

## Biotecnologia Microbiana (2024/2025)

### Distribuição dos trabalhos ao longo do semestre

| PL1                                   | PL2 | PL3   | PL4            | PL5            | PL6                     | PL7 | PL8           | PL9 | PL10 |
|---------------------------------------|-----|-------|----------------|----------------|-------------------------|-----|---------------|-----|------|
| TP0<br>Preparação de meios de cultura | 1.1 | 1.2   | 1.3            |                | 1.4                     |     |               |     |      |
|                                       | 2.1 | 2.2   | 2.3            | 2.4            |                         |     |               |     |      |
|                                       |     | 3.1.1 | 3.1.2<br>3.2.1 | 3.1.3<br>3.2.2 |                         |     |               |     |      |
|                                       |     |       |                |                | 4.1 Meios<br>Inoculação |     | 4.2           | 4.3 | 4.4  |
|                                       |     |       |                |                | 5.1 Meios               |     | 5.2           | 5.3 |      |
|                                       |     |       |                |                | 6.1 Meios               | 6.2 | 6.3<br>Alunos |     |      |

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 de crescimento microbiano

3.1 Produção e doseamento de bacitracina

3.2 Deteção de atividade antimicrobiana num ensaio de interação direta entre bactérias

TP4 Biotransformação de esteróides

TP5 Análise bacteriológica de águas

TP6 Controlo da esterilização – curvas de inativação e doses de esterilização

**TP 1 - Fermentação em estado sólido - Produção de cogumelos**

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 cereais

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

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

2.1 Preparação da couve. Doseamentos e plaqueamentos da amostra inicial (T0).

2.2 Doseamentos e plaqueamentos das amostras relativas à primeira e segunda semanas de fermentação.

2.3 Contagens das colónias em meios GYA e MRS.

2.4 Análise e discussão de resultados.

**TP 3 – Controlo do crescimento microbiano. Inclui 2 trabalhos: 3.1 e 3.2**

**3.1 Produção e doseamento de bacitracina.**

3.1.1 Inoculação das estirpes produtoras (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) em meio líquido MC. Placa de isolamento da estirpe sensível (*Micrococcus luteus*).

3.1.2 Preparação das soluções-padrão de bacitracina e dos sobrenadantes de *Bacillus licheniformis* / *Bacillus subtilis* crescidos em meio MC.

- Preparação do ensaio de difusão em agar.
- Embebição e colocação dos discos.

3.1.3 Medição dos halos de inibição de crescimento. Construção da reta-padrão. Doseamento da bacitracina produzida pela estirpe em estudo.

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

3.2.1 Preparar ensaio de interacção em meio MHA entre *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*.

3.2.2 Análise de resultados.

#### **TP 4 - Biotransformação de esteróides**

- 4.1 Preparação de meios de cultura e inoculação da estirpe fúngica em meio sólido.
- 4.2 Adição do substrato e inoculação da estirpe fúngica no meio de transformação.
- 4.3 Extração dos produtos resultantes.
- 4.4 Separação e identificação dos produtos.
- 4.5 Análise e discussão de resultados.

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

- 5.1 Preparação de meios de cultura.
- 5.2 Filtração de amostras de água e inoculação em meios de cultura gerais e seletivos.
- 5.3 Interpretação de resultados e identificação de indicadores de contaminação fecal. Análise da qualidade de água em estudo em função do fim a que se destina.

#### **TP 6– Controlo da esterilização**

- 6.1 Preparação de meios de cultura.
- 6.2 Inoculação em meio sólido de amostras irradiadas com diferentes doses de radiação gama.
- 6.3 Contagens de colónias. Construção de uma curva de sobrevivência antes e após irradiação de material contaminado.  
Resolução de problemas.
- 6.4 Discussão de resultados.

## TP/PL0 – Preparação de Meios de cultura

### Notas gerais

Frascos Graduados com tampa azul – Frascos Schott:

- Ideais para a preparação de meios de cultura;
- As tampas são compatíveis entre frascos (excepto o de 50 ml);
- O aro azul no bocal funciona como trava gotas.

Tubos Falcons:

- Capacidade 15 ou 50 ml;
- Podem ser cónicos e nesse caso são compatíveis com centrífugas ou têm uma base de sustentação.

Algodão Hidrófobo:

- Útil para fazer rolhas, protegendo a entrada de microrganismos;
- Não tem afinidade com a água como o próprio nome indica.

Meios de Cultura:

- **GYA:** glucose + extrato de levedura e agar. Permite o crescimento de bactérias totais
- **NB:** Caldo nutritivo;
- **NA:** Caldo nutritivo com agar;
- **MRS:** (Man, Rogosa, Sharpe)
- **Meio MRS pH 5,5 + Agar a 2,2%**  
Preparar o meio num frasco, medir e acertar o pH e só depois distribuir por frascos mais pequenos e adicionar o agar.
- **Meio Müller-Hinton semi-sólido**  
Utilizar o meio MHB (caldo) e juntar o agar posteriormente (0,75%). A distribuição do meio por tubos (10 ml por tubo) implica a cozedura prévia do mesmo.
- **Meio NA**  
Pesar de acordo com o fabricante e hidratar.
- **Meio NB**  
Pesar de acordo com o fabricante e hidratar.
- Adicionar agar (2%) na preparação de meio sólido (**NA**).
- **Meio PDA** (potato + dextrose + agar)  
Pesar de acordo com o fabricante e hidratar.
- **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%**
- **SDW** (Água esterilizada desmineralizada).

