

PROJETO MICROMAT

PROTOCOLO DE EXPERIMENTO

Normas de assepsia

1. Antes de iniciar o experimento, lave bem as mãos.
2. Higienize a bancada com álcool 70%.
3. Mantenha os cabelos presos.
4. Não leve qualquer material utilizado na bancada à boca.
5. Mantenha a bancada organizada, livre de materiais estranhos ao trabalho.
6. Mantenha todos os tubos e placas tampados, abrindo somente durante a manipulação e por um breve período de tempo.
7. Faça o descarte correto dos materiais conforme for instruído.

Experimento 1

Além das instruções escritas, disponibilizamos um [vídeo de demonstração do experimento](#).
NÃO DEIXE DE ASSISTIR.

1. **LAVE AS MÃOS!!!**
2. Cada grupo receberá 7 microtubos (6 contendo 900 µl de suspensão salina (0,9% NaCl) e 1 contendo 0,1 g de fermento biológico), 3 placas de Petri contendo meio YPD¹, 1 tubo Falcon contendo 10 ml de suspensão salina estéril, 3 alças de Drigalski, uma estante, uma micropipeta, uma caixa com ponteiras amarelas e canetas coloridas.
3. Sobre as placas de Petri (na face com o menor diâmetro), indique, usando uma caneta, as seguintes informações: Número do grupo e o valor correspondente à diluição de fermento que será plaqueada: 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} .
4. Na lateral dos microtubos, na parte fosca, marque com a caneta a diluição que será feita em cada microtubo (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}). Apoie-os na estante para microtubos, todos na mesma fileira.

¹Receita para 1 litro de meio: adicione 900 ml de água, 10 g de extrato de levedura, 20 g peptona e 10 g de ágar em um recipiente fechado. Após autoclavar, espere esfriar até que seja possível manusear o frasco sem o uso de luvas e acrescente 100 ml de glicose 20%.

5. Transfira para o tubo Falcon todo o conteúdo do microtubo que contém fermento.
6. Homogenize o conteúdo do tubo Falcon invertendo-o de 4 a 5 vezes. **IMPORTANTE: SE O CONTEÚDO DO TUBO FALCON NÃO FOR COMPLETAMENTE HOMOGENEIZADO, O EXPERIMENTO FALHARÁ!**
7. Retire a tampa do tubo Falcon utilizando o dedo mindinho, tomando cuidado para não tocar na borda do tubo. Em seguida, insira a ponteira na suspensão, puxe delicadamente 100 μl e feche o tubo. **Atenção: Nunca vire a micropipeta com a ponta para cima se estiver com líquido na ponteira.**
8. Em seguida, adicione 100 μl da suspensão de fermento no primeiro microtubo (diluição 10^{-1}) e deposite o conteúdo da micropipeta encostando a ponteira na lateral interna do microtubo. Feche a tampa do mesmo rapidamente e mude-o para a fileira da frente (ou de trás) da estante. **Descarte a ponteira da micropipeta. Atenção: a mudança de fileira dos microtubos serve para evitar erros.**
9. Para a segunda e as seguintes diluições, encaixe uma nova ponteira, aspire 100 μl do microtubo contendo a diluição anterior e transfira o volume total para o próximo microtubo na sequência de diluições. **SEMPRE homogenize antes de retirar o conteúdo com a micropipeta.** Repita o processo de diluições até transferir para o último microtubo.
10. Plaqueamento das diluições: comece pela diluição 10^{-6} . Homogenize bem o microtubo, aspire 100 μl do mesmo e deposite sobre o meio de cultura na placa de Petri marcada com 10^{-6} .
Cuidado para não perfurar a superfície do meio de cultura com a ponteira. Não deixe a placa de Petri completamente destampada, apenas uma abertura em ângulo de $30 - 45^\circ\text{C}$ é suficiente.
11. Com o auxílio da alça de Drigalski, espalhe o líquido delicadamente sobre o meio de cultura, não pressione demasiadamente. **IMPORTANTE: Espalhe até que o líquido tenha sido completamente absorvido.**
12. Repita os itens 9 e 10 para as diluições 10^{-5} e 10^{-4} . Teremos, no final, três plaqueamentos: diluição 10^{-4} , diluição 10^{-5} e diluição 10^{-6} .
13. Deixe as placas invertidas e incube na estufa a 37°C até que surjam colônias com pelo menos 1-2 mm de diâmetro (geralmente em até 36 h).
14. Na aula seguinte, conte as colônias das placas com o auxílio de uma caneta (útil para não contar a mesma colônia mais de uma vez).