

COLORAÇÃO COM AZUL-DE-METILENO

OBJECTIVO:

Com este método podemos obter uma estimativa da percentagem de células viáveis presentes numa amostra de leveduras.

PRINCIPIO DO MÉTODO:

As células vivas contêm enzimas capazes de reduzir o azul-de-metileno a compostos incolores. Quando as células estão imersas no azul-de-metileno, que penetra no seu interior, as enzimas das células vivas descolorem a matéria corante. As células mortas, nas quais a enzima está inactiva, não reagem corando de azul. A percentagem de células incolores dá-nos uma estimativa da viabilidade celular.

MATERIAL:

Microscópio, laminas e lamelas

REAGENTES :

- Azul-de-metileno
- Citrato de sódio, dihidratado
- Água destilada

Dissolver o azul-de-metileno (aprox. 1g) em água destilada (10ml). Adicionar o citrato de sódio (di-hidratado) (2g) e agitar até dissolução completa. Filtrar com a ajuda de um papel de filtro e adicionar o volume filtrado a 100 ml de água destilada.

PROCEDIMENTO :

Misturar a solução corante com um volume igual de suspensão da amostra de leveduras e colocar uma gota da mistura sobre uma lâmina de microscópio. A concentração de células deverá ser da ordem de 40 a 60 células por campo de microscópio, utilizando-se uma ampliação de (600x). Examinar aproximadamente 1000 células, ignorando as células filhas com um tamanho inferior à metade do tamanho da célula mãe.

EXPRESSÃO DO RESULTADO :

Considerar a viabilidade como a percentagem de células não coradas

ADVERTÊNCIAS:

Os métodos de coloração utilizados para a avaliação da viabilidade são menos fiáveis que outros métodos, tal como o método por contagem de superfície que considera a proporção de células que produziram células filhas. É importante lembrar que o método do azul-de-metileno é baseado na presença de enzimas específicas e que estas enzimas podem estar presentes em células que não se reproduzam ou podem não reagir com o azul-de-metileno em células viáveis.

A experiência tem demonstrado que a fiabilidade deste método decresce com a diminuição da viabilidade da amostra de leveduras. Deste modo, apesar deste método ter a vantagem de ser muito rápido, dá-nos mais uma indicação da viabilidade que do seu valor absoluto. Se os resultados suscitarem dúvidas deve utilizar-se a contagem por superfície.

Referências:

1. *EBC Yeast group, Journal of the Institute of Brewing, 1962,68,14*
2. *Rocken, W., and Strauss, M. Monatschrift fur Brauerei, 1976,5,209*