



O uso de placas UFC em técnicas de contagem de microrganismos

*Kalleb Gabryell Magalhães Silva**

*Álvaro José Boareto Mendes ***

*Vanessa Cristina Rezende Melandri****

Resumo

A biotecnologia é uma área de crescente importância no contexto atual, que tem despertado cada vez mais interesse e curiosidade. Dada sua relevância e o fato de que sua prática exige o conhecimento e adaptação relacionados ao ambiente de laboratório, o trabalho teve como finalidade habituar os alunos, introduzindo-os à conduta adequada, aos materiais e métodos comuns a áreas da ciência, de maneira geral, e às técnicas básicas em laboratório de biotecnologia. Este projeto teve foco maior em desenvolver, validar e praticar uma técnica específica: a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). O método consiste na contagem de células viáveis a partir da diluição e plaqueamento de uma amostra de microrganismo, que, após incubação, cresce e dá origem a colônias isoladas. Essas colônias, contadas, permitem determinar a densidade de microrganismos que havia na amostra original. Tal prática é de grande importância para a biotecnologia como um todo, pois, a partir dela, é

possível averiguar a quantidade de células da amostra, o que é crucial para diversos ramos da indústria e da medicina. Durante a realização do projeto, foram realizadas atividades de introdução à biotecnologia, mas, devido ao curto prazo estipulado para a sua realização, não foi possível concluí-lo integralmente, de modo que não foram obtidos os resultados dessa prática. Como alternativa, portanto, optou-se por realizar o levantamento e revisão de resultados de pesquisas constadas em outros trabalhos científicos.

Apresentação

Introdução

A palavra microbiologia – que vem da junção de três elementos de composição grega *mikrós* (pequeno) e *biologia* (*bios* = vida + *logos* = estudo) – é a ciência que se destina aos estudos de microrganismos e de seu funcionamento, especialmente das bactérias

*Aluno do 3º ano do ensino médio (CMRJ).

**Cap R/1. Doutor em ciências na área de tecnologia de processos químicos e bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Atualmente, é professor da Seção de Engenharia Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Nuclear do Instituto Militar de Engenharia. Chefe do Laboratório de Processos Biotecnológicos do IME.

***1º Ten OTT. Doutora em ciências na área de biodiversidade e saúde pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Atualmente, é professora de biologia no CMRJ.



(CREMEPE, 2006). A microbiologia se dedica ao estudo de microrganismos, seres microscópicos, que não podem ser vistos a olho nu. Eles possuem uma grande diversidade e podem estar presentes em ambientes variados, desde o solo até no interior de seres vivos (Madigan *et al.*, 2016).

Devido à sua ampla abrangência, sua importância se dá em cenários diversos, e se deve ao entendimento e à aplicação do conhecimento acerca do mundo microbiano em prol da humanidade e do meio ambiente, seja na medicina, ecologia, agropecuária, ou até na indústria, sendo a base para a construção de biorreatores. Ela foi impulsionada pela descoberta do microscópio no final do século XVII, por Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), que, através do microscópio, pôde visualizar os microrganismos e, então, abrir as portas para essa nova ciência, estando a microbiologia e a microscopia diretamente interligadas.

Leeuwenhoek foi o primeiro a ver e descrever bactérias, leveduras, vida dentro de uma gota de água e circulação de corpúsculos sanguíneos em capilares, isso porque ele inventou o microscópio nas Províncias Unidas, tendo por base a invenção de Robert Hooke (microscopista inglês), que foi o primeiro a fazer a descrição de um microrganismo ao ilustrar estruturas de frutificação de bolores (Tortora, 2010).

As células microbianas vivem em associações com outras células na natureza. Um grupo de células originadas de uma mesma célula parental formam populações, que, por sua vez, interagem com outras populações para formar comunidades microbianas, as quais dependem dos recursos disponíveis e das condições do ambiente.

Em microbiologia, utiliza-se a palavra “crescimento” para referenciar um aumento no número de células em decorrência da divisão celular. O crescimento de microrganismos se dá por uma curva caracterizada por quatro fases: latência, exponencial (logarítmica), estacionária e morte (ou destruição). A reprodução bacteriana ocorre via progressão geométrica, por isso a expressão é representada em logaritmo (log) do número de microrganismos pelo tempo gasto para a multiplicação, ou seja, o tempo para uma célula originar dois, que originarão quatro e assim sucessivamente (Tortora, 2010).

