

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

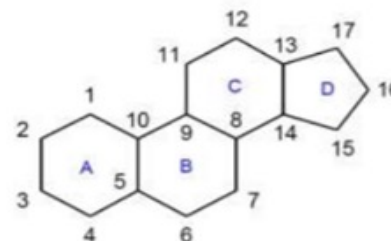
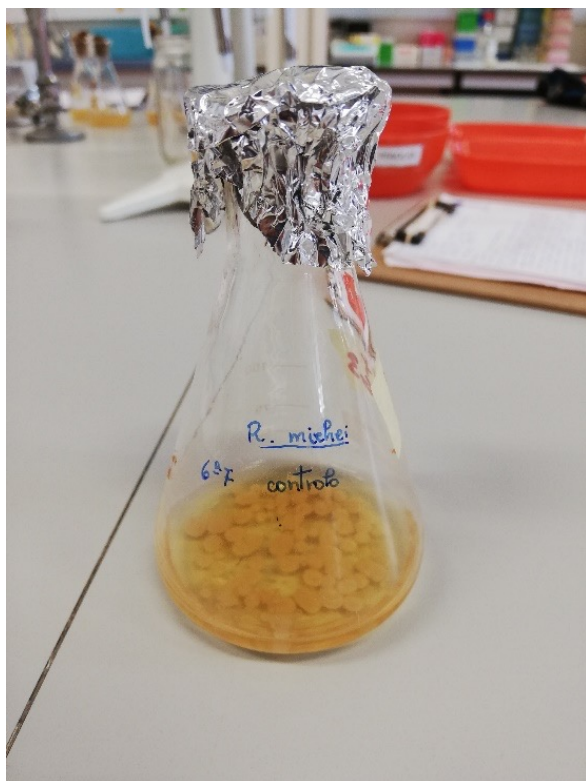
TP6 Controlo da esterilização – curvas de inativação e doses de esterilização (Docente: Sandra Cabo Verde)

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)
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				

TP4

Biotransformação de esteroides



Fonte: Soares, 2013

Núcleo esteroide

Os **esteroides** são lípidos simples derivados do **hidrocarboneto tetracíclico peridroiclopentanofenantreno**: três anéis A, B, C cada um com 6 átomos de C e um anel D com 5 átomos de C.

Hoje em dia a **manufatura de esteroides** inclui uma série de **passos microbianos** num processo que foi inicialmente **uma síntese química**.

A **matéria prima** de produção são os **fitoesteróis**: **Estigmasterol** e a **Diogenina**.

