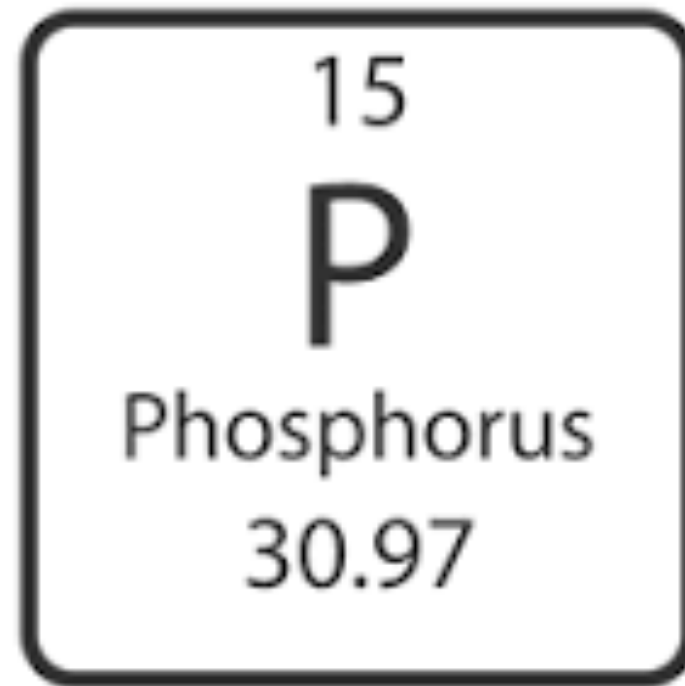
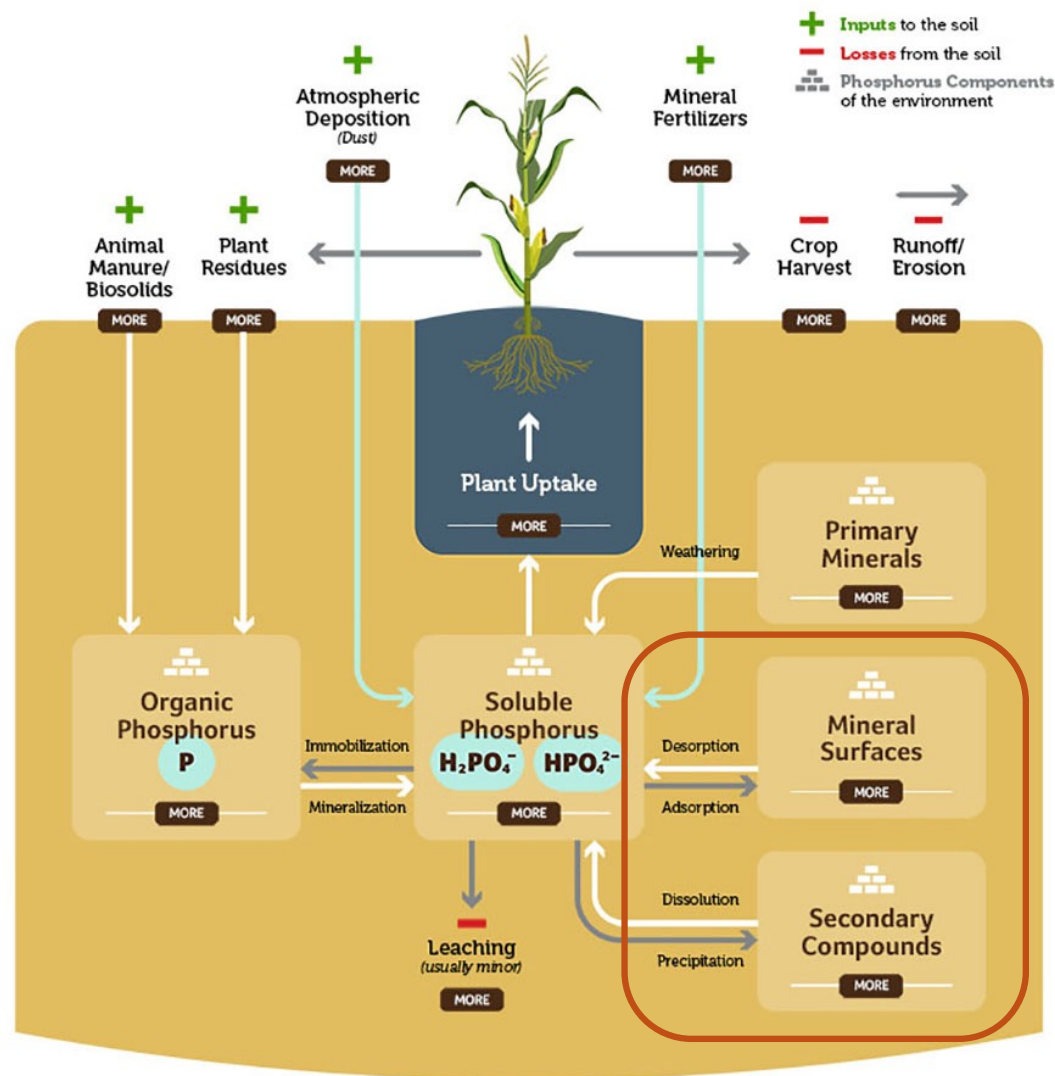


