

**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				

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

1. Verificar se os micélios dos cogumelos se encontram purificados (pela ausência de crescimento de colónias de outros microrganismos nas placas)
2. Com um bisturi, cortar três a quatro pedaços de agar em que cresceu o micélio purificado de *Pleurotus ostreatus* e transferir para um frasco contendo grãos de cereais esterilizados (estes procedimentos devem ser executados em condições de assepsia)
3. Agitar bem os frascos
4. Incubar a 25 °C, no escuro, durante duas semanas (deixar folga na tampa para permitir trocas gasosas)

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

Caixas de meio GYA e MRS referentes a T1, T2, T5 e T6 (dias de incubação da couve)

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 3 caixas da diluição selecionada)

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

4º Calcular cfu/mL

$$\text{cfu/mL} = \text{nºde colónias} \times 1/D \times 1/I$$

D= diluição

I= 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*



## 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 monocultura

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

Incubação a 37°C durante 2 e 5 dias com agitação

Inoculação da estirpe sensível em meio NA

#### 3.1.2 Ensaio de difusão em agar

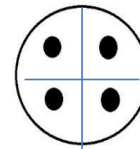
1. Inoculação por incorporação da estirpe sensível em meio MHass (segunda camada sobre meio MHA).
2. Aplicação de um disco de papel de filtro embebido no sobrenadante da cultura produtora (10 microlitros).

#### Curva padrão de bacitracina

3. Aplicar 3 discos embebidos com diferentes concentrações conhecidas de bacitracina comercial. Incubar a 37° C.

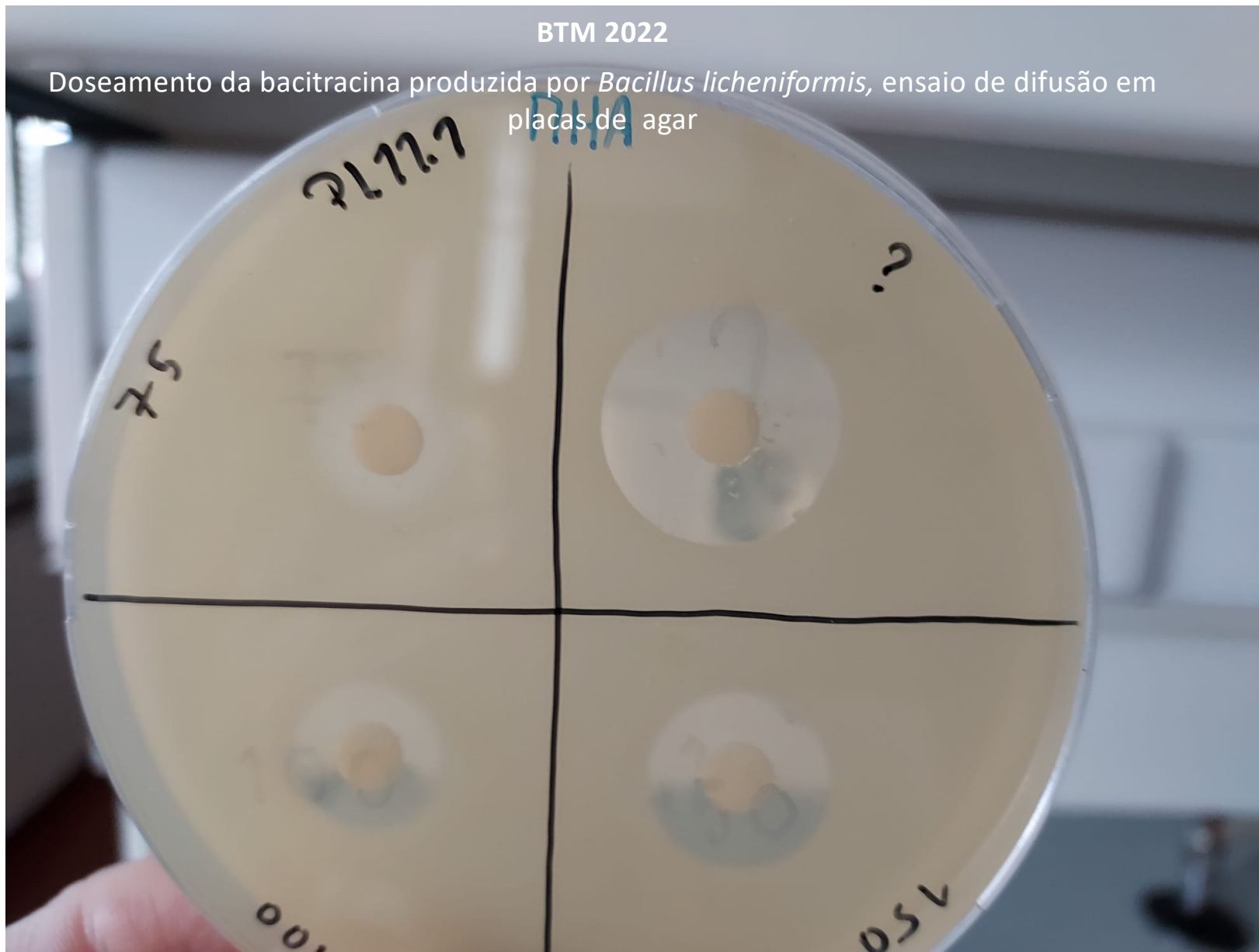
#### 3.1.3 Análise de resultados:

