

MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS DE LEVEDURAS

1- INTRODUÇÃO

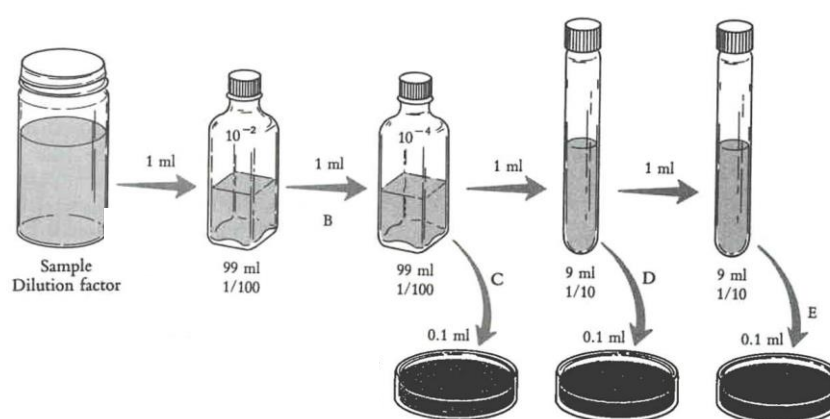
Existem vários métodos para a contagem do número de células de microrganismos, algumas técnicas permitem a quantificação de células viáveis enquanto outras quantificam o número total. As técnicas mais utilizadas são:

1. Contagem do número de Unidade Formadora Colônias (UFC)
2. Turbidimetria
3. Contagem direta em câmara de Neubauer

1.1 - CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURAS EM PLACA PETRI (UFC - UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS)

O método de diluição em placa é utilizado tanto para o isolamento quanto para a contagem de microrganismos. Para realização deste método é necessário obter a multiplicação celular a partir de uma única célula inoculada na superfície de um meio de cultura sólido, até que se forme uma colônia macroscópica, isolada e visível. Trata-se, portanto, de um método relativamente demorado. Em culturas com altas concentrações de células, utiliza-se o método de diluições seriada em placa, na razão de 1 para 10, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1: Procedimento geral de diluição seriada para uso em técnica de semeadura em meio sólido.



Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 199

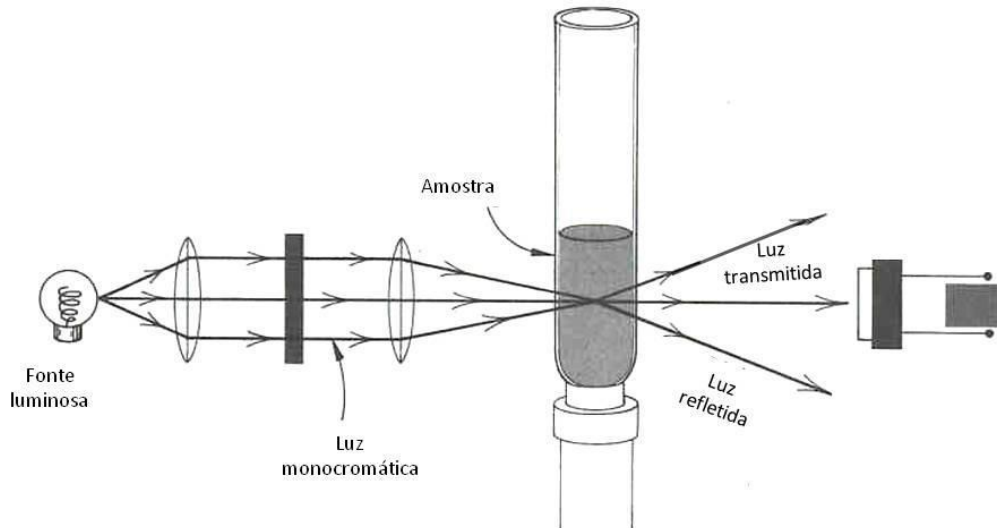
O cálculo de UFC é obtido de acordo com a fórmula:

UFC= Número de colônias na placa X fator de diluição/ volume do inóculo.

