



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Escola de Engenharia de Lorena - EEL**

---

**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050**

**AÇÃO DOS PRODUTOS QUÍMICOS NO CONTROLE DO CRESCIMENTO BACTERIANO**

**1- INTRODUÇÃO**

Diversos agentes químicos, com propriedade bactericida ou bacteriostático, podem ser utilizados no controle do crescimento bacteriano. Antibióticos são agentes químicos sintetizados por organismos vivos que podem apresentar toxicidade seletiva. A estreptomicina é um antibiótico aminoglicosídico produzido por *Streptomyces griseus*. Inibe a síntese proteica, sendo clinicamente útil contra bactérias Gram-negativas.

Outros agentes químicos também podem ser eficientes no controle do crescimento microbiano (ex. etanol, iodo, nitrato de prata, fenol, hipoclorito de sódio, peróxido, etc). A ação dos agentes pode ser influenciada por fatores como a taxa de difusão, o tamanho do inoculo de células, a velocidade de crescimento da bactéria e a sua susceptibilidade. Sendo, portanto, essencial determinar o potencial de atividade dos agentes químicos nos diferentes grupos de bactérias.

A atividade antimicrobiana pode ser determinada em função da menor concentração do agente capaz de inibir o crescimento microbiano, denominada de Concentração Mínima Inibitória (CMI). Adicionalmente, pode ser utilizado o Método de Difusão em placa, no qual avalia-se a formação de zonas de inibição do crescimento bacteriano ao redor de discos embebidos com agentes químicos.

**2- OBJETIVOS**

Avaliar a eficiência no controle de crescimento de *Staphylococcus aureus* utilizando diferentes agentes químicos testados;

Determinar a CMI do antibiótico Clorofenicol no controle do crescimento de *S. aureus* em caldo nutriente.

### 3- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

#### Material

- Placa de Petri com o meio de cultura
- Agar nutriente Mueller-Hinton
- Tubos com caldo triptona-NaCl
- Peróxido (água oxigenada 10v)
- Antisséptico bucal
- Lisofórmio
- Hipoclorito de sódio a 1%
- Iodo 100 g/mL
- Tubos de ensaio com culturas de *E. coli* K12 e *E. coli* 100
- Antibiótico (estreptomicina)
- Paquímetro
- Alça de repicagem
- Discos de papel de filtro esterilizados
- Béquer
- Pinças

#### Equipamento

- Estufa com temperatura controlada (37 °C)

### 4- PROCEDIMENTO

#### 4.1 MÉTODO DE DIFUSÃO EM PLACA

Para realização do teste com células bacterianas crescidas em placas com meio Agar Triptona-NaCl, seguir o procedimento abaixo:

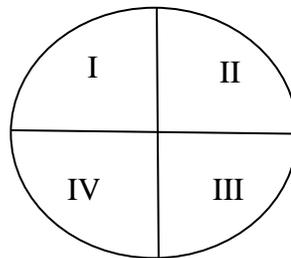
1. Seccionar a parte inferior das placas de Petri em 4 divisões e identifica-las:

I – Iodo

II – peróxido

III – antisséptico bucal

IV – hipoclorito de sódio



2. Em ambiente estéril, mergulhar um cotonete estéril (*swab*) nos tubos de ensaio com a cultura bacteriana.
3. Retirar o excesso de meio de cultura, apertando delicadamente o algodão do cotonete contra a parede interna do tubo de ensaio;

4. Esfregar o cotonete em toda a superfície do meio (*overlay*). Repetir esse procedimento três vezes, girando a placa em um ângulo de 60° entre cada repetição;
5. Deixar a cultura secar por 10 minutos à temperatura ambiente;
6. Colocar o disco de papel de filtro pressionar levemente aplicar 30 µL da solução com agente químico no centro do disco;
7. Incubar na estufa as placas por 24 horas a 37°C, na posição invertida;
8. Avaliar o crescimento nas placas, procurando identificar as áreas de inibição em torno dos discos de papel;
9. Medir com uma régua ou paquímetro o diâmetro (em milímetros) do halo de inibição.

**RESULTADOS:** Anotar os resultados na tabela a seguir:

Solução Desinfetante	Halo

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

- 1- Adicionar o antibiótico Clororfenicol (solução estoque na concentração de 30.7200 µg/mL) nos diferentes tubos de ensaio contendo 3mL de caldo nutriente. Cada tubo deverá conter a seguinte Concentração Final do antibiótico:

**Tubo 1** –  $C_f = 0 \mu\text{g/mL}$ ;

**Tubo 2** –  $C_f = 16\mu\text{g/mL}$ ;

**Tubo 3** –  $C_f = 32 \mu\text{g/mL}$ ;

**Tubo 4** –  $C_f = 64 \mu\text{g/mL}$ ;

**Tubo 5** –  $C_f = 128 \mu\text{g/mL}$ ;

**Tubo 6** –  $C_f = 512 \mu\text{g/mL}$

**Tubo 7** –  $C_f = 1024 \mu\text{g/mL}$ ;

Atenção! O volume de antibiótico adicionado não deve ser superior a 10% do volume de meio (3 mL) no tubo de ensaio. Se necessário, faça alíquotas de diluições da solução estoque de antibiótico antes de adicionar ao caldo nutriente.

- 2- Inóculo: adicionar 50µL da cultura de *S. aureus* nos tubos contendo as diferentes concentrações de Clorofenicol, incluindo o tubo controle sem antibiótico (Tubo 1).
- 3- Incubar os tubos na estufa por 18-24 horas a 37 °C, em modo estacionário.
- 4- Avaliar visualmente o crescimento nos tubos, identificando a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento.

## **5- ANEXO**

### **1. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA Agar Triptona-NaCl**

Triptona	10,0 g
NaCl	5,0 g/L
Agar	17,5 g/L

### **2. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA Caldo Triptona-NaCl**

Triptona	10,0 g
NaCl	5,0 g/L
pH= 7,3	