

**MANUAL DE PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO**

**ECOFISIOLOGIA E CULTURA DE
ALGAS**

APRESENTAÇÃO

O laboratório de Ecofisiologia e cultura de Algas possui o objetivo de atender aos trabalhos de pesquisa na área de Ecofisiologia de algas continentais e aulas práticas na relacionadas à botânica. As linhas de pesquisa do laboratório são: Inventários de Biodiversidade, Levantamentos florísticos, Fisiologia de Algas Continentais, Sistemática de Algas Continentais e Ecofisiologia vegetal. As aulas atendem práticas da disciplina Fisiologia Vegetal e TCC.

O mesmo está localizado no Campus I da Universidade Católica de Brasília, no Bloco São Gaspar Bertoni, na sala M-309a. Conta com uma área total de 25,44 m², dividida em área de uso comum (com bancadas, pias, armários e mobiliário) e câmara de cultivo do tipo *Walk-in* (capela de fluxo laminar e estante com iluminação e fotoperíodo).

O laboratório dispõe de um banco de cultura de microalgas vivas, em meio líquido, sólido e em criopreservação. Conta com cerca de 20 espécies, provenientes de áreas de preservação do Cerrado.

ÍNDICE

1. OBJETIVO	5
2. RESPONSABILIDADES TÉCNICAS	5
2.1 CURSOS QUE UTILIZAM O LABORATÓRIO:	5
2.2 PESSOAS ENVOLVIDAS DIRETAMENTE COM O LABORATÓRIO:	5
3. NORMAS DO LABORATÓRIO	5
4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	6
5. PROCEDIMENTOS	6
5.1.1 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL - EPI	6
5.2 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA – EPC	7
5.3 HIGIENIZAÇÃO/DESINFECÇÃO	9
5.4 OPERAÇÕES DOS EQUIPAMENTOS.....	9
5.4.1 <i>Agitador de tubos</i>	9
5.4.2 <i>Agitador magnético</i>	9
5.4.3 <i>Agitador Magnético com Aquecimento</i>	9
5.4.4 <i>Autoclave</i>	9
5.4.5 <i>Ar-condicionado</i>	10
5.4.6 <i>Balança de precisão</i>	10
5.4.7 <i>Banho-maria ultra termostático</i>	10
5.4.8 <i>Capela de Exaustão de Gases</i>	11
5.4.9 <i>Centrífuga</i>	11
5.4.10 <i>Compressor de ar</i>	12
5.4.11 <i>Estufa Digital</i>	12
5.4.12 <i>Fluxo de ar unidirecional (com lâmpada UV)</i>	13
5.4.13 <i>Fluxo de ar unidirecional</i>	13
5.4.14 <i>Lupa Estereoscópica</i>	13
5.4.15 <i>Lupa Estereoscópica Leica com Câmara Clara</i>	14
5.4.16 <i>Medidor de pH</i>	14
5.4.17 <i>Medidor de umidade</i>	14
5.4.18 <i>Mesa agitadora orbital</i>	15
5.4.19 <i>Micro-centrífuga com refrigeração</i>	15
5.4.20 <i>Micro-ondas</i>	15
5.4.21 <i>Micropipeta de volume variável</i>	15
5.4.22 <i>Microscópios</i>	16
5.4.23 <i>Purificador de água por osmose reversa</i>	16
5.4.24 Refrigerador	17
5.5 TÉCNICAS REALIZADAS NO LABORATÓRIO	17
CULTURA DE ALGAS	17
5.5.1 <i>Isolamento de algas</i>	17
5.5.2 <i>Plaqueamento</i>	17
5.5.3 <i>Axenização de culturas</i>	17
5.5.4 <i>Isolamento de Cianófagos</i>	18
5.5.5 <i>Purificação de cianófagos</i>	18
5.5.6 <i>Marcação de cianófagos com SYBR Green 1 em microscopia confocal a laser*</i>	19
5.5.7 <i>Medidas por taxa de crescimento - com renovação de meio</i>	20
5.5.8 <i>Contagem de células na câmara de Neubauer</i>	20
5.5.9 <i>Teste de detecção de microcistinas por imunensaio</i>	21
5.5.10 <i>Quantificação de Superóxido Dismutase</i>	21
5.5.11 <i>Efeito da luz na germinação de sementes – prática de Fisiologia Vegetal</i>	21
CULTURA DE ACIDOBACTÉRIA	22
5.5.12 <i>Recuperação de Acidobactéria em Glicerol</i>	22
5.5.13 <i>Preparação de meio VL55 sólido</i>	23
5.5.14 <i>Preparação de meio VL55 líquido</i>	26
5.5.15 <i>Lavagem de células bacterianas para experimentos com nitrogênio</i>	27
CULTIVO AXÊNICOS DE MUSGOS (BRYOPHYTA)	28

5.6	COLETAS, ACONDICIONAMENTO E RECOLHIMENTO DOS RESÍDUOS	37
6.1	PLANO DE AVALIAÇÃO PERIÓDICA DOS ESPAÇOS	37
6.2	PLANO DE MANUTENÇÃO E GUARDA PATRIMONIAL	38
6.3	PLANO DE LIMPEZA E ORGANIZAÇÃO	38
6.4	PLANO DE ATUALIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS	38
6.5	AGENDAMENTO PARA AULAS PRÁTICAS	38
7.	CONDULTAS A SEREM ADOTADAS EM CASOS DE ACIDENTES.....	39
7.1	CONTATOS DE EMERGÊNCIA	39
8.	ANEXOS	39
	<i>MAPA DE RISCOS – LABORATÓRIO DE ECOFISIOLOGIA DE ALGAS. SALA M309-A (AINDA NÃO FOI FEITO UM NOVO MAPA DE RISCO).....</i>	<i>39</i>
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

EMISSÃO		Data: 16/12/2022
Elaboração: Kélita Lourrany Teixeira Santos	Assinatura ou Rubrica	Data:
Revisão:	Assinatura ou Rubrica	Data:
Aprovação:	Assinatura ou Rubrica	Data:

1. OBJETIVO

O laboratório de Ecofisiologia e cultura de Algas possui o objetivo de atender aos trabalhos de pesquisa na área de Ecofisiologia de algas continentais e aulas práticas na relacionadas à botânica. As linhas de pesquisa do laboratório são: Inventários de Biodiversidade, Levantamentos florísticos, Fisiologia de Algas Continentais, Sistemática de Algas Continentais e Ecofisiologia vegetal. As aulas atendem práticas da disciplina Fisiologia Vegetal e TCC.

2. RESPONSABILIDADES TÉCNICAS

2.1 Cursos que utilizam o laboratório:

Regularmente:

Ciências Biológicas e Pós- graduação em Biotecnologia

2.2 Pessoas envolvidas diretamente com o laboratório:

Coordenador do laboratório:

- Dr^a. Morgana Maria Arcanjo Bruno

Técnica:

- Kélita Lourrany Teixeira Santos

3. NORMAS DO LABORATÓRIO

- Não é permitida a presença de pessoas não autorizadas no laboratório.
- A chave do laboratório está na responsabilidade do técnico do laboratório e somente será liberada aos alunos e pesquisadores que tiverem autorização.
- É obrigatório o uso de EPI – *Equipamento de Proteção Individual* (jaleco, sapato fechado, e luvas sempre durante a realização de qualquer procedimento, além de



gorro e máscara caso se faça necessário) dentro do laboratório (Portaria da reitoria n° 143 NR06).

- d. Todos os alunos que utilizarem o laboratório devem ser orientados pelo professor e técnico quanto ao seu funcionamento antes do início das atividades no laboratório.
- e. É proibida a entrada e o consumo de qualquer tipo de alimento ou bebida dentro do laboratório.
- f. Após os procedimentos realizados no laboratório o aluno deverá deixá-lo limpo e organizado, e verificar se desligou todos os equipamentos que utilizou.
- g. Verificar sempre a toxicidade e inflamabilidade dos produtos com os quais se esteja trabalhando.
- h. Evitar trabalhar sozinho no laboratório.
- i. Comunicar ao técnico responsável sobre o mau uso de equipamentos e qualquer tipo de acidente ou conduta de risco que ocorra nas dependências do laboratório.

4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Linhas de pesquisa:

- Fisiologia e sistemática de algas continentais;
- Crescimento, fotossíntese e mecanismos de concentração de carbono em algas e macrófitas;
- Produção de toxinas em cianobactérias;
- Relações alelopáticas;
- Ecofisiologia vegetal;
- Banco de germoplasma;
- Criopreservação;

Aulas práticas:

- Fisiologia vegetal
Aula - Germinação de sementes

5. PROCEDIMENTOS

5.1.1 Equipamentos de Proteção Individual - EPI

5.1.2 Jalecos

- a. Os jalecos devem ser abotoados completamente para proteger sua roupa e corpo de respingos de reagentes. Escolha um jaleco que seja do seu tamanho, nem grande ou pequeno demais.
- b. Use sempre jaleco de manga longa e nunca a suba para ventilação ou conforto. Seu braço estará protegido. Outra coisa importante é comprar um jaleco que



tenha o punho justo com elástico para evitar que a manga entre em contato com contaminantes.

- c. NUNCA saia do laboratório vestindo o jaleco. Quando for tirá-lo sempre deixe no local apropriado e designado para guardá-lo. Não guarde os usados junto com os limpos.
- d. Deve ser confeccionado em tecido de algodão tratado, pois um eventual contato com o fogo acarreta numa combustão mais lenta.

5.1.3 Luvas

- a. Após o uso, retire a luva de uma das mãos puxando-a externamente sobre a mão, virando-a pelo avesso;
- b. Com a outra mão enluvada, segure a luva que foi retirada, e pela parte interna da luva que ainda está na mão, puxe-a externamente, virando pelo avesso;
- c. Descarte a luva em saco de lixo branco.

5.1.4 Máscaras/ respirador:

- a. Insira os filtros.
- b. Com uma das mãos segure a máscara, com a mão ajuste os elásticos atrás da cabeça.
- c. O respirador o protegerá contra pó, poeira, névoas ou resíduos que possam irritar as vias aéreas ou o aparelho respiratório.

5.1.5 Óculos de proteção

- a. Coloque os óculos de proteção no rosto.
- b. Os óculos o protegerão contra impactos de partículas voláteis e respingos de produtos químicos.

