



## 2. Formação de biofilmes: protagonistas, contextos e aplicações

**Objetivos:** detetar a formação de biofilmes *in vitro*; reconhecer mecanismos de interferência na formação de biofilmes (antibióticos por exemplo); e perceber diferentes modos de atuação de antibióticos.

### 1ª aula de laboratório (16 de março)

#### **Materials**

- Isolado de *Bacillus subtilis* (Gram-positiva)
- Isolado de *Bacillus licheniformis* (Gram-positiva)
- Isolado de *Pseudomonas putida* (Gram-negativa)
- Isolado de *E. coli* (Gram-negativa)
- 100 mL soro fisiológico esterilizado
- Microtubos
- Micropipetas
- Zaragatoas
- Vórtex
- Escala de McFarland (ou espectrofotómetro)
- Microplacas de 96 poços
- Incubadora
- 250 mL de meio MB
- 250 mL de meio MB mais antibióticos
- Água estéril
- Solução de Cloranfenicol
- Solução de Canamicina
- Solução de Ampicilina

**NOTA:** Cada grupo irá trabalhar com uma estirpe Gram positiva e com uma Gram negativa (combinações a definir na aula). Cada grupo utilizará 1 microplaca por estirpe.

#### **Procedimento**

1. Adicionar 1 mL de soro fisiológico a um microtubo.
2. Com ajuda de uma zaragatoa, transferir células bacterianas de cada uma das culturas que lhe foram fornecidas (1 Gram+ e 1 Gram-) para o microtubo.
3. Homogeneizar no vórtex.
4. Comparar com a escala de McFarland, assegurar-se de que a densidade da cultura é da ordem de 1 na escala de McFarland.

5. Preparar uma placa de 96 poços com 180  $\mu\text{L}$  de meio NB + 20  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano (suspensão obtida no ponto anterior). Atenção, só iremos utilizar as 3 primeiras linhas (de A a C inclusive).
6. Incubar durante 96 horas, a 28 °C.
7. Repetir o mesmo procedimento para a outra estirpe bacteriana utilizando outra microplaca.

### No final das 96 horas de incubação (entre as 2 aulas)

1. Remover (poço a poço) a fração planctónica da cultura com o auxílio de uma micropipeta P200. Ter muito cuidado ao aspirar junto das paredes do poço de forma a não danificar o biofilme.
2. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de meio NB com os antibióticos a cada um dos poços.
3. Adicionar a cada um dos poços 10  $\mu\text{L}$  de água ou antibiótico:
  - o Colunas 1-3 (A1 a A3; B1 a B3, C1 a C3): 200  $\mu\text{L}$  de NB mais água (controlo)
  - o Colunas 4-6 (A4 a A6; B4 a B6; C4 a C6): 200  $\mu\text{L}$  de NB com Cloranfenicol (5 mg/mL)
  - o Colunas 7-9 (A7 a A9; B7 a B9; C7 a C9): 200  $\mu\text{L}$  de NB com Canamicina (5 mg/mL)
  - o Colunas 10-12 (A10 a A12; B10 a B12; C10 a C12): 200  $\mu\text{L}$  de NB com Ampicilina 10 mg/mL
4. Ler a absorvência a 600 nm.
5. Incubar durante 24 h, a 28 °C.

### 2ª aula no laboratório (23 de março)

#### ***Materiais***

- Placas da 1ª aula
- Espectrofotómetro
- Micropipetas

#### ***Procedimento***

1. Aspirar o meio dos poços A1 a C12, transferindo-o para as linhas D1 a F12 (i.e., a fração planctónica do poço A1 será transferida para o poço D1) e ler a absorvência a 600 nm.
2. Nos poços A1 a A12, adicionar 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético 33 % e resuspender com pipeta. Ler a absorvência a 600 nm.
3. Nos poços B1 a B12, adicionar 20  $\mu\text{L}$  de violeta de Cristal durante 3 min. Lavar gentilmente com 200  $\mu\text{L}$  de água três vezes. Aspirar, observar e fotografar o biofilme depositado no fundo do poço (detecção de biofilme rico em polissacáridos e peptidoglicanos). Ler a absorvência a 492 nm.
4. Nos poços C1 a C12, adicionar 20  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol, deixando atuar por 5 min. Lavar gentilmente com ácido acético a 0,5 % (200  $\mu\text{L}$ ) por 3 vezes. Aspirar, observar e fotografar o biofilme depositado no fundo da placa. Ler a absorvência a 600 nm.