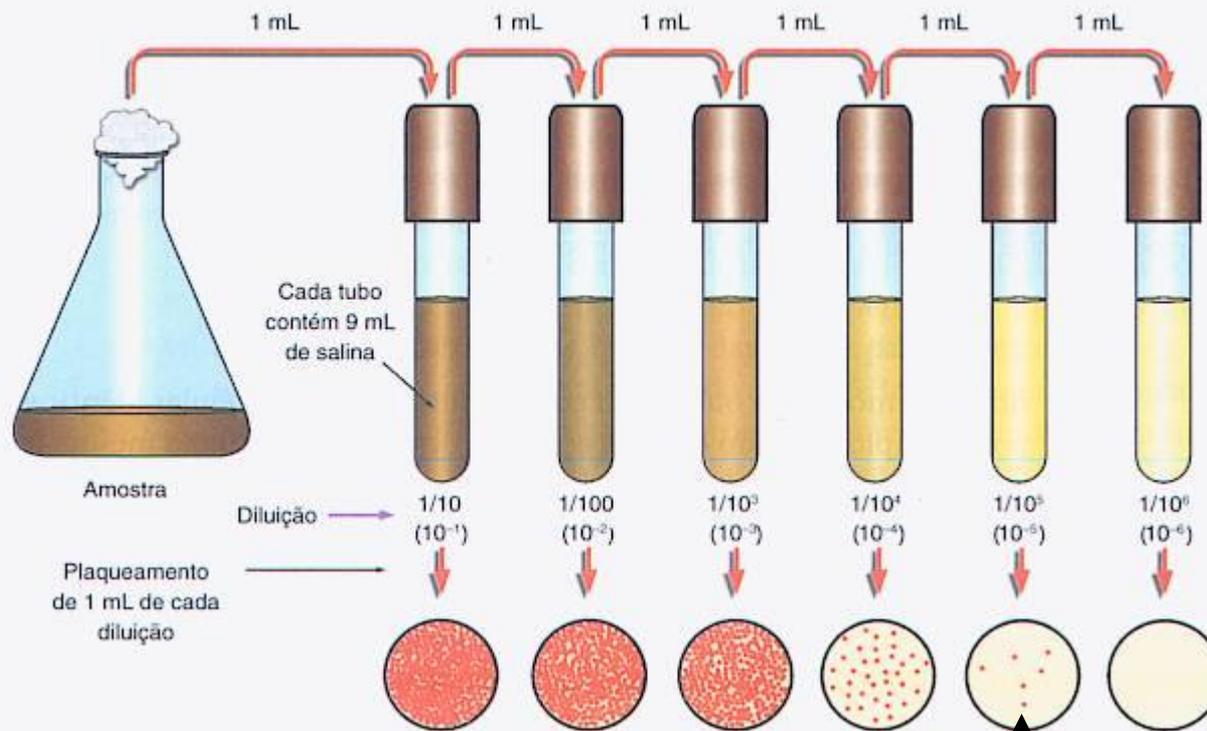
Diluição 1 mL da amostra : 9 mL do diluente

=

1:9 vol/vol (e)

=

1/10 (para)