5.2 Equipamentos de Proteção Coletiva – EPC

5.2.1 Capela de exaustão

- a. Deve ser ligada antes da utilização e o vidro abaixado até cobrir o rosto do usuário.
- b. Após a utilização deverá ser desligada novamente.
- c. É um equipamento imprescindível, pois é o local ideal para o manuseio de produtos químicos ou particulados.
- d. Ao fazer operações nas capelas deve-se:
 - Abaixar o vidro até cobrir o rosto e ombros do usuário para sua proteção, não atrapalhando o movimento das mãos dentro do equipamento.
 - Deixar na capela apenas o material a ser analisado.
 - O sistema de exaustão da capela deve ser desligado, após 10 a 15 minutos do término dos trabalhos.
- e. Ao iniciar um trabalho em capela, observe se:
 - O sistema de exaustão está operando.
 - Pisos e janelas estão limpos.
 - As janelas estão funcionando perfeitamente.
 - Nunca inicie um trabalho que exija aquecimento sem antes remover os produtos inflamáveis. (<http://www.unifal-mg.edu.br/>)

5.2.2 Extintor de incêndio

- a. Procure um extintor apropriado para a classe do incêndio a ser combatido.
- b. Segure o extintor na posição vertical.
- c. Rompa o lacre.
- d. Retire o pino de segurança.
- e. Observe a posição do vento e fique a favor dele. Isso evita que a fumaça e o próprio extintor se tornem um empecilho.
- f. A distância ideal para o combate gira em torno de um metro.
- g. É claro que às vezes o ideal não é possível, então busque chegar mais o perto possível, dentro da proporção mencionada.
- h. Dirija o jato para a base do fogo (parte baixa do fogo), devem-se fazer movimentos como se estivesse varrendo o fogo.
- i. Em combustíveis líquidos o combate deve ser feito cobrindo o fogo, fazendo tipo uma nuvem de agente extintor.
- j. Aperte o gatilho até o fim.
- k. Ao terminar o combate, verifique se realmente as chamas foram completamente extintas.
- l. Esse cuidado é importante para evitar que fogo reinicie. Em alguns casos revirar parte das cinzas será necessário.

5.2.3 Frascos lava-olhos

- a. Puxe a mangueira que está conectada a tampa e direcionar aos olhos.
- b. Aperte o centro do frasco para que o jato de água seja impulsionado.

5.3 Higienização/Desinfecção

- a. O laboratório, incluindo o piso e suas bancadas, é limpo diariamente pelos colaboradores do serviço de limpeza e os lixos acondicionados em sacos pretos (lixo comum) e brancos (luvas, máscaras e eventuais itens usados em procedimentos laboratoriais) são recolhidos pelos mesmos.
- b. A sala da câmara de cultivo é limpa uma vez por semana com água sanitária no piso, paredes e prateleiras.
- c. As bancadas são limpas com álcool 70% no início e término dos experimentos e aulas.
- d. Os materiais utilizados são desinfetados e lavados ao término dos experimentos e aulas práticas, e se estiverem contaminados por fungos e/ou bactérias, são esterilizados pelo método de calor úmido na autoclave.

5.4 Operações dos equipamentos

5.4.1 Agitador de tubos

- a. Verificar a voltagem antes de conectar o aparelho à tomada.
- b. Ligar o interruptor localizado à esquerda.
- c. Botão da direita liga o agitador graduando a velocidade em frações de 1 a 9 e acionando o mecanismo de rotação.
- d. Para agitar a amostra, deve-se fazer uma leve pressão com o recipiente no vórtex.
- e. Após o uso desligar o interruptor.

5.4.2 Agitador magnético

- a. Verificar a voltagem antes de conectar o aparelho à tomada.
- b. O botão à esquerda liga o agitador graduando a velocidade em frações de 10 até 100 por cento.
- c. Após o uso, desligar o interruptor.

5.4.3 Agitador Magnético com Aquecimento

- a. Verificar a voltagem antes de conectar o aparelho à tomada.
- b. O botão da esquerda liga o agitador (a luz fica acesa indicando que o aparelho está em funcionamento), graduando a velocidade em frações de 10 até 100 por cento.
- c. O botão da direita liga o aquecedor (a luz também fica acesa indicando o uso da função “Aquecimento”), graduando a intensidade de calor em frações de 10 até 100 por cento.
- d. As duas funções podem ser usadas simultaneamente.
- e. Após o uso, desligar os interruptores (luzes apagadas) e se tiver utilizado a função “Aquecedor”, colocar aviso indicando que a superfície está quente.

5.4.4 Autoclave



- a. Verificar se a água está acima da resistência.
- b. NUNCA ligar com a água abaixo da resistência.
- c. Colocar o cesto e o material a ser autoclavado, além de deixar espaço entre os materiais, permitindo a circulação do vapor úmido.
- d. Não encher mais que $\frac{3}{4}$ da capacidade total do equipamento.
- e. Fechar as válvulas opostas.
- f. Ligar o botão até o valor máximo e aguardar que aqueça até começar a sair vapor na parte superior.
- g. Fechar a válvula de cima e aguardar a pressão subir até 120°C.
- h. Quando a pressão chegar a 120°C (aproximadamente 20 minutos) virar o botão para o valor mínimo e aguardar o tempo de esterilização (varia dependendo do material).
- i. Depois de decorrido o tempo de esterilização, desligar o botão e aguardar a pressão chegar a 0°C.
- j. Quando chegar a 0°C, abrir a válvula superior e aguardar esfriar para abrir.

5.4.5 Ar-condicionado

- a. Pressionar a tecla liga/desliga (ON/OFF) no controle remoto para colocar o aparelho em funcionamento. Ao ligar o aparelho o ícone indicador de funcionamento (OPERATION) (1) no visor da unidade interna acenderá. O aparelho iniciará seu funcionamento no modo AUTOMÁTICO.
- b. Tecla de seleção de modo (MODE) de funcionamento. Selecionar AUTO. Quando o aparelho for configurado no modo AUTO os modos REFRIGERAÇÃO, AQUECIMENTO (versões quente/frio) ou VENTILAÇÃO, são selecionados automaticamente conforme a temperatura ambiente.
- c. Tecla temperatura (TEMP): configurar a temperatura desejada, normalmente entre 17°C e 30°C.
- d. Tecla ON/OFF: pressionar a tecla para desligar o aparelho.

5.4.6 Balança de precisão

- a. Abrir uma das portas de vidro da cabine de pesagem, colocar o recipiente de pesagem no prato, fechar a porta de vidro novamente (quando se utilizar um recipiente).
- b. Esperar que o monitor se estabilize e pressionar a tecla [O/T] (tara). Aparecerá uma seta indicando estabilidade (→). O display irá indicar zero.
- c. Abrir a porta de vidro, colocar os itens a serem pesados no recipiente de pesagem e fechar a porta de vidro.
- d. Ler no visor a exibição da estabilidade do valor pesado.

5.4.7 Banho-maria ultra termostático



- O volume do tanque é de 11 litros.
- Tem função de aquecimento e resfriamento (faixa de temperatura entre -20°C e +120°C).

Procedimento de utilização:

- Verifique se a tensão da tomada disponível é a mesma do aparelho, a qual consta na etiqueta de identificação.
- Coloque o líquido no tanque antes de ligar o aparelho:
- Acima de 15°C, use apenas água destilada, osmoseificada ou deionizada.
- Para temperaturas próximas à do ponto de ebulição da água utilize apenas PROPILENOGLICOL (1,2 propanodiol).
- Para temperaturas abaixo de 15°C, adicione apenas álcool etílico (JAMAIS utilize álcool etílico para temperaturas acima de 15°C).
- *OPÇÃO: Caso prefira, pode utilizar outro fluido de termostatização (Fluido de silicone 20 cSt).
- Ligue o interruptor geral, localizado na parte traseira do aparelho.
- Ao colocar o líquido dentro do tanque, sempre encha até cobrir totalmente a serpentina de aço inox. Se for usar circulação externa, aguarde até que o líquido circular e preencha novamente com o líquido.
- O aparelho sai de fábrica com uma mangueira ligando a saída da bomba e o retorno em circuito fechado. Caso for utilizar a circulação externa, desconecte e ligue as mangueiras, use de preferência, tubo ou mangueira com isolamento.
- Ao ligar o aparelho, o compressor é acionado automaticamente e desligará quando for programada uma temperatura de trabalho acima de 50°C ou quando o aparelho for desligado. Portanto, se quiser manter o aparelho ligado mesmo sem uso, programe uma temperatura positiva para evitar o congelamento do líquido.
- Depois de verificados todos os itens escolha um modo de operação e proceda conforme funcionamento.

5.4.8 Capela de Exaustão de Gases

- Ligar o interruptor localizado no motor de exaustão acima da capela.
- O exaustor e a lâmpada são acionados posteriormente através dos dois interruptores localizados na frente da capela.
- Após o uso, limpar a capela e desligar os interruptores.

5.4.9 Centrífuga

- O visor é um hermeticamente fechado display LCD. Ele é operado por meio de dois botões rotativos e indica os estados de funcionamento.
- A centrífuga só pode ser utilizada quando a tampa estiver bem fechada. A tampa pode ser aberta apenas quando o rotor estiver parado. Se a tampa é aberta por meio do sistema de libertação de emergência durante o funcionamento, o centrifugador será imediatamente desligar e desacelerar.



Procedimento:

- a. Pressione o interruptor de rede no lado direito da parte da frente. Para fechar a tampa, pressione do lado esquerdo e direito da tampa, para garantir que, tanto a tampa de bloqueio estejam no lugar.
- b. A centrífuga estará pronta para funcionar quando a chave de ignição estiver acesa.
- c. Pressione a tecla de início para começar uma corrida de centrifugação.
- d. Para interromper uma execução de centrifugação, pressione a tecla de paragem. A corrida de centrifugação será encerrada prematuramente.
- e. Para interromper um processo de desaceleração, pressione a tecla de início durante um processo de desaceleração, a fim de interrompê-lo e reiniciar a centrifugação.
- f. O visor de centrífuga tem os campos de exibição a seguir: Hora, "Lock", Velocidade, RCF.
- g. A duração da centrifugação pode ser ajustada a diferentes intervalos em um intervalo de 10 segundos a 11 horas e 59 minutos.
- h. Para selecionar o tempo de centrifugação desejada: Rode o botão esquerdo rotativo até "set" aparece na parte inferior esquerda da tela. Selecione a opção pressionando ou girando o botão direito rotativo. "Set" começará a piscar.
- i. Rode o botão direito rotativo, até a duração desejada é exibida.
- j. Pressione o botão direito rotativo, a fim de confirmar a entrada. Se isso não for feito, o valor será zerado automaticamente para o último ajuste.
- k. É também possível alterar o tempo de execução durante a execução de centrifugação.

5.4.10 Compressor de ar

- a. Abrir totalmente o registro/regulador de pressão.
- b. Ligar o compressor através da chave de partida.
- c. Deixar o compressor trabalhar por 5 minutos.
- d. Fechar totalmente o registro/regulador de pressão para que o compressor encha o reservatório. O compressor desligará automaticamente, quando o manômetro indicar uma pressão máxima em torno de 8,3 barg (120 lbf/pol²).
- e. Abrir o registro para liberar o ar comprimido do interior do reservatório, fazendo a regulação da vazão de ar que precisa. O compressor religará automaticamente quando o manômetro indicar uma pressão em torno de 5,5 barg (80 lbf/pol²).

Nota: O registro/regulador de pressão deve ser utilizado da seguinte forma: Para aumentar a pressão de serviço, puxe e vire a manopla no sentido horário. Para diminuir esta pressão, gire a manopla no sentido anti-horário.