1.2 - TURBIDIMETRIA

Trata-se de um método indireto no qual é quantificada a massa total de células a partir da turvação de um sistema líquido. Para esta contagem é necessário à utilização do espectrofotômetro. A absorvância (Abs) ou densidade óptica (DO) é a unidade utilizada na medida da turbidez. Os raios luminosos emitidos pelo aparelho podem incidir nas células, sendo dispersos, ou atravessar o meio, sendo detectados (Figura 2). Portanto, quanto maior o número de células, menor a quantidade de luz que alcança o detector. Além da concentração de células na suspensão, a quantidade de luz detectada depende de fatores como o diâmetro do tubo, o comprimento de onda e a intensidade da luz incidente. A detecção é em termos de porcentagem de luz transmitida (transmitância), sendo $Abs = 2 - \log$ de % da transmissão. Logo, a absorvância aumenta proporcionalmente ao aumento do número de células na cultura. A partir da construção de uma curva relacionando a concentração celular com as medidas de Absorvância, realizada a partir de diferentes pontos de diluição, é possível estimar a concentração de massa de células em uma amostra desconhecida.

Figura 2: Esquema com método turbidimétrico para medida de crescimentos celular.



Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 1997.

2- OBJETIVOS

Determinar o número de células na cultura de levedura pelos métodos de Unidade Formadora de Colônia (UFC); Quantificar a massa celular pelo método de Turbidimetria

3- MATERIAL E MÉTODOS

Material

- Alças de Drigalsky estéril
- 4 placas de Petri com Meio Agar Sabourand
- Tubos com 9mL de solução salina estéril
- Câmara Neubauer
- Tubos de ensaios
- Ponteiras esterilizadas para volumes de 1,0 e 0,1 mL
- Tubo com cultura de Células de *Saccharomyces cerevisiae* com concentração desconhecida
- Garrafa de diluição

Equipamento:

- Estufa para temperatura 25°C
- Espectrofotômetro
- Microscópio
- Autoclave

4- PROCEDIMENTO

4.1 - CONTAGEM DE CÉLULAS LEVEDURAS EM PLACA DE PETRI (UFC - UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS)

1. A partir da suspensão de células de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* com concentração desconhecida fazer uma primeira diluição 50x em garrafa com 98mL de solução salina. Em seguida, fazer diluições seriadas por seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de Salina 1% estéril.
2. Espalhar com a alça de Drigalski estéril 0,1 ml das diluições em 3 placas de Petri, com o meio Agar Sabourand.
3. Lacrar e identificar a placa;
4. Incubar as placas invertida a 28 °C por 2 dias na estufa.
5. Contar as colônias na placa onde o número deve ser de 30 a 300 colônias. Calcular o número de colônias utilizando o conceito de Unidade Formadora de Colônias (UFC) por mililitro da suspensão de células.

4.2 - QUANTIFICAÇÃO POR TURBIDIMETRIA DA AMOSTRA DESCONHECIDA

1. Adicionar na cubeta 2 mL da suspensão celular na diluição 10^{-1} do procedimento anterior e medir a Abs no espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm.
2. Na próxima aula, será montada a Curva Padrão e a equação da reta utilizada para determinar a concentração de massa celular na amostra. Caso seja necessário, podem ser utilizadas diluições da amostra

4.3- DETERMNAÇÃO DO PESO SECO PARA DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO

1. Centrifugar 50mL de cultura de *Saccharomyces cerevisie*. Descartar o sobrenadante.
2. Suspende as células em 50 mL de água destilada.
3. Homogeneizar a suspensão e tirar 5 alíquotas de 5mL para o cadinho (tarar previamente a balança)
4. Evaporar a água em estufa a 80-90C até a próxima aula.
5. Pesar

RESULTADOS: