

MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS

APRESENTAÇÃO

O laboratório de Microbiologia e Higiene dos Alimentos é utilizado para o isolamento de microrganismos e diferentes análises microbiológicas. Está equipado para rotinas microbiológicas que são fundamentais para diferentes áreas, desde aulas práticas, pesquisas e prestação de serviços.

Este localizado no Campus I da Universidade Católica de Brasília, no Bloco São Gaspar Bertoni, sala M-123/124. Conta com uma área total de Área: 150,07 m², dividida em área de uso comum (com bancadas, pias, tanques, armários e mobiliário) e interlab (com bancada e armários e material de uso mais restrito - material bibliográfico, equipamentos de projetos de pesquisa).

ÍNDICE

1 – OBJETIVO.....	4
2 – RESPONSABILIDADE	4
2.1 CURSOS QUE UTILIZAM O LABORATÓRIO:	4
2.2 PESSOAS ENVOLVIDAS DIRETAMENTE COM O LABORATÓRIO:	4
2.3 PLANO DE AVALIAÇÃO PERIÓDICA DOS ESPAÇOS	4
2.4 PLANO DE MANUTENÇÃO E GUARDA PATRIMONIAL	4
2.5 PLANO DE LIMPEZA E ORGANIZAÇÃO	4
2.6 PLANO DE ATUALIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS	5
2.7 AGENDAMENTO DE AULAS PRÁTICAS.....	5
3 – NORMAS DO LABORATÓRIO	6
4 - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	6
MICROBIOLOGIA APLICADA	7
BACTERIOLOGIA	7
MICROBIOLOGIA GERAL	7
HIGIENE DE ALIMENTOS	7
MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS	7
MICROBIOLOGIA BUCAL.....	7
5 - PROCEDIMENTOS	7
5.1 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL - EPI	7
5.2 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA - EPC	7
5.3 HIGIENIZAÇÃO/DESINFECÇÃO	8
5.4 OPERAÇÕES DOS EQUIPAMENTOS	8
<i>Espectrofotômetro: Voltagem 220v.....</i>	<i>8</i>
<i>Estufas De Secagem E Esterilização Modelo 400-De: Voltagem 220 V E Estufa Para Fungos</i>	
<i>Marca Ética.....</i>	<i>8</i>
<i>Estufa Bacteriológica Modelo 502.....</i>	<i>9</i>
<i>Estufa Bacteriológica Ma 032/3-4-5: Voltagem 220v</i>	<i>9</i>
<i>Deionizador De Água: Voltagem 220V.....</i>	<i>9</i>
<i>Fluxo Laminar: Voltagem 220v</i>	<i>9</i>
<i>Autoclave: Voltagem 220v.....</i>	<i>10</i>
<i>Banho-Maria Metabólico Tipo Dubnoff.....</i>	<i>10</i>
<i>Banho-Maria Sorológico.....</i>	<i>11</i>
<i>Micro Centrífuga.....</i>	<i>10</i>
<i>Microscópio Olympus.....</i>	<i>12</i>
<i>Balanças Analíticas.....</i>	<i>13</i>
<i>Balanças de Pesagem.....</i>	<i>13</i>
5.5 TÉCNICAS REALIZADAS NO LABORATÓRIO	13
5.6 COLETAS, ACONDICIONAMENTO E RECOLHIMENTO DOS RESÍDUOS	14
6 - CONDUTAS A SEREM ADOTADAS EM CASOS DE ACIDENTES.....	14
6.1 CONTATOS DE EMERGÊNCIA	15
7 - ANEXO I.....	16

EMISSÃO		Data: 02/04/2018
Elaboração: Ana Cláudia Alves/ Elias Rosa de Souza	Assinatura ou Rubrica	Data: 02/04/2018
Revisão: Samuel Dias Araújo Júnior	Assinatura ou Rubrica	Data:
Aprovação: Samuel Dias Araújo Júnior	Assinatura ou Rubrica	Data:

1 – OBJETIVO

Descrever de forma simples e objetiva as técnicas, atividades e operações realizadas no laboratório.

2 – RESPONSABILIDADE

2.1 Cursos que utilizam o laboratório:

Regular

- Biomedicina
- Ciências Biológicas
- Farmácia
- Engenharia Ambiental
- Nutrição
- Medicina
- Gastronomia

2.2 Pessoas envolvidas diretamente com o laboratório:

- Coordenação do EAP'S

- Thalita Tormim

- Técnicos:

- Elias Rosa

2.3 Plano de avaliação periódica dos espaços

A verificação dos laboratórios é feita diariamente pelo técnico que identificando algum problema de infraestrutura abrirá um chamado via sistema SISPREM para que a equipe de manutenção providencie os reparos necessários.

2.4 Plano de manutenção e guarda patrimonial

Anteriormente ao início do semestre a limpeza dos equipamentos e geladeiras são feitos, e se necessário, as calibrações internas de equipamentos específicos sempre no início e no fim dos semestres afim de preparar os equipamentos para início das aulas práticas.

2.5 Plano de limpeza e organização

O piso é limpo todos os dias pelos servidores do serviço de limpeza e conservação, conforme escala estabelecida pela gestão de Higienização da UCB.

As bancadas são limpas com sabão neutro e álcool 70° no início e ao término de todas as aulas. Equipamentos e materiais são encaminhados para a limpeza e desinfecção ao término de cada aula (ex: tubos de ensaio, espátulas, almotolias etc.), primeiramente ficam por cerca de 24h de molho em solução de cloro a 1%, em seguida são enxaguados e lavadoras normalmente com sabão neutro e novamente enxaguados com água corrente e preferivelmente pelo menos três enxagues com água destilada. No caso de derramamento fluidos biológicos dentro de equipamentos (centrífugas, estufas etc.) deve imediatamente ser descontaminados com hipoclorito 1% e em seguida passar álcool 70%.

O laboratório possui identificações quanto ao que está em cada armário e gaveta, bem como os riscos químicos e biológicos.

2.6 Plano de atualização dos equipamentos

Anualmente ocorre uma previsão orçamentária de Investimentos para o laboratório, seu grau de importância e urgência.

2.7 Agendamento de aulas práticas

Ao início do semestre é solicitado aos professores que utilizam os laboratórios, bem como os coordenadores dos cursos, os planos de ensino com as datas e roteiros das práticas. O agendamento é solicitado por e-mail para o reservasala@ucb.br e são

acompanhadas via sistema VBI, bem como planilha compartilhada com os laboratórios de Microbiologia, Parasitologia e Tecnologia de Alimentos para controle pessoal.

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 nº 143 NR06).
- 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.
- É proibida a entrada e o consumo de qualquer tipo de alimento ou bebida.
- Após os procedimentos realizados no laboratório o aluno deverá deixá-lo limpo e organizado, e verificar se desligou todos os equipamentos que utilizou.

4 - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Aulas práticas, projetos de pesquisa, prestação de serviço e monitorias.

AULA PRÁTICA (anexo 1)



Microbiologia Aplicada

Bacteriologia

Microbiologia Geral

Higiene De Alimentos

Microbiologia Dos Alimentos

Microbiologia Bucal

5 - PROCEDIMENTOS

5.1 Equipamentos de Proteção Individual - EPI

- Para manipulação de reagentes: Jaleco, óculos, luvas e máscara.
- Para manipulação de corantes: jaleco e luvas.

5.2 Equipamentos de Proteção Coletiva - EPC

Capela de Fluxo Laminar: É importante que a cabine esteja funcionando no mínimo 30 minutos antes do início do trabalho e permaneça ligada mais 30 minutos após a conclusão do trabalho, e ser submetida a processo de limpeza, descontaminação e desinfecção, nas paredes laterais e internas e superfície de trabalho antes do início das atividades, e na ocorrência de acidentes e derramamentos de respingos.

- Limpar o interior do equipamento com bucha e sabão
- Higienizá-lo com álcool 70%
- Ligar o fluxo apertando o botão verde, localizado na parte anterior
- Selecionar a chave metálica para cima (em direção à palavra “germicida”)
- Após 30 minutos, retornar a chave metálica para baixo (em direção à palavra “luz”)
- Desligue o aparelho apertando o botão vermelho e para desligar a luz branca deixe a chave metálica entre “germicida” e “luz”.

Lava-olhos de Emergência: É um equipamento utilizado para acidentes na mucosa ocular, o jato de água também deve ser forte e dirigido aos olhos. Quando ocorrer acidente com derrame de material nos olhos, estes devem ser lavados por, no mínimo 15 minutos, para remoção da substância, reduzindo danos ao indivíduo.

Chuveiro de Emergência: posicionar-se em baixo do crivo e acionar a haste tipo triângulo de acionamento. Tomar uma ducha por 15 minutos. Despir-se caso a roupa estiver contaminada. Procurar assistência médica imediatamente.

5.3 Higienização/Desinfecção

- O piso é limpo duas vezes ao dia pelos servidores do serviço de limpeza e conservação.
- As bancadas são limpas com sabão e álcool 70° ao término de todas as aulas.
- Locais infectados com materiais biológicos deverão ser descontaminados com solução de cloro a 1,0% ou álcool 70%.
- Equipamentos e materiais são lavados ao término de cada aula, e se estiverem contaminados por fungos e/ou bactérias, são autoclavados.

5.4 Operações dos equipamentos

Espectrofotômetro: Voltagem 220v

- Ligar o botão do equipamento, localizado na parte posterior, 15 minutos antes de utilizá-lo.
- Aperte a tecla “mode” até que seja selecionado o tipo de espectro desejado.
- Na tecla “wevelength” ajuste o comprimento de onda selecionando as teclas para cima e para baixo até que seja alcançado o valor desejado.
- Zerar o equipamento: Em uma cubeta, colocar 2,5 ml de meio puro e apertar o botão 100% abs
- Colocar 2,5ml de meio na cubeta, fechar o equipamento e anotar a leitura.
- Após utilização do aparelho, retirar as cubetas e desligá-lo no botão localizado na parte posterior.
- Retirar o equipamento da tomada.

Estufas De Secagem E Esterilização Modelo 400-De: Voltagem 220 V E Estufa Para Fungos Marca Ética

- Pressionar a chave liga /desliga (botões verde e vermelho simultaneamente)



- Ajustar o controlador de temperatura: Pressiona-se o botão branco do controlador de temperatura acionando-se o led vermelho e ajusta-se a mesma através das teclas de subida e descida da temperatura. --Pressiona-se novamente a tecla branca.
- Para ajustar o temporizador é necessário pressionar a chave verde e girar o anel exterior do temporizador até a posição (tempo) desejada.

Estufa Bacteriológica Modelo 502

- Ligar a chave geral
- Girar o botão de ajuste de temperatura para a direita até a temperatura desejada, observando a lâmpada de aquecimento acesa, indicando o ciclo de aquecimento.
- Verificar a temperatura da estufa através de termômetro de mercúrio

Estufa Bacteriológica Ma 032/3-4-5: Voltagem 220v

- Ligar a chave geral
- Ligar o botão, localizado na parte anterior do equipamento
- Com o auxílio das teclas para cima e para baixo ajustar a temperatura
- Utilizar um termômetro para verificar se o termostato está registrando a temperatura correta
- A cada bimestre a estufa deve ser higienizada com álcool e formol.

Deionizador De Água: Voltagem 220V

- Ligar o adaptador à entrada da coluna.
- Ligar o tubo de alimentação à rede de água.
- Abrir a torneira.
- Abrir a torneira de alimentação.
- Ligar a Célula Condutimétrica a corrente.

Fluxo Laminar: Voltagem 220v



- Limpar o interior do equipamento com bucha e sabão
- Higienizá-lo com álcool 70%
- Ligar o fluxo apertando o botão verde, localizado na parte anterior
- Selecionar a chave metálica para cima (em direção à palavra “germicida”)
- Após 30 minutos, retornar a chave metálica para baixo (em direção à palavra “luz”)
- Desligue o aparelho apertando o botão vermelho e para desligar a luz branca deixe a chave metálica entre “germicida” e “luz”.

Autoclave: Voltagem 220v

- Colocar água até a altura do descanso do cesto
- Colocar o material dentro da autoclave
- Fechar a tampa apertando os parafusos por igual e em forma de cruz
- Abrir a válvula de saída do vapor
- Ligar a chave comutadora no calor máximo
- Esperar até a saída contínua de vapor no bico do registro e em seguida fechar a saída
- Esperar até que seja atingida a pressão de 121 kgf/cm²
- Mudar a chave comutadora para o calor mínimo
- Esperar de 15 à 20 minutos para esterilização de meios e vidrarias, respectivamente, e 30 minutos para descontaminação
- Desligar a chave comutadora
- Esperar até a autoclave esfriar e o manômetro voltar a zero
- Depois do uso limpar e secar a autoclave para prevenir corrosão
- Retirar da tomada

Banho-Maria Metabólico Tipo Dubnoff

- Adicionar água destilada no interior da cuba, o volume final fica a critério do usuário, entretanto, é aconselhável que o volume seja igual ao dos recipientes a serem agitados.
- Conectar adequadamente os recipientes nas garras em aço inoxidável, se acaso as garras estiverem sem pressão, deve-se pressioná-las para baixo afim de promover o efeito mola.
- Conectar o cabo elétrico a uma tomada compatível de voltagem 220 volts.
- Selecionar a velocidade desejada fazendo uso do Knob (ajuste RPM)
- Selecionar a temperatura desejada fazendo uso das teclas do controlador de temperatura (“ / ” e FN”)
- O display sempre mostrará a temperatura real, para visualizar ou alterar a temperatura aperte a tecla “FN” e aparecerá “SP”, mesmo que piscando, utilize as teclas
- para diminuir ou aumentar a temperatura a ser programada, após esse procedimento, acione novamente a tecla “FN” e o programa estará concluído com os novos valores de temperatura.

Banho-Maria Sorológico

- Adicionar água destilada no interior da cuba, até a altura do cesto de alumínio
- Conectar o cabo elétrico a uma tomada compatível de voltagem 220volts.
- Selecionar a chave “liga/desliga”
- Selecionar a temperatura desejada no botão °C.

Micro Centrífuga

- Conectar o aparelho em tomada 220V.
- Pressionar o botão “liga/desliga”, na frente do equipamento, para ligar a centrífuga.
- Colocar as amostras de interesse dentro da centrífuga de forma balanceada.