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

**Todos os meios e soluções são esterilizados em autoclave a 1 atm, a 121° C e durante 20 minutos.**

## **TP 1 - Fermentação em estado sólido - Produção de cogumelos**

### **Fundamento teórico**

Os cogumelos são fungos, filo Basidiomycota, com um elevado valor nutricional, medicinal e potencial biotecnológico. Conhecem-se cerca de 300 espécies comestíveis (há quem refira mais de 2000), 30 das quais foram domesticadas e, destas, apenas cerca de dez espécies são cultivadas comercialmente. O mercado Europeu e Americano é dominado quase exclusivamente pela produção intensiva do cogumelo *Agaricus bisporus*, ao contrário do mercado asiático, onde são produzidas e consumidas outras espécies em grande quantidade (p.e. *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* - Shiitake), designadas vulgarmente por cogumelos exóticos. O interesse dos consumidores ocidentais por estas novas espécies tem vindo a aumentar nos últimos anos. A produção intensiva de cogumelos não é uma indústria agrícola artesanal, antes dependendo e beneficiando dos mais recentes avanços científicos e biotecnológicos, apresentando bastantes possibilidades de diversificação e evolução. A produção industrial de cogumelos envolve várias operações que, caso mal executadas, podem causar decréscimos de produção ou até a perda total da colheita: (i) seleção das estirpes e manutenção das culturas de micélios; (ii) preparação e propagação do micélio em meio granulado ou de serradura (*spawn*), ou em meio líquido; (iii) preparação do substrato de produção (p.e. à base de serraduras, palhas e outros subprodutos agroindustriais); (iv) inoculação e incubação do substrato; (v) formação de primórdios; e (vi) frutificação e gestão das colheitas. Os processos biotecnológicos de cultivo de cogumelos, conhecidos também por fermentações em estado sólido, resultam em alimentos de elevado valor nutricional, sendo boas fontes de proteínas e de outras substâncias de interesse.

### **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* e *Lentinula edodes*. A cultura pura de *Pleurotus ostreatus* vai ser depois propagada em meio granulado (*spawn*) e usada para cultivar este cogumelo em substratos vegetais.

## Organização do trabalho experimental

### 1º Sessão

#### **Materiais**

- Exemplares de várias espécies de cogumelos comestíveis
- Placas de Petri com meio de cultura sólido adequado para fungos (p.e. Agar de Sabouraud ou MYP)
- Pinças, bisturis, álcool, bico de Bunsen ou lamparina

#### **Procedimentos**

1. Marcar uma placa com meio de cultura com o nome da espécie de cogumelo, data e identificação do grupo de trabalho
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

### 2º Sessão

#### **Materiais**

- Placas de Petri com meio de cultura sólido adequado para fungos (p.e. Agar de Sabouraud ou MYP)
- Bisturis, álcool, bico de Bunsen ou lamparina

#### Procedimentos

1. Após crescimento dos micélios, purificar os mesmos por transferência para novas placas de Petri com meio de cultura e incubar durante uma semana (estes procedimentos devem ser executados em condições de assepsia)

### 3º Sessão

#### **Materiais**

- Frascos contendo grãos de cereais humidificados e esterilizados<sup>1</sup>
- Bisturis, álcool, bico de Bunsen ou lamparina

#### **Procedimentos**

1. Verificar se os micélios dos cogumelos se encontram purificados (pela ausência de crescimento de colônias de outros microrganismos nas placas) [Figura 1A]
2. Com um bisturi, cortar três a quatro pedaços de agar em que cresceu o micélio

purificado de *Pleurotus ostreatus* [Figura 1B] 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) [Figura 1C]

---

1 Preparar previamente, do seguinte modo: ferver os grãos de cereais durante cerca de 1h, escorrer bem, misturar com 0,5% (p/p) de gesso em pó e distribuir por frascos de 1 L com tampa metálica. Esterilizar no autoclave (1 h a 121° C). Manter refrigerados a 4° C, rolhados, até utilização.

#### 4º Sessão e seguintes

##### **Materiais**

Sacos plásticos contendo palha triturada e tratada termicamente<sup>2</sup>

##### **Procedimentos**

1. Verificar se os frascos de cereais se encontram completamente colonizados pelo micélio do cogumelo e livres de contaminações [Figura 1C]
2. Agitar de modo a soltar os grãos de cereais
3. Transferir uma porção dos cereais colonizados para os sacos contendo palha, agitar bem e perfurar os sacos em alguns pontos com um bisturi
4. Incubar os sacos a 20 - 25 °C, durante cerca de duas a três semanas (até a palha ficar colonizada pelo micélio; à luz ou no escuro) [Figura 1D]
5. Após colonização, transferir os sacos para um local mais fresco e húmido (ir borrifando com água para manter humidade), com luz natural ou fluorescente (mas com ciclo dia/noite)
6. Após alguns dias (2 - 5) vão começar a formar-se primórdios nas aberturas [Figura 1E] e, após mais dois a três dias, começam a formar-se os corpos frutíferos (cogumelos) [Figura 1F]
7. Colher os cogumelos antes de abrirem o chapéu completamente. Caso contrário começam a libertar grandes quantidades de esporos e a contaminar o laboratório.

---

2 Preparar previamente, do seguinte modo: obter ou triturar palha em pequenos pedaços e pasteurizar, mergulhada em água quente (~ 80° C) durante cerca de uma a duas horas. Escorrer e distribuir por sacos de plástico (transparentes ou pretos). Usar no próprio dia ou seguinte. Em alternativa, mergulhar a palha em água fria durante cerca 12 a 24 horas, escorrer, distribuir por sacos (de polipropileno) e esterilizar no autoclave (30 min a 121° C)

