

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* (cogumelo ostra) e *Lentinula edodes* (Shiitake). A cultura pura de *Pleurotus ostreatus* vai ser depois propagada em meio granuloso (Spawn – centeio ou 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

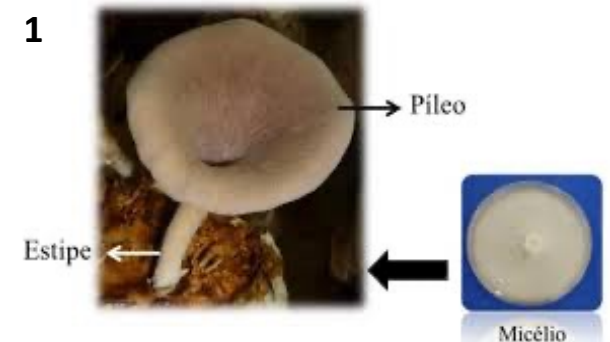
1.2 Purificação do micélio

1.3 Inoculação da cultura pura em grãos de trigo (Spawn)

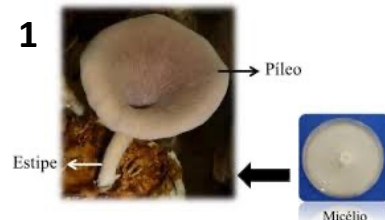
1.4 Inoculação dos grãos de trigo colonizados pelo micélio em palha de trigo

1.1 Procedimentos

1. Marcar uma placa com meio de cultura com a sigla do meio, o nome da espécie de cogumelo, data e identificação do grupo de trabalho (Ex: PDA + Cap *P. ostreatus* 27|09|2024 11.1)
2. Segurar o corpo frutífero e abrir ao meio, deixando visível a carne interna do chapéu (não tocar nesta zona com as mãos; estes procedimentos devem ser executados em condições de assepsia)
3. Com um bisturi previamente esterilizado em etanol e flamejado, cortar um pequeno pedaço da “carne” do cogumelo
4. Colocar o pedaço cortado no centro do meio de cultura, pressionando levemente
5. Incubar a 25° C, no escuro, durante uma semana



As diferentes etapas na produção de *Pleurotus ostreatus*



Grãos de trigo colonizados pelo micélio de *Pleurotus ostreatus* (semente)(BTM 2021)



Palha trigo inoculada com a semente de *P. ostreatus* - 48 h de incubação a 25^o C às escuras (BTM 2021)



Palha trigo ensacada e esterilizada pelo calor húmido da autoclave (BTM 2021)



Basidiocarpos de *P. ostreatus* com 8 dias de incubação na sala de frutificação (20^o C e alternância luz e escuridão) (BTM 2021)



Palha trigo inoculada com a semente de *P. ostreatus* - 3 dias de incubação a 25^o C às escuras (BTM 2021)