Dentro desse campo de estudos, um processo fundamental para o controle das amostras é a contagem de microrganismos. Ela pode ser realizada por meio de diferentes técnicas, que permitem averiguar sua concentração de maneiras diversas (Vermelho *et al.*, 2014). Sua importância se dá em cenários variados, tais como na medicina, para o diagnóstico de infecções bacterianas, nas indústrias alimentícias, para a verificação da qualidade e segurança dos produtos, e no monitoramento ambiental, para a validação da qualidade da água e do ar, além, obviamente, do acompanhamento do crescimento microbiano em pesquisas científicas ou nos processos industriais.

O foco maior deste projeto foi na técnica de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), um dos principais e mais utilizados métodos de contagem. Ele se destaca devido ao fato de considerar apenas as células viáveis, isto é, aquelas que são capazes de se multiplicar, e por sua simplicidade e fácil aplicação, necessitando apenas de materiais simples (Vermelho *et al.*, 2014), o que viabiliza sua prática pelos estudantes.



O ensaio de formação de colônias é uma técnica de análise da sobrevivência de células *in vitro*, baseado na capacidade de uma única célula crescer para uma colônia (em torno de 50 células). O ensaio de UFC pode ser usado para determinar a eficácia de outros agentes citotóxicos. Apenas uma fração de células semeadas mantém a capacidade de produzir colônias (Franken *et al.*, 2006).

A técnica de contagem direta em placa exige um tempo de incubação de 24h para o aparecimento de colônias visíveis na placa. Tal método considera que cada colônia é originária de uma única célula. Os resultados dessa contagem são expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) – (Tortora, 2010).

Além disso, com relação às indústrias, a análise de UFC também é utilizada como parâmetro para assegurar a qualidade de alimentos e de medicamentos, como, por exemplo, no monitoramento ambiental estipulado pela ANVISA. O Monitoramento Ambiental é uma ferramenta de avaliação de eficácia das medidas de controle de contaminação, que identificam ameaças para a qualidade e a segurança dos produtos fabricados por meio da avaliação do perfil microbiológico das áreas limpas, cujos resultados permitem verificar as tendências de crescimento microbiano dentro dos ambientes controlados.

Justificativa

Tendo em vista a grande relevância da microbiologia no cenário moderno, o projeto visa introduzir aos estudantes técnicas básicas dos laboratórios de biotecnologia, de modo a fornecer

uma visão geral da rotina de trabalho e habituá-los a esse ambiente, bem como prepará-los para escrever textos científicos nos moldes adequados e realizar pesquisas.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi pautado na iniciação científica dos alunos, por meio da realização de atividades que os treinassem e preparassem para o trabalho em laboratório. Inicialmente, foram feitas atividades envolvendo práticas variadas, de modo que todos os alunos pudessem se habituar, conhecer melhor os equipamentos e materiais e aprender as diferentes técnicas que são aplicadas comumente em laboratórios de biotecnologia. Após isso, cada um iniciou o trabalho com os projetos específicos.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste projeto eram voltados para a prática da técnica de contagem de unidades formadoras de colônias; a partir de amostras isoladas de bactérias, como *Lactobacillus casei* e *Lactococcus lactis*, e fungos, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*, diluí-los e contá-los, de modo a apresentar aos alunos o método, bem como reforçar sua validação. Tendo em vista, no entanto, a falta de tempo com o prazo estipulado para a finalização do projeto, isso foi mudado, e foi feita apenas a revisão de artigos relacionados à contagem de unidades formadoras de colônias e seus resultados.



Desenvolvimento

Os projetos, apesar de individuais, foram organizados de tal forma que tivessem relação entre si, e fizessem parte de uma sequência de etapas que poderiam, em trabalhos futuros, levar a um processo industrial em um biorreator, como demonstrado na **figura 1**.

– Metodologia



Figura 1 – Esquema geral de atividades

Fonte: O autor

– Materiais

Os materiais utilizados na contagem de UFC consistem em:

Meio de cultura

- Água destilada;
- Balança;
- Bastão de vidro;
- Béquer;
- Espátula;
- Meio de cultura;
- Pipeta graduada.