- Regular a velocidade o tempo da centrifugação, utilizando os botões “+ ou _”, “time” e “temp” correspondentes a essas funções, respectivamente.
- Pressionar o botão “▶” e aguardar o tempo de centrifugação necessário.
- Finalizada a centrifugação a tampa abrirá automaticamente retire as amostras com cuidado para evitar que o centrifugado ressuspenda na solução da amostra.
- **2.8** Desligar o aparelho, pressionando o botão “liga/desliga”. Desconectar a centrífuga da tomada.

Microscópio Olympus

- Sequência de ajuste inicial do microscópio
- Ajuste a voltagem com o seletor de voltagem do microscópio de acordo com acordo com a voltagem da rede elétrica local
- Ligue a fonte luminosa
- Coloque a lâmina na platina
- Destrave a trave mecânica de pré-focalização
- Focalize a lâmina com a objetiva 10 x
- Ajuste a distância interpupilar a correção dióptrica
- Coloque a objetiva adequada para observação
- Ajuste a intensidade da luz com o reostato deslizante
- Focalize com o botão macrométrico e micrométrico
- Trave a pré-focalização
- Ajuste o contraste de imagem com o diafragma de abertura, estando o condensador na posição máxima superior.
- Para observação com a objetiva 100 x , é necessário uma gota de óleo de imersão sintético para microscopia.

Importante: Depois do uso, limpe o óleo sintético com um pano macio e um pouco de xilol ou éter sulfúrico na superfície ótica. Nunca deixe o óleo nas superfícies óticas depois do trabalho.

As lentes devem estar sempre limpas. Poeira fina nas superfícies pode ser removida com um pano ou pincel limpos e impressões digitais limpam-se com um pouco macio e um pouco de xilol, benzina ou éter sulfúrico. Não use soluções orgânicas para limpar as superfícies dos componentes, especialmente nas partes plásticas, deve ser usado detergente neutro.

Balanças Analíticas

- Ligar a balança no botão **“on/off”**
- Aguardar estabilização
- Para zerar a balança aperte a tecla **“TARE”**
- Para autocalibração, aperte a tecla **CAL**, a mensagem **CAL** será exibida, se o prato não estiver vazio, aparecerá a mensagem **“UNLOAD”** e o prato deve ser descarregado. A mensagem **“Error”** será exibida se a calibração não for feita por causa de vibrações ou da corrente elétrica. Tão logo a mensagem **“0.0000”** é exibida, a balança retornará para as condições normais de pesagem.
- Para calibrações externas, pressione a chave **CAL** com o prato vazio. Vários hífen na horizontal, serão exibidos (- - - -). Tão logo os valores do peso comecem a piscar, coloque o peso no prato. Espere pela mensagem **“O”** piscar. Retire o peso do prato. Se a operação tiver sido com sucesso, a balança retornará às normais condições de pesagem, caso contrário, repita a operação.

Balanças de Pesagem

- Ligar à rede
- Ligar no botão **“liga/desliga”**
- Aguardar estabilização
- Para zerar a balança, aperte a tecla **“TARE”**.

5.5 Técnicas realizadas no laboratório

- Preparo de aulas práticas:
Conforme determinado em cada planejamento (anexo I);

- Preparo dos meios de cultura:
Conforme descrição do rótulo de acordo com o fabricante;
- Repicagem de material:
Repicar as bactérias e fungos na sala de procedimentos microbiológicos próximo à chama (bico de Bunsen), com auxílio de lâminas de bisturi e alça de platina, periodicamente, conforme a demanda das aulas e semestralmente para conservação das cepas;

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 - meios de cultura com bactérias e fungos. Os resíduos são descontaminados através do processo de autoclavação e dispostos em sacos brancos leitosos identificados. Os sacos são recolhidos e encaminhados para o Abrigo de Resíduos Infectantes (próximo ao bloco S);
- Resíduos de alimentos utilizados em análises laboratoriais são dispostos em sacos brancos leitosos identificados. Os sacos são recolhidos e encaminhados para o Abrigo de Resíduos Infectantes (próximo ao bloco S);
- Resíduos perfurocortantes – São dispostos em coletores adequados de material resistente. Quando atingem 2/3 de sua capacidade são acondicionados em saco branco leitoso, identificados e encaminhados ao abrigo de Resíduos Infectantes (próximo ao bloco S);
- Demais resíduos – Lixeira comum (ao final do expediente segregados conforme classificação de recicláveis);
- Os resíduos são recolhidos diariamente pela equipe de higienização e transportados para o armazenamento externo (abrigos). O recolhimento se dá em horário pré-estabelecido e, quando necessário, imediatamente após a sua geração.

6 - CONDUTAS 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.

Ocorrendo acidentes com produtos químicos, proceder conforme a ficha de emergência do referido produto.

Acidentes envolvendo materiais biológicos, lavar a região com água e sabão bactericida e álcool 70°. No caso de olhos, lavar com água imediatamente.

Entrar em contato com o SESMT e /ou a enfermaria mais próxima.

Choques elétricos: interromper a descarga, com desligamento da chave imediato.

6.1 Contatos de emergência

- Brigada de Incêndio – 3356-9439
- Serviço Especializado de Segurança e Medicina do Trabalho (SESMT) – 3356-9100 / 3356-9287
- Coordenação dos EAPs – 3356-9050 /
- Bombeiro/Defesa Civil - 193/199
- Laboratório de Microbiologia – 3356-9360

7 - ANEXO I

DISCIPLINA: MICROBIOLOGIA APLICADA

AULA PRÁTICA N°1

Nessa aula os alunos irão realizar duas atividades: 1) Observar micro-organismos ao microscópio óptico e 2) Demonstrar a ubiquidade dos micro-organismos.

Atividade 1: O objetivo dessa atividade é reconhecer os micro-organismos utilizando a microscopia óptica.

Materiais:

- Lâminas preparadas de bactérias (Gram positivas e negativas), fungos e protozoários .
- Microscópios

Atividade 2: O objetivo dessa atividade é demonstrar a presença de micro-organismos em todos os ambientes e amostras.

Materiais:

Os alunos trabalharão em grupos (normalmente tenho 5 ou 6 grupos)

- Meio de cultura – ágar nutriente em frascos, já fundidos.
 - Manter em banho maria. (os alunos irão verter o meio)
 - Quantidade suficiente para 3 placas por grupo
- Placas de Petri estéreis
- Swabs

- Pipeta Pasteur de plástico (não precisa ser estéril)
- Uma placa contendo colônias de bactéria (pode ser *E. coli*) – controle positivo (eu faço 1 para a turma)

AULA PRÁTICA N° 2

NESSA AULA OS ALUNOS IRÃO REALIZAR ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE ÁGUA.

Serão realizadas: 1) contagem de coliformes totais pela técnica de tubos múltiplos 2) Contagem de coliformes fecais utilizando-se Collilert 3) contagem de heterotróficos em meio PCA.

Amostras de água: A coleta será realizada pelos alunos – sem necessidade de preparação de material pelo laboratório de microbiologia.

