

## **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				

## PL6

**1.4.** Inoculação da palha com os grãos de centeio colonizados pelo micélio de *Pleurotus ostreatus*.

**4.1.** Inoculação dos fungos filamentosos (*Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp.), em meio PDA contido em Caixa de Petri (3 caixas de PDA / grupo), (Ensaio de Biotransformação de esteróides).

Preparação de meios de cultura para os trabalhos:

Análise das águas,

Biotransformação dos esteroides.

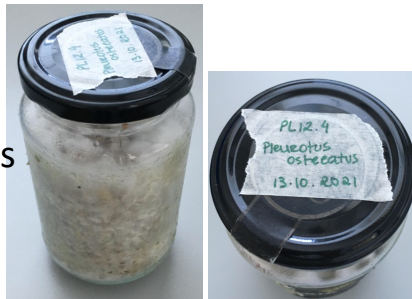
**Nota:** Pedir aos Alunos para trazerem águas (2 subterrâneas e 2 superficiais) para a aula (PL8 – 20|11|2024)

## TP1 Produção de cogumelos - *Pleurotus ostreatus* (cogumelo ostra)



Trigo colonizado pelo micélio de *P. ostreatus* (2 semanas de incubação 25°C)

Trigo colonizado pelo micélio de *P. ostreatus*, isolado pelos alunos a partir do cogumelo ostra (basidiocarpo)



Substrato de frutificação de *P. ostreatus* - Feno após 24 h de submersão em água e escorrido, para retirar excesso de água



Substrato de frutificação de *P. ostreatus* - Feno após esterilização em autoclave 30 minutos a 121°C

**PL6**

**PL12 (4ªfeira 15-16:30 h)**

**Meios de cultura a preparar:**

**Meio de transformação (T)**

**700mL acertar pH a 4.7**

400 mL meio T - distribuir 25 mL por cada um de **16 Frascos Erlenmeyer de 100 mL de capacidade**

300 mL meio T – adicionar Tween 80 a 0,1% - distribuir 25 mL por cada um de **12 Falcon de 50 ml de capacidade**

**Meio Slanetz &Bartley (S&B)** - para 12 caixas de 6 cm de diâmetro (cada uma leva 15 mL) **200 ml de S&B**  
**(Levar ao microondas até dissolver agar e estabilizar a temperature a 50 °C numa estufa e Plaquear)**

**Meio Kanamicina, Esculina Azida, agar** – para 12 caixas de 6 cm de diâmetro (cada uma leva 15 mL de meio) **200 ml de meio (esterilizar em autoclave)**

**Meio Viande Fois (VFA) ou Meat Liver Agar (MLA)** – 200 mL de meio VFA- distribuir 25 mL por cada um de **8 Falcon de 50 ml de capacidade. Fazer com o dobro da concentração**

**Preparar as colunas de sulfato de sódio com pipetas de Pasteur de vidro – 6 por grupo (24 por turma)**

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

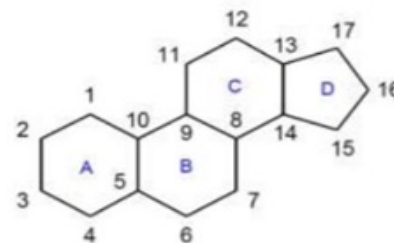
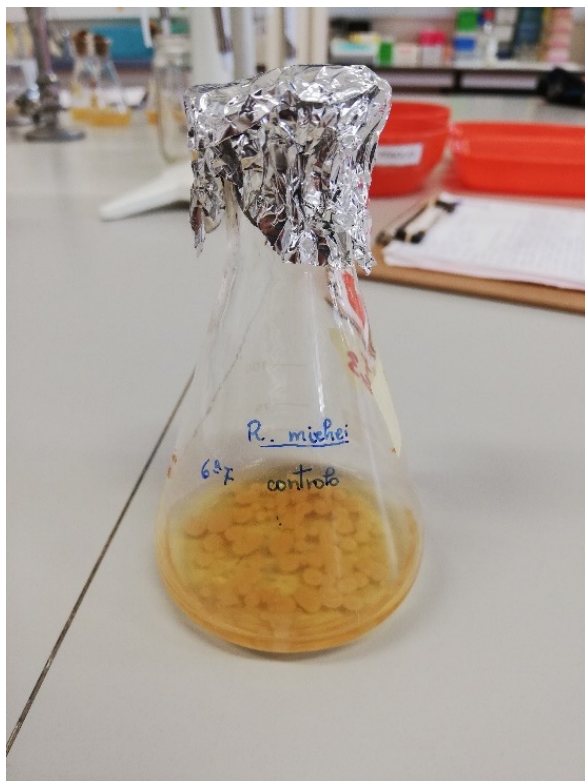
Acertar o pH 4,7.