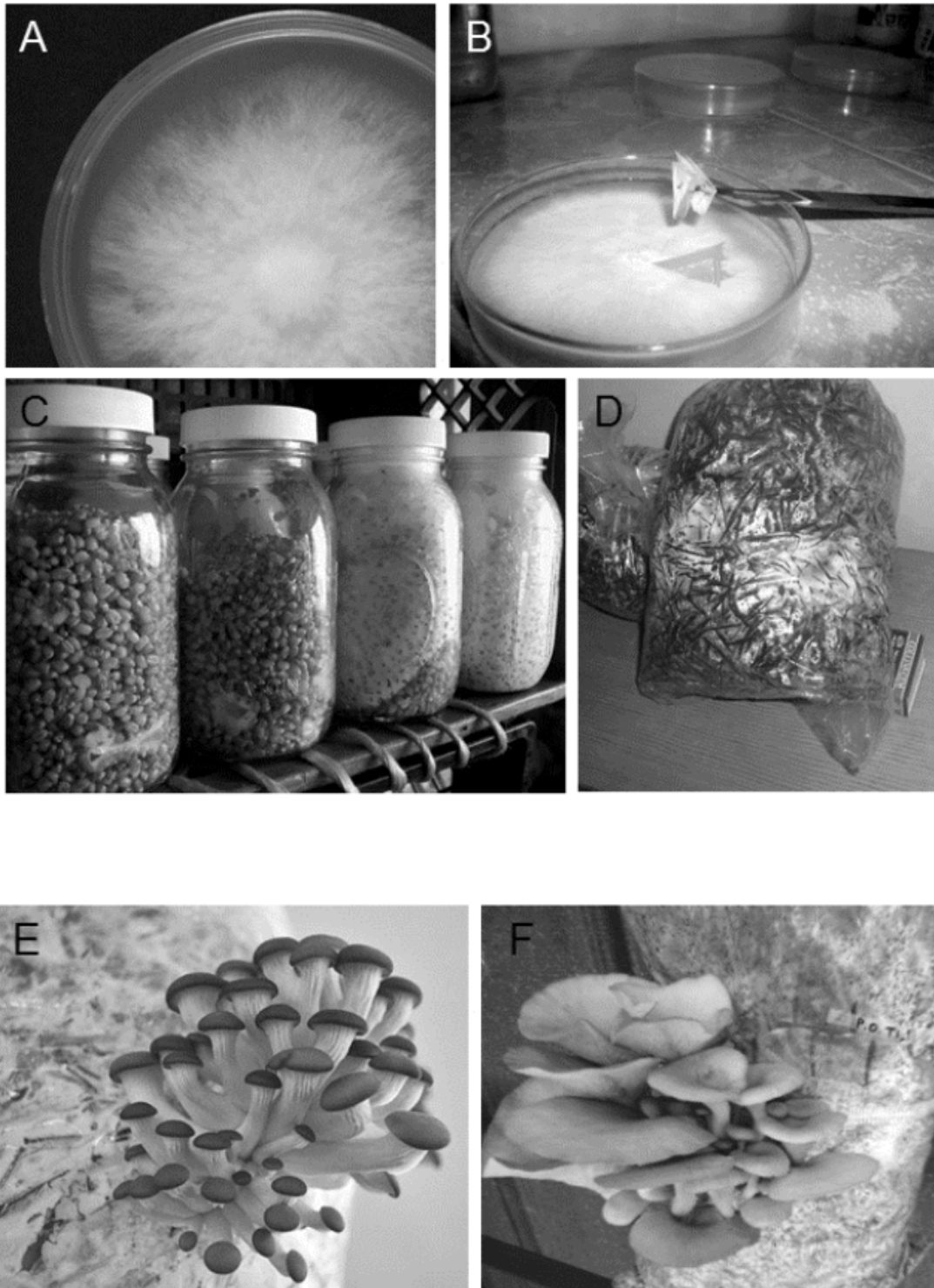


Figura 1. (A) Micélio purificado de *Pleurotus ostreatus*; (B) Ilustração da transferência de pedaços de agar com micélio para inoculação de frascos de cereais esterilizados; (C) Diferentes fases da colonização dos frascos com cereais esterilizados (o frasco mais à direita encontra-se completamente colonizado); (D) Saco de palha quase totalmente colonizada com o micélio de *P. ostreatus*; (E) Primórdios de *P. ostreatus*; (F) Corpos frutíferos maduros de *P. ostreatus*.



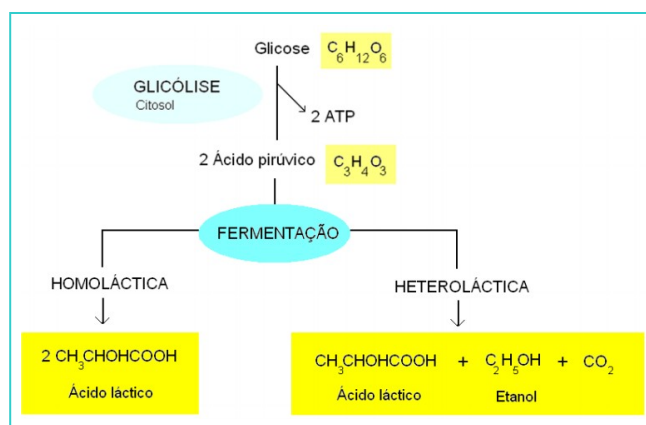
## TP 2 - Evolução da População Bacteriana na Fermentação da Couve em Chucrute

### Fundamento teórico

A chucrute resulta de uma fermentação dos açúcares, presentes na couve, a ácidos por bactérias lácticas naturalmente também presentes nas folhas.

As bactérias lácticas são os organismos mais importantes envolvidos na fermentação da chucrute. Também podem estar presentes outros microrganismos que caso tenham condições, podem desenvolver-se e interferir na fermentação. A qualidade do produto final depende, sobretudo, do controlo dos microrganismos indesejáveis durante o processo fermentativo. Num processo bem-sucedido as bactérias lácticas devem predominar.

Os produtos finais desta fermentação são o ácido láctico e pequenas quantidades de ácido acético e propiónico, CO<sub>2</sub>, pequenas quantidades de álcool e uma mistura de ésteres aromáticos. A acidez ajuda a controlar organismos contaminantes e contribui para um maior tempo de prateleira.



Para que os resultados desta fermentação sejam otimizados existem 4 fatores seletivos indispensáveis:

- A **acidez** ajuda a controlar organismos contaminantes e contribui para um maior tempo de prateleira;
- A **ausência de ar** exclui todos os contaminantes aeróbios que poderiam oxidar os ácidos orgânicos, originando produtos laterais que iriam prejudicar o sabor do chucrute;
- A **temperatura** ótima 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, confere características **hálicas** e dá sabor à couve.

## **Objetivo**

O objetivo desta experiência é registrar 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 a partir da determinação de:

- Medir o pH correspondente aos diferentes dias de incubação;
- Calcular a concentração de ácido láctico (através de uma titulação);
- Realizar uma contagem do número de células (cfu/mL) em meio MRS pH 5,5 e em meio GYA.

Em cada turma serão formados 4 grupos. Cada grupo preparará diferentes tempos para estudo da evolução da população bacteriana. (T0,1,2,3,4, 5 e 7 dias).

### **1ª Sessão**

Preparação da couve. Doseamento de ácido láctico e inoculação da amostra inicial (T0).

### **2ª Sessão**

Doseamentos e inoculação das amostras relativas à primeira semana de fermentação.

### **3ª Sessão**

Contagens de colónias em meio GYA e MRS.