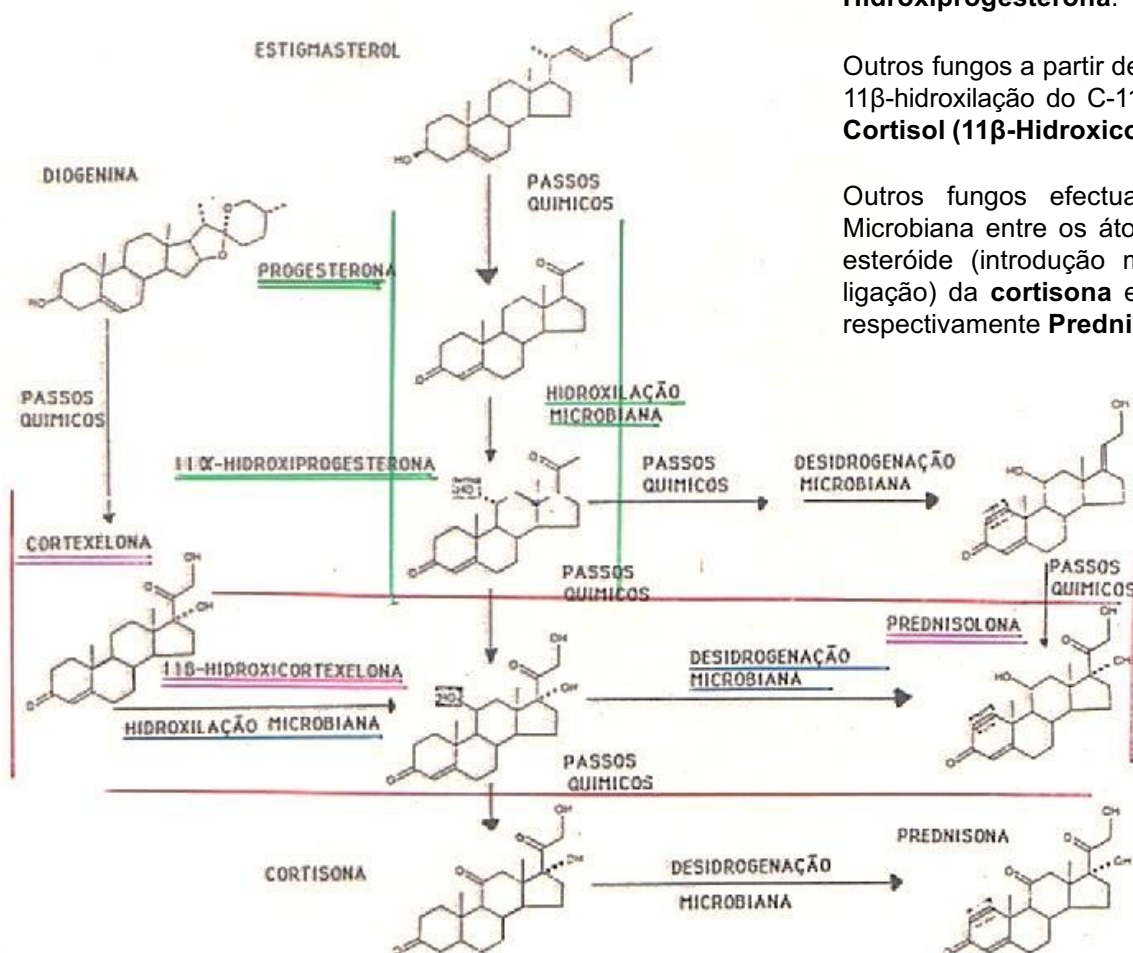
Todas estas transformações microbianas tiveram um efeito significativo no custo das hormonas esteroides e conseqüentemente na indústria químico-farmacêutica.

TP 4 - Biotransformação de esteróides
Fundamento teórico

Alguns fungos conseguem hidroxilar (introdução de OH) a **Progesterona** na posição 11 do núcleo esteróide (Hidroxilação Microbiana) em **11 α -Hidroxiprogesterona**.

Outros fungos a partir de **Cortexelona** efectuam a 11 β -hidroxilação do C-11 do núcleo esteróide em **Cortisol (11 β -Hidroxicortexelona)**.

Outros fungos efectuam uma Desidrogenação Microbiana entre os átomos C-1 e C-2 do núcleo esteróide (introdução microbiana de uma dupla ligação) da **cortisona** e do **cortisol** formando-se respectivamente **Prednisona** e **Prednisolona**.



TP 4 - Biotransformação de esteroides

Objectivo

Avaliar a **actividade transformante de esteroides, por fungos filamentosos**, tendo em conta a **identificação dos produtos extraídos** após transformação do substrato.

Organização do trabalho experimental

Cada grupo de alunos testa a capacidade de transformação de um esteroide por uma estirpe de um fungo filamentoso, além de preparar uma cultura sem o esteroide a testar, que funcionará como controlo.

MATERIAL BIOLÓGICO – Culturas em meio sólido de estirpes de *Cladosporium*

sp.; *Penicillium* sp. e *Alternaria* sp.

Meio de transformação (Meio T): Glucose 2%; Peptona 2%:
Fosfato de potássio 1%; Sulfato de magnésio 1%.

Acertar o pH 4,7.

Esterilizar à temperatura de 121°C durante 15 minutos.

MEIOS DE CULTURA – Meio de transformação (Meio T)

Substratos testados – cortexelona, progesterona.

Padrões – cortexelona, progesterona, 11β-hidroxycortexelona, 11α-hidroxiprogesterona, prednisolona.

Extracção dos produtos resultantes da transformação de esteroides, a partir do micélio e do meio de cultura – solvente: **Diclorometano**.

