



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia: da Teoria a Prática - LOT 2053

**ROTEIRO 1: AÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS NO CONTROLE DO
CRESCIMENTO BACTERIANO**

1. INTRODUÇÃO

Diversos agentes químicos com propriedades bactericidas ou bacteriostáticas podem ser utilizados para controlar o crescimento de microrganismos. Entre esses agentes estão os antibióticos, substâncias produzidas naturalmente por fungos e bactérias, ou obtidas por síntese química, que apresentam toxicidade contra microrganismos. A atividade antimicrobiana de um agente pode ser avaliada por diferentes metodologias, entre as quais se destacam: Teste de difusão em disco e a Concentração Mínima Inibitória (CMI).

O Teste de difusão em disco consiste na aplicação de discos impregnados com agentes antimicrobianos sobre o meio de cultura semeado com a bactéria-teste, permitindo observar a formação de zonas de inibição ao redor dos discos. Já a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI): identifica a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento microbiano em meio líquido. Esses métodos fornecem informações importantes sobre a eficácia de agentes químicos no controle do crescimento bacteriano e contribuem para a seleção adequada de antimicrobianos em aplicações laboratoriais, clínicas e industriais.

2. OBJETIVOS

Avaliar a ação de diferentes agentes químicos no controle do crescimento microbiano por meio do teste de difusão em disco; Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) do antibiótico testado frente à bactéria-alvo.

4- PROCEDIMENTO

4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

- 1- Adicionar o antibiótico Clororfenicol (solução estoque na concentração de 240 µg/mL) nos diferentes tubos de ensaio contendo 2,5mL de caldo

nutriente (concentração dupla). Cada tubo deverá conter a seguinte Concentração Final do antibiótico:

Tubo 1 – $C_f = 0 \mu\text{g/mL}$;

Tubo 2 – $C_f = 10 \mu\text{g/mL}$;

Tubo 3 – $C_f = 30 \mu\text{g/mL}$;

Tubo 4 – $C_f = 60 \mu\text{g/mL}$;

Tubo 5 – $C_f = 90 \mu\text{g/mL}$;

Tubo 6 – $C_f = 120 \mu\text{g/mL}$

2- Se necessário, completar o volume de cada tubo com água estéril até atingir o volume final de 5 mL do caldo nutriente;

3- Inoculação: adicionar 50 μL da cultura bacteriana aos tubos contendo as diferentes concentrações de cloranfenicol, incluindo o tubo-controle negativo (Tubo 1), sem antibiótico;

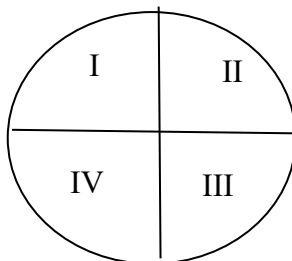
3- Incubar os tubos em estufa bacteriológica a 37 °C por 18–24 horas;

4- Avaliar visualmente o crescimento bacteriano nos tubos, identificando a menor concentração do antibiótico capaz de inibir totalmente o crescimento (ausência de turvação aparente);

4.2 MÉTODO DE DIFUSÃO DE DISCO EM PLACA

1- Na parte inferior das placas de Petri, delimitar quatro quadrantes iguais e identificá-los

- Solução I
- Solução II
- Solução III
- Solução IV



- 1- Em condições assépticas, mergulhar um cotonete estéril (*swab*) no tubo de ensaio contendo a cultura bacteriana;
- 2- Remover o excesso de inóculo pressionando suavemente o algodão do *swab* contra a parede interna do tubo;
- 3-Semear a superfície do meio de cultura esfregando o *swab* em toda a extensão da placa para garantir distribuição homogênea do inóculo;
- 4-Deixar a superfície da placa secar por cerca de 10 minutos à temperatura ambiente;
- 5- Com auxílio de uma pinça previamente flambada, transferir, de forma asséptica, os discos de papel para a superfície do ágar, evitando danificar o meio;
- 6- Aplicar 10 µL da substância no centro de cada disco de papel, utilizando uma micropipeta;
- 7-Incubar as placas em estufa a 37 °C, por 24 horas, na posição invertida (tampa voltada para baixo);
- 8-Avaliar o crescimento bacteriano, observando a presença de halos de inibição ao redor dos discos;
- 9-Medir o diâmetro dos halos de inibição utilizando régua;

RESULTADOS: Anotar os resultados na tabela a seguir:

Agente químico	Diâmetro dos halos (mm)	
	Microrganismo 1	Microrganismo 2