5.4.11 Estufa Digital

- a. Conectar o equipamento à tomada da rede elétrica na voltagem correta.
- b. Ligar a chave liga/desliga localizada no painel do equipamento.
- c. No display digital aparecerá a temperatura ambiente.

- d. Para se registrar uma nova temperatura, pressione a tecla 2 do menu por duas vezes. Aparecerá um valor piscando. Pressione a tecla 3 ajuste para mais, ou a tecla 4 ajuste para menos conforme o caso.
- e. Para registrar o tempo, pressione a tecla 2 por duas vezes aparecerá um valor piscando, pressione a tecla 3 ajuste para aumentar a temperatura, ou a tecla 4 para diminuir conforme o caso.
- f. Para se iniciar a contagem do tempo após serem registrados os valores, pressione a tecla 1 (início), soará um bipe, inicia-se a contagem do tempo, uma luz localizada no lado direito do display começa a piscar. Para se interromper a contagem do tempo, basta pressionar a tecla 1 (início).
- g. Ao atingir a temperatura de trabalho registrada pelo operador o seu equipamento emitirá 3 bips avisando que o seu equipamento está pronto para ser carregado.
- h. Ao se completar o tempo programado o equipamento emitirá um bipe por 120 segundos intermitentes, ou até apertar novamente a tecla início.
- i. Todos os valores referentes às funções, registrados no microprocessador, permanecerão inalterados até que se registrem outros valores, mesmo que o equipamento seja desligado.

5.4.12 Fluxo de ar unidirecional (com lâmpada UV)

- a. Antes de operar o equipamento deve-se seguir o seguinte procedimento de assepsia:
- b. Limpar as paredes internas e a superfície da área de trabalho com álcool 70%.
- c. Ligar o equipamento e a lâmpada germicida (UV), cobrindo a entrada da câmara de fluxo com papel pardo, deixe-a esterilizando por 15 minutos.
- d. Desligar a lâmpada germicida, ligar a fluorescente e opere normalmente.
- e. OBS: Se o fluxo possuir proteção de vidro, deve-se abaixá-la ao início da esterilização, e levantá-la ao término até a altura limite para poder trabalhar.
- f. Ao terminar o serviço, a superfície de trabalho e as laterais devem ser limpas com álcool 70%.

5.4.13 Fluxo de ar unidirecional

- a. Antes de operar o equipamento deve-se seguir o seguinte procedimento de assepsia:
- b. Ligar o equipamento, ligue a fluorescente, limpar as paredes internas e a superfície da área de trabalho com álcool 70% e operar normalmente.
- c. Ao terminar o serviço, a superfície de trabalho e as laterais devem ser limpas com álcool 70%.

5.4.14 Lupa Estereoscópica

- a. Verificar a voltagem antes de conectar o aparelho à tomada.
- b. Descobrir e dobrar a capa do aparelho.
- c. Nunca arraste a lupa, se preciso, levante-a.
- d. Ligar a lupa.



- e. Utilizar o macrométrico nas laterais para ajustar e focalizar.
- f. Após o término do serviço, desligar o aparelho.
- g. Desconectar o aparelho da tomada.
- h. Limpar a lupa.
- i. Cobrir o aparelho.
- j. Se ocorrer qualquer imprevisto, comunicar ao Professor ou Técnico responsável.

5.4.15 Lupa Estereoscópica Leica com Câmara Clara

- a. Conectar o cabo do estabilizador à energia.
- b. Ligar o estabilizador.
- c. Verificar se a fonte de luz está na intensidade mínima.
- d. Nunca arraste a lupa, se preciso, levante-a.
- e. Antes de ligar a fonte de luz, observe se irá utilizar a luminosidade externa ou interna da lupa.
- f. Desatarraxe o cabo óptico, condutor de luz e insira o que for utilizar.
- g. Após o uso, limpar a superfície da lupa.
- h. Voltar ao aumento mínimo.
- i. Abaixar a intensidade luminosa.
- j. Desligar a fonte de luz.
- k. Desligar o estabilizador.
- l. Desconectar a tomada do estabilizador da energia elétrica.
- m. Cobrir as oculares e a câmara clara.
- n. Em caso de imprevisto, favor comunicar ao docente responsável pelo projeto ou ao técnico responsável.

5.4.16 Medidor de pH

- a. Ligue o equipamento no botão ON/OFF e aguarde 10 minutos para estabilização.
- b. Caso a temperatura da solução seja a mesma da solução tampão, enxague a ponta do eletrodo com água destilada e enxugue-o com papel absorvente.
- c. Mergulhe o eletrodo na solução, o valor de pH da solução será mostrado automaticamente no display.
- d. Caso a temperatura da solução a ser medida seja diferente da solução tampão, faça com que as duas temperaturas fiquem equivalentes antes de iniciar a calibração.
- e. Após a calibração, o valor de pH da solução será mostrado automaticamente no display.
- f. O instrumento deverá ser recalibrado sempre que houver divergências nas temperaturas das soluções.

5.4.17 Medidor de umidade

- a. Inserir a sonda diretamente na esfera de raiz, ela não irá prejudicar a planta.

- b. Instantaneamente o seu medidor de umidade do solo vai lhe dar uma leitura precisa da umidade disponível para a planta.
- c. A bateria está inclusa no aparelho.
- d. É muito importante que a calibração do aparelho seja realizada no mesmo local do solo a que se destina a ser usado.

5.4.18 Mesa agitadora orbital

- a. Verificar a voltagem antes de conectar o aparelho à tomada.
- b. Para ligar o aparelho, utilize os interruptores que estão posicionados do lado esquerdo: o interruptor de cor vermelha liga o equipamento, o de cor verde aciona o mecanismo de rotação.

5.4.19 Micro-centrífuga com refrigeração

- a. Ligar o interruptor localizado na parte traseira e aperte o botão “Power”.
- b. Ajustar o programa de nº1 a 9, utilizando o botão de seleção do programa.
- c. É possível selecionar RPM ou RCF utilizando o botão “Mode”.
- d. Ajustar ou alterar o nível desejado de RPM ou RCF. O ajuste será acima ou abaixo em intervalos de 100 RPM em 100 rpm exibidos no painel.
- e. O ajuste do tempo será acima/abaixo do nível de intervalos de 10 em 10 segundos.
- f. Modo de execução Running: Ajusta o tempo desejado até 99 min 59 segs.
- g. Modo de execução Hold: Para tempo maior que 100 min.
- h. A temperatura pode ser ajustada também com o botão acima/abaixo.
- i. Após os ajustes estarem completos, apertar o botão “Enter” para armazená-los e em seguida o botão “Start” que a centrífuga iniciará o trabalho.

5.4.20 Micro-ondas

- a. Conecte o cabo elétrico em uma tomada padrão de 3 pinos (20 amperes).
- b. O prato giratório e a base devem sempre estar em seus devidos lugares durante o seu funcionamento.
- c. Feche a porta. Certifique-se de que a porta está devidamente fechada.
- d. A lâmpada permanece acesa quando o micro-ondas está em funcionamento ou quando a porta está aberta.
- e. Cada vez que uma tecla é pressionada, o equipamento emite um “bip” para informar que a função foi aceita.
- f. Ajuste e programar o tempo que deseja e pressione a tecla INICIAR, se desejar interromper o funcionamento, pressione a tecla CANCELAR.

5.4.21 Micropipeta de volume variável

- Trocar a ponteira antes de aspirar líquido, amostra ou reagente diferente;
- Pressionar e soltar o botão de modo lento e constante;



- NUNCA pipete líquidos onde a temperatura for superior a 70°C ou menor que 4 °C;
- NUNCA vire a pipeta de cabeça para baixo
- NUNCA deite a pipeta enquanto houver líquido na ponteira;
- NUNCA utilize graxa ou silicone no pistão ou selos
- NUNCA tente ajustar o volume acima da especificação

Procedimento para utilização:

- a. Colocar a ponteira na micropipeta. Pressionar o êmbolo até a 1ª posição e mergulhe no líquido a pipetar.
- b. Aspirar de modo controlado (se for demasiado rápido, poderão entrar bolhas de ar e a quantidade medida pode estar errada).
- c. Pressionar o êmbolo até a 2ª posição para expelir todo o líquido.
- d. Se for pipetar outro líquido diferente ou sujou a ponta da micropipeta, pode eliminá-la usando o ejetor de ponteiras.

5.4.22 Microscópios

- a. Verificar a voltagem antes de conectar o aparelho à tomada.
- b. Colocar o indicador de intensidade de luz em seu ponto mínimo.
- c. A mesa deve estar na posição mais baixa para colocação da lâmina.
- d. O objeto a ser observado deve ser colocado na lâmina, geralmente coberto por lamínula.
- e. Ajustar a posição da lâmina com os parafusos do charriot, até que a luz incida sobre o objeto.
- f. Colocar a lente objetiva de menor aumento (4X), em posição de uso, achar o foco utilizando o parafuso macrométrico.
- g. Nas demais lentes objetivas, achar o foco com o parafuso micrométrico.
- h. A objetiva de 100X deve ser usada somente com óleo de imersão. Após a observação, limpar o óleo da objetiva com papel absorvente macio e seco.

5.4.23 Purificador de água por osmose reversa

- a. Antes de ligar o purificador é necessário colocar um filtro com membrana na última carcaça (saída de água), na ponta da mangueira azul. Para colocar o filtro com membrana acople a mangueira à ponta larga do filtro, por onde a água deve entrar, deixando livre a outra ponta estreita do filtro por onde a água deve sair.
- b. Abra o registro de água de abastecimento e deixe circular pelo equipamento até que uma pequena quantidade saia pelo rejeito (mangueira laranja) na pia para descarte.
- c. Após esse procedimento, ligue o estabilizador (110V) onde está conectado o equipamento, a fim de acionar a bomba pressurizadora. Aguarde a produção de água tratada (mangueira azul). Ao término da coleta de água tratada pelo



Purificador (mangueira azul), desligue o equipamento da rede elétrica e feche o registro da água de abastecimento.

5.4.24 Refrigerador

- a. Verificar a voltagem antes de conectar o aparelho à tomada.
- b. Regular a temperatura desejada no pelo botão termostato.
- c. Para desligar, desconecte o plugue da tomada ou ajuste o botão do termostato para posição DESL.
- d. Sempre que desligar o refrigerador, aguarde dez minutos antes de religá-lo.

5.5 Técnicas realizadas no laboratório

Cultura de Algas

5.5.1 Isolamento de algas

Uma alíquota do material coletado é colocada em uma placa de Petri. O isolamento dos espécimes é realizado manualmente sob o microscópio estereoscópico e com o auxílio de pipetas Pasteur de vidro. Posteriormente, faz-se a diluição das massas algais e coleta por pelo menos cinco vezes consecutivas.

Após a triagem, as colônias são transferidas para tubos contendo meio de cultura próprios para algas de água doce.