Cultura dos microrganismos:

- Amostra contendo o microrganismo;
- Micropipeta;
- Placas de Petri;
- Tubos de ensaio.

– Métodos

O método de contagem de unidades formadoras de colônias consiste em:

• Preparo do meio

Para o preparo das placas, dilui-se o meio de cultura em água destilada dentro de um béquer, com auxílio de um bastão de vidro. Após a homogeneização, com uma pipeta graduada, põe-se um pouco do meio ainda líquido nas placas e se aguarda gelificar.

• Cultura dos microrganismos

A partir de uma amostra de microrganismo isolada em meio líquido, realiza-se a diluição seriada; distribui-se 9ml de água destilada nos tubos de ensaio e coloca-se, com a micropipeta, 1ml da amostra concentrada em um deles. Então, mistura-se, retira-se 1ml dessa nova amostra e põe-se no próximo tubo. Esse processo é realizado até atingir a concentração desejada.

Então, com a amostra diluída, faz-se o plaqueamento, retirando-se uma alíquota e depositando sobre as placas com o meio. Levam-se, após isso, as placas à estufa bacteriológica, onde elas ficam durante o período de incubação do microrganismo.

Após o crescimento do microrganismo, formam-se na placa colônias isoladas, cada qual originária de uma única célula, denominada unidade formadora de colônia. Contando-se a quantidade de colônias na placa e considerando-se o volume de amostra em



cada uma e o fator de diluição utilizado, é possível determinar a concentração microbiana na amostra original.

Resultados e análise

É inegável a importância da microbiologia nos dias atuais. Os recentes avanços nas áreas de saúde e produtos potencialmente benéficos à saúde por muitas vezes se utilizaram de análises como o cultivo e contagem de unidades formadoras de colônia.

Como não houve tempo suficiente para concluir a prática e obter resultados, foram selecionados dois estudos que também envolviam a contagem de unidades formadoras de colônias para serem analisados. O foco maior deste projeto é apenas na técnica de contagem em si, e não serão abordadas de forma tão significativa as propostas gerais dos estudos.

Na pesquisa de Macci (2019), a contagem de unidades formadoras de colônias foi utilizada para avaliar a capacidade antimicrobiana de agentes quelantes, e demonstrou-se ideal para tal, uma vez que é capaz de determinar a concentração de células viáveis, o que possibilitou verificar os microrganismos vivos em cada caso e compará-los.

O estudo de Langoni (2015) também se utilizou dessa técnica, aplicando-a para auxiliar a verificação de ocorrência de mastite no gado leiteiro, identificando a presença das bactérias causadoras da inflamação nas amostras.

Os dois trabalhos demonstram a eficácia e aplicabilidade da contagem de UFC, bem como sua versatilidade, sendo capaz de ser utilizada em situações diversas.

Conclusão

Após o fechamento do ciclo, é válido ressaltar que se pôde realizar diversas atividades, as quais seguramente cumpriram a meta de introduzir os alunos às práticas de laboratório de biotecnologia e ensiná-los a se portar nesse ambiente. Mesmo não tendo sido possível finalizar o projeto específico, ainda se pôde obter aprendizado dele. A inconclusão do trabalho levou os alunos a perceber que práticas como essa demandam bastante tempo e que nem sempre se obtêm os resultados desejados. Isso é normal e pode acontecer.

Referências

FRANKEN, N. A.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C.; **Clonogenic assay of cells in vitro**. Nat Protoc. 2006;1(5):2315-9.

GOMES, B. S. **A importância da microbiologia**. CREMEPE, 2006.



LANGONI, H. *et al.* Celularidade do leite e Unidades Formadoras de Colônias nas mastites causadas por *Staphylococcus coagulase* negativa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 518-524, jun 2015.

MADIGAN, M.T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. Ed. Artmed, 2016.

MACCI, D.S. **Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes irrigantes finais utilizando a contagem de unidades formadoras de colônias**. 2019. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (cirurgião-dentista). Curso de Odontologia. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

TORTORA, G.; J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre. Artmed, 2010.

VERMELHO, A.B. *et al.* **Práticas de Microbiologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.