Esterilizar à temperatura de 121°C durante 15 minutos.



## TP4

### Biotransformação de esteroides



Fonte: Soares, 2013

Núcleo esteroide

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

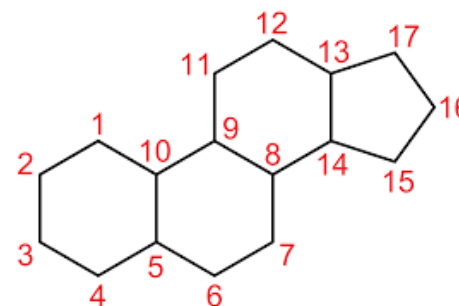
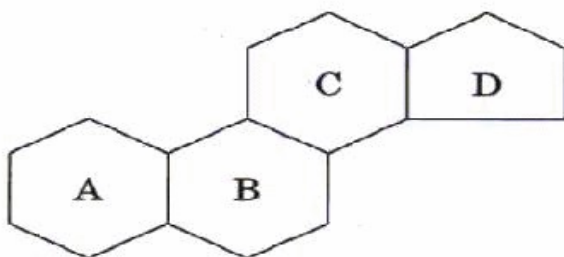
## TP 4 - Biotransformação de esteróides

A biotransformação de compostos orgânicos consiste na utilização de métodos biológicos para modificar compostos orgânicos.

**Os esteroides** são **lípidos simples** derivados do **hidrocarboneto tetracíclico**

**peridrociclopentanofenantreno**: três anéis A, B, C cada um com 6 átomos de C e um anel D com 5 átomos de C.

Núcleo peridrociclopentanofenantreno



**Os esteroides diferem entre si consoante:**

- 1 – número e posição das duplas ligações.
- 2 – configuração das ligações entre os grupos funcionais substituídos e o núcleo ( $\alpha$  ou  $\beta$ )
- 3 – configuração dos anéis em relação uns aos outros.