TP1 Fermentação em estado sólido - Produção de cogumelos

Castelo Paiva produção de Shiitake

<https://www.youtube.com/watch?v=yPOH3sRDgT4>

Produção de Shiitake Portugal

<https://www.youtube.com/watch?v=LEImSRnrDok>

Produção de Shiitake Brasil

https://www.youtube.com/watch?v=A4Ai9G2_ado

Embrapa - Produção *Pleurotus* Brasil

<https://www.youtube.com/watch?v=fQqt6z2se48>

TP2

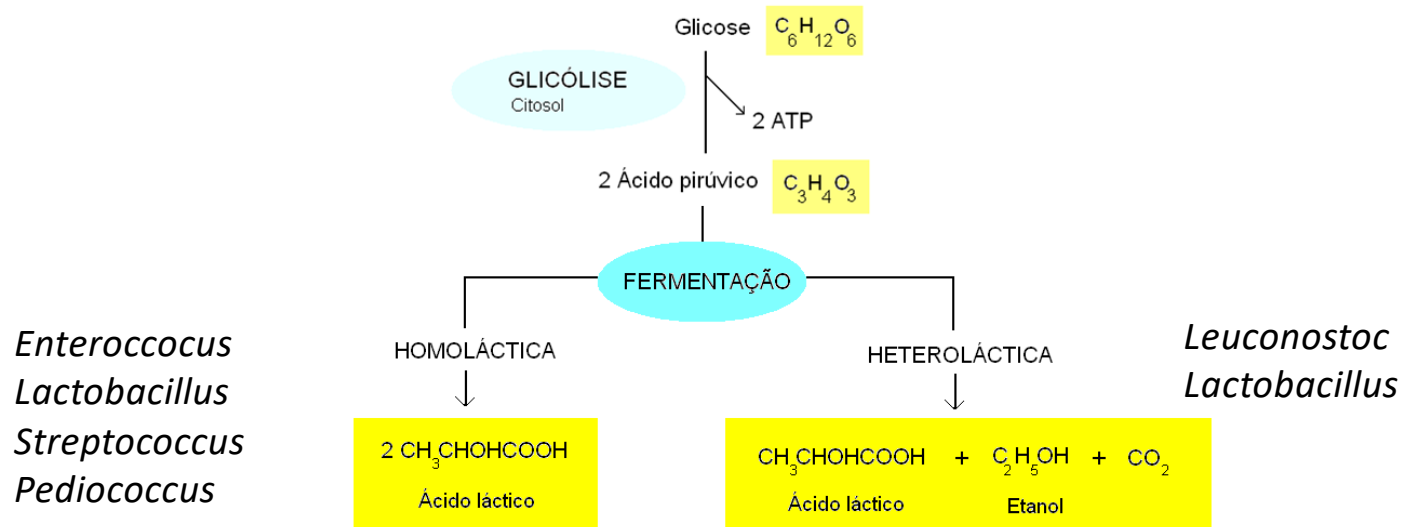
Evolução da população bacteriana na fermentação da chucrute

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

Fundamento teórico

O chucrute é um produto da fermentação da couve por bactérias lácticas naturalmente presentes nas folhas da couve. O processo ocorre em condições **anaeróbicas**, à temperatura ambiente (**20^o C**) e em presença de baixa quantidade de **sal**.

Do ponto de vista bioquímico trata-se de uma **fermentação heteroláctica** em que, além de **ácido láctico**, são produzidos **ácido acético**, etanol e **dióxido de carbono**.



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

Fundamento teórico

Bactérias Lácticas

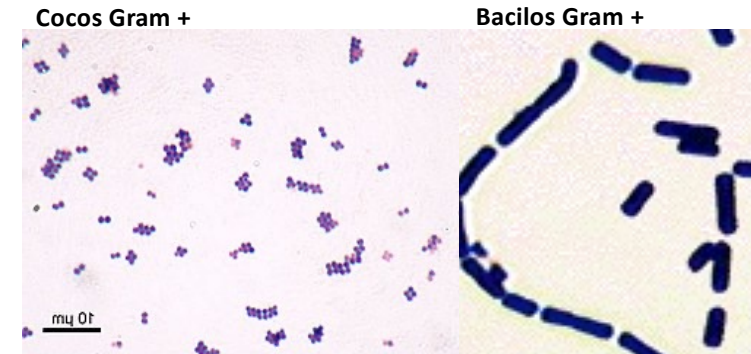
- Gram positivas
- Geralmente imóveis
- Não formadoras de esporos
- Forma de **cocos** ou **bacilos**
- Produzem **ácido láctico** como principal produto da **fermentação**
- São **fermentativas anaeróbias** mas **aerotolerantes** (anaeróbias facultativas)
- Geralmente **catalase-negativas**

As homoláticas incluem espécies dos géneros:

Lactococcus, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*.