Separação e identificação dos produtos extraídos por **cromatografia de camada fina**

PL8

TP4 Biotransformação de esteróides

Adição dos substratos ao meio de transformação e posterior inoculação

- **Marcar cada um dos 3 frascos** Erlenmeyer com 25 mL do meio de transformação (T) com: **turma | grupo, nome do fungo e Controlo** ou **cortexelona** ou **progesterona**.
- Pesar 40 mg de cortexolona e 40 mg de progesterona para cada um de **dois copos esterilizados**. **Adicionar** a cada um **2,5 mL de metanol**. E dissolver (soluções de cortexelona e progesterona para a turma).
Pipetar 0,5 mL da solução em metanol de cortexelona / progesterona, para **dois dos frascos** preparados anteriormente.
- O terceiro frasco funcionará de controlo.
Preparar uma suspensão de esporos a partir do fungo fornecido em meio sólido: adicionar cerca de **15mL de meio T+0,1%Tween 80**.
Raspar o micélio com uma **ansa de plástico estéril** ou **com um espalhador**.
Filtrar por um funil de algodão hidrófobo esterilizado.
- Pipetar **3 mL da suspensão obtida** para cada um dos três frascos Erlenmeyers preparados anteriormente.
- Incubar as culturas numa estufa com agitação orbital a **28°C** durante **3 a 5 dias**.

TP5

Análise bacteriológica de águas

Água potável
henriquetabosa.blogspot.com



Água contaminada
portalesp.com.br



PL7

TP 5 - Análise bacteriológica de diferentes águas - Indicadores de contaminação fecal

A prática comum para que uma água não represente risco para a saúde é a pesquisa de microrganismos indicadores de contaminação fecal.

Objectivo

Analisar a qualidade microbiológica de amostras de águas de diferentes origens de acordo com os parâmetros legislados.

→ **Água superficial**

→ **Água subterrânea**

Água para consumo humano

Água balnear

Água de hemodiálise

Água de rega

Organização do trabalho experimental

Cada grupo pesquisa os parâmetros microbiológicos especificados na lei de acordo com o fim a que se destina a água em estudo.

Protocolo experimental

Método das membranas filtrantes (diâmetro poro 0,45 μm)

Meios selectivos e diferenciais



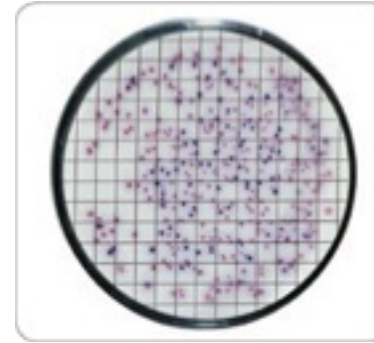
microclar.com



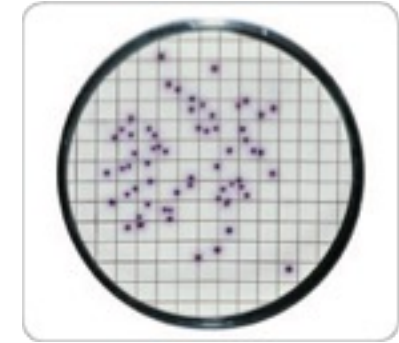
Indicadores de contaminação fecal

Contagens totais em meio NA

Contagens de coliformes totais - Não fecais e fecais (ex. *E. coli*)

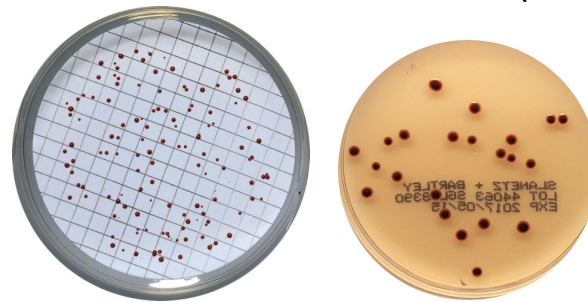


Deteção de Coliformes totais (meio CCA - **CHROMOCULT**)



Deteção de Coliformes fecais (*E. coli*) (meio CCA)

Deteção de *Enterococcus*



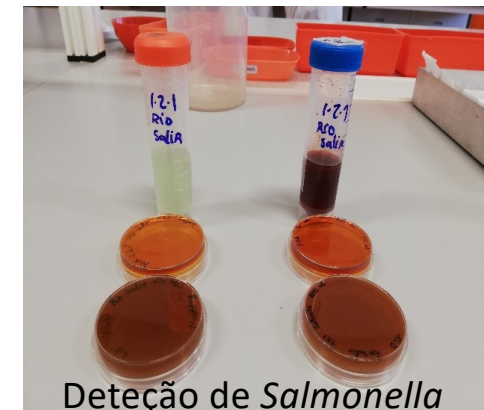
Deteção de *Enterococcus* (meio Slanetz & Bartley)

Pesquisa de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras (ex. *Clostridium perfringens*)

Pesquisa de *Salmonella* spp.