## **TP 4 - Biotransformação de esteroides Fundamento teórico**

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

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

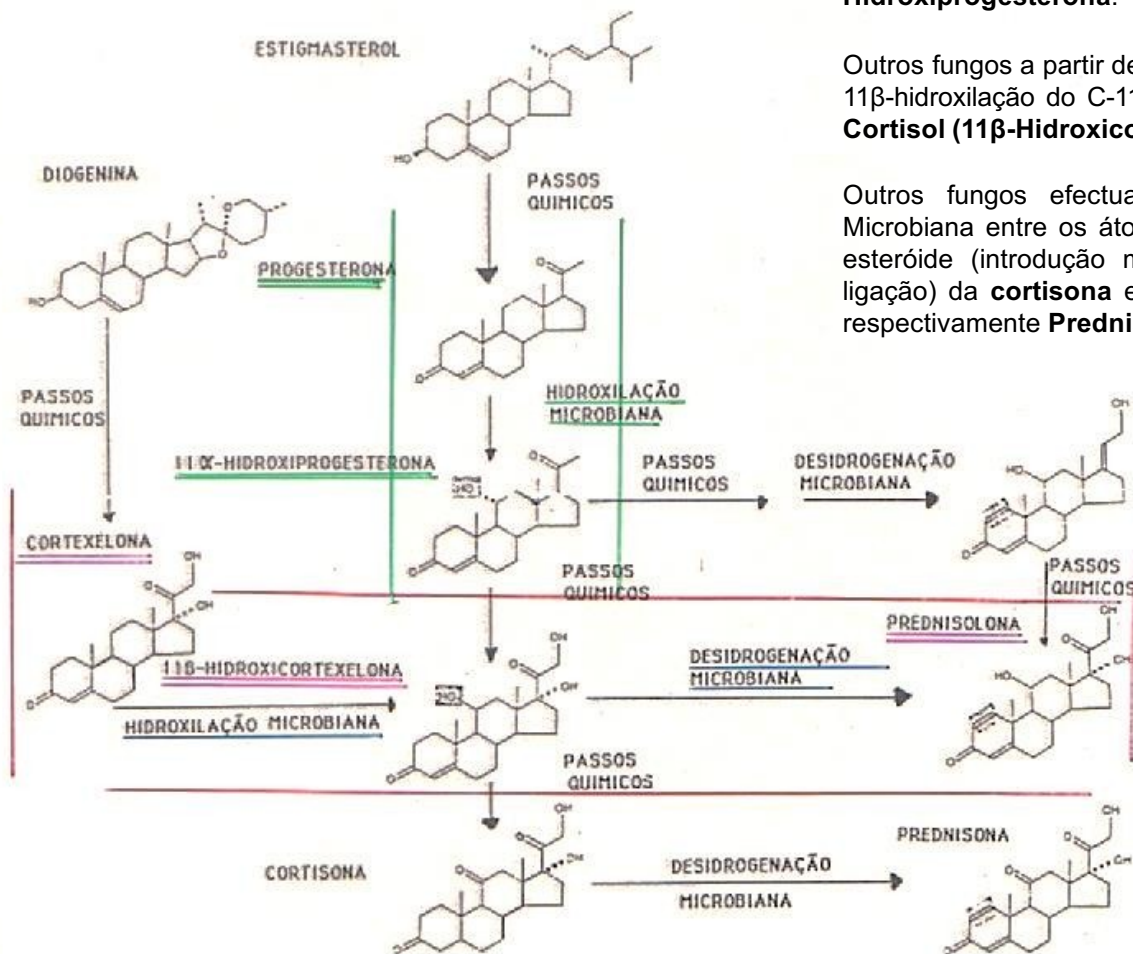
Todas estas transformações microbianas tiveram um efeito significativo no custo das hormonas esteroides e conseqüentemente na indústria químico-farmacêutica.

**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 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona**.

Outros fungos a partir de **Cortexelona** efectuam a 11 $\beta$ -hidroxilação do C-11 do núcleo esteróide em **Cortisol (11 $\beta$ -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.

**MEIOS DE CULTURA** – Meio de transformação (Meio T)

**Substratos testados** – cortexelona, progesterona.

**Padrões** – cortexelona, progesterona, 11 $\beta$ -hidroxicortexelona, 11 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, prednisolona.

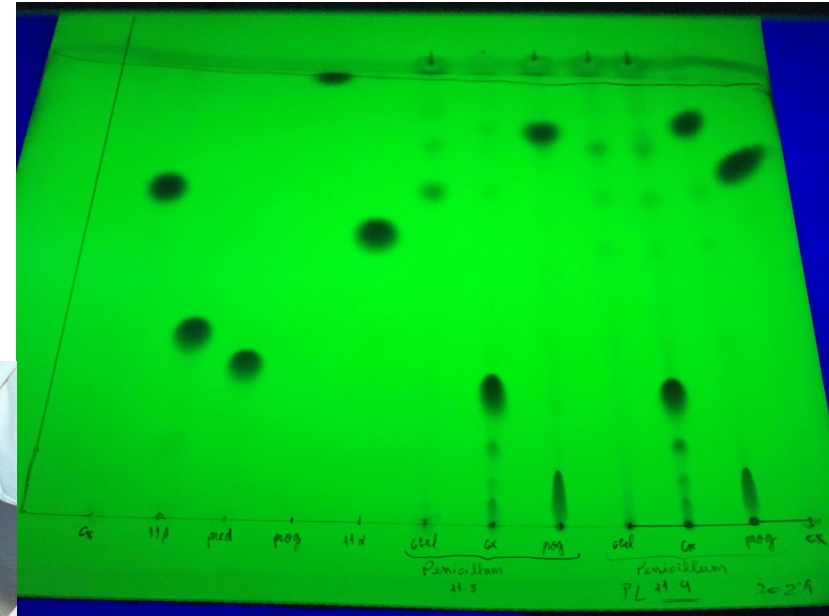
**Extracção dos produtos** resultantes da transformação de esteroides, a partir do micélio e do meio de cultura – solvente: **Diclorometano**.