Atividade 1: Teste de tubos múltiplos. (ver anexo)

Materiais (por grupo):

- ❖ Tubos de Durham
- ❖ Tubos com Caldo LST: 5 tubos grandes, 10 tubos pequenos – na primeira série serão inoculados 10 mL, na segunda série serão inoculados 1 mL e na terceira série serão inoculados 0,1 mL da amostra de água
- ❖ Pipetas de vidro e pera
- ❖ Micropipetas e ponteiras de
- ❖ Incubar em estufa bacteriológica à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por 24 horas.

Atividade 2: Teste de Colilert.

Materiais (1 para a turma toda)

- ❖ 1 frasco autoclavado de volume de 250 mL.
- ❖ Proveta esterilizada (para medir um volume de 100 mL).
- ❖ Material para o colilert será fornecido pelo lab de águas
- ❖ Incubar em estufa bacteriológica à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por 24 horas.

Atividade 3: Contagem de heterotróficos

Materiais (pro grupo):

- ❖ 9 placas de Petri com meio PCA.
- ❖ 3 Tubos com 9 mL solução salina (ou água peptonada)
- ❖ Micropipetas e ponteiras de 1 mL e de 200 mL.
- ❖ Alças Drigalsky e álcool para esterilização.
- ❖ Bico de Bunsen, álcool, fósforo.

AULA PRÁTICA N°3

NESSA AULA OS ALUNOS IRÃO ISOLAR MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE SOLO.

Os alunos receberão uma amostra de solo com profundidades de 0-5 cm; 5-10cm e 10 -20 cm.

Atividade 1: Os alunos irão preparar diluições seriadas das amostras de solo (que já foram coletadas e estão armazenadas no lab de microbiologia). Os alunos irão pesar 1 g de solo e diluir em 50 mL de solução salina. A seguir irão transferir 1 mL dessa suspensão para 4 tubos contendo 9 mL de solução salina.

Materiais:

- Tubos tipo Falcon de 50 mL (4 frascos, um para cada grupo)
- 200 mL de solução salina estéril para primeira diluição
- Espátulas e balança (um frasco para apoiar o tubo Falcon na balança.
- Tubos contendo 9 mL de solução salina (4 para cada grupo)
- Micropipetas de 1 mL

Atividade 2: Os alunos irão inocular o volume de 0,1 mL em meio sólido contendo diferentes fontes de Carbono.

Materiais:

- Micropipetas de 200uL e alça de platina (+ álcool)
- Meios sólido: Meio M9 + 1% da fonte de carbono: amido, ou celulose, ou leite em pó. Meio M9 sem fontes de carbono adicionadas. Ágar nutriente
- Duas ou três placas de cada tratamento, por grupo. (são 5 tratamentos, ver acima)
- As placas devem ser incubadas à temperatura ambiente.

AULA PRÁTICA N° 4

NESSA AULA OS ALUNOS IRÃO ISOLAR MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORES DE ÓLEO A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE COLUNA DE WINOGRADSKY E DE UMA AMOSTRA DE SOLO

Introdução: A turma de Microbiologia aplicada do ano passado preparou colunas de Winogradsky a partir de duas amostras: solo do jardim da Católica e solo onde houve um derramamento de óleo. As colunas foram preparadas com 50 g de solo em 100 mL de solução M9. Essa solução contém (por L): 12,8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de NaCl e 1,0 g de NH_4Cl (adicionar 2mM de $\text{MgSO}_4 = 0,24\text{g/L}$ e 0,4% de fonte de carbono). Foram adicionadas 10 gotas de óleo Singer para enriquecimento de bactérias degradadoras de óleo.

A coluna foi aerada com o auxílio de uma bomba de aquário e deixada na luz. Ao final do semestre a coluna foi recolhida e deixada na luz natural durante um ano, sem aeração e sem adição de outra fonte de carbono.

Na aula prática desse semestre iremos isolar bactérias dessas colunas e verificar a sua habilidade de degradar óleo.

Atividade: Inocular micro-organismos em placas contendo tributirina como fonte de Carbono.

Parte 1: Os alunos irão preparar diluições seriadas das amostras de solo (as mesmas da aula prática 3) e da coluna (que será fornecida pela professora). Os alunos irão pesar 1 g de solo e diluir em 50 mL de solução salina. A seguir irão transferir 1 mL dessa suspensão para 4 tubos contendo 9 mL de solução salina.

Materiais:

- Tubos tipo Falcon de 50 mL (4 frascos, um para cada grupo)
- 200 mL de solução salina estéril para primeira diluição
- Espátulas e balança (um frasco para apoiar o tubo Falcon na balança.
- Tubos contendo 9 mL de solução salina (4 para cada grupo)

- Micropipetas de 1 mL

Parte 2: Os alunos irão inocular o volume de 0,1 mL em meio sólido contendo meio com tributirina.

Materiais:

- Micropipetas de 200uL e alça de platina (+ álcool)
- Meios sólido: Meio M9 + 1% de tributirina e Meio M9 sem fontes de carbono adicionadas. Ágar nutriente
- Duas ou três placas de cada tratamento, por grupo. (são 3 tratamentos, ver acima)
- As placas devem ser incubadas à temperatura ambiente.

DISCIPLINA: BACTERIOLOGIA

AULA PRÁTICA Nº 1

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA – Nº 1	GRUPOS	MATERIAL TOTAL
19/02	5B	<p>Microscopia: visualização de bactérias</p> <p>1) observar as lâminas do laminário</p> <p>- separar 1 caixa de laminário para cada dupla com as seguintes lâminas:</p> <p>lâmina 1 - bacilo Gram pos lâmina 3 - Staphylococcus lâmina 4 - E. coli lâmina 6 - Sarcina lâmina 12 - saliva lâmina 13 - Streptococcus</p>	<p>São 25 estudantes (serão organizados em duplas)</p> <p>11 duplas + 1 grupo com 3 alunos</p>	<p>Dividir nas bancadas:</p> <p>- 12 microscópios - 12 caixas de coleção de lâminas do Laboratório (01 para cada dupla)</p> <p>Material de uso comum:</p> <p>- Papel toalha - Sabão para lavar as mãos</p>

AULA PRÁTICA Nº 2

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA – Nº 2	GRUPOS	MATERIAL TOTAL

26/02	5B	<p>Microscopia, esfregaço e colorações</p> <p>1) preparar esfregaço em lâminas – a partir das culturas em placa de Petri e/ou de coletas dos colegas</p> <p>2) fazer as colorações de Gram, Ziehl-Neelsen e Ryu</p> <p>3) deixar algumas caixas de laminário disponíveis para os estudantes que quiserem observar as lâminas do laboratório.</p> <p>4) deixar focalizada no microscópio lâminas de micobacteria corada pelo Ziehl-Neelsen</p>	<p>São 25 estudantes divididos em 5 grupos</p>	<p>Dividir nas bancadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 03 culturas com crescimento em placa de um coco Gram positivo: <i>Streptococcus epidermidis</i> (01 placa por bancada, para cada 2 grupos + 1 grupo) - 03 culturas com crescimento em placa de um bacilo Gram negativo: <i>E. coli</i> (01 placa por bancada, para cada 2 grupos + 1 grupo) - 05 estantes (01 para cada grupo) - 15 alças bacteriológicas (3 por grupo) - 10 tubos com solução salina (cerca de 3 mL) – (02 para cada grupo) - 10 lamparinas (2 por grupo) <p>Verificar se as lamparinas estão abastecidas com álcool e funcionando</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5 microscópios (1 para cada grupo - bancada) <p>Material de uso comum:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lenço de papel (para limpar as lâminas e as lentes do microscópio) - Papel toalha
-------	----	--	---	---



