

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 couve lombarda a 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) |
|------------------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| TP0 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 | | | | |

TP0

Preparação de meios de cultura

Perguntas de revisão sobre meios de cultura:

Defina meio de cultura?

Classifique os meios de cultura:

- 1) quanto à sua funcionalidade;
- 2) quanto à procedência dos constituintes;
- 3) quanto ao estado físico.

Perguntas de revisão sobre métodos de esterilização de materiais de laboratório:

Defina o que é esterilização de um material de laboratório?


Sugira o método de esterilização para:

- 1) meios de cultura;
- 2) material de vidro;
- 3) Uma solução termolábil

Identificação dos grupos de alunos:

PL12 12.1-12.2-12.3-12.4

Classificação de meios de cultura

| | | | |
|------------------------------|--|---|--|
| Estado físico (consistência) | Meios Sólidos Adicionar 2% de agar | Meios Líquidos (Caldos) Sem agar | Meios semi-Sólidos Adicionar 0,5% - 0,75% de agar |
| Utilização funcional | Meios Selectivos Meios suplementados com agentes de seleção Permitem apenas o crescimento de determinado microrganismo | Meios Diferenciais Meios que permitem diferenciar microrganismos pelas características morfológicas ou características metabólicas EXs.: meio B King; meio triptofano | Meios Anaeróbios Geradores Anaerobiose: Ácido ascórbico e carvão ativado <div data-bbox="1825 810 2072 837" data-label="Caption"> <p>Jarra de anaerobiose</p> </div>  |

Agentes solidificantes

Agar: polissacarídeo complexo extraído de algas marinhas (**dissolve** na água à **temperatura de 100°C** e **solidifica** abaixo dos **45°C**)

Gelatina: mistura de poli e oligopeptídeos derivados da hidrólise parcial do colágeno (proteína)

Sílica-gel: substância inorgânica inerte

Meios líquidos

Não permite formar colónias

Permite aumentar o número de microrganismos

Permite efetuar testes bioquímicos



Meios sólidos

Permite isolamento e purificação de microrganismos

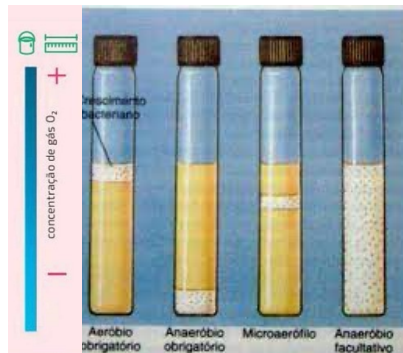
Permite caracterizar macroscopicamente colónias



Meios semi-sólidos

Permite efetuar testes bioquímicos

Permite o crescimento e estudo da relação dos microrganismos com o oxigénio (aeróbios, anaeróbios e microaerofílicos)



CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL

PROCEDÊNCIA DOS CONSTITUINTES

Naturais: sem composição química definida, geralmente extratos vegetais, extratos animais ou de outros microrganismos (Ex.: "Potato dextrose Agar"- PDA)

Sintéticos (ou Quimicamente definidos): composição química definida

Simples: permitem o crescimento bacteriano sem satisfazer exigência em especial Ex.: Caldo nutritivo (NB – "Nutrient Broth")

Complexos: substâncias como meio de infusão de cérebro e coração, soro bovino, fragmento de fígado

EX.: Meio Natural - PDA

| | |
|-------------------|---------|
| Glucose | 20 g |
| Extrato de batata | 4 g |
| Agar | 20 g |
| Água destilada | 1000 mL |

EX.:Meio Sintético ou Quimicamente definido

| Componente | Quantidade | Função |
|---|------------|--------------------------------|
| Glucose | 4 - 10 g | fonte de C e energia |
| K ₂ HPO ₄ | 7 g | tampão; fonte de K e P |
| KH ₂ PO ₄ | 2 g | tampão; fonte de K e P |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 g | fonte de N e S |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.1 g | fonte de S e Mg ²⁺ |
| CaCl ₂ | 0.02 g | fonte de Ca ²⁺ e Cl |
| Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo | 2 - 10 µg | micronutrientes |
| H ₂ O destilada | 1 000 ml | |
| pH 7.0 | | |

EX.: Meio Caldo Nutritivo - NB

| | |
|------------------|---------|
| Extrato de carne | 3 g |
| Peptona | 5 g |
| NaCl | 8 g |
| Água destilada | 1000 mL |

Preparação de meios de cultura

Frascos Graduados com tampa azul

- Frascos Schott;



Tubos Falcons:

- Capacidade 15 ou 50 ml



Tubos de ensaio

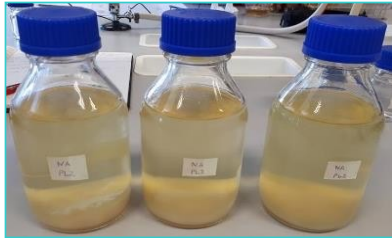


- Frascos Erlenmeyer



- Fita indicadora de esterilização

Preparação de meios de cultura



Calcular o peso de cada produto para o volume de meio a preparar

Pesar constituintes e Dissolver
(1 a 1 com agitação; aquecer se necessário)

↓
Medir e ajustar o pH (se necessário)

↙ ↘
Adicionar agar

↙ ↘
Distribuir em tubos ou frascos

↙ ↘
Autoclavar

↙ ↘
Cozer

↓
Autoclavar

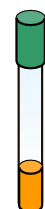
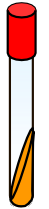
↓
Filtrar
0.45 ou 0.22micra