Diluição Seriada
na Razão 1/10

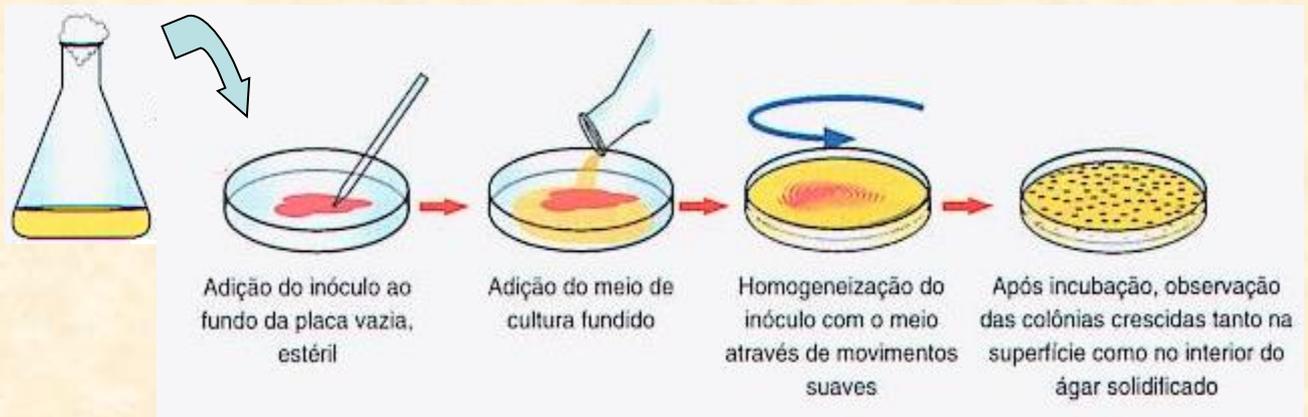
Contagem de Colônias

CONTAGEM DE VIÁVEIS EM PLACA

Técnica de Espalhamento em Superfície (“**Spread-Plate**”)



Técnica de Espalhamento em Profundidade (“**Pour-Plate**”)



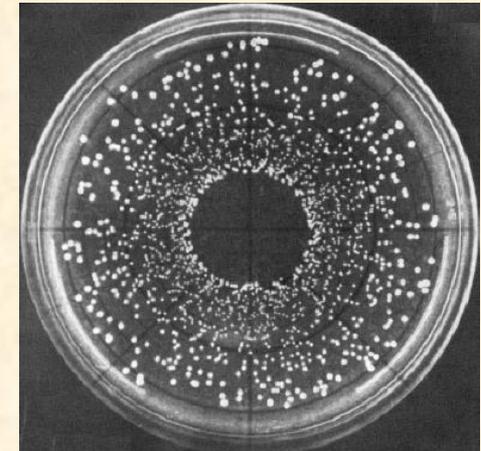
CONTAGEM DE VIÁVEIS EM PLACA

Técnica de
Espalhamento
em Superfície
("Spread-Plate")

→ Inóculo de **0,1 a 0,5 mL**;

→ Possibilita o uso de "Meios Opacos";

→ Não existe choque térmico "devido" ao meio de cultura ;



CONTAGEM DE VIÁVEIS EM PLACA

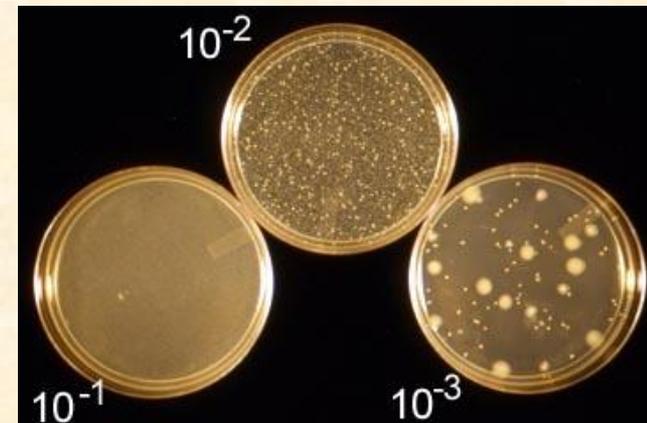
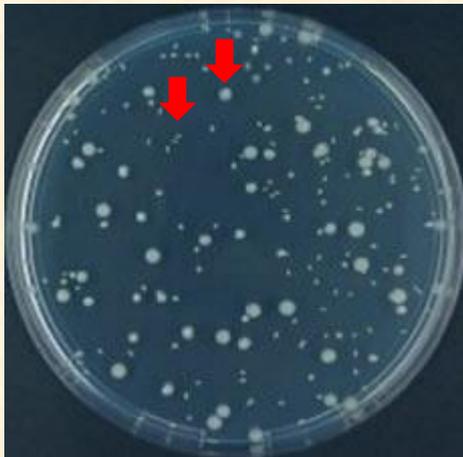
Técnica de Espalhamento em Profundidade (“Pour-Plate”)

→ Inóculo de 1 a 5 mL;

→ **Não** possibilita o uso de “Meios Opacos”;

→ Detecção difícil de colônias no interior do meio de cultura

→ Existe choque térmico “na adição” do meio de cultura;



