

## **BTM**

### **Trabalhos práticos**

**TP0** Preparação de meios de cultura

**TP1** Fermentação em estado sólido - Produção de cogumelos

**TP2** Evolução da população bacteriana na fermentação da chucrute

**TP3** Controlo do crescimento microbiano.

3.1 Produção e doseamento de bacitracina.

3.2 Deteção de atividade antimicrobiana num ensaio de interacção *Bacillus* spp. / *Micrococcus luteus*

**TP4** Biotransformação de esteróides

**TP5** Análise bacteriológica de diferentes águas - Indicadores de contaminação fecal

**TP6** Controlo da esterilização – curvas de inativação e doses de esterilização (Docente: Sandra Cabo Verde)

**BTM 2024/2025**  
**Distribuição dos trabalhos ao longo do semestre**

PL1 (25/09 )	PL2 (2/10)	PL3 (9/10)	PL4 (16/10)	PL5 (23/10)	30 /10	PL6 (6/11)	PL7 (13/11)	PL8 (20/11)	PL9 (27/11)	PL10 (4/12)	(11/12)
TPO Preparação de meios de cultura	1.1	1.2	1.3		Teste prático 1	1.4					Teste prático 2
	2.1	2.2	2.3	2.4							
		3.1.1	3.1.2 3.2.1	3.1.3 3.2.2							
						4.1 Meios		4.2	4.3	4.4	
						5.1 Meios		5.2	5.3		
						6.1 Meios	6.2 (Sandra Cabo Verde) Controlo da esterilização – curvas de inativação e doses de esterilização				

## TP1 Fermentação em estado sólido- Produção de cogumelos

### Objetivo

Neste trabalho os alunos vão isolar e purificar culturas de micélios a partir dos corpos frutíferos de várias espécies de cogumelos, como por exemplo *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*. A cultura pura de *Pleurotus ostreatus* vai ser depois propagada em meio granulado (Spawn - trigo) e usada para cultivar este cogumelo em substratos vegetais (palha de trigo).

**1.1** Isolamento de micélio de fungos comestíveis a partir de cogumelos de cultura

**1.2** Purificação do micélio de *Pleurotus ostreatus* (PDA)

**1.3** Inoculação da cultura pura em grãos de cereal (Spawn)

**1.4** Inoculação dos grãos de cereal colonizados pelo micélio em palha de trigo

## TP3 Controlo de crescimento microbiano

- TP3 Controlo de crescimento microbiano

### 3.1 Produção e doseamento de bacitracina

3.2 Detecção de atividade antimicrobiana num ensaio de interação direta entre bactérias

## TP3.1 Doseamento de antibiótico produzido em mono e em co - cultura

### Organização do trabalho experimental

Cada grupo irá testar a produção de bacitracina, produzida por *Bacillus licheniformis*

Estirpe sensível (*Micrococcus luteus*)

#### **3.1.1 Produção de bacitracina em mono-cultura**

**Inoculação da estirpe produtora (*B.licheniformis*) em meio líquido MC (25 mL em frasco Erlenmeyer).**

**Incubação a 37°C durante 3 dias com agitação**

*Marcar o frasco Erlenmeyer de meio MC com: sigla do meio, nome da bactéria, data de inoculação turma/grupo*

1. Esterilizar uma ansa metálica à chama (levar ao rubro), arrefecer e retirar crescimento a partir da caixa de Petri que contém *B. licheniformis*
2. Junto da chama do bico de Bunsen abrir o frasco Erlenmeyer que contém 25 mL de meio MC e introduzir a ansa com o crescimento no frasco, esfregar a ansa na parede do balão para soltar o material e agitar o balão;
3. A boca do frasco deve ser flamejada antes e após a inoculação
4. Incubar a 37°C, com agitação (100 rpm), até 48h.

**Inoculação da estirpe sensível *Micrococcus luteus*: em meio NA**

1. Marcar o fundo da Caixa de NA com caneta de acetato, com sigla do meio, nome da bactéria, data de inoculação turma/grupo
2. Esterilizar uma ansa metálica à chama (levar ao rubro), arrefecer e retirar crescimento a partir da caixa de Petri que contém *Micrococcus luteus*;
3. Introduzir a ansa na caixa de NA, previamente marcada e inocular *M. luteus* em estria;
4. Incubar a 37°C.

## TP 2 - Evolução da População Bacteriana na Fermentação da Couve em Chucrute

Em cada turma serão formados 4 grupos. Cada grupo preparará um frasco correspondente a diferentes tempos de incubação da couve, para estudo da evolução da população bacteriana. (T1, T2, T3, T4, T5 ou T7 dias). T0 será analisado por todos os grupos.

**Amostras descontínuas, retiradas ao longo do tempo, conservadas a 4°C até serem analisadas na aula seguinte:**

1. Determinação do pH (8 mL suco da couve em Falcon 50 mL capacidade)
2. Doseamento da acidez total (5 mL suco da couve +5 mL de água destilada). Titulante **NaOH 0,1 M**
3. Número de cfu/ml em meio **MRS pH 5.5** (diluições seriadas e decimais com inoculação em meio de cultura)
4. Número de cfu/ml em meio **GYA (glucose yeast agar)**

Dias de incubação da couve	MRS Diluições a inocular	GYA Diluições a inocular
T0	$10^0$ ; $10^{-1}$ ; $10^{-2}$	$10^{-1}$ ; $10^{-2}$ ; $10^{-3}$
T 1,2,5,6 dias	$10^{-1}$ ; $10^{-2}$ ; $10^{-3}$ ; $10^{-4}$ ; $10^{-5}$ ; $10^{-6}$	$10^{-1}$ ; $10^{-2}$ ; $10^{-3}$ ; $10^{-4}$ ; $10^{-5}$ ; $10^{-6}$

Diluições em microtubos:  
 $10^{-1}$  = **100 µl** (suco da chucrute) em **900 µl** de soro fisiológico

Volume do Inóculo **20 µl (MRS e GYA)**  
3 Caixas de meio (**MRS e GYA**) por cada diluição

## TP 2 - Evolução da População Bacteriana na Fermentação da Couve em Chucrute

### Caixas de meio GYA e MRS referentes a T0

Fazer a contagem das colónias para determinação de cfu/mL do suco da couve

1º selecionar a diluição onde vai fazer a contagem de colónias (30 a 300 colónias)

2º fazer a contagem como auxílio de um marcador de acetato (nas 2 caixas da diluição selecionada)

3º fazer a média do número de colónias contadas nas três caixas

4º Calcular cfu/mL

$$\text{cfu/mL} = \text{n}^\circ \text{de colónias} \times 1/D \times 1/l$$

D= diluição

l= volume de inóculo

As colónias de *Lactobacillus* em meio sólido são pequenas (2-5 mm), convexas, com margens inteiras, opacas e **sem pigmentos**

Meio MRS colónias de *Lactobacillus*