Deteção de *Pseudomonas aeruginosa*

Deteção de *Staphylococcus* sp.



Deteção de *Salmonella*

Água Superficial (exs. rios, nascentes)

<u>Indicadores microbiológicos da qualidade da água</u>	<u> Volumes de água a filtrar </u>	<u> Meios a inocular </u>
Coliformes totais (CT) – Não fecais e fecais (ex. <i>E. coli</i>)	0,01 mL, 0,1 mL, 1 mL,	CCA
Enterococcus	1 mL, 10m L	SBA
Salmonella	5000 mL	água peptonada 4%

Água Subterrânea (exs. poços, furos)

<u>Indicadores microbiológicos da qualidade da água</u>	<u> Volumes de água a filtrar </u>	<u> Meios a inocular </u>
Coliformes totais (CT) – Não fecais e fecais (ex. <i>E. coli</i>)	0,1 mL, 1 mL, 10 mL	CCA
Enterococcus	1 mL, 10m L	SBA
Anaeróbios (sulfito-redutores) (<i>Clostridium perfringens</i>)	25 mL (pasteurizar 80°C 10 min.)	VFA (dupla concentração). Fundir o meio VFA em banho maria e misturar com os 25 mL da água já Pasteurizada

Volumes inferiores a 10 mL podem ficar retidos na membrana, para evitar, filtrar primeiro um volume de água destilada esterilizada (SDW)

Coliformes totais (CT) Não fecais e fecais/ termotolerantes (CF) (ex. *E. coli*) (Gram -)

Meio CCA (2 substratos cromogênicos) é um meio seletivo e diferencial

- Salmon-Gal (análogo da Lactose)
- X-Glucoronido

C não fecais – fermentam a lactose na presença de sais biliares a 35° C

Enzima β -D-Galactosidase hidrolisa Salmon-Gal do meio CCA

No meio CCA colônias de cor **salmão a vermelho**

C Fecais (*E. coli*) Gram -)– fermentam a lactose na presença de sais biliares a 45° C (**Termotolerantes**)

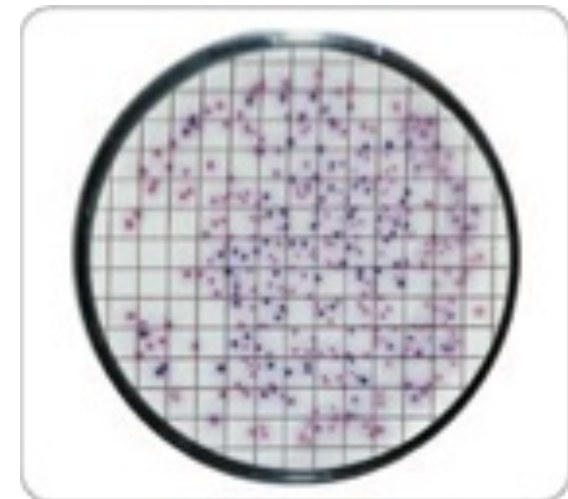
Enzima β -D-Galactosidase hidrolisa Salmon-Gal do meio CCA

Enzima β -D-Glucuronidase hidrolisa X-Glucoronido do meio CCA

No meio CCA colônias de cor **azul escuro a violeta**

Tergitol inibe crescimento Gram+ e algumas Gram- mas não inibe o crescimento das Coliformes

Meio CCA



Mode of Action

In the first instance, the interaction of selected peptones, pyruvate, sorbitol and a phosphate buffer guarantees rapid colony growth, even for the subletally injured coliforms. The growth of Gram-positive bacteria as well as some Gram-negative bacteria is largely inhibited by the content of Tergitol® 7 which has no negative effect on the growth of the coliform bacteria.

