



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL

Departamento de Biotecnologia

Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática– LOT2053

**RTEIRO 3: CONTINUAÇÃO: MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS –
CONTAGEM DIRETA**

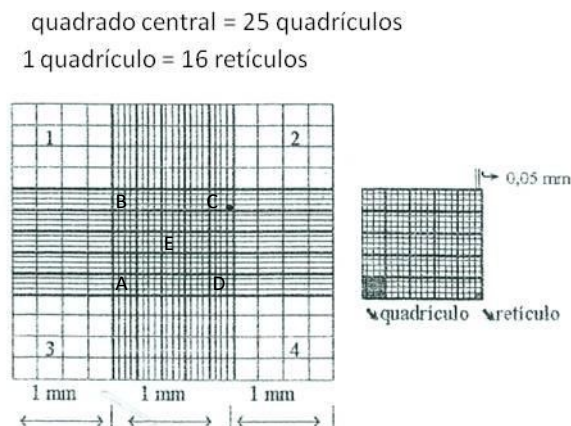
1- INTRODUÇÃO

1.2 - CONTAGEM DIRETA DE CÉLULAS DE LEVEDURAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

Trata-se de um método de quantificação direta de células em suspensão líquida, realizado por meio da contagem em Câmara de Neubauer. Para tanto, uma alíquota da amostra é depositada no espaço existente entre a câmara e a lamínula que a cobre. A câmara de Neubauer possui formato retangular e é delimitada por dois sulcos, formando três plataformas (Figura 1). A plataforma central contém a área reticulada e encontra-se 0,1 mm abaixo das plataformas laterais. Ao posicionar a lamínula sobre as plataformas laterais, forma-se um espaço de 0,1 mm de profundidade entre a lamínula e a área reticulada central.

A área reticulada possui dimensões de 3 mm × 3 mm, totalizando 9 mm². O quadrado central dessa área é subdividido em 25 quadriculo, e cada um deles é novamente dividido em 16 quadrados menores (retículos). Dessa forma, o quadrado central contém 400 retículos utilizados para a contagem celular.

Figura 1: Esquema representando a câmara de Neubauer, seguida de informações sobre suas dimensões





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena –EEL

Departamento de Biotecnologia

Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática– LOT2053

Divisões da Câmara:

- Área total reticulada: 3 mm x 3 mm (9 mm²)
- Profundidade: 0,1 mm
- Volume de 0,9 mm³
- Quadrado central: 25 quadrículo
- Cada quadrículo contém 16 pequenos retículos

Quando contamos células na Câmara de Neubauer, contamos em um volume muito pequeno.

A área central tem:

- Área: 1 mm × 1 mm = 1 mm²
- Profundidade da câmara: 0,1 mm

Então, o volume analisado em 1 quadrado grande é:

$$1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$$

Após contagem no microscópio do número de células, aplica-se o cálculo descrito a seguir para o número total de células na amostra.

1- Contagem pelos quadrados 1, 2, 3 e 4.

$$N^{\circ} \text{ de células /mL} = n / 4 \times 10^4;$$

n = número de células nos quadrados 1, 2, 3 e 4.

2- Contagem pelos quadrículos A, B, C, D e E

$$N^{\circ} \text{ de células /mL} = n \times 5 \times 10^4;$$

n = número de células nos quadrículos A, B, C, D e E.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena –EEL

Departamento de Biotecnologia

Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática– LOT2053

2- OBJETIVOS:

Realizar a quantificação de células de leveduras pelo método de contagem direta em câmara.

3-PROCEDIMENTO

Será utilizada uma suspensão de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e corante azul de metileno.

3.1- CONTAGEM DIRETA DE CÉLULAS DE LEVEDURAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

1. Adicionar 1 mL da amostra em um microtubo e acrescentar 3 gotas de azul de metileno, homogenizando suavemente;
2. Encostar a ponta da micropipeta na borda da lamínula e preencher cuidadosamente o espaço da câmara por capilaridade, evitando formação de bolhas;
3. Colocar a lamínula;
4. Posicionar a câmara no microscópio e ajustar o aumento para 400X;
5. Contagem das células: Contar as células em 4 quadrados grandes de um lado da câmara:

Calcular a média dividindo o total por 4 ou contar as células nos quadrículos A, B, C, D e E e multiplicar o valor obtido por 5.

6. Critérios para a contagem: Contar células isoladas normalmente. Para aglomerados onde as células são visíveis individualmente, contar cada célula. Para aglomerados onde não é possível distinguir as células, contar o grumo como 1 unidade. Adicionar 1 mL da amostra e adicionar 3 gotas de azul de metileno