O meio de cultura é trocado periodicamente em capela de fluxo laminar, com descarte de 40% do volume inicial.

As culturas são mantidas em câmara de cultura climatizada a 24°C, intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro.

5.5.2 Plaqueamento

As amostras isoladas em meio líquido podem ser plaqueadas em meio sólido com agarose 1% ou 2%. As amostras são espalhadas uniformemente com alça de Drigalski ou de platina que são previamente flambadas em lamparina. Após inoculação, as placas são vedadas com parafilme e identificadas com data do plaqueamento, local do material coletado, meio de cultura, concentração da agarose, espécie isolada e responsável pelo isolamento. As culturas são mantidas em estufa climatizada a 24°C, intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. O procedimento deve ser realizado em capela de fluxo laminar para evitar contaminação pelo meio externo.

5.5.3 Axenização de culturas



A axenização da cultura inicia-se com sua centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos. Após esse procedimento, despreza-se o sobrenadante e acrescenta-se detergente Extran 0,1% sobre o precipitado. A solução é então ressuspensa por meio de agitação em vórtex. Após nova centrifugação, descarta-se o sobrenadante e acrescenta-se solução de azida sódica 0,05 mM (NaN_3 , Controlec Química Fina) diluída em meio de cultura. A cultura é mantida em câmara de cultivo por 24h, procedendo-se a nova centrifugação e lavagem, utilizando-se meio de cultura. Uma vez axenizada, as culturas devem mantidas em aeração fraca, proveniente de ar comprimido de bomba de aquário.

5.5.4 Isolamento de Cianófagos

A água com o inóculo é centrifugada em baixa rotação 3.000 rpm por 10 minutos para remoção de zoo e fitoplâncton. Logo em seguida, o sobrenadante é centrifugado novamente a 33.000 rpm por 60 minutos para a precipitação de partículas virais. O precipitado é ressuspensa em 2 mL de água destilada em tubos do tipo eppendorf, formando uma solução. Esta solução deverá ser mantida no gelo até o processo de filtração em filtro de membrana de 0,22 μm estéril para eliminação de bactérias.

Preparação das Placas para Inoculação dos Vírus - Espalhamento por cima, com solução de vírus e cianobactérias juntos:

Este método é uma modificação daquele descrito por Manage *et al.* (2001). Aliquotas de vírus filtrado 500 μL são misturadas a uma cultura de cianobactérias previamente centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos em concentração de 2×10^8 células totalizando 2 mL. Essa mistura é incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, de forma a incentivar a adsorção dos cianófagos. Posteriormente, a solução é vertida sobre uma placa de Petri, previamente preparada com uma camada de agarose 2% solidificado. Após inoculação, as placas são vedadas com parafilme e identificadas com data do plaqueamento, método utilizado, meio de cultura, concentração do Agar e responsável pelo isolamento. As placas devem ser mantidas em câmara de cultivo climatizada a 23°C, intensidade luminosa de 50 μmol s de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. As placas devem ser observadas diariamente até o surgimento dos primeiros halos, sendo fotografadas antes e depois da formação destas estruturas.

* Os procedimentos de isolamento de cianófagos em placa devem ser realizados em capela de fluxo laminar para evitar contaminação pelo meio externo.

5.5.5 Purificação de cianófagos

Cada um dos halos formados deriva, em teoria, de uma única partícula viral. Assim, para darmos continuidade ao processo de isolamento, procede-se da



seguinte forma: primeiro, remove-se vários fragmentos de agarose das regiões lisadas de uma placa com uma ponteira de pipeta automática, concentrando-os em um tubo do tipo eppendorf, em 500 μ L de meio de cultura formando uma solução concentrada com fragmentos de agarose provenientes de vários halos, visando assim a obtenção de um estoque de halos para isolamentos futuros; segundo, remove-se a agarose de apenas um halo, sendo este ressuspendido em 500 μ L de meio de cultura em tubos do tipo eppendorf, obtendo-se assim uma diluição da amostra para nova inoculação em placa, visando o isolamento de uma cepa viral; a seguir, as amostras são homogeneizadas (vórtex) e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante de cada amostra é removido e filtrado em filtro de 0,22 μ m estéril. Alíquotas de 100 μ L do filtrado são ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura e utilizadas para inocular novas placas. A partir do surgimento de vários halos provenientes de apenas um halo é possível obter-se a titulação da amostra.

5.5.6 Marcação de cianófagos com SYBR Green 1 em microscopia confocal a laser*

Em tubo de polipropileno de 15 ml autoclavado, filtrar 10 mL de água coletada e contaminada por cianófitos e reservar. Diluir de 1 μL da solução estoque de SYBR Green 1 em 1.250 μL de solução tampão TBE (Tris/Borato/EDTA - 89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico e 1 mM EDTA, pH 8.0), em tubo do tipo Eppendorf. Enrolar o tubo em papel alumínio e encubar por 15 minutos em temperatura ambiente. Dessa solução pronta, remover 30 μL para cada 1 mL de água filtrada e manter no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente para a coloração dos vírus. Após este procedimento, a água contendo os vírus corados será inoculada às células de cianobactérias na seguinte proporção: 1 mL de água com vírus corada com SYBR Green: 1 mL de cultura de cianobactéria em crescimento exponencial (4×10^6 cel/ml):3 mL de meio de cultura totalizando 5 mL.

Incubar a amostra sob intensidade luminosa de 12 μm fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a temperatura ambiente, até sua observação em microscópio de fluorescência. Para a preparação das lâminas, utilizar uma solução de montagem contendo ácido ascórbico 0,5% e Glicerol 50% e uma alíquota da amostra com vírus e células de cianobactéria.

É importante fazer as observações diariamente para analisar o tempo de infecção e a possível multiplicação dos cianófitos no interior das células.

A observação deve ser realizada em microscópio confocal a laser, utilizando fonte de laser 405 nm para visualização das amostras de cianobactérias e para visualizar cianófitos corados com SYBR Green 1 em células infectadas deve-se utilizar fonte de laser Argon e espectro com emissão 480-530 nm.

*Os procedimentos devem ser realizados na penumbra.

5.5.7 Medidas por taxa de crescimento - com renovação de meio

A cultura devem ser previamente tratada com Extran 0,1% e azida sódica para descontaminação. A concentração inicial normalmente é de 5×10^4 células/ml, em triplicatas. O tempo de experimento é de 3 a 4 semanas. A contagem de células deve ser realizada a cada dois dias na câmara de Neubauer, antes e após da renovação do meio de cultura. A cada 5 dias deve ser realizada a substituição de 30% do volume da amostra por meio de cultura por meio novo. As culturas devem ser mantidas em estufa climatizada a 24°C, intensidade luminosa de 50 μmol s de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro.

5.5.8 Contagem de células na câmara de Neubauer



- a. Remover 500 µl de cultura de cada frasco;
- b. A este volume acrescentar a mesma quantidade de lugol, de forma a melhorar a visualização das células na câmara de Neubauer;
- c. O número de células por mililitro de solução de cultivo é calculado contando-se as células presentes em 5 quadrantes da câmara de Neubauer;
- d. Depois multiplica-se o valor por 50.000 – levando-se em consideração o volume da amostra;
- e. Este valor é ainda duplicado, pois a amostra encontra-se diluída em lugol;
- f. A taxa de crescimento é avaliada de acordo com a fórmula:

5.5.9 Teste de detecção de microcistinas por imunensaio

Macerar as células em nitrogênio líquido e ressuspendidas em 2 mL de solução tampão TPS 50mM em tubo Falcon. Depois, são centrifugadas a 10000rpm, a 4°C por 10 minutos. Nas placas de reação são adicionados, em cada poço, 50µL da solução padrão, do controle e as amostras, 50µL da solução anticorpo em cada tubo. A solução é incubada por 90 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, agitar a placa e lavá-la por três vezes com solução de lavagem, utilizando uma pisseta. Deixar a placa escorrendo por 2 minutos invertidas no papel toalha. Bater a placa sobre o papel toalha para secagem da placa. Depois disso, acrescentar 50µL do conjugado de enzima nos poços utilizando uma pipeta multicanal. Homogeneizar em mesa agitadora de bancada por 30 segundos. Incubar a placa por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois desse período, proceder à lavagem, como descrito anteriormente. Acrescentar 50µL do substrato/corante em cada um dos poços com a pipeta multicanal. Cobrir a placa com papel alumínio e incubá-la de 20 a 30 minutos em temperatura ambiente. Adicionar 50µL da solução de paragem em cada poço. Ler a absorbância em 450nm.

5.5.10 Quantificação de Superóxido Dismutase

Poços com SOD padrão: Em cada poço, adicionar 200µl de solução de detecção de radical. Fazer duplicatas para cada diluição (A1, A2 ...G1, G2) Adicionar ordenadamente em cada poço, 10µl de cada SOD padrão diluída (A a G) nas diferentes concentrações. Finalmente, acrescentar em cada poço, 20µl de xantina oxidase.

Poços com amostras: Em cada poço, adicionar 200µl de solução de detecção de radical. Fazer duplicatas para cada amostra. Acrescentar 10µl de amostra em cada poço. Finalmente, acrescentar em cada poço, 20µl de xantina oxidase. Deixar em agitação por 20minutos. Realizar a leitura da placa entre 440 e 460nm.

5.5.11 Efeito da luz na germinação de sementes – prática de Fisiologia Vegetal



O objetivo desta prática é verificar o efeito da luz vermelha e vermelha extrema, na germinação de sementes de várias espécies de hortaliças.

Metodologia. Distribuir 10 sementes de *Leucaena* (*Leucaena* sp.) escarificadas com lixa em cada placa. Uma placa será montada para cada um dos seguintes tratamentos:

- a) luz branca: uma placa com sementes sobre papel de filtro umedecido, expostas a luz incandescente contínua;
- b) escuro: uma placa coberta com papel alumínio;
- c) luz vermelha: uma placa coberta com 4 camadas de papel celofane vermelho e expostas à luz fluorescente por 30 minutos; em seguida embrulhar em papel alumínio;
- d) luz vermelha extrema: uma placa coberta com 4 camadas cada de papel celofane vermelho e azul colocados frente à luz incandescente por 30 minutos; em seguida embrulhar em papel alumínio.

Diariamente, o número de sementes germinadas (mostrando a radícula com um mínimo de 5 mm de comprimento) deverá ser anotado.

Cultura de Acidobactéria

Professora Responsável: Cristine Chaves Barreto

5.5.12 Recuperação de Acidobactéria em Glicerol

Objetivo: Recuperar bactérias guardadas em estoque de glicerol, para cultivos e experimentos.

Aplicação: Resgate, cultivo e ativação do metabolismo microbiano. Deve-se recuperar imediatamente as culturas descongelando e subsequentemente transferindo ao meio de crescimento adequado. Todas as culturas devem ser consideradas potencialmente perigosas e/ou sensíveis e devem ser abertas por indivíduos treinados em técnicas microbiológicas que trabalhem em instalações com requisitos de contenção apropriados para o nível de biossegurança das culturas. Os ciclos subsequentes de congelamento e descongelamento reduzem a vida útil do microrganismo

Execução:

- a) Ligar o fluxo meia hora na UV. Após este tempo, limpe bem o fluxo com lisofórmio, e deixe mais meia hora na UV. TODOS os procedimentos devem ser realizados em ambiente estéril e materiais devidamente autoclavados.