### **4ª Sessão**

Análise e discussão de resultados.

## **Bibliografia**

Beganovi J; Kos B; Pavunc A.L.; Uroi K.; Joki M.; Suškovi J. (2014) Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. Microbiological Research 169 623–632.

Michael J. Waites, Neil L. Morgan, John S. Rockey, Gary Higton. 2001 Industrial Microbiology, Blackwell Science.

Viander B.; Maarit M. Palva A. (2003) Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation. Food Microbiology 20: 391–395.

## **Protocolo experimental**

### **1º sessão**

#### **2.1. Preparação da couve para a fermentação. Doseamentos da amostra inicial.**

1. Retirar as folhas danificadas e as exteriores da couve.
2. Descaroçar e cortar a couve em tiras de alguns milímetros de largura.
3. Peser a couve cortada e misturar sal (NaCl) na quantidade de 3% desse peso. 4. Pressionar a mistura da couve com o sal de forma a libertar o suco da couve.
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.

#### **Análise Microbiológica**

Num tubo de ensaio estéril colocar 1 mL de suco + 9 mL de soro, a partir deste realizar então as diluições (100µl suco + 900µl soro num microtubo)

Meio **GYA**: 10<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>

Meio **MRS**: 10<sup>0</sup> 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup>

Inóculo 20 µl (2 réplicas por diluição)

#### **Análise Química**

Retirar **5 mL** de suco da couve e medir o pH com um elétrodo;

Após a medição de pH, adicionar 5 mL de água destilada e ferver para eliminar o CO<sub>2</sub>.

Arrefecer, adicionar duas gotas de fenolftaleína (indicador de pH) e titular utilizando NaOH 0.01M como titulante.

Massa molecular do ácido láctico = 90

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

Trata-se de uma fórmula bastante aproximada porque outros ácidos - como o ácido acético - podem ser produzidos, em particular se predominarem organismos heterofermentativos como espécies de *Leuconostoc* e *Streptococcus*. No entanto a fórmula é uma medida adequada da formação de ácido láctico se predominarem organismos homofermentativos como espécies de *Lactobacillus* e de *Pediococcus*.

## 2ª sessão e seguintes

### 2.2 Doseamentos e inoculações das amostras relativas à primeira e segunda semana de fermentação

1. Examine e faça as contagens nos meio MRS e GYA das colónias relativas ao T0.
2. Remova uma amostra de suco relativa a cada dia de incubação para determinar o pH e a quantidade de total de ácidos de acordo com o feito na 1ª sessão, mas utilizando uma solução de NaOH 0,1 M.

De acordo com o tempo de incubação, preparar diluições apropriadas de suco e inocular 0,02 mL em caixas de Petri com meio GYA e MRS (como fez na sessão anterior).

|                          |  |  |
|--------------------------|--|--|
| Dia 0                    | MRS: $10^0$ , $10^{-1}$ , $10^{-2}$  | GYA: $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$                                     |
| Dias 1, 2, 3,4, 5, 6 e 7 | MRS: $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ | GYA: $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ |

### Análise de resultados:

Represente os resultados em dois gráficos, um que represente a variação do número de microrganismos totais e de lácticos ao longo do tempo e outro que sumarie os resultados da variação do valor de pH e da quantidade de ácido láctico formado ao longo do tempo de fermentação da couve.

## **TP 3 – Controlo do crescimento microbiano**

### **3.1 Produção e Doseamento de antibiótico**

#### **Fundamento teórico**

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário capazes de inibir o crescimento de outros organismos, mesmo quando utilizados a baixas concentrações. Atualmente são conhecidos milhares de antibióticos diferentes, mas apenas cerca de duas centenas são comercializados, constituindo o produto de origem microbiana de maior valor comercial.

Dois exemplos de culturas produtoras de antibióticos são *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, o antibiótico por elas sintetizado é a bacitracina. Existem vários fatores que influenciam ou controlam a produção deste antibiótico, como a concentração de fosfato, a concentração de glucose e a presença de iões metálicos divalentes ( $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ).

Quando uma estirpe sensível à bacitracina (neste trabalho utilizaremos *Micrococcus luteus*) é exposta a este antibiótico haverá uma zona em que o seu crescimento será inibido. A essa zona chama-se **halo de inibição**.

Para dosear a bacitracina produzida será utilizado o método de difusão em agar, baseado na relação linear existente entre diâmetro dos halos de inibição de crescimento de uma estirpe indicadora (sensível) e o logaritmo da concentração do agente inibidor (soluções de bacitracina de concentração conhecida).

#### **Objetivo**

- 1 - Proceder ao doseamento de bacitracina, produzida por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*.
- 2 - Detecção de atividade antimicrobiana num ensaio de interação em meio sólido entre *Bacillus* spp. / *Micrococcus luteus*.
- 3 Controlo de qualidade associada às condições de trabalho.

#### **Organização do trabalho experimental**

A curva-padrão de doseamento de antibiótico é construída a partir dos halos observados em *M. luteus* com discos embebidos em soluções de bacitracina com as seguintes concentrações: 50; 75; 100; 125; 150 µg/ml.

#### **Bibliografia**

Balouir M.i; Sadiki M.; Ibensouda S. K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 71–79.

## **Protocolo experimental**

### **1ª Sessão**

Inoculação da estirpe produtora (*Bacillus licheniformis* / *Bacillus subtilis*) em meio líquido MC.

Placa de isolamento da estirpe sensível (*Micrococcus luteus*).

### **2ª Sessão**

Preparação das soluções-padrão de bacitracina e dos sobrenadantes de *Bacillus licheniformis*/  
*Bacillus subtilis* crescidos em meio MC.

Preparação das placas com a estirpe sensível.

Embebição e colocação dos discos.

### **3ª Sessão**

Medição dos halos de inibição de crescimento.

Construção da recta-padrão.

Doseamento da bacitracina produzida pela estirpe em estudo.

Registar os resultados do ensaio de interação.

### **1ª sessão**

#### **3.1.1**

##### **Inoculação das estirpes produtoras. Placa de isolamento da estirpe sensível.**

1. Inoculação das estirpes produtora de bacitracina em 25 mL de meio MC. Deverá fazê-lo partindo de uma cultura *overnight* no mesmo meio. Incubar a 37° C, com agitação até 48h.
2. De forma semelhante proceda à inoculação de cada estirpe produtora, em meio líquido, em conjunto com *Micrococcus luteus*. Incubar a 37° C, com agitação até 48h.
3. Inoculação em NA de *Micrococcus luteus*. Incubar a 37° C durante 48h.

