



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053

**MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS DE
MICRORGANISMOS**

ROTEIRO 1

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

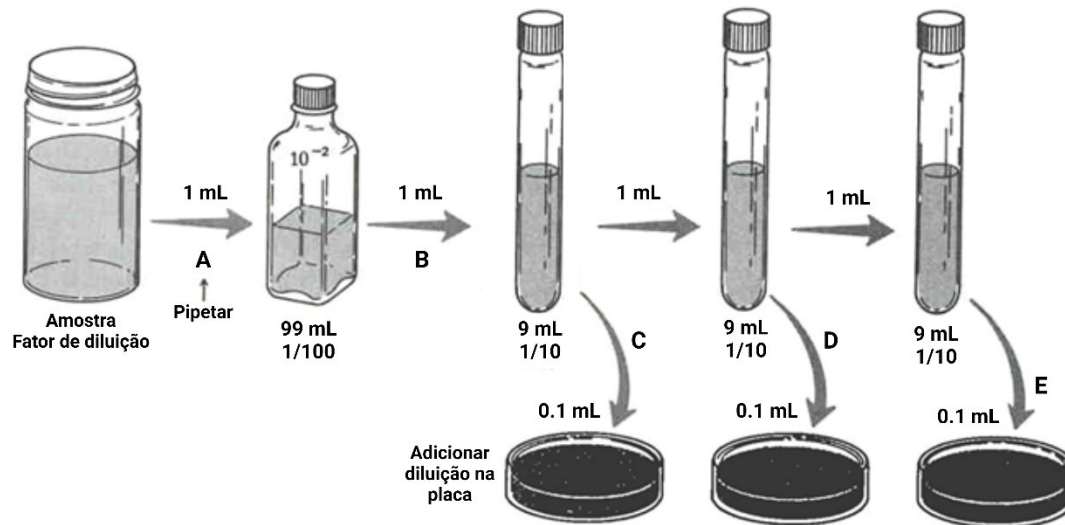
1.1 – CONTAGEM DE CÉLULAS EM PLACA PETRI (UFC - UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS)

O método de diluição em placa, ou contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), é uma técnica padrão utilizada tanto para o isolamento quanto para a quantificação de microrganismos viáveis. O princípio desse método requer que uma única célula, após semeadura na superfície de um meio de cultura sólido, se multiplique até originar uma colônia macroscópica, isolada e visível. Por depender desse crescimento individualizado, o método é relativamente demorado. Em culturas com concentrações elevadas de células, o processo é otimizado pela aplicação de diluições seriadas em placa, tipicamente na razão de 1:10, conforme demonstrado na Figura 1



Departamento de Biotecnologia
Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053

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



Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 1999

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 OU ESPECTROFOTOMETRIA

A espectrofotometria constitui um método indireto para a quantificação da biomassa celular, que se baseia na medição da turbidez de uma suspensão líquida. Esta turbidez é quantificada em unidades de Absorbância (Abs) ou Densidade Óptica (DO), utilizando um espectrofotômetro. Quando um feixe de luz incide na suspensão microbiana, os raios luminosos são dispersos pelas células em suspensão, e apenas o remanescente atravessa o meio até o detector (Figura 2). Conseqüentemente, quanto maior a concentração de células na cultura, menor a quantidade de luz que atinge o detector.



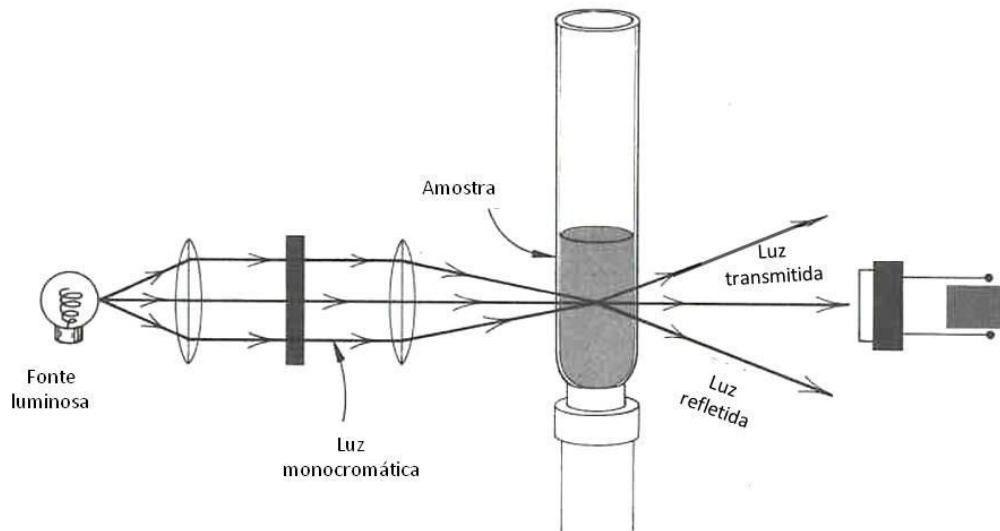
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053

A detecção da luz é usualmente expressa como a porcentagem de luz transmitida (Transmitância). A Absorbância (DO) é calculada a partir da Transmitância pela relação: $Abs = 2 - \log de \%$. Dessa forma, a absorbância aumenta proporcionalmente ao aumento do número de células em suspensão (dentro da faixa de linearidade do instrumento). É importante ressaltar que a leitura depende de fatores instrumentais cruciais, como o comprimento de onda, a intensidade da luz incidente e o diâmetro do recipiente de leitura.

A partir da construção de uma curva-padrão que correlaciona concentrações celulares conhecidas com suas respectivas medições de Absorbância, é possível estimar de forma rápida e eficiente a concentração celular (ou massa) em amostras cuja concentração é desconhecida.

Figura 2: Método de espectrofotometria para medida de crescimentos celular.



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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053

2- OBJETIVOS

Determinar o número de células viáveis em uma suspensão de células de leveduras pelo método de Unidade Formadora de Colônia (UFC) e quantificar a massa celular (mg/mL) pelo método de Turbidimetria.

3- PROCEDIMENTO

3.1 - CONTAGEM DE CÉLULAS LEVEDURAS EM PLACA DE PETRI (UFC)

1. A partir da suspensão de células de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* com concentração desconhecida fazer uma primeira diluição 100x em garrafa com 99 mL de solução salina. Em seguida, fazer diluições seriadas por seriadas de 10^{-3} a 10^{-5} em tubos de ensaio contendo 18,0 mL de Salina 1% estéril;
2. Espalhar com a alça de Drigalski estéril 0,1 ml das últimas diluições em 3 placas de Petri com o meio Agar Nutriente;
3. Lacrar e identificar as placas;
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 30-25 a 250-300 colônias. Calcular o número de colônias utilizando o conceito de Unidade Formadora de Colônias (UFC) por mililitro da suspensão de células.

3.2 – QUANTIFICAÇÃO POR TURBIDIMETRIA DE UMA AMOSTRA DESCONHECIDA

1. Utilizando um ponto de diluição do procedimento anterior, adicionar na cubeta 2 mL da suspensão celular e medir a Abs no espectrofotômetro (comprimento de onda de 600nm).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053

2. Anotar a medida de Abs que será aplicada na Curva Padrão (Abs X mg/mL) para determinar, a concentração de massa celular (mg/mL) da amostra em análise.