- a) Obter o criotubo do ultrafreezer e colocá-lo imediatamente em gelo. O descongelamento será rápido; aproximadamente 2 minutos ou até que todos os cristais de gelo tenham derretido.
- b) Em fluxo laminar, abrir o tubo
- c) Usar ponteira estéril para inocular 400ul de bactéria, em 5 mL de meio líquido VL-55 contendo xilana como fonte de carbono (a 0,05%).
- d) Paralelamente, inocule em placa, gota 10 μ L (4 por placa preferencialmente) em meio VL-55 sólido contendo xilana como fonte de carbono (0,05%).
- e) Devolva o tubo no mesmo lugar na caixa de onde foi retirado.
- f) Adicionar os tubos a caixa apropriada para o ultrafreezer. (caso tenha sobrado, mas recomenda-se não congelar novamente).
- g) Reportar o repique executado na planilha de armazenamento
- h) Guarde as culturas inoculadas na condição de crescimento, tempo e temperatura adequada à espécie, aproximadamente 30° C em uma estufa BOD.

Observações:

- Nunca retire o tubo do gelo.
- Evite a técnica de esgotamento em placa ao retirar do glicerol, Acidobactéria cresce melhor em alta densidade celular, utilize esta técnica para um inóculo posterior para análise de possíveis contaminações.
- Se estiver trabalhando com Acidobactéria, o meio ideal para o resgate de culturas é sempre VL-55 com Xilana, de preferência líquido.
- algumas cepas bacterianas podem exibir uma fase de latência prolongada. Estas cepas podem exigir uma extensão no período de incubação.

5.5.13 Preparação de meio VL55 sólido

Objetivo: Preparação de meio de cultura quimicamente definido VL-55 sólido para cultivo de Acidobactéria

Aplicação: Resgate, cultivo e ativação do metabolismo microbiano em meio quimicamente definido, apropriado para os estudos de fisiologia de Acidobactéria. Esse meio requer a preparação separada da solução de sais e da solução solidificante a mistura ocorre na cabine de segurança biológica (antes de começar, veja o fluxo de preparação em observações).



Execução:

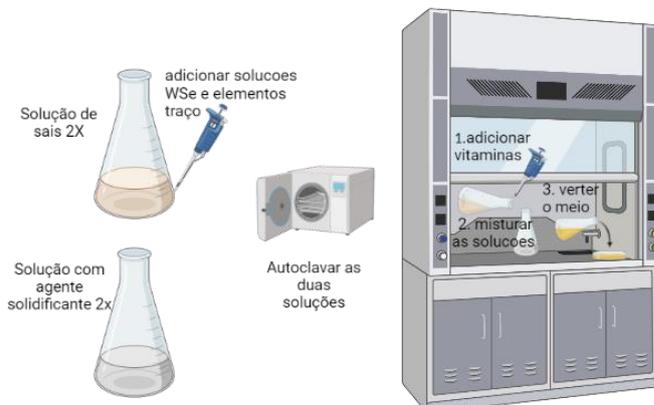
- a) Preparar a solução de sais 2X (duas vezes concentrada) e a solução com agente solidificante 2X em dois Erlenmeyer, separadamente. A receita a seguir é para se preparar 1 L de meio.
- b) Preparar 500 mL (½ do volume final desejado) de solução de sais 2X de acordo com a receita:
 - MgSO₄ 0,4 mM
 - (NH₄)HPO₄ 0,4 mM
 - CaCl₂ 0,6 mM
 - MES 3,9 g/L (usar a balança)
- c) Caso for preparar volumes menores que 1L, usar “regra de três” para o cálculo de MES: quantidade a ser pesada em g = (g por litro x volume a ser preparado) / (1000 mL).
- d) Diluir os reagentes líquidos de acordo com a fórmula $C_i \times V_i = C_f \times V_f$. A concentração inicial é 1000 mM (soluções estoque, preparação no POP AcB03), a concentração final é o da receita no item 4.2. O volume final é o volume a ser preparado e o volume inicial é o que deve ser calculado.
- e) Colocar metade do volume final de água em um Becker contendo uma barra magnética, por exemplo, para preparar 500 mL adicione 250 mL de água.
- f) Colocar o Becker em agitador magnético e iniciar a agitação em temperatura ambiente.
- g) Adicionar os reagentes, um a um, ao Becker contendo a água.
- h) Após a completa dissolução de todos os reagentes ajustar o pH para 5,5. O uso do pHmetro está em instrução técnica ao lado do equipamento.
- i) Usar uma proveta para completar o volume final desejado com água destilada.
- j) Adicionar o volume da solução da proveta ao Erlenmeyer. Esse Erlenmeyer deve ter o dobro da capacidade do volume final do meio. Caso seja necessário, dividir o volume final em vários frascos com volumes iguais.
- k) Adicionar a fonte de carbono: xilana 0,05% OU lactose 0,05% (ou seja, 0,5 g por L desejado – adicione essa quantidade em 500 mL da solução de sais 2X).
- l) Adicionar 2 mL/L de solução de tungstato e selenito
- m) Adicionar 2 mL/L de solução de elementos traço.
- n) .
- o) Feche o frasco, deixando a tampa frouxa para passagem do ar quente (pode usar uma bucha de algodão, mas não use papel de alumínio).
- p) Identifique o frasco com o nome do meio de cultura, seu nome e data da preparação.
- q) Preparar 500 mL de solução com agente solidificante 2X adicionando 1,5 % de ágar nobre (15 g) OU 0,8% de gelana (8 g) diretamente em um Erlenmeyer. Esse Erlenmeyer deve ter o dobro da capacidade do volume final do meio. Caso seja necessário, dividir o volume final em vários frascos com volumes iguais.
- r) Repetir as instruções dos itens 4.14 e 4.15 para a solução com agente solidificante 2X
- s) Proceder a esterilização do meio de cultura em autoclave (IT - PPCGB 02) de acordo com a instrução de trabalho ao lado do equipamento.



- t) Ligar e preparar a cabine biológica, a instrução técnica está ao lado do equipamento.
- u) Esperar as soluções estéreis chegarem à temperatura próxima 37°C.
- v) Usar a cabine biológica (IT - PPCGB 01) para adicionar 2 mL/L de solução de vitaminas (Wolfe's) à solução de sais 2X.
- w) Imediatamente misturar as duas soluções em um dos frascos, em geral adicionamos a solução de sais no frasco de solução com agente solidificante. Se a temperatura da solução de sais estiver muito baixa (por exemplo, na temperatura ambiente), o meio irá solidificar no próprio frasco e o procedimento deve ser interrompido e recomeçado do início. É importante manter as duas soluções em temperatura entre 37 – 45°C.
- x) Ainda na cabine de segurança biológica, distribua aproximadamente 20 mL do meio em cada placa de Petri. Aguarde o meio solidificar e armazene as placas em temperatura ambiente. Inocule as placas em um período máximo de 1 mês

Observações:

- Solução estoque de $MgSO_4$ 1 M. Se usar $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$. $PM=138,38$. $1M = 246,47$ g/L. Preparar 100 mL dissolvendo 24,65 g. Esterilizar em autoclave e armazenar na bancada.
- Solução estoque de $(NH_4)HPO_4$. Se usar $(NH_4)HPO_4 \cdot 4 H_2O$. $PM=209,07$. $1M = 209,07$ g/L. Preparar 100 mL dissolvendo 20,91 g. Esterilizar em autoclave e armazenar na bancada.
- Solução estoque de $CaCl_2$. Se usar $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$. $PM = 147,01$. $1M = 147,01$ g/L. Preparar 100 mL dissolvendo 14,70 g. Esterilizar em autoclave e armazenar na bancada.
- Como na preparação de meio sólido requer mistura de duas soluções, opte por fazer volumes menores de meio, como 500 mL usando frascos de 1 L para a solução de sais (contendo 250 mL de solução 2X) e para solução contendo agente solidificante (contendo 250 mL de solução 2X). Dessa forma será mais fácil misturar as duas soluções em um mesmo frasco. Esse procedimento deve ser realizado para que o ágar não seja degradado no processo de esterilização em solução com baixo pH.
- $CaCl_2$ é importante para solidificar o meio com gelatina, dependendo da marca comprada será preciso adicionar o dobro desse volume. Faça um teste de “solidificação” antes de usar um novo frasco desse reagente.
- Para o cultivo de Acidobactéria não armazenamos as placas em geladeira, mas em temperatura ambiente por dois motivos: observar contaminação ocorrida durante a preparação das placas e utilizar sempre meio fresco para o cultivo. Portanto, planejamento do número de placas por experimento é essencial, estima 20 mL de meio para cada placa.
- DSMZ meio 1266 é o meio VL-55, mas há diferenças com a nossa receita. O meio se chama VL-55 pois o pH é 5,5.
- Fluxo de preparação do meio VL-55 sólido



Created in BioRender.com 

5.5.14 Preparação de meio VL55 líquido

Objetivo: Preparação de meio de cultura quimicamente definido VL-55 líquido para cultivo de Acidobactéria

Aplicação: Resgate, cultivo e ativação do metabolismo microbiano em meio quimicamente definido, apropriado para os estudos de fisiologia de Acidobactéria.

Execução:

- a) Preparar a solução de sais de acordo com a receita
 - $MgSO_4$ 0,2 mM
 - $(NH_4)HPO_4$ 0,2 mM
 - $CaCl_2$ 0,3 mM
 - MES 1,95 g/L (usar a balança)
- b) Caso for preparar volumes menores que 1L, usar “regra de três” para o cálculo de MES: quantidade a ser pesada em g = (g por litro x volume a ser preparado) / (1000 mL).
- c) Diluir os reagentes líquidos de acordo com a formula $C_i \times V_i = C_f \times V_f$. A concentração inicial é 1000 mM (soluções estoque), a concentração final está na receita. O volume final é o volume a ser preparado e o volume inicial é o que deve ser calculado.
- d) Colocar metade do volume final de água em um Becker contendo uma barra magnética, por exemplo, para preparar um litro, usar 500 mL de água.
- e) Colocar o Becker em agitador magnético e iniciar a agitação em temperatura ambiente.
- f) Adicionar os reagentes, um a um, ao Becker contendo a água.
- g) Após a completa dissolução de todos os reagentes ajustar o pH para 5,5. O uso do pHmetro está em instrução de trabalho (IT) ao lado do equipamento.
- h) Usar uma proveta para completar o volume final desejado com água destilada.
- i) Adicionar o volume da solução da proveta ao Erlenmeyer. Esse Erlenmeyer deve ter o dobro da capacidade do volume final do meio. Caso seja necessário, dividir o volume final em vários frascos com volumes iguais.

