ROTEIRO DE PRÁTICA

GRUPO: _____

DISCIPLINA: _____ **DATA:** _____

ELABORADO POR: Prof.ª Dárlen Crísthiê H. Pena (EEOP), Lígia Caroline Glória (EF/UFOP), Gabriela Prates Coelho (EF/UFOP), Prof.ª Flávia D. M. Marinho (EF/UFOP)

TÍTULO: Fermentação

OBJETIVOS

- Compreender o processo anaeróbico da fermentação
- Identificar o processo fermentativo em meios de cultura específicos

INTRODUÇÃO

A fermentação é caracterizada pela ausência de oxigênio. Os seres vivos anaeróbicos, utilizam a fermentação como forma de obtenção de energia para manutenção de sua sobrevivência, já alguns organismos aeróbios utilizam como uma alternativa para momentos de pouca disponibilidade de oxigênio.

As principais formas de fermentação realizadas pelos organismos decorrem do consumo da glicose ($C_6H_{12}O_6$) com a formação prévia de ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$) por meio da glicólise, conforme a equação:

$$CH_2OH(CHOH)_4CHO + 2\ ADP + 2P_i + 2\ NAD^+ \rightarrow 2\ CH_3COCOOH + 2\ ATP + 2\ NADH_2$$

Fermentação Alcoólica

Consiste na redução do ácido pirúvico a álcool etílico e ocorre conforme etapas I e II.

I. Ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$) é convertido a acetaldeído (C_2H_4O) por descarboxilação (CO_2), por meio da ação da enzima **piruvato descarboxilase**.

$$2\ CH_3COCOOH \rightarrow 2\ CH_3CHO + 2\ CO_2$$

II. Acetaldeído (C_2H_4O) é reduzido a álcool etílico (C_2H_5OH) por meio da ação da enzima **álcool-desidrogenase** e pelo NADH.

$$2\ CH_3CHO + 2\ CO_2 + 2\ NADH_2 \rightarrow 2\ CH_3CH_2OH + 2\ NAD^+$$

A equação balanceada da fermentação alcoólica a partir do ácido pirúvico é:

$$2\ CH_3COCOOH + 2\ NADH_2 \rightarrow 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2 + 2ATP$$

Fermentação Lática

Consiste na redução do ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$) a ácido lático ($C_3H_6O_3$) em uma única etapa, por meio da ação da enzima **desidrogenase lática**.

A equação balanceada da fermentação láctica a partir do ácido pirúvico é:

$$2\ CH_3COCOOH + 2\ NADH \rightarrow 2\ CH_3COHCOOH + 2\ NAD^+ + 2\ ATP$$

A fermentação lática é realizada por algumas espécies de bactérias, fungos, protistas e células animais (ex.: tecido muscular) quando o oxigênio é escasso. Dentre as bactérias, *Staphylococcus aureus, Salmonella thyphimurium* e *Escherichia coli* fermentam, respectivamente, manitol, xilose e lactose, produzindo ácido. Meios de cultura específicos são empregados, com base neste processo, para identificação destas espécies.

MATERIAL E EQUIPAMENTO

- 1 Alça bacteriológica
- 1 Agulha bacteriológica
- Bico de Bunsen
- 1 Caneta permanente
- Estufa bacteriológica mantida a 30 ºC a 35 ºC
- Isqueiro
- Jaleco
- Luva
- Máscara
- 1 Placa de petri contendo meio MacConkey
- 1 Placa de petri contendo meio Sal Manitol
- 1 Placa de petri contendo meio Xilose Lisina Desoxicolato
- 1 Tubo contendo ágar inclinado Tríplice Açúcar Ferro (TSI)
- 1 Tubo contendo *Escherichia coli*
- 1 Tubo contendo *Salmonella thiphymurium*
- 1 Tubo contendo *Staphylococcus aureus*

PROCEDIMENTO

I. Registrar na tabela da questão 3 do Relatório de atividades, as características da placa ou tubo disponível em sua bancada (cor, tipo).

II. Se for placa, com a caneta permanente, dividir o fundo da placa em quatro quadrantes.

III. Identificar um dos quadrantes da placa ou um dos tubos de ensaio com o número do seu GRUPO.

IV. Flambar até o rubro a alça bacteriológica, se placa, ou a agulha bacteriológica, se tubo.

V. Usar o dedo mínimo para remover a rolha do tubo contendo o microrganismo, disponível em sua bancada.

VI. Flambar a extremidade do tubo de ensaio na chama do bico de Bunsen.

VII. Coletar, com auxílio da alça bacteriológica ou agulha bacteriológica e sem encostar nas paredes do tubo, colônias do microrganismo.

VIII. Flambar a extremidade do tubo de ensaio contendo o microrganismo.

 IX. Fechar o tubo com a rolha presa pelo dedo mínimo, retornando-o para o suporte.

 Xa. Semear as colônias removidas, com a alça bacteriológica no quadrante da placa de Petri identificado com o número do seu grupo (ver Figura 1) ou,

 Xb. Introduzir com a agulha bacteriológica as colônias na base do meio de cultura do tubo e estriar a superfície inclinada do ágar (ver Figura 2).

 XI. Mudar de bancada.

 XII. Realizar os procedimentos descritos nos itens I a X, omitindo o item II.

 XIII. Mudar de bancada novamente.

 XIV. Realizar os procedimentos descritos nos itens I a X, omitindo o item II.

 XV. Mudar de bancada pela última vez.

 XVI. Realizar os procedimentos descritos nos itens I a X, omitindo o item II.

 XVII. Levar as placas e tubos para estufa bacteriológica a 35 ºC.

 XVIII. Posicionar as placas com as tampas voltadas para baixo.

 XIX. Incubar durante o tempo descrito na Tabela I.

 XX. Retirar as placas e tubos da estufa ao final do tempo descrito na Tabela I.

 XXI. Observar as características dos meios de cultura das placas e dos tubos.

 XXII. Realizar as atividades do relatório individualmente.

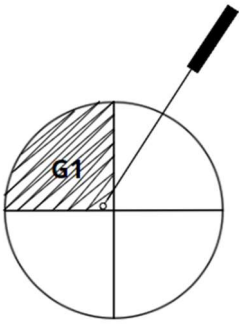

Figura 1

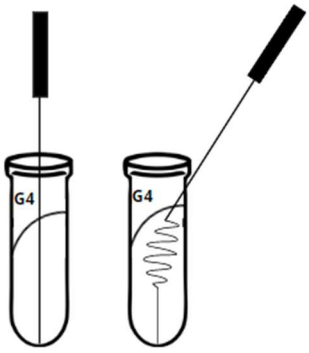

Figura 2

Tabela I – Meios de cultura e condições de incubação de acordo com o microrganismo

Microrganismo	Meio de cultura (ágar)	Tempo de incubação (horas)
Escherichia coli	MacConkey Tríplice Açúcar Ferro (TSI)	18 – 72 18 – 24
Staphylococcus aureus	Sal manitol	18 – 72
Salmonela thiphymurium	Xilose Lisina Desoxicolato Tríplice Açúcar Ferro (TSI)	18 – 48 18 – 24