

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA DE PLANTAS
36.571-000 VIÇOSA - MG - BRASIL**

**MÉTODO DE DILUIÇÃO EM PLACAS PARA CONTAGEM DE
CÉLULAS
BACTERIANAS VIÁVEIS EM UMA SUSPENSÃO**

Reginaldo da Silva Romeiro
Professor Titular da UFV

INFORMAÇÃO BÁSICA

Numa suspensão de células bacterianas, cada mililitro deve conter milhões de células. Nem todas, obviamente, estão viáveis. O número de células viáveis presentes em uma suspensão tem sido genericamente denominado u.f.c. ("unidades formadoras de colônias"), sendo a sigla equivalente em inglês c.f.u. ("colony forming units"). Assim, UFC (unidade formadora de colônia) é usado quase como sinônimo de célula viável. Os métodos de contagem de colônias em placas ancoram-se no princípio que, sendo a diluição e o semeio em placas bem feitos, cada colônia surgida é considerada originária de uma única célula viável.

A quantificação de UFC necessariamente envolve o preparo, com toda assepsia, de uma suspensão de células bacterianas, que a seguir sofre diluições em série e uma alíquota de cada diluição é semeada em placa (Figura 1). Após a incubação, conta-se o número de colônias, sempre assumindo-se ser cada colônia originária de uma única célula.

É recomendável o cultivo da bactéria em um meio pobre em carboidratos pois, caso contrário, há abundante produção de cápsula e eventual aderência de células umas às outras, ocasionando erros de contagem. Isso porque, quando acontece de um grupo de células ser depositado na superfície do meio, a colônia surgida é contada na pressuposição de ser ela originária de uma única célula viável, o que pode não ser verdade. Espécies de *Xanthomonas* sp. Especificamente têm tendência a uma copiosa produção de cápsula. Uma das formas de se minimizar o problema é a adição de um espalhante (Tween 80 a 0,1 %, por exemplo) conforme GERHARDT (1994). ROMEIRO et alii (1991) obtiveram bons resultados em contagem de u.f.c. de *X. campestris* pv. *manihotis* fazendo uso de Tween 80.

O método de diluição em placas para contagem de u.f.c. é uma das técnicas mais básicas e essenciais em bacteriologia.

MEIO DE CULTURA

O meio universalmente conhecido como Nutriente Agar (NA) ou Agar Nutriente presta-se bem a esta finalidade. Geralmente é adquirido pronto (ANÔNIMO, 1984), bastando apenas dissolvê-lo em água e autoclavar:

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Agar	15g
Água destilada	1000ml (q.s.p.)

É possível prepará-lo, conforme procedimento recomendado por KIRALY et alii (1970):

PROCEDIMENTO

A bactéria em estudo deve ser cultivada em um meio que não favoreça a excessiva formação de material capsular, pois os glomos resultantes da aglomeração de células podem interferir na contagem.

Para minimizar esse tipo de problema, pode-se, por exemplo, substituir a fonte de carbono do meio de cultura. No caso do meio 523 (KADO & HESKET, 1970) rotineiramente utilizado no Laboratório de Bacteriologia de Plantas da UFV, a sacarose é substituída por glicose uma vez que o primeiro açúcar estimula intensa formação de cápsula na célula bacteriana (SILVA, 1996).

01. Adicione, aseticamente, água estéril em um tubo de cultura
02. Agite e transfira a suspensão resultante para um tubo ou frasco vazio, também estéril.
03. .Proceda a diluições em séria, até 5^{15}
04. Transfira 100µl de cada uma das 8 últimas diluições, começando da mais diluída para a menos diluída para a superfície do meio em placa, uma placa para cada diluição.
05. Imediatamente, proceda ao espalhamento da alíquota com auxílio de espátula de Drigalsky.
06. Incube as placas, invertidas, a 28°C / por 24-48 horas ou até o surgimento de colônias
07. Proceda á contagem das colônias, na diluição ou diluições onde elas estiverem individualizadas, sem coalescências e, ou, superposições.
08. Calcule quantas C.F.U. havia na suspensão original

RELAÇÃO DE MATERIAL NECESSÁRIO, POR ESTUDANTE

- | | |
|----|---|
| 01 | Cultura bacteriana em meio sólido inclinado |
| 01 | Tubo ou freasco pequeno, vazio e estéril |
| 01 | Espátula de Drigasky |
| 01 | Pipeta automática ajustável para 1 ml |
| -- | Ponteiras plásticas estéreis (q.s.p.) |
| 15 | Tubos com 4ml de água ou salina estéreis |
| 08 | Placas de petri com meio de KADO & HESKETT (1970) |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ANÔNIMO. MANUAL DIFCO – Medios de Cultivo Deshidratados y Reactivos para Microbiologia. DIFCO Laboratories. Detroit. 1984. 1166p.
- GERHARDT, P (Ed.). Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington. 1994. 791p