1. Medição dos halos de inibição de crescimento
2. Construção da recta-padrão de bacitracina
3. Extrapolação da bacitracina produzida pela estirpe em estudo



BTM 2022

Doseamento da bacitracina produzida por *Bacillus licheniformis*, ensaio de difusão em placas de agar



## TP3.1 Doseamento de antibiótico produzido em mono cultura

### 2ª Sessão

1. A partir da cultura da estirpe produtora (*Bacillus licheniformis*), retirar alíquotas de 1 mL (correspondentes a 2 e 5 dias de incubação), centrifugar durante 10 min a 12 000 r.p.m. (microcentrífuga) e recolher o sobrenadante (700 µl) para um tubo esterilizado e voltar a a centrifugar nas mesmas condições. Recolher o sobrenadante final e identificar.
2. A partir da bacitracina comercial fornecida, preparar por diluição soluções com 75; 100; 125; e 150 µg/mL.
3. **Inocular 7 tubos de meio MHA**s (semi-sólido), fundido e arrefecido a 50° C, com uma suspensão de células de *Micrococcus luteus* a partir da placa de isolamento efectuada anteriormente (de modo a obter uma concentração final de cerca de  $10^6$  a  $10^7$  células/ml).

Misturar bem, evitando a formação de bolhas de ar.

Verter o conteúdo do tubo sobre placas de MHA e **deixar solidificar (total 7 caixas /grupo)**

**Dividir em quadrantes as 6 caixas de MHA**, identificar cada setor (concentração de bacitracina 75, 100 , 125 e 150µg/mL) e o último quadrante com o sobrenadante da cultura (*Bacillus licheniformis*) de concentração desconhecida (?);

**A sétima caixa de MHA inoculada com *M. luteus* será utilizada no ensaio de interação em meio sólido com *B. subtilis* e *B. licheniformis*.**

•**Embebição e colocação dos discos de papel de filtro:**

4. Embeber discos de papel de filtro (Difco antibiotic assay discs) nas soluções de bacitracina preparadas e no sobrenadante de cada cultura (10  $\mu$ l).

Colocar estes discos na placa preparada anteriormente, em posição equidistante, fazendo ligeira pressão para garantir adesão.

Colocar a placa a 4° C durante 30 minutos a 4 h, para facilitar a difusão da bacitracina para o meio.

Retirar a placa do frigorífico e incubar na estufa a 37 ° C, durante 24 h.

•**Nota:** a colocação dos discos é feita recorrendo a uma pinça metálica esterilizada. A esterilização desta pinça é feita em álcool, retira-se o excesso de álcool e flameja-se a pinça à chama.

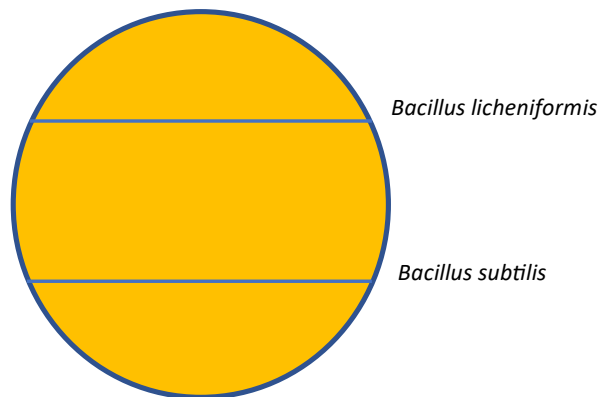
### 3.2.1- Produção de bacitracina em co-cultura:

Detecção de actividade antimicrobiana num ensaio de interacção *Bacillus* spp. /*Micrococcus luteus*