For the second stage, Merck has developed a new combination of two chromogenic substrates which allow for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli*.

Coliform identification

The characteristic enzyme for coliforms, β -D-galactosidase cleaves the Salmon-GAL substrate and causes a salmon to red colour of the coliform colonies.

E. coli identification

The substrate X-glucuronide is used for the identification of β -D-glucuronidase which is characteristic for *E. coli*.

E. coli cleaves both Salmon-GAL and X-glucuronide, so that positive colonies take on a dark-blue to violet colour. These are easily distinguished from the other coliform colonies which have a salmon to red colour.

CCA

As part of an additional confirmation of *E. coli*, the inclusion of tryptophane improves the indole reaction, thereby increasing detection reliability when it is used in combination with the Salmon-GAL and X-glucuronide reaction.

Typical Composition (g/litre)

Peptones 3.0; sodium chloride 5.0; sodium di-hydrogen phosphate 2.2; di-sodium hydrogen phosphate 2.7; sodium pyruvate 1.0; tryptophane 1.0; agar-agar 10.0; Sorbitol 1.0; Tergitol® 7 0.15; chromogenic mixture 0.4.

Evaluation

***E. coli*:** dark-blue to violet colonies (Salmon-GAL and X-Glucuronide reaction).

Total coliforms: salmon to red colonies (Salmon-GAL reaction) and dark-blue to violet colonies (*E. coli*).

Other Gram-negatives: colourless colonies, except for some organisms which possess β -D-glucuronidase activity. These colonies appear light-blue to turquoise.

CCA

Quality control

Test strains	Colony colour	Salmon-GAL	X-Glucuronide	Indole
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	dark-blue to violet	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	salmon to red	+	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	salmon to red	+	-	+
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 11060	light-blue to turquoise	-	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	colourless	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	inhibited	-	-	-

Enterococcus (Gram+)

Meio Slanetz & Bartley agar

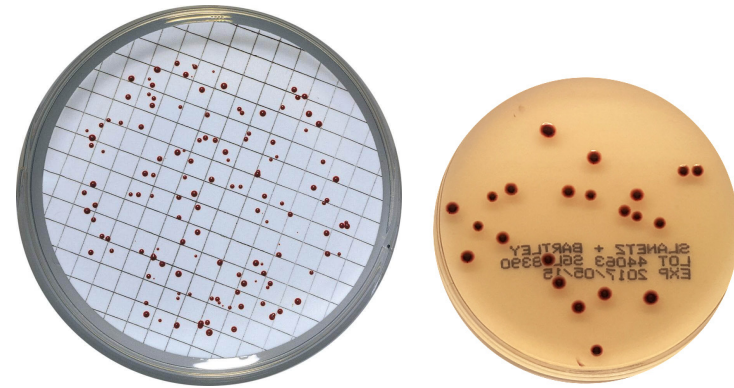
Meio seletivo

Azida de soda inibe as bactérias Gram –

Enterococcus reduzem os sais de tetrazolium (TTC) do meio a “formazan” de cor vermelha e as colónias ficam dessa cor

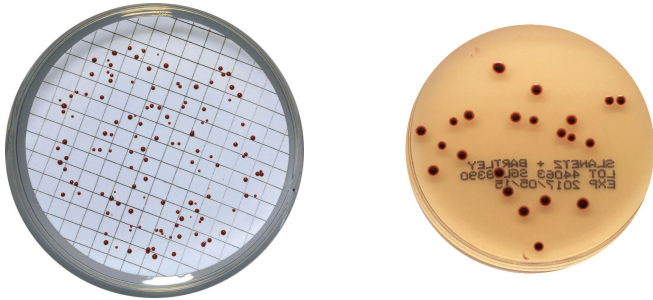
Meio de Kanamicina Esculina azida agar – meio para confirmar colónias de Enterococcus

**Enterococcus - hidrolisam a esculina em glucose e esculetina (enzima β -glucosidase)
A esculetina em presença do ferro presente no meio forma com ele um complexo de cor negra.**



Deteção de *Enterococcus* (meio Slanetz & Bartley
identificação presuntiva de *Enterococcus*)

Deteção e identificação presuntiva de *Enterococcus* em meio Slanetz & Bartley agar – incubação 48 h a 37°C