### **2ª sessão**

#### **3.1.2**

##### **Preparação dos sobrenadantes de *B. licheniformis* e *B. subtilis* e das soluções padrão de bacitracina**

- A partir da cultura da estirpe produtora em mono e em co-cultura, retirar alíquotas de 1 mL, centrifugar durante 10 min a 12 000 r.p.m. (microcentrífuga) e recolher o sobrenadante para um tubo esterilizado e voltar a a centrifugar nas mesmas condições. Recolher o sobrenadante final e identificar.

- A partir da bacitracina comercial fornecida, preparar por diluição soluções com 75; 100; 125; e 150 µg/mL.

#### **Preparação das placas com a estirpe sensível:**

- Inocular quatro tubos de meio MHA<sub>s</sub> (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<sup>6</sup>- 10<sup>7</sup> células/ml).
- Misturar bem, evitando a formação de bolhas de ar.
- Verter o conteúdo do tubo sobre placas de MHA e deixar solidificar.
- Dividir em quadrantes, identificar cada setor (concentração de bacitracina 75, 100 e 125 µg/mL) e o último quadrante com o sobrenadante da cultura de concentração desconhecida (*B. subtilis* e *B. licheniformis*);
- Repetir o passo anterior mas em que o último quadrante terá o sobrenadante resultante do crescimento em co-cultura e em meio líquido da estirpe produtora de antibiótico com *Micrococcus luteus*.
- A quarta 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:**

- Embeber discos de papel de filtro (Difco antibiotic assay discs) nas soluções de bacitracina preparadas e no sobrenadante de cada cultura. Colocar estes discos na placa preparada anteriormente, em posição equidistante, fazendo ligeira pressão para garantir adesão.

**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.

- 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.

### **3ª sessão**

#### **3.1.3**

##### **Medição dos halos de inibição de crescimento e doseamento de bacitracina**

1. Após incubação, medir o diâmetro dos halos de inibição de crescimento à volta dos discos de papel de filtro.
2. Representar graficamente o diâmetro do halo em função de log [bacitracina].

Testar a significância do método fazendo uma análise de regressão

3. A partir da reta obtida, calcular a concentração de bacitracina existente no sobrenadante de cada cultura testada.
4. Comparar e discutir os resultados.

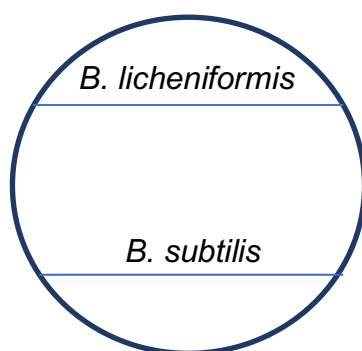
### TP3.2 Detecção de atividade antimicrobiana num ensaio de interação em meio sólido

#### Bacillus spp. /Micrococcus luteus

#### Protocolo experimental

##### 1ª Sessão

**3.2.1** Realizar um ensaio de interação *Bacillus* spp. /*Micrococcus luteus* em meio MHA inoculando em meio sólido as estirpes produtoras por riscado à superfície e *Micrococcus luteus* por incorporação.



##### 2ª Sessão

#### **3.2.2** Análise de Resultados

Registrar os resultados do ensaio de interação:

Interação **sem efeito no crescimento**, quando não houver alterações no crescimento da bactéria indicadora, crescendo esta ao longo da linha de inoculação e junto à bactéria produtora.

Interação com **inibição do crescimento** quando houver ausência total do crescimento da bactéria indicadora na zona de contato desta com a bactéria produtora.

Comparar os resultados obtidos em meio líquido e sólido.

#### Bibliografia

Bhuyan, S. K., Bandyopadhyay; P., Kumar P., Mishra; D. K., M.; Prasad R.; Kumari A., Upadhyaya K. C.; Varma A.; 2 & Yadava P. K. (2015) - Interaction of *Piriformospora indica* with *Azotobacter chroococcum*. Scientific Reports volume 5:13911 | DOI: 10.1038/srep13911



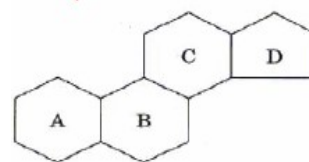
## TP 4 - Biotransformação de esteróides

### Fundamento teórico

Os esteróides 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.

