

# **BMM 0122 - Microbiologia Básica**

## **Engenharia Ambiental - 2019**

### **Prática 5: Ciclos biogeoquímicos**

#### **1. Introdução:**

As bactérias, assim como outros micro-organismos apresentam importante atividade no ambiente aquático (mar, rio, nascentes, etc.), no solo ou em superfícies (paredes, monumentos, piso e etc.), sobrevivendo na forma livre ou de biofilmes, apresentando uma posição chave na cadeia alimentar, reciclando os elementos do meio através de sua participação nos ciclos bioquímicos. Para isso, devem apresentar a capacidade de produzir e secretar enzimas que atuam na degradação de matéria orgânica complexa ou na fixação de nitrogênio ou ainda alterando as condições do meio para a biodisponibilização de elementos para os outros seres vivos.

#### **2. Procedimentos:**

Cada grupo deverá utilizar 2 bactérias isoladas nas etapas preliminares do curso.

##### **2.1. Solubilização de fosfato inorgânico**

Inocular a bactéria com cuidado, em um único ponto, sobre meio para solubilização de fosfato (Verma *et al.*, 2001) e incubar a cultura a 28°C por até 72 horas.

Após crescimento bacteriano, a presença de um halo em torno das colônias indicou a capacidade de solubilizar fosfato.

##### **2.2. Produção de endoglicanase**

Inocular a bactéria com cuidado, em um único ponto, sobre meio TSA 5% contendo 1% de Carboximetilcelulose (CMC) e incubar a cultura a 28°C por até 72 horas.

Após o crescimento bacteriano, serão adicionados 5 mL do corante vermelho congo (1%) e posteriormente lavado com 5 mL de NaCl (5M). A presença de um

halo incolor em torno da colônia indica a secreção de endoglicanases, a qual quebra o CMC, impedindo a sua coloração pelo vermelho congo.

### 2.3. Produção de amilase

Inocular a bactéria com cuidado, em um único ponto, sobre meio TSA 5% contendo 1% de amido e incubar a cultura a 28°C por até 72 horas.

Após o crescimento bacteriano, serão adicionados 5 mL de solução de iodo (1%). A presença de um halo incolor em torno da colônia indica a secreção de amilases, a qual degradou o amido.

### 2.4. Fixação de nitrogênio

Inocular a bactéria com cuidado, em um único ponto com alça de ponta reta, em tubos de ensaio de 20 x 70 mm, contendo 10 mL de meio NFB semi-sólido. Para isso, a alça deverá ser introduzida no meio de cultura da superfície até o fundo do tubo e incubar a 28°C por até 72 horas no escuro.

A formação de um disco (halo) de crescimento próximo a superfície dos tubos indica a capacidade de fixar nitrogênio, visto que este meio de cultura não apresenta fonte de N<sub>2</sub> disponível para a bactéria.

## Prática 6: Controle biológico

### 1. Procedimentos:

Cada grupo deverá utilizar 2 bactérias e 1 fungo isolados nas etapas preliminares do curso.

#### 1.1. Produção de compostos antimicrobianos por bactérias

Inocular as bactérias com cuidado, em um único ponto (distantes uma da outra), sobre meio TSA 5% e incubar a cultura a 28°C por até 7 dias. Após crescimento, as culturas serão inativadas com Luz UV ou vapor de clorofórmio por 1 hora e, em seguida mantidas em fluxo laminar (ambiente esterilizado) para eliminação do clorofórmio.

Sobre as culturas inativadas será colocada uma cultura **Tester** (*S. aureus*). Para isso, a cultura **Tester** será homogeneizada em meio TSA 5% semi-sólido

(contendo apenas metade da quantidade de ágar) e 5mL desta suspensão será colocada sobre a cultura inativada. Deixar solidificar e incubar a 37°C por até 48 horas. A presença de um halo no entorno da cultura inativada demonstra que foi produzido um antibiótico contra a bactéria **tester**.

## **1.2. Produção de compostos antimicrobianos por fungos**

Inocular o fungo selecionado em meio de cultura BD (líquido) e incubar a cultura a 28°C por até 6 dias. Para avaliação, a bactéria **tester** será inoculada (100 µL) sobre meio TSA, com auxílio de uma alça de Drigalsky ou Swab. Após esta etapa, um disco de papel será colocado sobre esta cultura e até 100 µL (adicionado de 10 em 10 µL até saturar) do meio de cultura onde o fungo cresceu deverá ser adicionado sobre este papel filtro. Após esta etapa, a cultura será incubada a 37°C por 24 horas. A presença de um halo no entorno do disco de papel demonstra que foi produzido um antibiótico contra a bactéria **tester**.