As heteroláticas incluem:

Leuconostoc e alguns *Lactobacillus*



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

Fundamento teórico

Num processo bem sucedido as bactérias lácticas devem predominar

A qualidade do produto final depende, sobretudo, do controlo dos microrganismos indesejáveis durante o processo fermentativo.

Produtos finais desta fermentação

Ácido láctico e pequenas quantidades de ácido acético e propiónico, CO₂, pequenas quantidades de álcool e uma mistura de ésteres aromáticos.

Fatores seletivos

A acidez ajuda a controlar organismos contaminantes e contribui para um maior tempo de prateleira (validade).

A ausência de ar exclui todos os contaminantes aeróbios que poderiam oxidar os ácidos orgânicos.

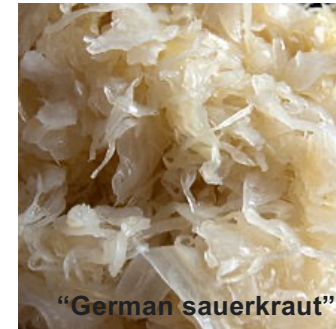
A temperatura óptima da fermentação da couve em chucrute é entre os **18 e 21°C**.

O sal ajuda à extrusão do suco da couve favorecendo o desenvolvimento das bactérias mais apropriadas à fermentação.

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

- Objectivo

O objectivo desta experiência é registar as **alterações da população microbiana**, do **pH** e da **produção de ácido láctico** durante a **fermentação espontânea** da couve lombarda a **chucrute**.



- Organização do trabalho experimental
- Estudar a evolução da população bacteriana no tempo zero (T0) a partir da determinação de:
 - pH
 - [ácido láctico], através do **doseamento da acidez total**
 - número de cfu/ml de bactérias lácticas em meio **MRS** pH 5,5
 - número de cfu/ml de bactérias totais em meio **GYA** (glucose yeast agar)

Como preparar a couve

<https://www.youtube.com/watch?v=RFI5d8cb-U>

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, T5, T6 - dias).

T0 será analisado por todos os grupos.

Protocolo experimental

2.1. Preparação da couve para a fermentação. Doseamentos da amostra inicial (T0).

1. Retirar as folhas danificadas e as exteriores da couve.
2. Descaroçar e cortar a couve em tiras de alguns milímetros de largura.
3. Pesar a couve cortada e misturar sal (NaCl) na quantidade de 3% desse peso (3 g de sal para 100 g de couve).
4. Pressionar a mistura da couve com o sal de forma a libertar o suco da couve (cerca de 15 minutos).
5. Acondicionar a mistura em frascos.
6. Distribui-se o suco pelos frascos juntamente com as folhas de couve; fazendo pressão para impedir condições de aerobiose, colocando as folhas velhas por cima para fazer uma camada protetora e fechar bem os frascos.
7. Incubar a 20° C.
8. Proceder à análise microbiológica e química.

PL12 (4ªfeira dia 2 | 10 | 2024)

Marcação dos frascos de chucrute (na fita adesiva com caneta de acetato):

- | | | |
|----------------------|--|--------------------------------|
| G1. T0 e T1 – 3 10 | tirar do 2.4.15 e colocar 4º C frigorifico | (Marta) 12.1 T1 dia 3 10 |
| G2. T0 e T2 – 4 10 | tirar do 2.4.15 e colocar 4º C frigorifico | (Marta) 12.2 T2 dia 4 10 |
| G3. T0 e T5 – 7 10 | tirar do 2.4.15 e colocar 4º C frigorifico | (Marta) 12.3 T5 dia 7 10 |
| G4. T0 e T6 – 8 10 | tirar do 2.4.15 e colocar 4º C frigorifico | (Marta) 12.4 T6 dia dia 8 10 |

2 frascos por grupo para cada tempo de incubação (dias)

PH T0

NaOH 0,1M (volume gasto na titulação)