Tema 4

Solubilização de fosfato





Objetivos

- Quantificar a solubilização de fosfato em meio líquido;
- Medir o pH final do meio;
- Avaliar crescimento bacteriano por densidade ótica;
- Comparar culturas puras e co-culturas;
- Relacionar crescimento com eficiência de solubilização.

3.1. Inoculação (24 de março)

1. Suspende colônias bacterianas em solução salina estéril.
2. Homogeneizar em vórtex.
3. Ajustar turbidez para 0,5 McFarland.
4. Nos frascos erlenmeyer com 25 mL de NBRIP líquido, inocular 250 μ L de:
 - Sa
 - Sb
 - Sa + Sb (co-cultura, volumes iguais)
 - Solução salina

Incubar a 28 °C até **segunda feira**.

3.2. Quantificação e avaliação (30 de março)

pH final e solubilização de fosfato

1. Homogeneizar suavemente o Erlenmeyer.
2. Transferir **2 x 3 mL** para microtubo.
3. Centrifugar culturas ($10.000 \times g$, 10 min).
4. Recolher sobrenadante e filtra-lo com filtro Whatman 42.
5. Medir pH final do sobrenadante filtrado.
6. Colocar 200 μL da amostra ou curva padrão (sobrenadante filtrado) na microplaca (fazer em **triplicado**).
7. Adicionar 40 μL of reagente 1 ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
8. Incubar à temperatura ambiente durante 10 min num agitador orbital.
9. Adicionar 40 μL do reagente 2 (verde de malaquite)
10. Incubar à temperatura ambiente durante 20 min num agitador orbital.
11. Medir absorvância a 630 nm.

Utilizar curva padrão para calcular Pi solúvel ($\mu\text{g/mL}$).