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

## Identificação dos produtos resultantes da biotransformação de esteroides por cromatografia de camada fina



Cultura de fungos filamentosos em meio T com substrato esteroide (cortexelona ou progesterona)



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

Tendo em conta os produtos extraídos após transformação dos esteroides (cortexelona e progesterona) podemos classificar os fungos que vamos estudar em três grupos consoante a actividade transformante apresentada:

1 – **No primeiro grupo** incluímos os fungos que apresentam um só produto final: **Prednisolona**

Substrato	Enzima	Produto intermediário	Enzima	Produto final
Cortexelona	<b>11<math>\beta</math>-hidroxilase</b>	11 $\beta$ -Hidroxicortexelona	<b>Desidrogenase</b>	Prednisolona

2 – **No segundo grupo** incluímos os fungos que transformam a cortexelona em dois produtos finais: **11 $\beta$ -Hidroxicortexelona (cortisol)** e **Prednisolona**

Substrato	Enzima	Produto final	Enzima	Produto final
Cortexelona	<b>11<math>\beta</math>-hidroxilase</b>	11 $\beta$ -Hidroxicortexelona	<b>Desidrogenase</b>	Prednisolona

3 – **No terceiro grupo** incluímos os fungos que apresentam apenas a capacidade de hidroxilação 11  $\beta$ , resultando um único produto final :**11 $\beta$ -Hidroxicortexelona (cortisol)**

Substrato	Enzima	Produto final
Cortexelona	<b>11<math>\beta</math>-hidroxilase</b>	11 $\beta$ -Hidroxicortexelona

PL8

TP5

## Análise bacteriológica de águas

Água potável  
[henriquetabosa.blogspot.com](http://henriquetabosa.blogspot.com)



Água contaminada  
[portalesp.com.br](http://portalesp.com.br)



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

### **Fundamento teórico**

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 a analisar.

## Protocolo experimental

- Método das membranas filtrantes
- Meios selectivos e diferenciais



microclar.com





## Indicadores de contaminação fecal

Contagens totais em meio NA

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

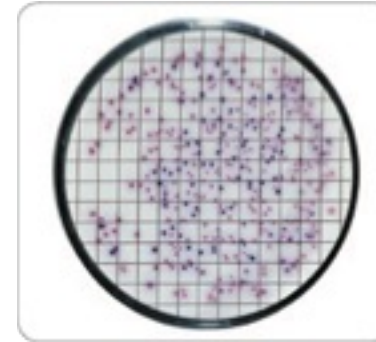
Detecção de *Enterococcus*

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

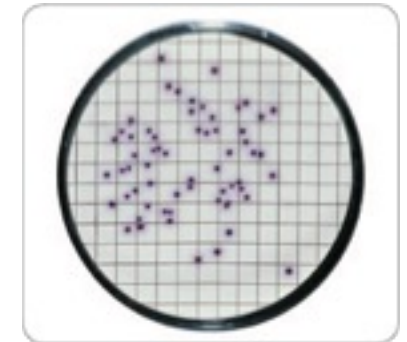
Pesquisa de *Salmonella* spp.

Detecção de *Pseudomonas aeruginosa*

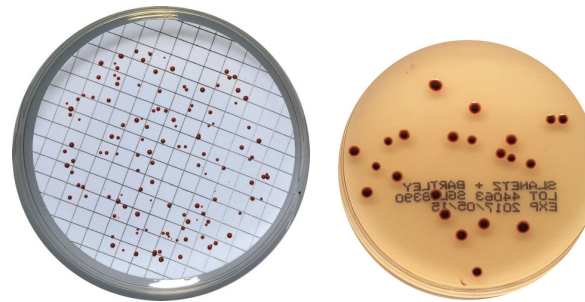
Detecção de *Staphylococcus* sp.