12.1 –

12.2 –

12.3 –

12.4 –

Protocolo experimental

Análise Microbiológica

1. Pipetar para um microtubo **100 µl suco da couve** (10^0)

2. Num **tubo Falcon estéril de 15 mL** de capacidade pipeter **1 mL de suco couve + 9 mL de soro fisiológico estéril** (10^{-1}), a partir **desta diluição** realizar então as seguintes:

10^{-2} 100 µl da dil. 10^{-1} + 900 µl de soro fisiológico (em microtubo)

10^{-3} 100 µl da dil. 10^{-2} + 900 µl de soro fisiológico (em microtubo)

3. **Inocular em GYA:** 10^{-1} 10^{-2} e 10^{-3}

Inocular em MRS: 10^0 10^{-1} e 10^{-2} (**10^0 100 µl suco da couve em microtubo**)

Marcação das caixas de Petri antes da inoculação:
Sigla do meio, diluição, volume Inóculo, tempo de incubação do suco da couve e sigla do grupo
Ex: **GYA 10^{-1} 20 µl T0 12.1**

Inóculo 20 µl (**3 réplicas por diluição**), usar as pérolas de vidro para espalhar os inóculos

4. Análise Química

Retirar **8 mL de suco da couve** e **medir o pH com um elétrico** (em Falcon 50 mL de capacidade);

Após a medição de pH, adicionar a **5 mL do suco da couve, 5 mL de água destilada**, colocar os **10 mL em frasco Erlenmeyer de 100 mL de capacidade e ferver para eliminar o CO_2** (Micro-ondas).

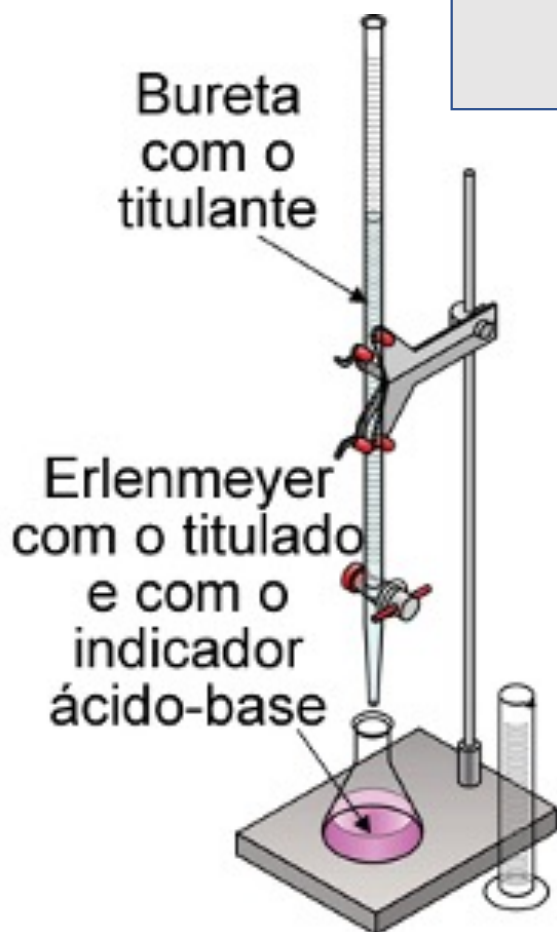
Arrefecer, adicionar **duas gotas de fenolftaleína** (indicador de pH) e titular utilizando **NaOH 0.1M** como titulante.

Titulação

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{(\text{vol em ml de NaOH}) \times \text{molaridade do NaOH} \times \text{massa molecular ácido láctico}}{10 \times (\text{vol em ml da amostra})}$$

Massa molecular do ácido láctico = 90

Molaridade do NaOH = 0,1M



Titulante NaOH 0,1M (encher Bureta)

Titulado ácido total no suco da couve (no frasco Erlenmeyer)

Indicador de pH (ácido-base) fenolftaleína (na presença de ácido – **incolor**, **rosa** no ponto de viragem, neutralização ácido-base)