3.2. Quantificação e avaliação (30 de março)

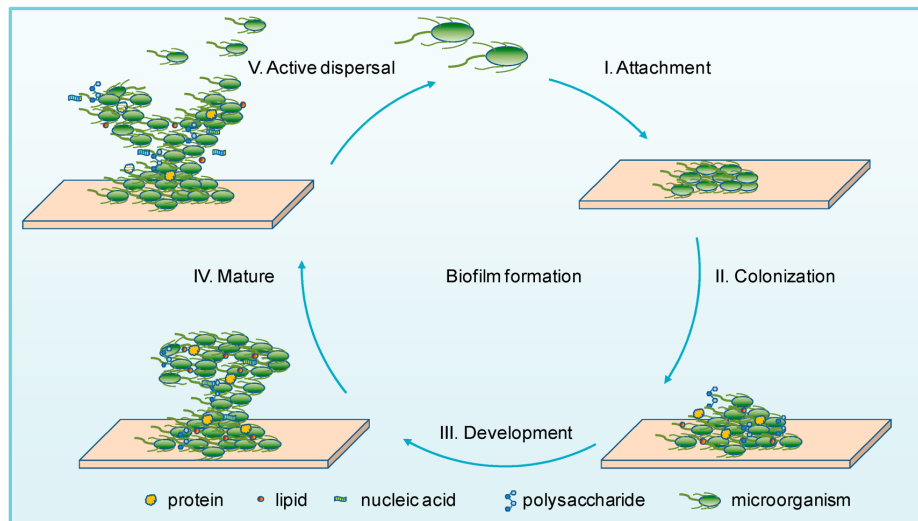
Medição da OD

A OD deve ser medida antes da centrifugação, mas após sedimentação breve do TCP.

1. Homogeneizar suavemente o Erlenmeyer.
2. Transferir 1 mL para microtubo.
3. Deixar sedimentar 2–3 min para reduzir partículas grandes de TCP.
4. Transferir cuidadosamente sobrenadante superior para cuvete ou microplaca (200 μ l, fazer triplicados).
5. Medir absorbância a 600 nm.

	OD ₆₀₀	pH final	Pi solúvel (μg/mL)	Pi/OD ₆₀₀
Sa				
Sb				
Sa+Sb				
Sem inoculação				

Tema 3 Biofilmes





Objetivos

- Avaliar quantitativamente a formação de biofilmes por estirpes isoladas de sapal.
 - Comparar formação de biofilmes em culturas individuais e em co-cultura.
 - Diferenciar biomassa total, fração planctónica e componentes da matriz.
 - Avaliar a eficiência relativa de formação de biofilme em co-culturas versus culturas puras.
-



3.1. Inoculação (24 de março)

1. Transferir 1 mL de solução salina estéril para microtubo.
 2. Suspende colónias bacterianas em solução salina.
 3. Homogeneizar em vórtex.
 4. Ajustar a turbidez para aproximadamente 0,5 McFarland.
 5. Adicionar 180 μ L de meio em cada poço da microplaca.
 6. Preparar as seguintes condições: **Sa** (em triplicado), **Sb** (em triplicado), em **Co-cultura** (Sa + Sb, volumes iguais de cada suspensão) e solução salina (**controle negativo**)
 7. Inocular 20 μ L em cada poço respetivo da microplaca.
 8. Incubar a 28 °C até sexta feira
-



3.2. Quantificação e avaliação (30 de março)

- **A. Quantificação da Fração Planctónica**

1. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para novos poços.
2. Medir absorbância a 600 nm.

- **B. Quantificação da Biomassa Total Solubilizada (ácido acético)**

1. Adicionar 200 μ L de ácido acético a 33 %, e ressuspender com pipeta.
 2. Medir absorbância a 600 nm.
-



3.2. Quantificação e avaliação (30 de março)

- **C. Quantificação de Biofilmes - polissacáridos/parede (violeta de cristal)**
 - Adicionar 200 μL de violeta de cristal e deixar atuar durante 10-15 min.
 - Lavar suavemente 3x com 200 μL água estéril.
 - Secar ao ar.
 - Adicionar 200 μL de ácido acético 33% para solubilizar o corante.
 - Medir absorbância a **570 nm**.
-

3.2. Quantificação e avaliação (30 de março)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa				C-	C-	
B	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb				C-	C-	
C	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb				C-	C-	
D	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	C-	C-	C-
E	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	C-	C-	C-
F	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	Sa+Sb	C-	C-	C-
G												
H												

1. Fracção planctónica (amarelo) + biomassa total solubilizada (verde) a 600 nm
2. Biofilme (azul) a 570 nm

	OD planctónica (600 nm)	OD biofilme (570 nm)	Índice normalizado (biofilme/planctónico)
Sa			
Sb			
Sa+Sb			
Controlo negativo			