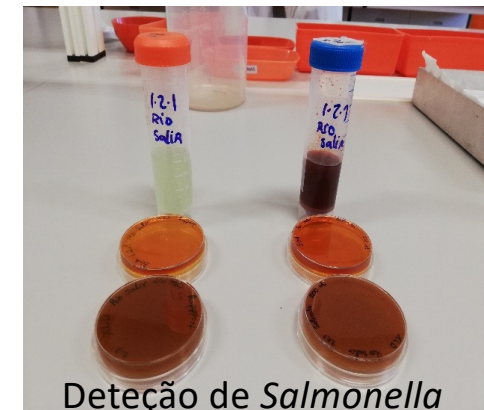
Detecção de Coliformes totais em meio CCA - **CHROMOCULT** - não fecais (colónias salmão) e fecais (colónias violeta)



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



Detecção de *Enterococcus* (meio Slanetz & Bartley)



Detecção 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

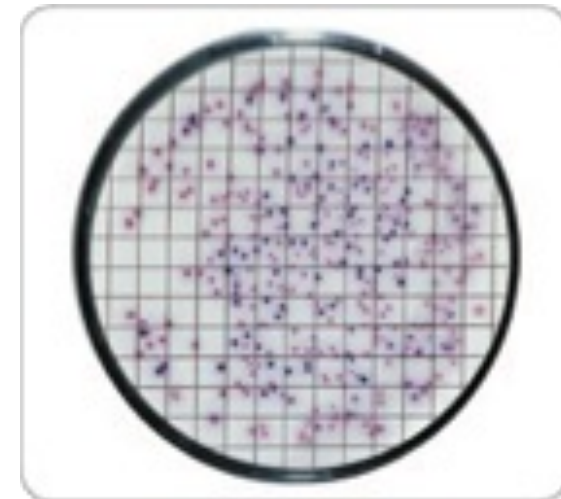
- Salmon-Gal (análogo da Lactose)
- X-Glucoronido

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

Enzima  $\beta$ -D-Galactosidase hidrolisa Salmon-Gal do meio CCA

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

Meio CCA



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

Enzima  $\beta$ -D-Galactosidase hidrolisa Salmon-Gal do meio CCA

Enzima  $\beta$ -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**

**Enterococcus (Gram+)**

**Meio Slanetz & Bartley agar**

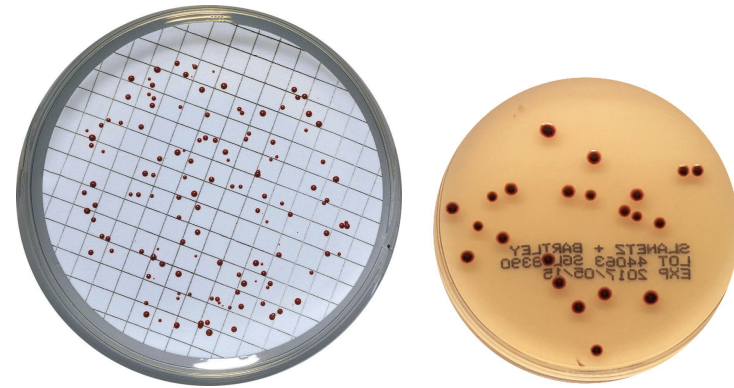
**Meio seletivo**

**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  $\beta$ -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*)

## Meat Liver Agar

Viande de Fois

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 H<sub>2</sub>S 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.