Meio Slanetz & Bartley - colônias vermelhas de *Enterococcus*

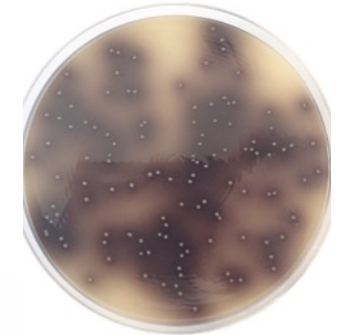
Mode of Action

The growth of the entire accompanying Gram-negative microbial flora is inhibited by sodium azide. Enterococci reduce TTC to give a red formazan, their colonies are thus red in colour. According to LACHICA and HARTMAN (1968), the selectivity for enterococci can be improved by adding carbonate and Tween 80®.

Typical Composition (g/litre)

Peptone from casein 15.0; peptone from soymeal 5.0; yeast extract 5.0; D(+)-glucose 2.0; di-potassium hydrogen phosphate 4.0; sodium azide 0.4; 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (not present in Cat. No. 1.05289.0500) 0.1; agar-agar 10.0.

**Meio “Kanamicina Azide Esculin” agar
Comfirmação da identificação de *Enterococcus* - incubação 24 h a 37°C**



Mode of Action

Kanamycin and azide largely inhibit the accompanying bacterial flora. D-streptococci are, however, only slightly sensitive to these substances; they can grow almost normally and hydrolyse the glucoside esculin to give glucose and esculetin. Esculetin forms an olive green to black complex with iron(III) ions.

Typical Composition (g/litre)

Peptone from casein 20.0; yeast extract 5.0; sodium chloride 5.0; sodium citrate 1.0; sodium azide 0.15; kanamycin sulfate 0.02; esculin 1.0; ammonium iron(III) citrate 0.5; agar-agar 15.0.

Test strains	Inoculum (cfu/ml)	Recovery rate	Colour change to olivegreen-black
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700	10 ³ -10 ⁵	> 70%	+
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043	10 ³ -10 ⁵	> 70%	+
<i>Enterococcus durans</i> ATCC 11507	10 ³ -10 ⁵	> 70%	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	10 ³ -10 ⁵	Not limited	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	> 10 ⁵	< 0.01%	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	> 10 ⁵	< 0.01%	-

Meat Liver Agar

Pesquisa de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras (ex. *Clostridium perfringens*)

Cat. No. 1.15045.0500
(500 g)

For the cultivation of anaerobic microorganisms.

Mode of Action

The nutrient basis of meat and liver tissue maintains an adequate degree of anaerobiosis in the culture medium and also provides a rich supply of nutrients. It thus ensures that even strict and fastidious anaerobes grow well. The sulfite present in the culture medium is reduced to H₂S by some anaerobes (e.g. many *Clostridium* species), this is indicated by blackening due to the presence of an iron salt.

Typical Composition (g/litre)

Meat-liver base 20.0; D(+)-glucose 0.75; starch 0.75; sodium sulfite 1.2; ammonium iron(III) citrate 0.5; agar-agar 11.0.

Preparation

Suspend 34 g in 1 litre of demin. water and autoclave (15 min at 121 °C).
pH: 7.6 ± 0.2 at 25 °C.

The plates are clear and yellow-brown.

Experimental Procedure and Evaluation

The culture medium can be dispensed into tubes or poured as plates. Inoculation can be performed by the pour plate method or by surface smearing. Inoculated plates must be incubated in an anaerobic environment established by e.g. Anaerocult® A, Anaerocult® A mini or Anaerocult® P.

Incubation temperature and period: as optimal as possible. H₂S-positive anaerobes grow as black colonies.