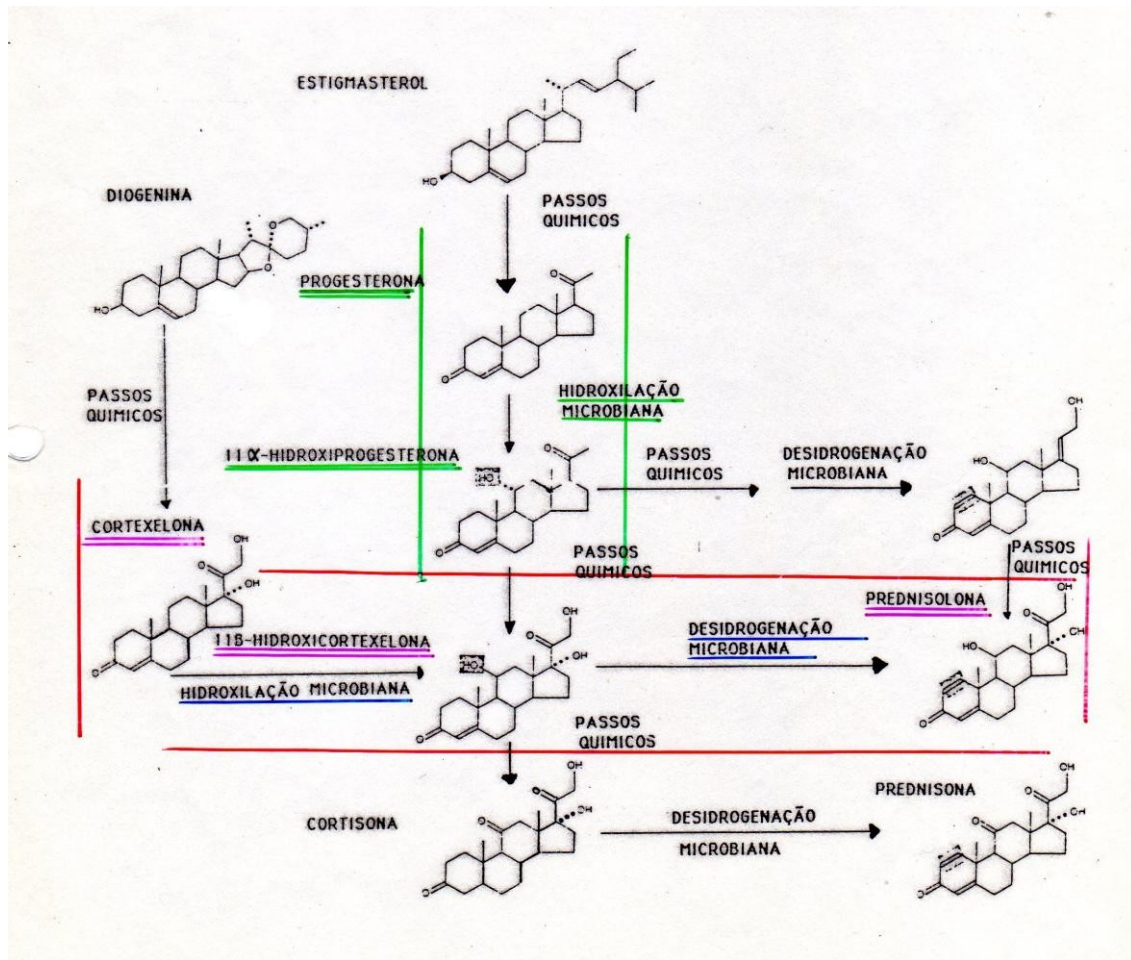
Os esteróides diferem entre si consoante:

- Número e posição das duplas ligações;
- Configuração dos anéis em relação uns aos outros;
- Configuração das ligações entre os grupos funcionais substituídos e o núcleo ( $\alpha$  ou  $\beta$ ).



A partir do substrato **Cortexolona** *Curvularia lunata* efectua a 11 $\beta$ -hidroxilação do C-11 do núcleo esteróide, este fungo é utilizado na síntese comercial do **Cortisol (11 $\beta$ - Hidroxicortexelona)**.

As propriedades terapêuticas da cortisona e do cortisol foram aumentadas pela introdução microbiana de uma dupla ligação entre os átomos C-1 e C-2 do núcleo esteróide (Desidrogenação Microbiana) formando-se respectivamente **Prednisona** e **Prednisolona**.



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

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

1 – No primeiro grupo incluímos os fungos que apresentam um só produto final.

| Substrato   | Enzima          | Produto intermediário  | Enzima        | Produto final |
|-------------|-----------------|------------------------|---------------|---------------|
| Cortexolona | 11β-hidroxilase | 11β-Hidroxicortexolona | Desidrogenase | Prednisolona  |

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

| Substrato   | Enzima                  | Produto final                  | Enzima        | Produto final |
|-------------|-------------------------|--------------------------------|---------------|---------------|
| Cortexelona | 11 $\beta$ -hidroxilase | 11 $\beta$ -Hidroxicortexelona | Desidrogenase | 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

| Substrato   | Enzima                  | Produto final                  |
|-------------|-------------------------|--------------------------------|
| Cortexelona | 11 $\beta$ -hidroxilase | 11 $\beta$ -Hidroxicortexelona |

### **Objetivo**

Avaliar a atividade transformante de esteróides 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 esteróide por um fungo filamentoso, além de preparar uma cultura sem o esteróide a testar, que funcionará como controlo.

### **Bibliografia**

Donova, M. V., & Egorova, O. V. (2012). Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* .(94):1423–1447.

SABRIEH GHASEMI , RASOOL KHEYRABADI & ZOHREH HABIBI (2014) Microbial transformation of hydrocortisone by two fungal species *Fusarium fujikuroi* PTCC 5144 and *Rhizomucor pusillus* PTCC 5134 . *Biocatalysis and Biotransformation* 32(3):168–172.

## **Protocolo Experimental**

**MATERIAL BIOLÓGICO** – Culturas em meio sólido de estirpes de *Cladosporium* sp.;  
*Penicillium* sp. e *Alternaria* sp.

**MEIOS DE CULTURA** – Meio de transformação (Meio T): Glucose 2%; Peptona 2%; Fosfato de potássio 1%; Sulfato de magnésio 1%. pH 4,7. Esterilizar à temperatura de 121°C durante 15 minutos.

**Substratos testados** – cortexolona e progesterona.

**Padrões** – ergosterol, cortexolona, progesterona, 11β-hidroxycortexelona, 11α-hidroxiprogesterona e prednisolona.

Utilizar SEMPRE material de vidro.

### **1ª sessão**

#### **Adição dos substratos ao meio de transformação e posterior inoculação**

- Em condições de assépsia distribuir com uma pipeta esterilizada 20 mL do meio de transformação para cada um de três frascos Erlenmeyer de 100 mL esterilizados.
- Pesar 40 mg de cortexolona e 40 mg de progesterona para cada um de dois copos esterilizados. Adicionar a cada um 2 mL de metanol. Dissolver.
- Pipetar 0,5 mL da solução em metanol de cortexelona / progesterona, para dois dos frascos preparados em 3.1.
- O terceiro frasco funcionará de controlo.
- Preparar uma suspensão de esporos a partir do fungo fornecido em meio sólido.
- Adicionar cerca de 20 mL de meio T+0,1%Tween 80. Raspar o micélio
- 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 72 horas.