- j) Adicionar a fonte de carbono: xilana 0,05% OU lactose 0,05% (ou seja, 0,05g para cada 100 mL).
- k) Adicionar 2 mL/L de solução de tungstato e selenito
- l) adicionar: 2 mL/L de solução de elementos traço
- m) Feche o frasco, deixando a tampa frouxa para passagem do ar quente (pode usar uma bucha de algodão, mas não use papel de alumínio).
- n) Identifique o frasco com o nome do meio de cultura, seu nome e data da preparação
- o) Proceder a esterilização do meio de cultura em autoclave de acordo com a instrução de trabalho (IT - PPCGB 02) ao lado do equipamento.
- p) Ligar e preparar a cabine biológica (IT - PPCGB 01), a instrução de trabalho está ao lado do equipamento.
- q) Esperar a solução de sais estéril chegar à temperatura próxima 37 oC.
- r) Usar a cabine biológica para adicionar 2 mL/L de solução de vitaminas (Wolfe's).

Observações:

- Solução estoque de $MgSO_4$ 1 M. Se usar $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ $PM=138,38$. $1M = 246,47$ g/L. Preparar 100 mL dissolvendo 24,65 g. Esterilizar em autoclave e armazenar na bancada.
- Solução estoque de $(NH_4)HPO_4$. Se usar $(NH_4)HPO_4 \cdot 4 H_2O$ $PM=209,07$. $1M = 209,07$ g/L. Preparar 100 mL dissolvendo 20,91 g. Esterilizar em autoclave e armazenar na bancada.
- Solução estoque de $CaCl_2$. Se usar $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ $PM = 147,01$. $1M = 147,01/L$. Preparar 100 ml dissolvendo 14,70 g. Esterilizar em autoclave e armazenar na bancada.
- DSMZ meio 1266 é o meio VL-55, mas há diferenças com a nossa receita

5.5.15 Lavagem de células bacterianas para experimentos com nitrogênio

Métodos:

- a) Todos os procedimentos devem ser realizados com materiais estéreis em ambiente estéril (capela de fluxo laminar)
- b) Adicionar 0,5 mL de solução de lavagem estéril em uma placa contendo as 4 colônias de Acidobacteria;
- c) Usar uma alça de Drigalsky estéril para remover as células da placa por raspagem;
- d) Usar uma micropipeta de 1 mL para coletar o líquido contendo as bactérias. Aspire com cuidado para não entupir a ponteira e causar uma aspiração descontrolada sujando a pipeta.
- e) Adicionar à solução contendo as bactérias em tubos eppendroffs estéreis (de 1,5 ml ou 2 ml);
- f) Vortexar por 10 segundos e centrifugar a 5000 rpm por 5 min;
- g) Remover o sobrenadante e adicionar 0,5 mL de solução de lavagem estéril;
- h) Repetir a etapa 5 (vortexar e centrifugar)
- i) Repetir a etapa 6 Remover o sobrenadante e adicionar 0,5 mL de solução de lavagem estéril.
- j) Completar o volume para 1 mL de solução de lavagem;



k) Usar essa suspensão para inocular novas placas pelo método de gotas

Cultivo axênicos de musgos (Bryophyta)

Professor Responsável: Marcelo Henrique Soller Ramada

5.5.16 Preparação de meio de cultura BCD

Preparar soluções-estoque dos macro- e micronutrientes nas seguintes concentrações:

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 127 g/L
- KH_2PO_4 : 125 g/L *
- KNO_3 : 101 g /L
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 73,5 g/L

Micronutrientes:

- H_3BO_3 : 614 mg/L
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 55 mg/L
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 389 mg/L
- $CoCl_2 \cdot 6H_2O$: 55 mg/L
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 55 mg/L
- KI: 28 mg/L
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$: 25 mL

* regular o pH de KH_2PO_4 para 6.5 com uma solução de pelo menos 4M KOH

Após a preparação das soluções estoque supracitadas, autoclavar e armazenar em geladeira (4°C).

Para preparar 1L do meio de cultura BCD, adicionar 800 mL de H₂O destilada em um béquer e misturar as soluções-estoque na proporção apresentada no quadro abaixo:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 mL
KH_2PO_4	2 mL
KNO_3	10 mL
Micronutrientes	1mL

Em seguida, adicionar 12.5 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, solubilizar o composto e completar o volume para 1L com o auxílio de uma proveta e transferir todo o volume para um Erlenmeyer.

Pesar 8g de ágar e adicionar ao Erlenmeyer

Fechar o Erlenmeyer com papel laminado e papel filme e autoclavar

Retirar o meio da autoclave e esperar resfriar



Após este período, suplementar com 2 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ verter o meio de cultura em placas de Petri descartáveis e armazenar a temperatura ambiente

5.5.17 Pré-cultivo de musgos coletados

- a) Selecionar coletas de musgo realizadas anteriormente e retirar uma porção para a realização de pré-cultivo
- b) Depositar a porção retirada em uma placa de Petri de vidro e, com auxílio de uma pinça, realizar uma inspeção para retirada de possíveis contaminantes (ex. espécies não-alvo)
- c) Após este processo, fracionar o musgo com auxílio de uma espátula ou bisturi, coletando apenas a porção verde do gametófito, tomando cuidado para não danificar o material por completo
- d) Para realizar a lavagem do material, transferir a porção fracionada para uma peneira e depositar em um béquer de 600 mL (ou maior) contendo água destilada e manter sob agitação por 5-10 minutos.
- e) Após este período, descartar a água e realizar a lavagem por, no mínimo, mais uma vez.
- f) Retirar o material vegetal e separá-lo em uma nova placa de Petri de vidro.
- g) Em um fluxo laminar, secar o individualmente cada um dos gametófitos com papel filtro autoclavado e depositar em uma placa contendo meio BCD.
- h) Repetir este procedimento até que a placa contenha um total de 10 gametófitos (caso seja necessário, fazer mais uma placa com esta configuração).
- i) Transferir a placa de pré-cultivo para a câmara de cultivo à 20-25°C
- j) Observar o surgimento e desenvolvimento de novos gametófitos por, no mínimo, 4-6 semanas.
- k) Em caso de sucesso, selecionar os novos gametófitos para a realização da descontaminação de material vegetal.

5.5.18 Descontaminação de gametófitos de musgos e acompanhamento

- a) Limpar o fluxo laminar com álcool 70% (v/v) em abundância e ligar a UV por 30 minutos.
- b) Separar material a ser descontaminado (em caso de amostras *in situ*, realizar protocolo de lavagem conforme indicado no item acima e separar apenas a porção apical de cada gametófito. Já, para amostras advindas de pré-cultivo, apenas reservar a placa selecionada).
- c) Preparar a (as) solução (ções) de hipoclorito de sódio (NaClO) ou Dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) nas concentrações desejadas.
- d) No fluxo laminar, separar alíquotas da solução de descontaminação em tubos do tipo eppendorf de 2 mL previamente autoclavados. Com auxílio de uma pinça, transferir um gametófito de forma individual para um tubo contendo a solução descontaminante e manter sob agitação constante por 2 minutos.
- e) Após este período, descartar todo o sobrenadante e adicionar 2 mL de água destilada autoclavada e agitar pelo mesmo período. Repetir este passo por, no mínimo, mais uma vez.



- f) Remover o gametófito do tubo com o auxílio de uma pinça previamente flambada e depositá-lo em uma placa de Petri de vidro contendo papel filtro autoclavado.
- g) Aguardar até que o material vegetal seque e fracioná-lo em 2-3 explantes por meio da utilização de uma espátula ou bisturi (previamente autoclavados e flambados)
- h) Transferir os explantes para uma placa de Petri contendo o meio BCD e armazenar a placa em câmara de crescimento.
- i) Observar o desenvolvimento dos explantes e contaminação por, no mínimo, 4 semanas.
- j) Após este período, transferir uma porção do material vegetal para um novo meio de cultura e para controle de contaminação com meio LB e BCD + 1% sacarose.
- k) Observar controles por 4 semanas e inspecionar para a presença de contaminantes.
- l) Caso não seja observado o crescimento de contaminantes, este material será considerado axênico.

5.5.19 Descontaminação de esporófitos de musgos

- a) Limpar o fluxo laminar com álcool 70% (v/v) em abundância e ligar a UV por 30 minutos.
- b) Separar material a ser descontaminado (esporófitos) e lavar em água abundante (fora do fluxo)
- c) Preparar a (as) solução (-ções) de hipoclorito de sódio (NaClO) ou Dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) nas concentrações desejadas.
- d) Com auxílio de uma espátula e de pinça previamente esterilizadas (flambadas), remover uma porção da seta do esporófito e transferir com cuidado, 2-3 esporófitos (caso o material seja escasso, optar por apenas uma cápsula por tratamento), para um tubo do tipo eppendorf 2 mL previamente autoclavado.
- e) Transferir 2 mL da solução de descontaminante para tubo contendo esporófitos e misturar por inversão (ou agitador do tipo vórtex) durante 90 segundos
- f) Naturalmente, este tempo pode ser alterando dependendo da quantidade e morfologia dos esporófitos
- g) Retirar, com auxílio de uma pipeta (preferencialmente p1000), toda solução descontaminante contida no tubo
- h) Adicionar 2 mL água destilada autoclavada e misturar por inversão por 2 minutos (ou agitador do tipo vórtex). Após este período, remover toda a água e repetir a lavagem por mais uma vez
- i) Ao final do processo, retirar toda a água contida no tubo e adicionar cerca de 500-600 uL de água destilada autoclavada ao tubo
- j) Romper, com auxílio de uma ponteira (preferencialmente ponteira p1000), as cápsulas descontaminadas*
- k) Observar atentamente se as cápsulas foram devidamente rompidas e seus esporos liberados. Em uma situação ótima, a solução de esporos fica com uma tonalidade levemente verde (quanto mais esporos, mais verde esta solução ficará)



- l) Coletar cuidadosamente, evitando pegar qualquer resto celular, cerca de 150-200 uL da suspensão de esporos, transferir para placas de Petri com meio de crescimento para musgos (previamente depositada com um disco de celofane autoclavado) e fechar com fita microporosa. Fazer uma ou duas réplicas. Adicionalmente, plaquear 50 uL da suspensão em meio LB como controle de esterilidade (fechar com fita do tipo “zap”). Caso seja de interesse, coletar 10 uL para contagem e verificação da morfologia dos esporos em hemocitômetro.
- m) Transferir placas para cabine de crescimento com as condições previamente estabelecidas de crescimento (temperatura e fotoperíodo) e observar diariamente o desenvolvimento dos esporos ao longo de 10-14 dias
- n) Após este período, caso os esporos tenham germinado, transferir o celofane para uma nova placa e observar por mais 14 dias. No caso do surgimento de colônias (clones), selecionar e transferir para novas placas de Petri contendo meio BCD (ou outro) e observar o seu desenvolvimento por 4 semanas.