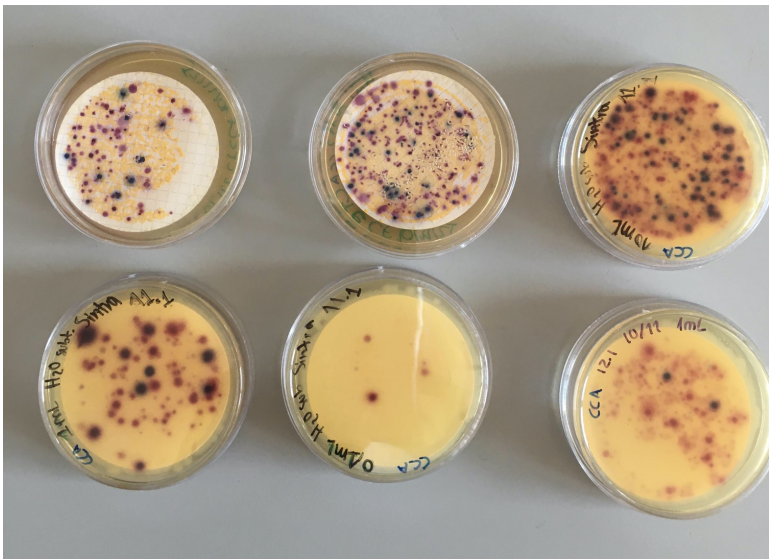
Additives

Merck Cat. No.	Product	Pack size
1.13829.0001	Anaerocult® A	1 x 10
1.01611.0001	Anaerocult® A mini	1 x 25
1.13807.0001	Anaerocult® P	1 x 25
1.16387.0001	Anaerobic jar	1 ea
1.07040.0001	Plate-basket	1 ea
1.15112.0001	Anaerotest®	1 x 50
1.14226.0001	Anaeroclip®	1 x 25



Colônias de *Clostridium perfringens* em meio "Meat Liver Agar"

CHROMOCULT - meio CCA



Colônias Azul escuro a violeta – coliformes fecais ex. *E. coli*

Colônias vermelhas a rosa – coliformes não fecais

Colônias Incolores – outras Gram (-)

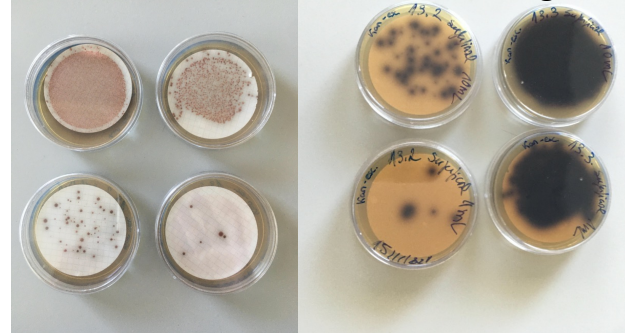
Colônias azul turquesa - poucas com atividade β -Glucuronidase

Meio Slanetz & Bartley agar

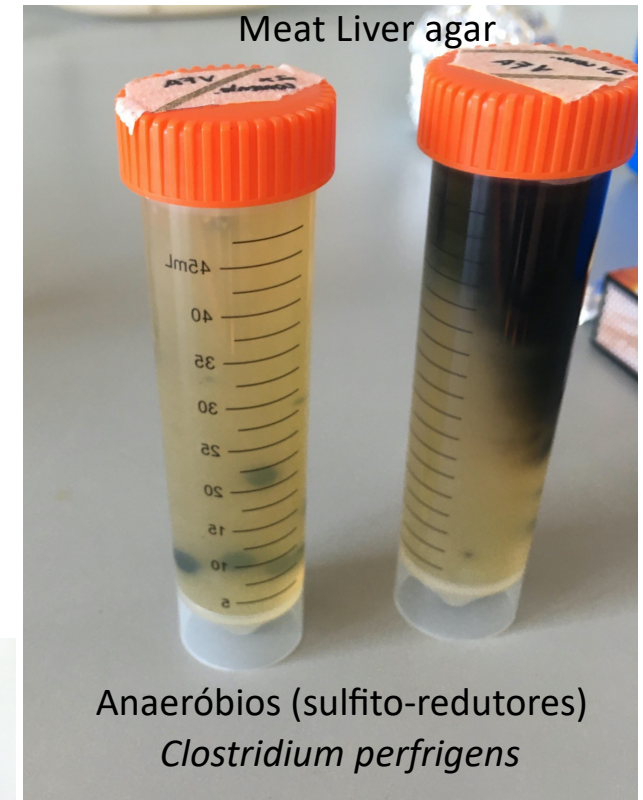


Enterococcus

Meio de canamicina esculina azida agar



Meat Liver agar



Anaeróbios (sulfito-redutores)
Clostridium perfringens