CONTAGEM DE VIÁVEIS EM PLACA

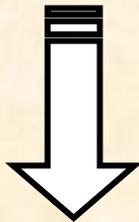
Contagem de Colônias

X

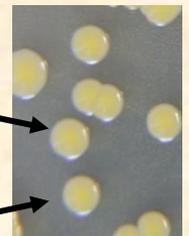
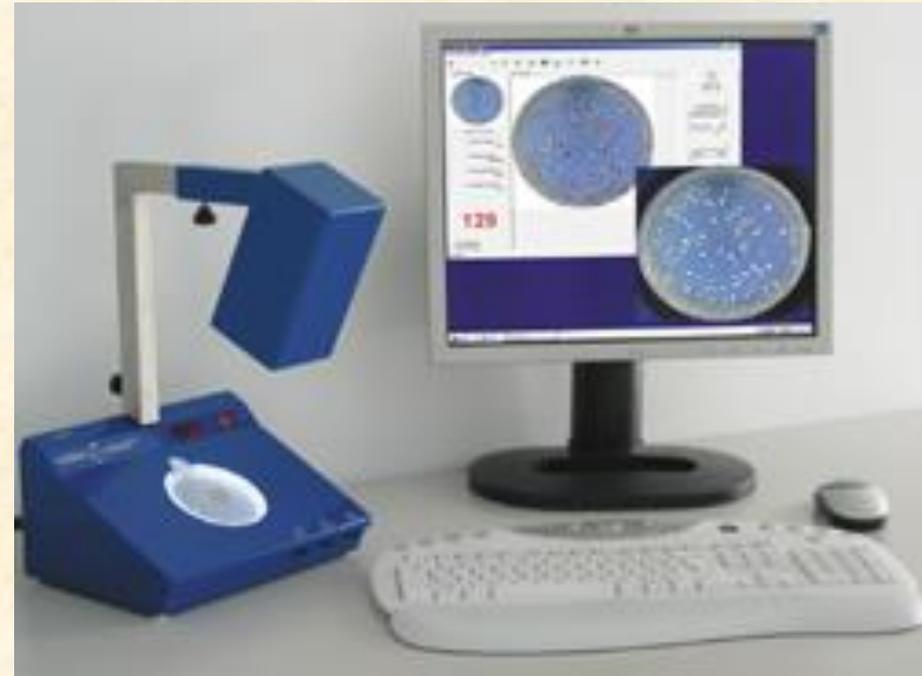
Inverso da Diluição da Amostra

X

Fator de Correção de Volume do Inóculo

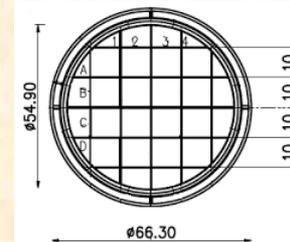
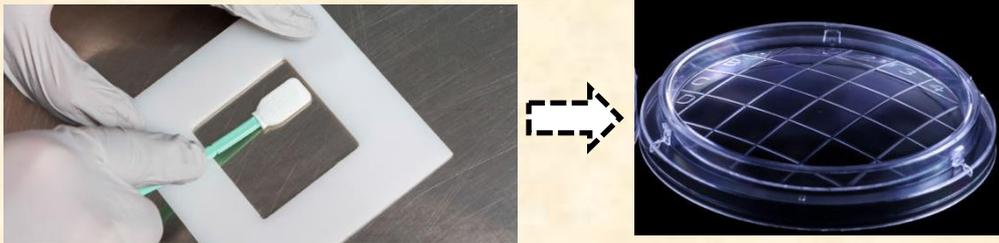


Determinação da Contagem de **Unidades Formadoras de Colônias** na Amostra



CONTAGEM DE VIÁVEIS EM PLACA

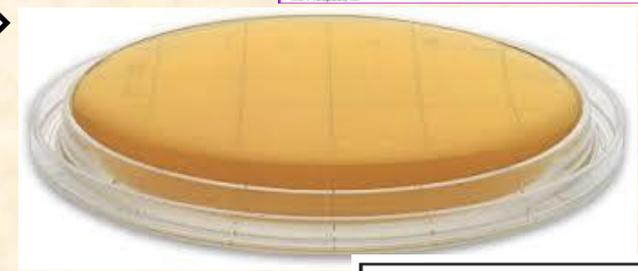
Método da Placa de Contato (RODAC)



Improved RODAC Plates Offer These Unique Features:

- Highest quality BBL Media, including D/E Neutralizing Agar, Trypticase[®] Soy Agar and more!
- 60 mm RODAC plates feature media surface area that conforms to IES standards.¹
- Grid sits inside RODAC dish — so it won't get in the way of your marks!
- Excellent stackability — a RODAC exclusive!
- Convex dish base results in unique RODAC surface for better contact between agar bed and surface area tested.
- User-friendly, wide sides are easy to grasp and apply to surfaces.