- GUIMARÃES, W.V. 1995. Curva de Crescimento de *E. coli*. Roteiro de aula prática do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Viçosa. 2p.
- NAPOLEÃO, R. L. Avaliação de antagonistas a *Agrobacterium tumefaciens* isolados de rizosfera, de rizoplano e de tumores de roseira. Imprensa Universitária-UFV. 1996. 61p (Tese de MS)
- ROMEIRO, R. S.; SOUZA, R. M. & LIEBEREI, R. Sensibilidade a cianeto e capacidade de metabolização do composto por isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Fitopatologia Brasileira, 16(2): 24, 1991. [Abstract].
- SIGEE, D. C. Bacterial Plant pathology. Cambridge University Press. Cambridge. 1993. 325p.
- SILVA, D. O. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. 36.571.000 Viçosa, Minas Gerais. Brasil. (Comunicação Pessoal). 1996
- STANIER, R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L., PAINTER, P. R. 1986. The Microbial World. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 689p.
- WINKLER, U., RUGER, W., WACKERNAGEL, W. Bacterial, Phage and Molecular Genetics. An Experimental Course. Spring-Verlay Berlin Heidelberg. New York. 1976. 240p.

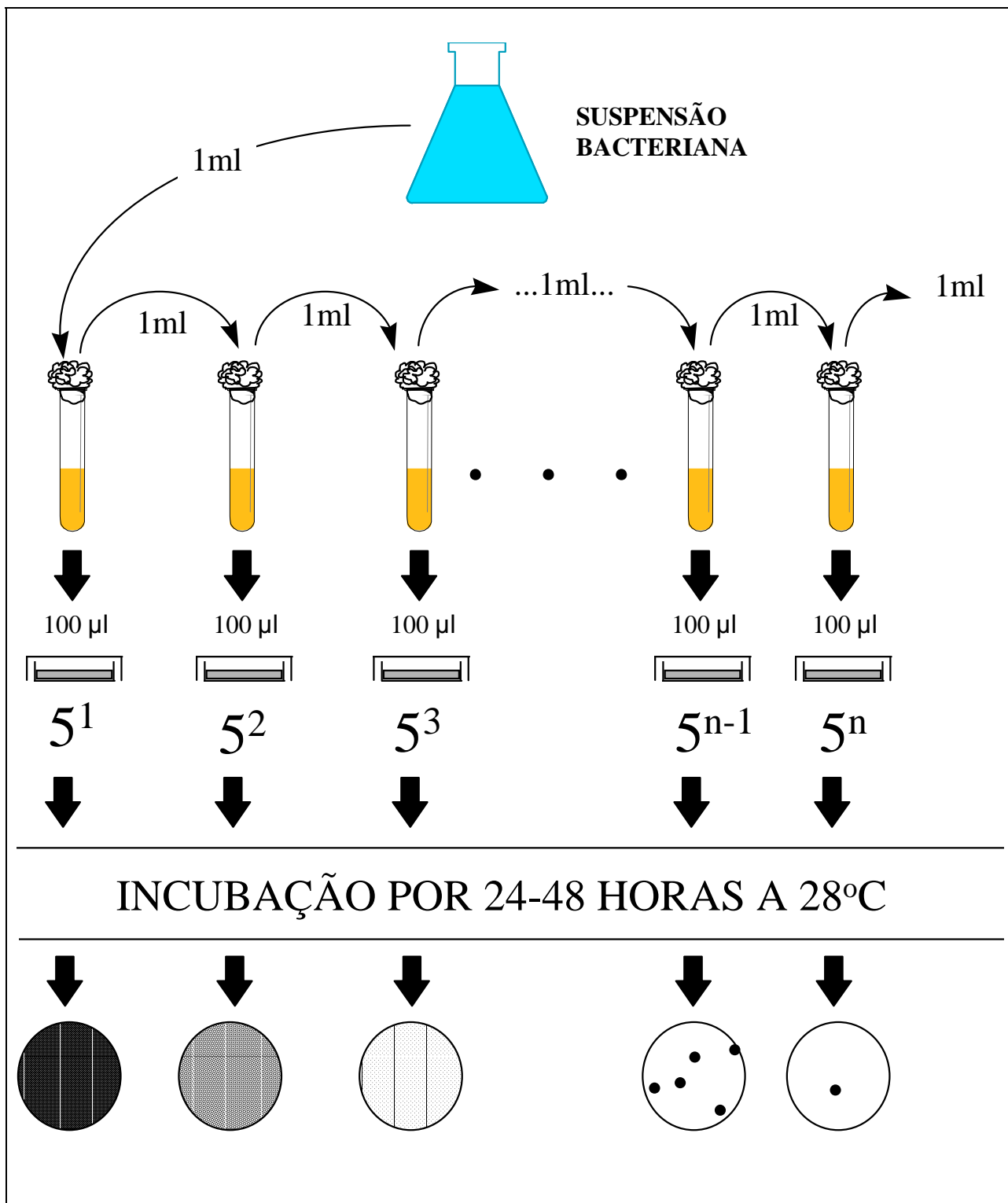


Figura 01: Esquema explicativo do procedimento para execução da técnica de diluições em placas e contagem de C.F.U.