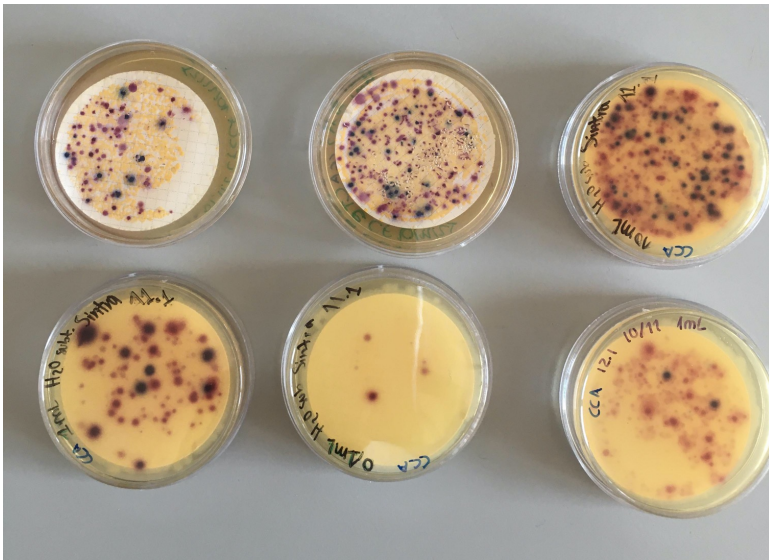
Incubation temperature and period: as optimal as possible. H<sub>2</sub>S-positive anaerobes grow as black colonies.

### 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

BTM resultados 2021

CHROMOCULT - meio CCA



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

Colônias vermelhas a rosa – coliformes não fecais

Colônias Incolores – outras Gram (-)

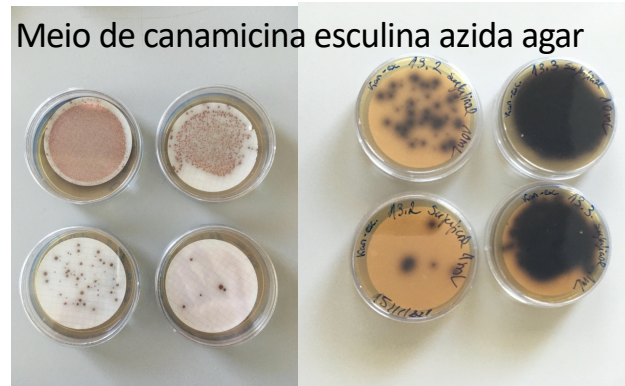
Colônias azul turquesa - poucas com atividade  $\beta$ -Glucuronidase

Meio Slanetz & Bartley agar

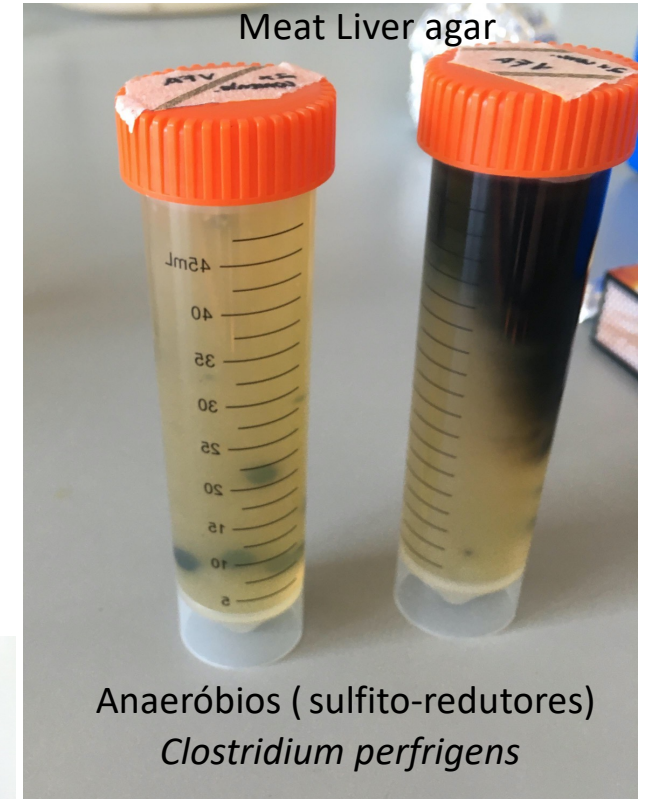


*Enterococcus*

Meio de canamicina esculina azida agar



Meat Liver agar



Anaeróbios ( sulfito-redutores)  
*Clostridium perfringens*