				<ul style="list-style-type: none">- Sabão para lavar as mãos- Lâminas limpas- pipetas Pasteur descartáveis com bulbo- Swabs- Abaixadores de língua- Palitos- 02 conjuntos para coloração de Gram- 02 conjuntos para coloração de Ziehl-Neelsen – colocar uma lamparina perto para aquecer a fucsina- 02 conjuntos para coloração de Ryu- Descarte para as lâminas usadas
--	--	--	--	---

AULA PRÁTICA N° 3

Parte 1: Preparo de meios de cultura

Parte 2: Semeadura em meios de cultura

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA – Nº 3	GRUPOS	MATERIAL TOTAL
12/03	5A/5B	<p>Parte 1: Preparo dos meios de cultura:</p> <ul style="list-style-type: none"> - BHI - ágar nutriente - MacConkey - ágar manitol <p>Parte 2: Técnicas de semeadura em placas</p> <p>1) técnica quantitativa no meio de CLED</p> <p>2) técnica qualitativa (esgotamento) nos meios de EMB e MacConkey</p> <p>Cada grupo vai usar 3 placas de cada, onde irão semear cada bactéria nos 3 meios:</p> <p><i>S. aureus</i> semear em CLED, EMB e MacConkey</p> <p><i>E.coli</i> semear em CLED, EMB e MacConkey</p> <p><i>Proteus</i> semear em CLED,</p>	<p>São 25 estudantes divididos em 5 grupos</p> <p>2 grupos farão o BHI</p>	<p>1: Colocar na bancada do professor:</p> <ul style="list-style-type: none"> - material para pesagem - reagentes para os meios que serão preparados <p>2: Materiais para semeadura divididos nas bancadas para os grupos</p> <ul style="list-style-type: none"> - 05 tubos com crescimento em caldo: <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>E.coli</i> e <i>Proteus</i> (distribuir 01 tubo com caldo para cada grupo) - 15 alças bacteriológicas (03 por grupo) - 05 estantes (para colocar a alça e os tubos com crescimento - 01 para cada grupo) - 15 lamparinas (03 por grupo) - 15 placas com meio de CLED - 15 placas com meio de EMB - 15 placas com meio de MacConkey

		<p>EMB e MacConkey</p> <p>Organizar os materiais nas pontas das bancadas</p>		<p>(distribuir 03 placas de cada meio para cada grupo)</p> <p>Material de uso comum:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Papel toalha - Sabão para lavar as mãos - Álcool para limpar as bancadas - Canetas para identificar as placas <p>Estufa bacteriologia a 37°C ou 36,5°C para incubar os meios semeados</p>
--	--	--	--	--

AULA PRÁTICA Nº 4

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA nº 4	GRUPOS	MATERIAL TOTAL
26/03	5B	CONTAGEM DE BACTÉRIAS	São 25 estudantes divididos	<p>Para cada grupo:</p> <p>01 tubo com crescimento bacteriano. Pode ser qualquer bactéria com bom</p>

		<p>1 – Plaqueamento em meio sólido para contagem de colônias – método da diluição seriada</p> <p>2 – Contagem em câmara de Neubauer</p> <p>3 – Medida da turbidez</p>	<p>em 5 grupos</p>	<p>crescimento: <i>E. coli</i>.</p> <p>01 conjunto com 6 tubos com 9 mL de meio BHI.</p> <p>03 placas de Petri – pode ser LB ou ágar nutriente ou Mueller Hinton</p> <p>01 caneta retroprojeter</p> <p>01 estante para tubos</p> <p>02 alças de Drigalski em becker com álcool</p> <p>03 lamparinas ou mais</p> <p>Pipetas estéreis de 1 mL ou 5 mL ou 10 mL</p> <p>Pipetadores (verificar se estão funcionando)</p> <p>02 tubos Eppendorf</p> <p>Solução de azul de metileno (01 para cada 2 grupos)</p> <p>01 Pipeta monocanal de 100 µL com ponteiras</p> <p>01 Câmara de Neubauer</p> <p>Lamínulas</p> <p>Descarte nas bancadas para as ponteiras e outros materiais</p> <p>Material de uso comum:</p> <p>05 microscópios - 01 para cada grupo (colocar na ponta da bancada)</p> <p>Espectrofotômetro (absorbância: 610</p>
--	--	--	---------------------------	--

				<p>nm)</p> <p>01 tubo com meio BHI sem crescimento – deixar próximo ao espectrofotômetro (para ser o branco da leitura)</p> <p>Cubetas</p> <p>Descarte para as cubetas próximo ao espectrofotômetro</p> <p>Pisceta com água destilada para lavar as cubetas</p> <p>Lenços de papel</p> <p>Descarte para as pipetas</p> <p>Papel toalha</p> <p>Sabão para lavagem das mãos</p>
--	--	--	--	---

AULA PRÁTICA Nº 5

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA – Nº 5	GRUPOS	MATERIAL TOTAL
10/04	5B	<p><u>Provas de identificação:</u></p> <p>Conjunto para identificação de enterobactérias: TSI, SIM e</p>	<p>São 25 estudantes divididos em 5 grupos</p>	<p>Para cada grupo (são 5 grupos):</p> <p>- 01 cultura em placa de Petri (em meio MacConkey) com crescimento de enterobactéria</p>



		<p>Meio de Citrato de Simmons</p> <p>- semear bactérias numeradas</p> <p>Prova da catalase</p> <p>- em lâmina</p> <p>Meio de manitol</p> <p>- semear <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i></p> <p>Prova da coagulase</p>		<p>(uma espécie para cada grupo): <i>Proteus, Klebsiella, Salmonella, E. coli, Shigella, ...</i></p> <p>ATENÇÃO: numerar as culturas, os alunos não devem saber com qual bactéria estão trabalhando.</p> <p>- 05 conjuntos para identificação de enterobactérias: TSI, SIM e Meio de Citrato de Simmons</p> <p>- 05 canetas retroprojeter</p> <p>- 05 estantes para tubo</p> <p>- 10 alças bacteriológicas (duas para cada grupo)</p> <p>- 10 agulhas bacteriológicas (duas para cada grupo)</p> <p>- 10 lamparinas (duas para cada grupo)</p> <p>- 05 conjuntos para a prova da catalase (H₂O₂) (um para cada grupo)</p> <p>- 03 placas de Petri com crescimento de <i>Staphylococcus</i> em ágar nutriente, para a prova da catalase. (01 para cada dois grupos)</p> <p>- 03 placas de Petri com crescimento de <i>Streptococcus</i> em ágar nutriente, para a prova da catalase. (01 para cada dois)</p> <p>- 10 pipetas de bulbo descartáveis</p>
--	--	--	--	---