## 2ª Sessão

### Extração dos produtos resultantes da transformação de esteróides, a partir do micélio e do meio de cultura

- Retirar da estufa as culturas.
- Pipetar 1 mL de meio de cultura e micélio para um tubo de ensaio.
- Identificar o tubo – referência da amostra (Cortex, Prog ou Controlo) e nº de isolamento.
- Pipetar 5 mL de diclorometano para cada um dos tubos de ensaio com micélio e meio de cultura.
- Agitar no vortex. Deixar repousar, formam-se duas fases, com uma pipeta Pasteur de vidro e uma tina de borracha remova a camada orgânica que se encontra no fundo de cada tubo de ensaio. Pipetar essa camada orgânica através de uma coluna de sulfato de sódio e para um novo tubo.
- Esta extração deve ser repetida, pelo menos, três vezes sobre o mesmo micélio e meio de cultura (para ser quantitativamente significativa).
- Evaporar o solvente nos tubos contendo 15 mL de diclorometano e os esteróides neles dissolvidos.

## 3ª sessão

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

Preparação do solvente e da tina de cromatografia

- Diclorometano – 70 mL
  - Acetona – 30 mL
- Deitar o solvente na tina de cromatografia.
  - Fechar a tina. Deixar saturar a atmosfera no interior da tina durante cerca de duas horas.
  - Preparar as soluções das amostras padrão com o solvente indicado:

|   |              |
|---|--------------|
| Ergosterol dissolvido em metanol              | 50 mg /5mL   |
| Cortexolona dissolvida em metanol             | 50 mg / 5 mL |
| 11β-hidroxicortexelona dissolvida em metanol  | 50 mg / 5 mL |
| Prednisolona dissolvida em metanol            | 50 mg / 5 mL |
| Progesterona dissolvida em metanol            | 50 mg / 5 mL |
| 11α-hidroxiprogesterona dissolvida em metanol | 50 mg / 5 mL |

- Marcar a 2 cm da base da placa de cromatografia, com um lápis a linha de aplicação de amostras.
- Marcar com um lápis os pontos de aplicação das amostras e a respetiva

referência, deixando 1 cm entre cada ponto de aplicação da amostra. Manter a placa de cromatografia durante 10 minutos numa estufa à temperatura de 120 ° C.

**Preparação das amostras:** pipetar 0,5 mL de diclorometano para os tubos de ensaio onde decorreu a extracção dos esteróides. Agitar no vortex.

- Aplicar as amostras na placa de cromatografia com uma microseringa de 50 microlitros: 5 microlitro das amostras padrão e 50 microlitros das amostras a analisar.
- Colocar a placa de cromatografia na tina de cromatografia até o solvente percorrer a maior parte da placa (cerca de 30 minutos).
- Retirar a placa da tina e marcar com um lápis a linha até onde correu o solvente. Deixar evaporar o solvente.
- Observar a placa sob radiação UV (254 nm).
- Medir as distâncias entre a linha de aplicação das amostras e o centro da mancha do soluto. Registrar o número de manchas que aparecem por cada amostra aplicada.
- Identifique os produtos através da comparação das distâncias percorridas pelas amostras com as amostras padrão corridas na mesma placa.

### **Aula de Análise dos Resultados**

Através das diferentes manchas obtidas na cromatografia é possível perceber se ocorreram reações de hidroxilação e/ou desidrogenação dos esteroides.

Avaliar cada cromatograma de forma a identificar as transformações ocorridas.

## **TP 5 - Análise bacteriológica de diferentes águas**

### **Indicadores de contaminação fecal**

#### **Fundamento teórico**

As doenças com origem na água de consumo, como a cólera e a febre tifóide, resultam da ingestão de água contaminada com dejetos. A prática comum para que uma água não represente risco para a saúde é a pesquisa de microrganismos indicadores de contaminação fecal.

A presença de indicadores de contaminação fecal numa água, seja destinada ao consumo ou a uma atividade recreativa, é indicadora da potencial existência de microrganismos patogénicos entéricos, ou seja, de microrganismos que são transmitidos pela via fecal-oral e que infetam o trato gastrointestinal.

#### **Objetivo**

Analisar a qualidade de amostras de águas de diferentes origens (**superficial; subterrânea**; para consumo humano, mineral; de piscina; balnear; hemodiálise e de rega) de acordo com os parâmetros legislados.

#### **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.

##### **1ª sessão**

Preparação de meios de cultura.

##### **2ª sessão**

Filtração de amostras de água e inoculação em meios de cultura gerais e selectivos.

##### **3ª sessão**

Interpretação de resultados e identificação de indicadores de contaminação fecal. Análise da qualidade de água em estudo em função do fim a que se destina.

#### **Bibliografia**

Bitton G. (2005) - MICROBIAL INDICATORS Of FECAL CONTAMINATION *in* Wastewater Microbiology, Third Edition John Wiley & Sons, Ltd., cap 5: 153-169.

## **Protocolo experimental**

### Contagens totais em meio NA

- Utilize o método de incorporação em agar nutritivo ou o método das membranas filtrantes para analisar as diferentes amostras de água.
- Analise os seguintes volumes de amostra: 1 mL, 0,1 mL e 0,01 mL nas águas superficial, subterrânea, balnear e de rega.
- Nas águas de consumo, piscina, mineral e de hemodiálise análise 1 mL.
- Temperatura de incubação 22 e 37 °C.

### Contagens de coliformes totais e fecais

- Utilize o método das membranas filtrantes: filtre 100 mL das águas de consumo, de piscina, mineral e de hemodiálise, por membrana de 0,45 µm e transfira cada membrana para o meio de cultura selectivo apropriado.
- Filtrar 0,1 mL das águas superficial, subterrânea, balnear e de rega.
- Incube as caixas de Petri a 37°/ 44°C durante 24 horas.

### Deteção de *Enterococcus* sp.

- Utilize o método das membranas filtrantes: filtre 100 mL das águas de consumo, de piscina, mineral e de hemodiálise, por membrana de 0,45 µm e transfira cada membrana para o meio de cultura Slanetz and Bartley.
- Filtrar 0,1 mL das águas superficial, subterrânea, balnear e de rega.
- Incube as caixas de Petri a 37°C durante 48 horas. As colónias presuntivamente enterococos fecais apresentam-se de cor vermelha acastanhada sendo necessária a confirmação.

### Confirmação de *Enterococcus* fecais

- Transfira as membranas com *Enterococcus* presuntivos para meio de Kanamicina, Esculina Azida, Agar. As colónias positivas apresentam uma cor negra.
- Incube as caixas de Petri a 37°C durante 24 horas.