5.5.19 Manutenção de culturas axênicas de musgos

- a) Realizar a transferência de musgos após 4-5 semanas para a manutenção dos cultivos axênicos.
- b) Em um fluxo laminar, ordenar as placas a serem transferidas.
- c) Com auxílio de uma pinça previamente flambada, abrir a placa e transferir a colônia de musgo para um novo meio de cultura
- d) Repetir este procedimento para todas as colônias de todas as espécies.
- e) Ao final do processo, armazenar as placas em câmara de crescimento e observar o seu desenvolvimento durante 4-5 semanas
- f) Acompanhar o crescimento, se possível, diariamente. Checar por contaminações.

5.5.20 Cultivo de musgos em meio líquido e determinação de peso fresco

- a) Para a realização de cultivo de musgos axênicos em meio de cultura líquido, separar erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio e selecionar placas contendo musgos vistosos (i. e. predominantemente verdes, com vigor físico etc.)
- b) Em um fluxo laminar previamente limpo, selecionar uma colônia do musgo a ser transferido (com no mínimo 10-20 gametófitos) e fracioná-los em fragmentos menores.
- c) Transferir fragmentos para o meio de cultura desejado (BCD ou BCD + 1% sacarose) e tampá-lo corretamente.
- d) Armazenar cultura líquida em câmara de crescimento e observar o crescimento e desenvolvimento por 6-8 semanas. Checar para contaminação.
- e) Após este período, encerrar os cultivos e reservá-los para a determinação de peso fresco.
- f) Peser tubos do tipo Falcon que serão utilizados para o peso fresco e anotar os valores.



- g) Em um fluxo laminar limpo, montar o sistema de filtração previamente autoclavado (Kitassato e Funil de Büchner) e adicionar um papel filtro também autoclavado.
- h) Coletar cerca de 500 uL do meio de cultura para realização de controles de contaminação com LB e BCD + 1% sacarose.
- i) Transferir todo o conteúdo do inóculo líquido para o sistema de filtração e ligar o vácuo por 3 minutos.
- j) Transferir o material vegetal para o tubo falcon correspondente previamente pesado.
- k) Pesar novamente os tubos e verificar a diferenças do peso inicial e final de cada tubo.
- l) Armazenar o material fresco em freezer -20°C

5.5.21 Preparação de meio de cultura BCD

- a) Preparar soluções-estoque dos macros- e micronutrientes nas seguintes concentrações:
 - b) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 127 g/L
 - c) KH_2PO_4 : 125 g/L *
 - d) KNO_3 : 101 g /L
 - e) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 73,5 g/L
 - f) Micronutrientes:
 - g) - H_3BO_3 : 614 mg/L
 - h) - $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 55 mg/L
 - i) - $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 389 mg/L
 - j) - $CoCl_2 \cdot 6H_2O$: 55 mg/L
 - k) - $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 55 mg/L
 - l) - KI: 28 mg/L
 - m) $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$: 25 mL
 - a. Regular o pH de KH_2PO_4 para 6.5 com uma solução de pelo menos 4M KOH
 - b. Após a preparação das soluções estoque supracitadas, autoclavar e armazenar em geladeira (4°C).
- n) Para preparar 1L do meio de cultura BCD, adicionar 800 mL de H₂O destilada em um béquer e misturar as soluções-estoque na proporção apresentada no quadro abaixo:
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mL
 - KH_2PO_4 2 mL
 - KNO_3 10 mL
 - Micronutrientes 1mL



- o) Em seguida, adicionar 12.5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, solubilizar o composto e completar o volume para 1L com o auxílio de uma proveta e transferir todo o volume para um erlenmeyer.
- p) Pesar 8g de ágar e adicionar ao Erlenmeyer
- q) Fechar o Erlenmeyer com papel laminado e papel filme e autoclavar
- r) Retirar o meio da autoclave e esperar resfriar
- s) Após este período, suplementar com 2 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ verter o meio de cultura em placas de Petri descartáveis e armazenar a temperatura ambiente

5.5.22 Pré-cultivo de musgos coletados

- a) Selecionar coletas de musgo realizadas anteriormente e retirar uma porção para a realização de pré-cultivo
- b) Depositar a porção retirada em uma placa de Petri de vidro e, com auxílio de uma pinça, realizar uma inspeção para retirada de possíveis contaminantes (ex. espécies não-alvo)
- c) Após este processo, fracionar o musgo com auxílio de uma espátula ou bisturi, coletando apenas a porção verde do gametófito, tomando cuidado para não danificar o material por completo
- d) Para realizar a lavagem do material, transferir a porção fracionada para uma peneira e depositar em um béquer de 600 mL (ou maior) contendo água destilada e manter sob agitação por 5-10 minutos.
- e) Após este período, descartar a água e realizar a lavagem por, no mínimo, mais uma vez.
- f) Retirar o material vegetal e separá-lo em uma nova placa de Petri de vidro.
- g) Em um fluxo laminar, secar o individualmente cada um dos gametófitos com papel filtro autoclavado e depositar em uma placa contendo meio BCD.
- h) Repetir este procedimento até que a placa contenha um total de 10 gametófitos (caso seja necessário, fazer mais uma placa com esta configuração).
- i) Transferir a placa de pré-cultivo para a câmara de cultivo à 20-25°C
- j) Observar o surgimento e desenvolvimento de novos gametófitos por, no mínimo, 4-6 semanas.
- k) Em caso de sucesso, selecionar os novos gametófitos para a realização da descontaminação de material vegetal.

5.5.23 Descontaminação de gametófitos de musgos e acompanhamento



- a) Limpar o fluxo laminar com álcool 70% (v/v) em abundância e ligar a UV por 30 minutos.
- b) Separar material a ser descontaminado (em caso de amostras in situ, realizar protocolo de lavagem conforme indicado no item acima e separar apenas a porção apical de cada gametófito. Já, para amostras advindas de pré-cultivo, apenas reservar a placa selecionada).
- c) Preparar a (as) solução (-ções) de hipoclorito de sódio (NaClO) ou Dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) nas concentrações desejadas.
- d) No fluxo laminar, separar alíquotas da solução de descontaminação em tubos do tipo eppendorf de 2 mL previamente autoclavados. Com auxílio de uma pinça, transferir um gametófito de forma individual para um tubo contendo a solução descontaminante e manter sob agitação constante por 2 minutos.
- e) Após este período, descartar todo o sobrenadante e adicionar 2 mL de água destilada autoclavada e agitar pelo mesmo período. Repetir este passo por, no mínimo, mais uma vez.
- f) Remover o gametófito do tubo com o auxílio de uma pinça previamente flambada e depositá-lo em uma placa de Petri de vidro contendo papel filtro autoclavado.
- g) Aguardar até que o material vegetal seque e fracioná-lo em 2-3 explantes por meio da utilização de uma estátua ou bisturi (previamente autoclavados e flambados)
- h) Transferir os explantes para uma placa de Petri contendo o meio BCD e armazenar a placa em câmara de crescimento.
- i) Observar o desenvolvimento dos explantes e contaminação por, no mínimo, 4 semanas.
- j) Após este período, transferir uma porção do material vegetal para um novo meio de cultura e para controle de contaminação com meio LB e BCD + 1% sacarose.
- k) Observar controles por 4 semanas e inspecionar para a presença de contaminantes.
- l) Caso não seja observado o crescimento de contaminantes, este material será considerado axênico.

5.5.24 Descontaminação de esporófitos de musgos

- a) Limpar o fluxo laminar com álcool 70% (v/v) em abundância e ligar a UV por 30 minutos.
- b) Separar material a ser descontaminado (esporófitos) e lavar em água abundante (fora do fluxo)
- c) Preparar a (as) solução (-ções) de hipoclorito de sódio (NaClO) ou Dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) nas concentrações desejadas.
- d) Com auxílio de uma espátula e de pinça previamente esterilizadas (flambadas), remover uma porção da seta do esporófito e transferir com cuidado, 2-3 esporófitos (caso o material seja escasso, optar por apenas



- uma cápsula por tratamento), para um tubo do tipo eppendorf 2 mL previamente autoclavado.
- e) Transferir 2 mL da solução de descontaminante para tubo contendo esporófitos e misturar por inversão (ou agitador do tipo vórtex) durante 90 segundos
 - f) Naturalmente, este tempo pode ser alterando dependendo da quantidade e morfologia dos esporófitos
 - g) Retirar, com auxílio de uma pipeta (preferencialmente p1000), toda solução descontaminante contida no tubo
 - h) Adicionar 2 mL água destilada autoclavada e misturar por inversão por 2 minutos (ou agitador do tipo vórtex). Após este período, remover toda a água e repetir a lavagem por mais uma vez
 - i) Ao final do processo, retirar toda a água contida no tubo e adicionar cerca de 500-600 uL de água destilada autoclavada ao tubo
 - j) Romper, com auxílio de uma ponteira (preferencialmente ponteira p1000), as cápsulas descontaminadas*
 - k) Observar atentamente se as cápsulas foram devidamente rompidas e seus esporos liberados. Em uma situação ótima, a solução de esporos fica com uma tonalidade levemente verde (quanto mais esporos, mais verde esta solução ficará)
 - l) Coletar cuidadosamente, evitando pegar qualquer resto celular, cerca de 150-200 uL da suspensão de esporos, transferir para placas de Petri com meio de crescimento para musgos (previamente depositada com um disco de celofane autoclavado) e fechar com fita microporosa. Fazer uma ou duas réplicas. Adicionalmente, plaquear 50 uL da suspensão em meio LB como controle de esterilidade (fechar com fita do tipo “zap”). Caso seja de interesse, coletar 10 uL para contagem e verificação da morfologia dos esporos em hemocítômetro.
 - m) Transferir placas para cabine de crescimento com as condições previamente estabelecidas de crescimento (temperatura e fotoperíodo) e observar diariamente o desenvolvimento dos esporos ao longo de 10-14 dias



- n) Após este período, caso os esporos tenham germinado, transferir o celofane para uma nova placa e observar por mais 14 dias. No caso do surgimento de colônias (clones), selecionar e transferir para novas placas de Petri contendo meio BCD (ou outro) e observar o seu desenvolvimento por 4 semanas.

5.5.25 Manutenção de culturas axênicas de musgos

- a) Realizar a transferência de musgos após 4-5 semanas para a manutenção dos cultivos axênicos.
- b) Em um fluxo laminar, ordenar as placas a serem transferidas.
- c) Com auxílio de uma pinça previamente flambada, abrir a placa e transferir a colônia de musgo para um novo meio de cultura
- d) Repetir este procedimento para todas as colônias de todas as espécies.
- e) Ao final do processo, armazenar as placas em câmara de crescimento e observar o seu desenvolvimento durante 4-5 semanas
- f) Acompanhar o crescimento, se possível, diariamente. Checar por contaminações.