				<p>(duas para cada grupo)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 05 tubos com <i>S. aureus</i> em caldo para inóculo no ágar manitol (01 para cada grupo) - 05 tubos com <i>S. epidermidis</i> em caldo para inóculo no ágar manitol (01 para cada grupo) - 15 placas com ágar manitol (03 para cada grupo) - 05 conjuntos prontos para demonstração da prova da coagulase
--	--	--	--	--

AULA PRÁTICA Nº 6

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA – Nº 6	GRUPOS	MATERIAL TOTAL
23/04	2B	<p>Controle de microorganismos e antibiograma:</p> <p>1) efeito de agentes químicos no crescimento de bactérias – álcool 70 %; desinfetante; solução de iodo; solução de água</p>	<p>São 25 estudantes divididos em 5 grupos</p>	<p>Materiais divididos nas bancadas para os grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 05 canetas retroprojetor - 05 estantes ou suportes para tubo - 05 culturas com crescimento em caldo de um coco Gram positivo: <i>Streptococcus</i> ou

		<p>sanitária.</p> <p>2) efeito da lavagem das mãos na eliminação de microrganismos</p> <p>3) antibiograma – técnica de Kirby Bauer</p> <p>4)) efeito da radiação UV sobre o crescimento das bactérias</p>	<p><i>Staphylococcus</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - 05 culturas com crescimento em caldo de um bacilo Gram negativo: <i>E. coli</i> - 15 alças bacteriológicas (3 alças para cada grupos) - alças de Drigalski (quantas tiver) - 15 lamparinas (3 para cada grupo) - 20 placas de Petri com meio nutriente (4 para cada grupo) - 10 placas de Petri com meio de Müeller Hinton (2 para cada grupo) - 05 becker com alça de Drigalski e pinças mergulhados na solução de álcool 70 % - Discos comerciais para o antibiograma de bactérias Gram positivas - Discos comerciais para o antibiograma de bactérias Gram negativas <p>Material de uso para cada 2 grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Discos de papel de filtro estéreis
--	--	---	---

				<ul style="list-style-type: none"> - Solução de álcool a 70 % - Solução de iodo - Desinfetante comercial (Lysoform) - descartes <p>Equipamento: Câmara de Segurança Biológica</p> <p>Material de uso comum:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Papel toalha - Sabão para lavar as mãos
--	--	--	--	--

DISCIPLINA: MICROBIOLOGIA GERAL

PROGRAMAÇÃO DAS AULAS PRÁTICAS MICROBIOLOGIA FORMAÇÃO GERAL - MEDICINA

AULA PRÁTICA Nº 1

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA – Nº 1	GRUPOS	MATERIAL TOTAL
19/02	5B	<p>Microscopia: visualização de bactérias</p> <p>1) observar as lâminas do laminário</p>	<p>São 25 estudantes (serão organizados em duplas)</p>	<p>Dividir nas bancadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 12 microscópios - 12 caixas de coleção de lâminas do Laboratório (01 para cada dupla)

		<p>- separar 1 caixa de laminário para cada dupla com as seguintes lâminas: lâmina 1 - bacilo Gram pos lâmina 3 - Staphylococcus lâmina 4 - E. coli lâmina 6 - Sarcina lâmina 12 - saliva lâmina 13 - Streptococcus</p>	<p>11 duplas + 1 grupo com 3 alunos</p>	<p>Material de uso comum: - Papel toalha - Sabão para lavar as mãos</p>
--	--	---	--	--

AULA PRÁTICA Nº 2

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA – Nº 2	GRUPOS	MATERIAL TOTAL
26/02	5B	<p>Microscopia, esfregaço e colorações</p> <p>1) preparar esfregaço em lâminas – a partir das culturas em placa de Petri e/ou de coletas dos colegas</p> <p>2) fazer as colorações de Gram, Ziehl-Neelsen e Ryu</p> <p>3) deixar algumas caixas de</p>	<p>São 25 estudantes divididos em 5 grupos</p>	<p>Dividir nas bancadas:</p> <p>- 03 culturas com crescimento em placa de um coco Gram positivo: <i>Streptococcus epidermidis</i> (01 placa por bancada, para cada 2 grupos + 1 grupo)</p> <p>- 03 culturas com crescimento em placa de um bacilo Gram negativo: <i>E. coli</i> (01 placa por bancada, para cada 2 grupos + 1 grupo)</p>

		<p>laminário disponíveis para os estudantes que quiserem observar as lâminas do laboratório.</p> <p>4) deixar focalizada no microscópio lâminas de micobacteria corada pelo Ziehl-Neelsen</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 05 estantes (01 para cada grupo) - 15 alças bacteriológicas (3 por grupo) - 10 tubos com solução salina (cerca de 3 mL) – (02 para cada grupo) - 10 lamparinas (2 por grupo) <p>Verificar se as lamparinas estão abastecidas com álcool e funcionando</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5 microscópios (1 para cada grupo - bancada) <p>Material de uso comum:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lenço de papel (para limpar as lâminas e as lentes do microscópio) - Papel toalha - Sabão para lavar as mãos - Lâminas limpas - pipetas Pasteur descartáveis com bulbo - Swabs - Abaixadores de língua - Palitos - 02 conjuntos para coloração de Gram - 02 conjuntos para coloração de Ziehl-Neelsen – colocar uma lamparina perto para aquecer a
--	--	---	--

				fucsina - 02 conjuntos para coloração de Ryu - Descarte para as lâminas usadas
--	--	--	--	--

AULA PRÁTICA Nº 3

Parte 1: Esfregaço e coloração de Gram

Parte 2: Inóculo das provas bioquímicas para enterais

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA – Nº 3	GRUPOS	MATERIAL TOTAL
5/03	5D	<u>Parte 1:</u> Microscopia, esfregaço e colorações 1) preparar esfregaço em lâminas – a partir das culturas em placa de Petri e/ou de coletas dos colegas 2) fazer a coloração de Gram	São 53 estudantes divididos em duas turmas 4 grupos para cada laboratório	Em cada laboratório Dividir nas bancadas: <u>Parte 1:</u> - 02 culturas com crescimento em placa de um coco Gram positivo: <i>Streptococcus epidermidis</i> (01 placa por bancada, para cada 2 grupos) - 02 culturas com crescimento em placa de um bacilo Gram negativo: <i>E. coli</i> (01 placa por

		<p>3) deixar algumas caixas de laminário disponíveis para os estudantes que quiserem observar as lâminas do laboratório.</p> <p>4) deixar focalizada no microscópio lâminas de micobacteria corada pelo Ziehl-Neelsen</p> <p><u>Parte 2:</u> Provas de identificação</p> <p>Conjunto para identificação de enterobactérias: TSI, SIM e Meio de Citrato de Simmons</p> <p>- semear bactérias numeradas</p>	<p>bancada, para cada 2 grupos)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 04 estantes (01 para cada grupo) - 12 alças bacteriológicas (3 por grupo) - 08 tubos com solução salina (cerca de 3 mL) – (02 para cada grupo) - 08 lamparinas (2 por grupo) <p>Verificar se as lamparinas estão abastecidas com álcool e funcionando</p> <ul style="list-style-type: none"> - 8 microscópios (2 para cada grupo - bancada) <p><u>Parte 2:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 04 conjuntos para identificação de enterobactérias: TSI, SIM e Meio de Citrato de Simmons (01 para cada grupo) <p>Material de uso comum:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lenço de papel (para limpar as lâminas e as lentes do microscópio) - Papel toalha - Sabão para lavar as mãos - Lâminas limpas - pipetas Pasteur descartáveis com bulbo - Swabs - Abaixadores de língua
--	--	---	---