↓
Plaquear

↙ ↘
**Solidificar em
posição inclinada**

↙ ↘
**Solidificar em
posição vertical**

Meios líquidos



Meios sólidos e semi-sólidos

- **NA:** Caldo nutritivo (NB) com agar

- Extrato de carne 3 g
- Peptona 5 g
- NaCl 8 g

- Agar 20 g
- Água 1000 mL

- **Receitas dos meios em g por 1000 mL de água ou em %**

- Alguns meios são comercializados com a mistura de todos os constituintes (ler instruções no frasco – quantidade a p Litro de água)



Solvente mais utilizado para fazer meios de cultura é a **água** (destilada, desmineralizada e menos frequente da torneira)

Meios de Cultura

- **GYA:** glucose + extrato de levedura e agar
- **NB:** Caldo nutritivo;
- **NA:** Caldo nutritivo com agar;
- **MRS:** (Man, Rogosa, Sharpe)
- **Meio MRS pH 5,5 + Agar a 2,2%**
- **Meio Müller-Hinton semi-sólido (MHAss) (0,75% agar).**
- **Meio Müller-Hinton sólido (MHB + (2% agar)**
- **Meio MC**

Soitona 20g; peptona 10g; glucose 10g; cloreto de sódio 3.5g; sulfato de potássio 1g; sulfato de magnésio 0.01g; água destilada 1000ml. Ajustar pH a 7.0.

- **Soro a 0,85% (NaCl)**

Depois de preparados e antes da esterilização os frascos são frouxamente fechados e identificados.

Todos os meios e soluções são esterilizados em **autoclave (calor húmido) a 1 atm, a 121º C e durante 20 minutos.**



Estufa de esterilização (calor seco)



Calor seco – **180° C** durante 2 horas
Esterilização – ex.: material de vidro

Meios de Cultura a preparar (PL1) 2024

PL12 4ª-feira 14-16:30 h

1. Meio GYA 3000 mL
2. Meio MRS (pH=5.7) 3000 mL
3. Meio MC 200 mL (-)
4. Meio MHAss 500 mL 50 Falcon (cada um com 10 mL)*
5. Meio PDA 500 mL
6. Meio MHA 500 mL (+)
7. Meio NA 500 mL

* 500 mL **MHAss** (após cozer o agar distribuir 10 mL por cada um de 50 Falcons de 50 mL de capacidade)

(+) 500 mL **MHA**

MHB + 20 g Agar/1000 mL

(-) distribuir 25 mL por cada um de 8 frascos Erlenmeyer de 100 mL de capacidade)

Identificação dos grupos de alunos:

PL12 12.1-12.2-12.3-12.4

Identificação dos meios na fita de autoclave com caneta de acetato (entra as riscas existentes na fita):

Sigla do meio (ex: MRS)

Volume (ex: 500 mL)

Distribuição dos meios pelos 4 grupos de alunos:

G1 – GYA (3000 mL) e PDA (500 mL)

G2 – MRS (3000 mL) e MHA (500 mL)

G3 – MC (200 mL) e NA (500 mL)

G4 – MHAss (500 mL)

Meio Müeller-Hinton (MHA) MHB (caldo) + agar (20g/1000 mL)

2g Extrato de carne

17,5g Hidrolisado de caseína

1,5g Amido

20g Agar

1000mL Água destilada

Esterilizar em autoclave a 1 atm, a 121C⁰ e durante 15 min.

Meio GYA

20g Glucose

5g Extrato levedura

20g Agar

1000mL Água destilada

Ajustar pH a 7.0

Agar Nutritivo (NA) Caldo nutritivo (NB) + agar (20g /1000 mL)

3g Extrato de carne

5g Peptona

8g Cloreto Sódio

20 g Agar

1000mL Água destilada

Esterilizar em autoclave a 1 atm, a 121C⁰ e durante 20 min.

Meio MC

20g Soitona

10g Peptona

10g Glucose

3,5g Cloreto Sódio

1g Sulfato Potássio

0,01g Sulfato Magnésio

1000mL Água destilada

Ajustar pH a 7.0

Esterilizar em autoclave a 1 atm, a 121C⁰ e durante 20 min.

MRS

Seguir as instruções do produto + agar (**22g/1000 mL**)

MRS: (Man, Rogosa, Sharpe)

Meio MRS pH 5,5 + Agar a 2,2%

Preparar o meio em **6 frascos de 500 mL de capacidade**, cada um com 500 mL de meio **depois adicionar agar** de modo a prefazer **2,2%**

O frasco do MRS indica o agar que tem o produto (**1,6%**)

MHAss

Meio Müller-Hinton semi-sólido

Utilizar o meio **MHB (caldo)** e juntar o agar posteriormente (**0,75%**). A distribuição do meio por tubos Falcon de 50 mL de capacidade (10 ml por tubo) **implica a cozedura prévia do mesmo** (em micro-ondas ou em banho-Maria).

Soro Fisiologico

NaCl 0,85%

Como preparar a couve para a chucrute

[https://www.youtube.com/watch?v=RFI5d8cb- U](https://www.youtube.com/watch?v=RFI5d8cb-U)

Antes da segunda aula prática de BTM ao alunos devem ver o vídeo (“link”) da preparação da couve lombarda para fazer a chucrute