¹ U.S. Patent # 3,729,382.
² Process Control Guidelines for Gamma Radiation Sterilization of Medical Devices, 1984. Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Arlington, Va.
³ Microorganisms in Clean Rooms, IES-PP-C0023.1, 1993. Institute of Environmental Sciences, Mt. Prospect, Ill.

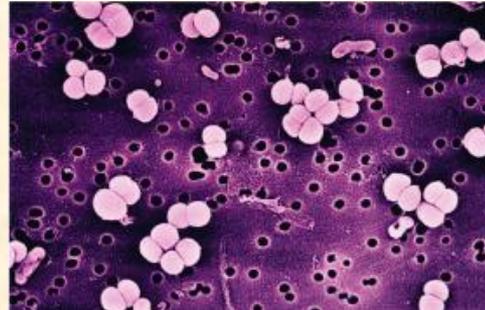


Variações da Placa RODAC

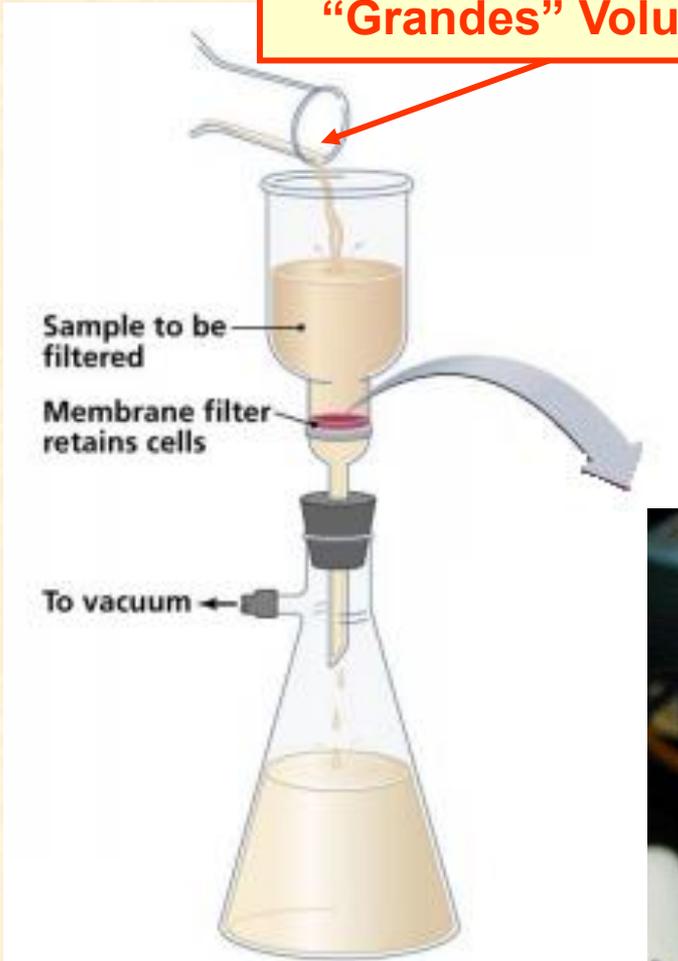


CONTAGEM DE VIÁVEIS EM MEMBRANA FILTRANTE

Permite a Análise de "Grandes" Volumes



Meio de Cultura





Disciplina de Microbiologia

Ensino Remoto

Curso de Nutrição - Integral

U N I R I O



Instituto Biomédico

→ Não deixe de fazer os exercícios (Google Formulários e Socrative);

→ Aproveite a Aula de Estudo Sincrônico para tirar suas dúvidas;

OBRIGADO