				<ul style="list-style-type: none"> - Palitos - 02 conjuntos para coloração de Gram
--	--	--	--	--

AULA PRÁTICA Nº 4

DATA	HORÁRIO	AULA PRÁTICA – Nº 4	GRUPOS	MATERIAL TOTAL
10/04	5D	<p>Controle de microrganismos e antibiograma:</p> <p>1) efeito de agentes químicos no crescimento de bactérias – álcool 70 %; desinfetante; solução de iodo; solução de água sanitária.</p> <p>2) efeito da lavagem das mãos na eliminação de microrganismos</p>	<p>São 53 estudantes divididos em duas turmas</p> <p>4 grupos para cada laboratório</p>	<p>Em cada laboratório M-122 e M-124. Dividir nas bancadas:</p> <p>Para cada lab (são 4 grupos em cada lab):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 04 canetas retroprojeter - 04 estantes ou suportes para tubo - 04 culturas com crescimento em caldo de um coco Gram positivo: <i>Streptococcus</i> ou <i>Staphylococcus</i> - 04 culturas com crescimento em caldo de um bacilo Gram negativo: <i>E. coli</i>

		<p>3) antibiograma – técnica de Kirby Bauer</p> <p>ANTIBIOGRAMA PRONTO</p> <ul style="list-style-type: none"> - uma placa com antibiograma para Gram positivo e uma placa com antibiograma para Gram negativo para cada grupo fazer a leitura - tabela para leitura para cada grupo <p>4) efeito da radiação UV sobre o crescimento das bactérias</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 8 alças bacteriológicas (2 alças para cada grupos) - alças de Drigalski (quantas tiver) - 8 lamparinas (2 para cada grupo) - 16 placas de Petri com meio nutriente (4 para cada grupo) - 04 becker com alça de Drigalski e pinças mergulhados na solução de álcool 70 % <p>Material de uso para cada 2 grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Discos de papel de filtro estéreis - Solução de álcool a 70 % - Solução de iodo - Desinfetante comercial (Lysoform) - descartes <p>Material de uso comum:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Papel toalha - Sabão para lavar as mãos <p>Equipamento:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Câmara de Segurança Biológica para uso do UV
--	--	--	--

DISCIPLINA: HIGIENE DE ALIMENTOS
AULA PRÁTICA Nº 1

**CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO : INFLUÊNCIA DA T°, PH E
NUTRIENTE**

OBJETIVO

Evidenciar a influencia da Temperatura, do pH, e dos nutrientes presentes no meio sobre a velocidade de crescimento de microrganismos através da leitura no espectrofotômetro.

PROCEDIMENTO:

Uma cultura iniciadora de *Escherichia coli* , foi preparada em um Erlemmeyer contendo 250ml de meio LB. (peptona, extrato de levedura e NaCl) deixando 24h o frasco a temperatura ambiente.

Dessa cultura iniciadora, 10ml serão colocados em um erlemmeyer contendo 150ml de meio de cultura e essa amostra será colocada nas condições experimentais especificada.

Grupo	Condições experimentais
-------	-------------------------

	Temperatura (°C)	pH	Meio de cultura
I	37°	7,5	LB
II	45°	7,5	LB
III	37°	5	LB
IV	15°	7,5	LB
V	37°	7,5	LB + 2% NaCl
VI	37°	7,5	LB (50% diluição)

LEITURA DE ABSORBÂNCIA

Retirar assepticamente com pipeta automática 3,5ml do meio de cultura e colocar em cubeta de espectrofotômetro. Agitar cuidadosamente, limpar com papel a cubeta e fazer a leitura de adsorbância a 600nm.

Colocar o Erlemmeyer de volta imediatamente nas condições experimentais e aguardar o próximo tempo de amostragem.

(Medir o pH)

A partir dos dados obtidos nas leituras, traçar as curvas de crescimento :

$DO = f(t)$

$\log_{10} = f(t)$

horas de leituras (aproximativas) :

t_0 : 8:00

t_1 : 8:30

t_2 : 9:00

t_3 : 9:30

t_4 : 10:00

t_5 : 10:30

t_6 : 10:45

t_7 : 11:00

t_8 : 11: 15

Estudo comparativo será realizado por contagem em placa de Agar Padrão: a cada amostra, colocar um alçada numa placa e espalhar com alça de Drigalsky. Deixar a 37°C, 48h e fazer contagem das colônias.

Estabelecer a curva $N^\circ \text{ colônias} = f(t)$.

AULA PRÁTICA N°2

CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES À 45°C

Objetivo

Detectar em alimentos, o número mais provável (NMP) de coliformes totais e coliformes à 45°C através da técnica de tubos múltiplos.

Procedimento:

Cada grupo de alunos deverá preparar os tubos de Caldo LST/verde brilhante que serão usados na prática.

- Preparo do meio de cultura

Material

01 erlenmeyer de 250ml;

Meio LST ou verde brilhante;

09 tubos de cultivo e 09 tubos de Durham;

Balança;

Espátula;

Pipeta de 10ml e pipetador;

Água destilada.

Procedimento

Pesar o meio LST/verde brilhante conforme especificado no rótulo e acrescentar a quantidade exata de água destilada, homogeneizar o meio e pipetar 9ml do caldo em cada tubo de cultivo contendo um tubo de Durham. Autoclavar a 121°C por 15min.

- Preparação da amostra

Material

01 erlenmeyer de 300ml com 225 ml de água peptonada estéril e 02 tubos com 9ml de água peptonada preparados previamente.

01 saco estéril;

Pinça e bisturi.

Procedimento

Pesar 25g de amostra no saco plástico estéril e adicionar os 225ml de água peptonada. Colocar o saco plástico no homogeneizador durante 30-60 seg. obtendo assim uma diluição 10⁻¹.

Inocular 1ml do homogeneizado no 1º tubo de H₂O sp. (diluição 10⁻²) e após agitação no “vortex”, inocular 1ml da diluição 10⁻² no 2º tubo (diluição 10⁻³).

- Inoculação da amostra

Material

Pipetas de 1ml ou 5ml estéreis;

09 tubos de LST preparados no início da prática.

Procedimento

Inocular 1ml de cada diluição em 3 tubos. (3 tubos por diluição)

Incubação a 35,5°C

- Leitura dos resultados

Após 48h de incubação a 35°C, verificar o número de tubos positivos – presença de gás nos tubos de Durham. Com esse número, determinar o NMP (número mais provável) de coliformes totais de acordo com a tabela.

Obs.: Para calcular o NMP de coliformes fecais: Inocular 1ml de cada tubo positivo em 9ml de caldo EC, incubar a 45°C e observar a presença de gás (bolhas) após 24 -48h.

AULA PRÁTICA N°3

CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA HIGIENIZAÇÃO

IMPORTANTE: O protocolo está calculado para 1 (uma) turma. Preparar o material de acordo com a quantidade de turmas que farão aula prática na semana!!!