5.5.26 Cultivo de musgos em meio líquido e determinação de peso fresco

- a) Para a realização de cultivo de musgos axênicos em meio de cultura líquido, separar Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio e selecionar placas contendo musgos vistosos (i. e. predominantemente verdes, com vigor físico etc.)
- b) Em um fluxo laminar previamente limpo, selecionar uma colônia do musgo a ser transferido (com no mínimo 10-20 gametófitos) e fracioná-los em fragmentos menores.
- c) Transferir fragmentos para o meio de cultura desejado (BCD ou BCD + 1% sacarose) e tampá-lo corretamente.
- d) Armazenar cultura líquida em câmara de crescimento e observar o crescimento e desenvolvimento por 6-8 semanas. Checar para contaminação.
- e) Após este período, encerrar os cultivos e reservá-los para a determinação de peso fresco.
- f) Pesar tubos do tipo Falcon que serão utilizados para o peso fresco e anotar os valores.



- g) Em um fluxo laminar limpo, montar o sistema de filtração previamente autoclavado (Kitassato e Funil de Büchner) e adicionar um papel filtro também autoclavado.
- h) Coletar cerca de 500 uL do meio de cultura para realização de controles de contaminação com LB e BCD + 1% sacarose.
- i) Transferir todo o conteúdo do inóculo líquido para o sistema de filtração e ligar o vácuo por 3 minutos.
- j) Transferir o material vegetal para o tubo falcon correspondente previamente pesado.
- k) Pesquisar novamente os tubos e verificar a diferenças do peso inicial e final de cada tubo.
- l) Armazenar o material fresco em freezer -20°C

5.6 Coletas, Acondicionamento e Recolhimento dos resíduos

Todos os resíduos gerados no laboratório são segregados e devidamente acondicionados, conforme legislação vigente e da seguinte maneira:

- Resíduos infectantes (Material contaminado com fungos e/ou bactérias e outros resíduos provenientes de vegetais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos) – Sacos Brancos Leitosos identificados;
- Resíduos perfurocortantes / cortantes – Coletor de materiais perfurocortantes;
- Demais resíduos (Lixo comum) são recolhidos e segregados conforme a natureza do material para serem reciclados.

Diariamente, uma pessoa responsável recolhe os resíduos corretamente acondicionados e os transporta até o expurgo da Universidade. O recolhimento é realizado em horário pré-estabelecido e, quando necessário, imediatamente após a sua geração.

6. PLANO DE AÇÕES

6.1 Plano de Avaliação periódica dos espaços

As verificações dos laboratórios são feitas diariamente ou semanalmente (dependendo das demandas de aulas e/ou aulas práticas) pelos técnicos responsáveis dos espaços. Qualquer problema de infraestrutura é aberto um chamado via sistema SISPRE, na qual a equipe de manutenção providencie os reparos necessários, dando maior importância para casos de emergência.



6.2 Plano de manutenção e guarda patrimonial

- a) Os técnicos de cada espaço fazem as verificações dos equipamentos e material patrimonial. Se necessário, é feita uma calibração e limpeza externa preventiva dos equipamentos específicos, sempre no início e fim dos semestres, a fim de preparar os equipamentos para os inícios das aulas práticas.
- b) Equipamentos defeituosos são abertos requisições de manutenção enviados para a equipe do almoxarifado. Se for aprovado, o equipamento será levado por uma empresa externa e especialista no equipamento defeituoso.
- c) Observação: Alguns equipamentos só podem ser limpos internamente e calibrados por uma empresa especializada, pois caso seja feita por qualquer outra pessoa, pode danificar, descalibrar e/ou estragar.

6.3 Plano de Limpeza e organização

Em cada andar dos blocos da Universidade, há uma equipe de higienização que ajuda nas lavagens e limpeza dos laboratórios. Esta equipe vai ao laboratório de acordo com as demandas dos espaços, com aulas práticas e monitorias. Montagem e desmontagem de aulas práticas e as limpezas de bancadas são feitas pelos técnicos responsáveis, visando melhor qualidade no conteúdo que será ministrado dentro do espaço.

6.4 Plano de atualização dos equipamentos

Os equipamentos são catalogados em planilhas como o POP (Procedimento Operacional Padrão). Ao final de cada semestre os técnicos responsáveis anexam em planilhas a Previsão orçamentária de equipamentos que precisam ser comprados para aulas práticas.

6.5 Agendamento para aulas práticas

Os agendamentos de aulas práticas são realizados com antecedência, sendo ideal ser agendando no início do semestre para que não haja choque nos horários. A reserva é feita exclusivamente por e-mail: reservasala@ucb.br com cópia para o técnico responsável por aquele espaço. É IMPRESCINDÍVEL QUE ENVIE A RESERVA TAMBÉM PARA O TÉCNICO DO LOCAL, POIS ELE QUE IRÁ ARRUMAR E ORGANIZAR O LABORATÓRIO.

No e-mail precisa constar algumas informações, como: Nome do professor; nome da disciplina; código da disciplina; data; horário; número do laboratório ou nome do laboratório; quantidade de alunos; e em anexo o roteiro de aula prática contendo materiais de interesse. Sem estas informações não será possível a realização da reserva.



7. CONDULTAS A SEREM ADOTADAS EM CASOS DE ACIDENTES

É fundamental informar a Brigada de Incêndio, ao Serviço Especializado de Segurança e Medicina do Trabalho (SESMT), a Coordenação do EAP's e aos Responsáveis pelo laboratório a ocorrência de qualquer acidente no laboratório.

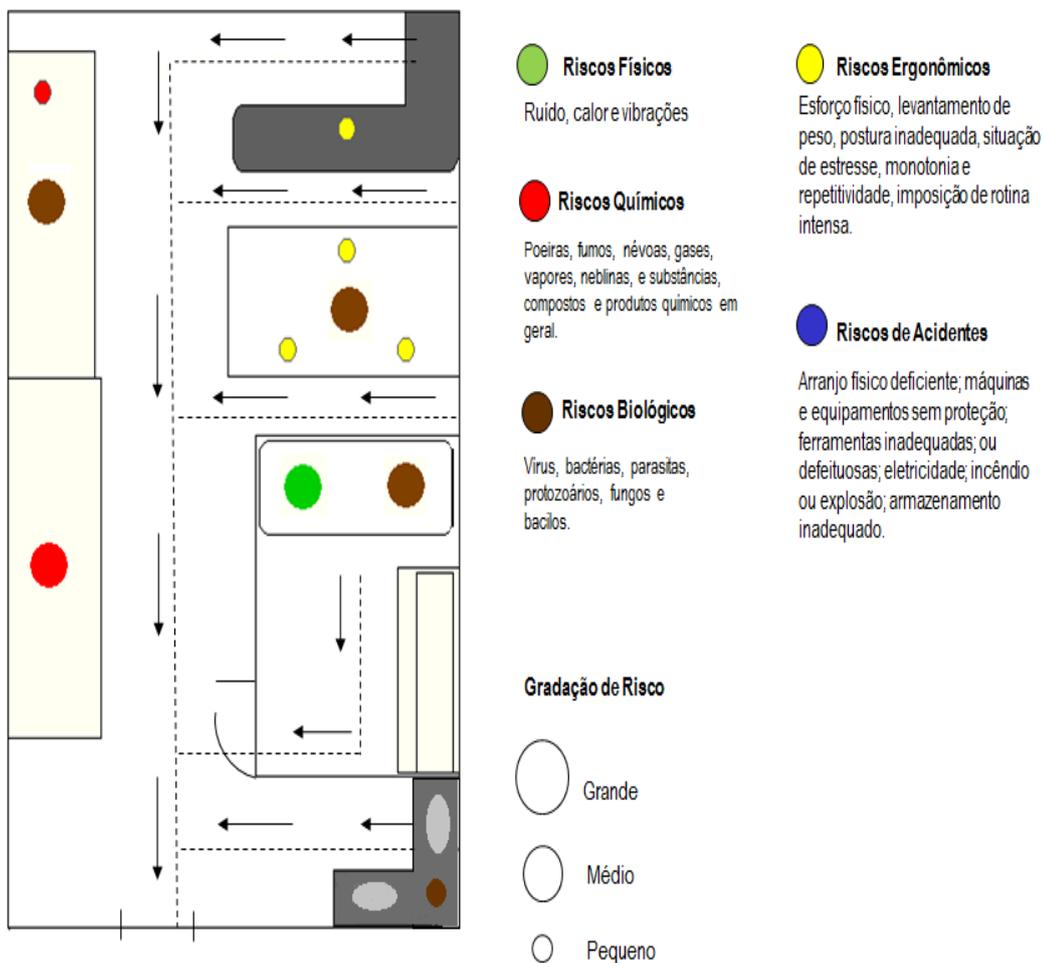
- Em caso de acidentes com ácido: lave as partes afetadas com bastante água. Se os olhos forem atingidos, lave-os com bastante água e pingar gotas de uma solução diluída de ácido bórico a 2%.
- Em caso de acidentes com acetona P.A.: em caso de respingo nos olhos, lave-os com água em abundância durante vários minutos, vítimas de inalação de vapores devem ser retiradas para ambientes arejados.
- Choques elétricos: interromper a descarga, com desligamento da chave imediato.

7.1 Contatos de emergência

- Técnico do laboratório (Kélita) – 9411 / 9376
- Coordenador do laboratório (Morgana) – 9794
- Brigada de Incêndio – 3356-9439 / 8319-2204
- Serviço Especializado de Segurança e Medicina do Trabalho (SESMT) – 3356-9100 / 3356-9287
- Coordenação dos EAPs – 3356-9749
- Bombeiro/Defesa Civil - 193/199

8. ANEXOS

MAPA DE RISCOS – Laboratório de Ecofisiologia de algas. Sala M309-A (ainda não foi feito um novo mapa de risco)



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- I. ATCC® BACTERIAL CULTURE GUIDE tips and techniques for culturing bacteria and bacteriophages p.18-20. <www.atcc.org/minis>



- II. Jaboti. 2014. Disponível em: <<http://jabotibones.com.br/como-usar-e-lavar-seu-jaleco-adequadamente/>> Acesso em: 30 de junho de 2015.
- III. Manuais de Procedimentos anteriores: 2012/2013 – Elaborados por Hugo Gomes Vieira / Kamilla Rodrigues Tosetto.
- IV. Manuais de Procedimentos anteriores: 2015 – Elaborados por Priscilla Fernandes do Nascimento.
- V. Manuais de Procedimentos anteriores: 2017 – Elaborados por Marden Wendell Nunes Soares
- VI. Portal da Educação. 2014. Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/cotidiano/artigos/54602/luvas-estereis-e-de-procedimentos>> Acesso em: 30 de junho de 2015.
- VII. Segurança do trabalho. 2013. Disponível em: <<http://segurancadotrabalhonwn.com/como-usar-o-extintor/>> Acesso em: 30 de junho de 2015.
- VIII. Universidade Federal de Alfenas. 2015. Disponível em: <<http://www.unifal-mg.edu.br/>> Acesso em: 30 de junho de 2015.
- IX. Sait, M., P. Hugenholtz, and P. H. Janssen. 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* 4:654–666.