### Pesquisa de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras

- Pasteurize 25 mL da amostra a 75°C durante 10 minutos.
- Arrefecer rapidamente e adicioná-la a um tubo Falcon que contém 25 mL de meio de cultura Gelose Viande-Fois –Sulfite Citrate com dupla concentração.
- Incubar a 37°C em jarra de anaerobiose. Quantificar o número de colónias negras correspondentes às bactérias sulfito-redutoras.



#### Pesquisa de *Salmonella* spp.

- Utilize o método das membranas filtrantes para filtrar a água a analisar.
- Água superficial 5 litros; água balnear 1 litro.
- Meio de pré-enriquecimento: filtrar a água e transferir para frasco Erlenmeyer com 20 ml de água de peptona durante 24 horas.
- Meio de enriquecimento: transfira 1 mL do meio de enriquecimento para meio Rappaport e 1 mL para meio de Selenite Enrichment Broth durante 24 horas.
- Meios selectivos.
- Inocule a partir dos meios de enriquecimento dois meios selectivos: Brillhante Green Phenol Agar ; Meio Rambach ou XLD Agar.

#### Deteção de *Pseudomonas aeruginosa*

- Utilize o método das membranas filtrantes para filtrar a água a analisar e transfira a membrana para o meio seletivo *Pseudomonas* Agar P ou F.
- Incube as caixas a 37°C durante 48 horas.
- Em meio P e sob luz ultra-violeta o aparecimento de fluorescência de cor azul indica a presença de *Pseudomonas aeruginosa* enquanto que no meio F aparece adicionalmente um pigmento amarelo esverdeado directamente visível.

#### Identificação de patogénicos

- Utilize o método das membranas filtrantes para filtrar 250 mL e transferir a membrana para meio MacConkey.

#### Deteção de *Staphylococcus* sp.

- Filtre os volumes de acordo com a amostra a testar e transfira as membranas para meio Manitol Salt Agar.

## **Parâmetros Microbiológicos a analisar nas águas em estudo**

Água superficial (Dec-Lei 236/98 anexo I)

- Coliformes totais •
- Coliformes fecais •
- Enterococos fecais •
- Salmonella

Água subterrânea (Dec-Lei 236/98 artigo 14º -2)

- Coliformes totais
- Coliformes fecais
- Enterococos fecais
- Bactérias anaeróbias

Água de consumo humano (Dec-Lei 236/98 anexo VI)

- Coliformes totais
- Coliformes fecais
- Enterococos fecais
- Microrganismos totais
- Bactérias anaeróbias
- Pseudomonas
- Estafilococos

Água de piscina (CNQ 23/93)

- Coliformes fecais
- Enterococos fecais
- Microrganismos totais
- Estafilococos

Água balnear (Dec-Lei 236/98 anexo XV)

- Coliformes totais
- Coliformes fecais
- Enterococos fecais
- Microrganismos totais
- Salmonella

Água mineral (Dec-Lei 156/98 anexo I, B, ponto 3(art.4º))

- Coliformes totais
- Coliformes fecais
- Enterococos fecais

- Microrganismos totais
- Bactérias anaeróbias
- Pseudomonas

Água de Hemodiálise (Dec-Lei 392/93 art. XIX)

- Coliformes totais
- Coliformes fecais
- Enterococos fecais
- Microrganismos totais
- Pseudomonas
- Estafilococos
- Microrganismos patogénicos

Água de Rega (Dec-Lei 236/98 anexo XVI)

- Coliformes fecais

## **TP 6 - Resposta dos microrganismos a um agente letal**

Este trabalho é realizado em colaboração com a Unidade de Microbiologia do Instituto de Tecnologia Nuclear, IST. A responsabilidade é da Doutora Sandra Cabo Verde.

### **Fundamento teórico**

A radiação e tecnologia nucleares estão envolvidas em:

- Produção radiológica;
- Reatores;
- Processamento de alimentos (em Portugal e na UE a irradiação de alimentos só se aplica a especiarias, mas noutros pontos do mundo já é utilizada para vários tipos de alimentos, visando garantir a sua segurança) e material médico cirúrgico;
- Radiofármacos.

A radiação é bastante importante dado o seu poder descontaminante que permite a eliminação de microrganismos e o aumento do tempo de prateleira (novamente no caso dos alimentos). Esta eliminação é possível pois a radiação quebra o DNA de microrganismos (efeito radiolítico).

Por exemplo relativamente aos efluentes, estes têm de ser desinfetados de modo que se eliminem possíveis microrganismos patogênicos (ex: vírus) que se podem tornar contaminantes ambientais (em águas subterrâneas, de rega, de piscina, etc).

No caso da indústria da cortiça produz compostos fenólicos que têm de ser degradados na ETAR da própria indústria. Como? Uma vez que os compostos fenólicos são muito estáveis, quando estes são quebrados pela radiação, foram-se produzidos produtos de radiação também tóxicos. Assim sendo, usa-se um consórcio de microrganismos de água de cozedura que fazem bioremediação.

### **Protocolo experimental**

O procedimento será adequado ao projeto em curso e será fornecido na aula prática.

### **Objetivo**

Estudar a resposta dos microrganismos à radiação gama.

Organização do trabalho experimental

Cada grupo irá efetuar uma curva de sobrevivência antes e após irradiação de material contaminado.

## **Bibliografia**

2013 - I. Nunes, N. Mesquita, S. Cabo Verde, M. Carolino, A. Portugal, ML Botelho Bioburden Assessment and Gamma Radiation Inactivation Patterns in Parchment documents. *Radiation Physics and Chemistry* 88:82-89.

2013 - I. Nunes N. Mesquita, S. Cabo Verde, M. Carolino, A. Portugal, ML Botelho. Characterization of an Airborne Microbial Community: A Case Study in the Archive of the University of Coimbra, Portugal *International Biodeterioration and Biodegradation*. 79: 36–41.

2012 – I. Nunes N. Mesquita, S. Cabo Verde, MJ Trigo, M. Carolino, A. Portugal, ML Botelho. Gamma radiation effects on physical properties of parchment documents: Assessment of Dmax. *Radiation Physics and Chemistry* 81: 1943–1946.

Cabo Verde, Sandra (2007) – Avaliação de HACCP, tecnologias de irradiação e métodos moleculares no controlo higieno-sanitário de *Salmonella* e *Campylobacter* em ovos. Tese de doutoramento.