Ensaio em **meio sólido**

**Estirpes produtoras** *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*

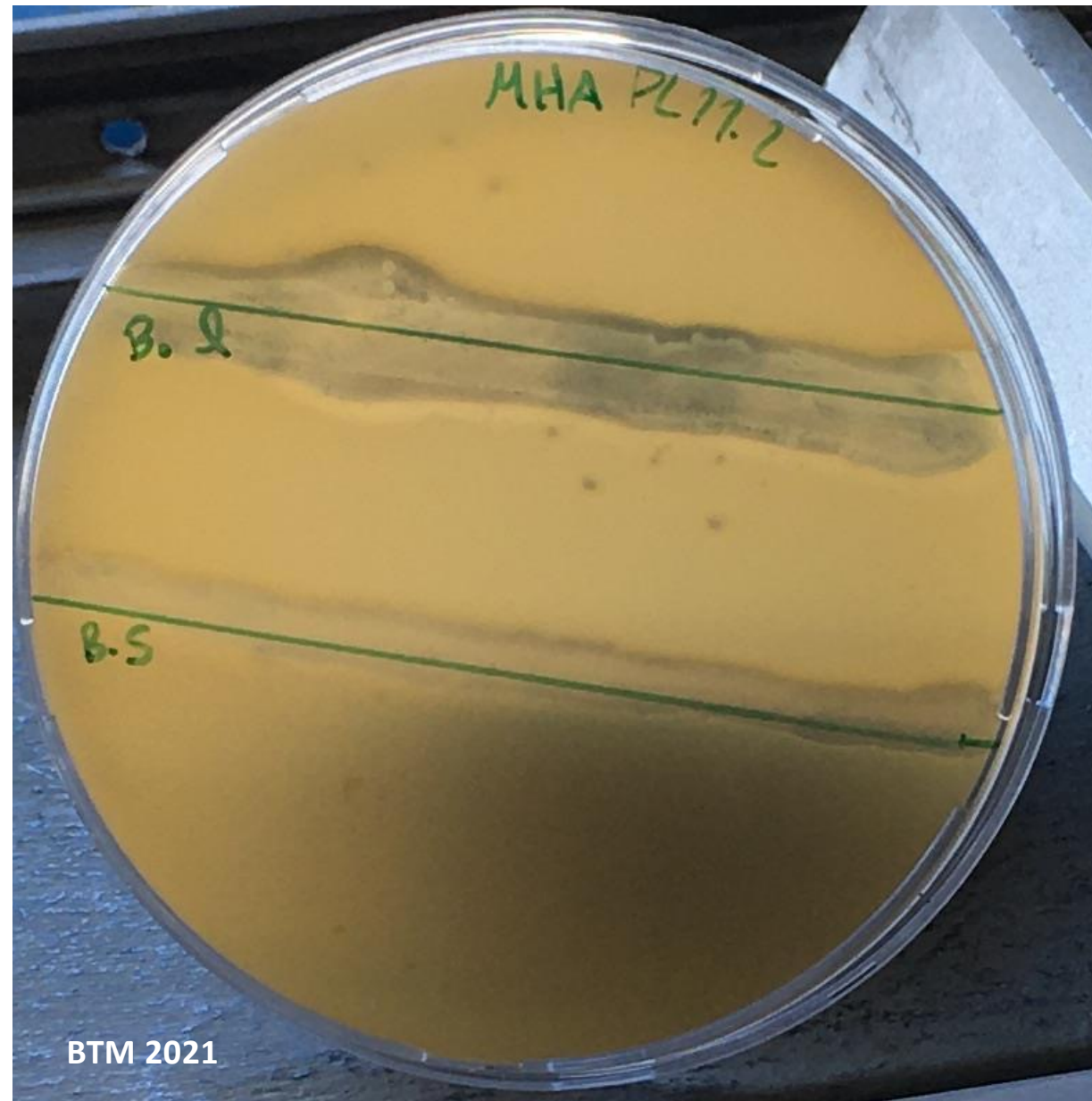
**Estirpe indicadora** *Micrococcus luteus*

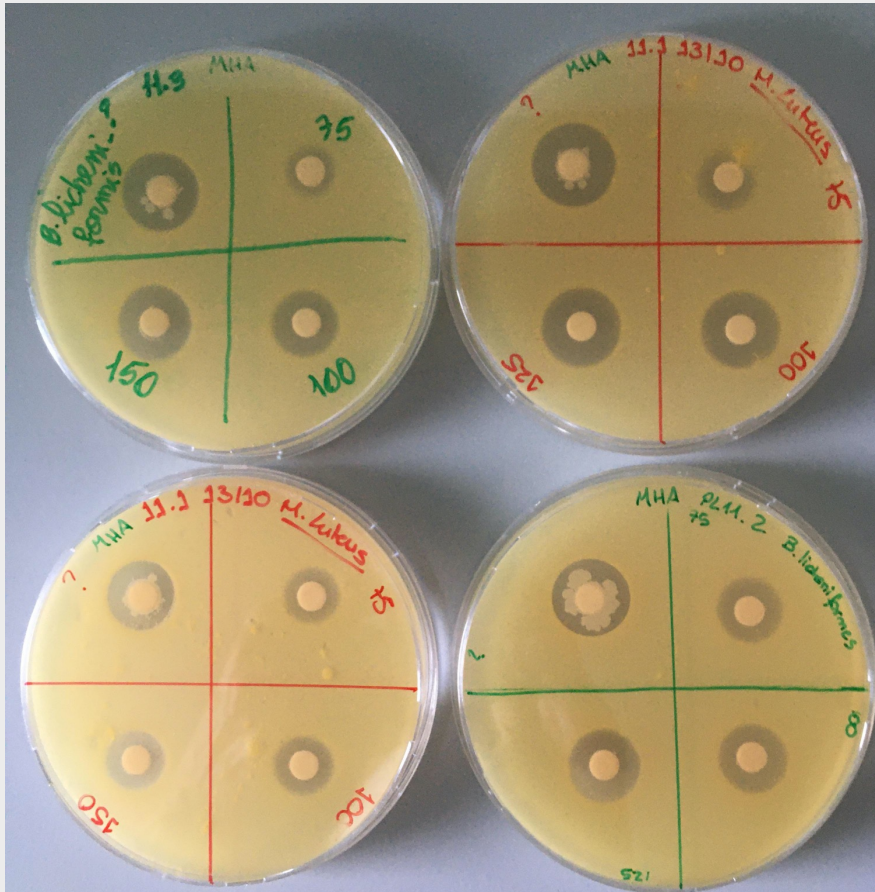


*Micrococcus luteus* (7ª Caixa de MHA com estirpe sensível inoculada por incorporação)



### 3.2.1- Produção de bacitracina em co-cultura





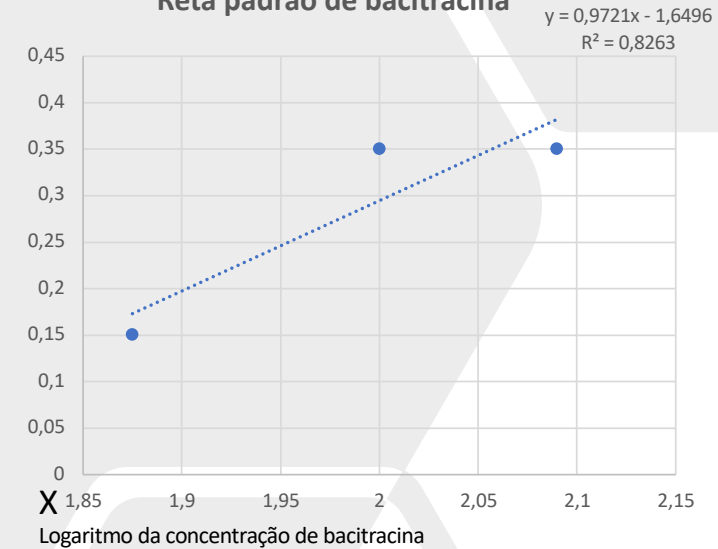
BTM 2021

Doseamento da bacitracina produzida por *Bacillus licheniformis*, ensaio de difusão em placas de agar

( $\mu$ ) bacitracina micrograma/mL	Eixo X log (bacitracina)	Eixo Y Halo inibição cm
75	1,875	0,15
100	2	0,35
125	2,09	0,35

Y  
diâmetro do halo de inibição do crescimento da estirpe indicadora (cm)

Reta padrão de bacitracina



halo de cm	$0,5 = 0,9721 * \text{Log}(\text{bac})$	
	-1,65	$0,5 + 1,65 = 0,972 * \text{Log}(\text{bac})$
		$0,972 * \text{Log}(\text{bac}) = 2,15$
		$\text{Log}(\text{bac}) = 2,15 / 0,972$
		$\text{Log}(\text{bac}) = 2,2$
		158