Meio	Vidraria/volume	Quant.	pesar	água
H ₂ O pep.	Erlen./2000ml	01	40g	2000ml
H ₂ O pep.	Erlen./1000ml	01	20g	1000ml
H ₂ O pep.	Erlen./125ml	01	1,2g	60ml
BDA	Erlen./250ml	01	5,85g	150ml
PCA	Erlen./500ml	04	7,05g	300ml
BP	Erlen./500ml	02	18,31g	300ml

- 12 erlenmeyers de 500ml contendo 250ml de água peptonada
- 12 tubos contendo 5ml de água peptonada
- 06 placas de BDA
- 48 placas de PCA
- 24 placas de BP
- *Autoclavar e deixar em geladeira pronto para o uso.*

MATERIAL QUE DEVE SER COLOCADO NAS BANCADAS (POR GRUPO):

1ª prática

03 placas de PCA;
01 alça de Drigalski;
01 pinça;
12 discos de papel de filtro;
Soluções de álcool (50/70/90%);
Solução de cloro e pinho.

2ª prática

01 placa de PCA;
01 placa de BDA.

3ª prática

02 sacos estéreis;
02 erlenmeyers com 250ml de água peptonada;
04 placas de PCA;
01 alça de Drigalski;
Micropipeta de 1000µl.

4ª prática

04 placas de BP;
04 Swabs;
02 tubos de água peptonada;
Micropipeta de 1000µl.

OBS.: Autoclavar ponteiros de 1000µl;

Colocar pissetas com álcool 70%, detergente, solução de iodo e hipoclorito na pia para a lavagem das mãos na prática 03.

Separar as placas de BDA na estufa de fungos;

AULA PRÁTICA N°4

HIGIENIZAÇÃO DE HORTALIÇA: EFICIÊNCIA DA SANIFICAÇÃO COM SOLUÇÃO CLORADA

Material

Erlenmeyer 500ml

TUBOS DE ENSAIOS

Pipeta 5ml, 1ml

Saco plástico para homogenização de amostra

Homogeneizador de amostra

Pinça e bisturi.

Pipetas de 1ml ou 5ml estéreis;

09 tubos de LST preparados no início da prática.

Reagentes

Água peptonada

Meio LST e EC

Soluções de sanificações

Procedimento

Durante a aula será comparada a eficiência da higienização de alface.

Cada mesa realizara 4 testes de higienização em tempo controlado, conforme tabela 1

Cortar com faca esterilizada a alface em dois.

I antes da higienização

a - **Preparação da amostra**

Pesar 25g de amostra (folhas não lavadas) no saco plástico estéril e adicionar os 225ml de água peptonada. Colocar o saco plástico no homogeneizador durante 30-60 seg. obtendo assim uma diluição 10^{-1} .

Inocular 1ml do homogeneizado no 1° tubo de H₂O sp. (diluição 10^{-2}) e após agitação no “vortex”, inocular 1ml da diluição 10^{-2} no 2° tubo (diluição 10^{-3}).

b- Inoculação da amostra

Inocular 1ml de cada diluição em 3 tubos. (3 tubos por diluição)

Incubação a 35,5°C

c- Leitura dos resultados

Após 48h de incubação a 35°C, verificar o número de tubos positivos – presença de gás nos tubos de Durham. Com esse número, determinar o NMP (número mais provável) de coliformes totais de acordo com a tabela.

Obs.: Para calcular o NMP de coliformes fecais: Inocular 1ml de cada tubo positivo em 9ml de caldo EC, incubar a 45°C e observar a presença de gás (bolhas) após 24 -48h.

II Depois da higienização

Com a segunda metade realizar a higienização das folhas conforme as condições descritas na tabela I.

Preparar a amostra 2 com o mesmo procedimento que a primeira amostra.

Tabela 1 condições de Higienização

	Mesa 1		Mesa 2		Mesa 3	
Grupo	1	2	3	4	5	6
Amostra 1	Sem Lavagem		Sem Lavagem		Sem Lavagem	
Amostra 2	lavagem	Lavagem	lavagem	lavagem	lavagem	lavagem
Sanificação	sem	50 ppm	100 ppm	200 ppm	Vinagre 2,5%	Kiboa 200ppm

Tempo de imersão	5 min	5min	5 min
-------------------------	-------	------	-------

DISCIPLINA: MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

AULA PRÁTICA N°1

CONTAGEM DE COLIFORMES 35°C E 45°C, CONTAGEM DE BOLORES/LEVEDURAS, PSICOTRÓFICOS E AERÓBIOS MESÓFILOS.

1) Fazer a assepsia da bancada com álcool 70%. Trabalhar assepticamente perto da lamparina.

2) Preparar a amostra do alimento: alface

Material

1 erlenmeyer de 300ml com 225 ml de água peptonada estéril e 08 tubos com 9ml de água peptonada;

1 saco estéril;

Pipetas estéreis;

Balança para pesagem do alimento

Procedimento

- Pesar 25g de amostra no saco plástico estéril e adicionar os 225ml de água peptonada. Colocar o saco plástico no homogeneizador durante 30-60 seg obtendo assim uma diluição 10^{-1} . - Inocular 1ml do homogeneizado no 1º tubo com 9 ml de água peptonada (diluição 10^{-2}) e após agitação no “vortex”, inocular 1ml da diluição 10^{-2} no 2º tubo (diluição 10^{-3}).

Contagem de Coliformes 35°C e Coliformes 45°C

OBJETIVO:

Detectar em alimentos, o número mais provável (NMP) de coliformes totais e coliformes à 45°C através da técnica de tubos múltiplos.

Material

Pipetas;
18 tubos de LST

3) Inoculação das amostras das diluições preparadas

- Inocular 1ml de cada diluição em 3 tubos. (3 tubos por diluição)
- Incubação a 35,5°C por 48 h
- Fazer a leitura com a monitoria – 5C anotar os resultados e guardar os tubos na geladeira para a próxima aula

Contagem de bolores/leveduras, psicrotróficos e aeróbios mesófilos

OBJETIVO:

Fazer as contagens desses indicadores em placas.

4) Inoculação das amostras das diluições preparadas

a) aeróbios mesófilos:

Material

Pipeta automática de 100 µl e ponteiras estéreis;
3 placas de PCA

- Pipetar 0,1ml (100 µl) de cada diluição (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}) em placa de Petri com meio PCA e espalhar com alça de Drigalski
- Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h
- Fazer a leitura com a monitoria – 5C calcular a UFC/g e anotar os resultados

b) psicrotróficos:

Material

Pipeta automática de 100 µl e ponteiras estéreis;
3 placas de PCA

- Pipetar 0,1 ml (100 µl) de cada diluição em placa de Petri com meio PCA e espalhar com alça de Drigalski
- Incubar a 4°C por 7 dias.
- Fazer a leitura na próxima aula (26/08) calcular a UFC/g e anotar os resultados

c) bolores e leveduras:

Material

Pipeta automática de 100 µl e ponteiras estéreis;
3 placas de PCA com cloranfenicol ou meio DRBC

- Pipetar 0,1 ml (100 µl) de cada diluição (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}) em placas de Petri com o meio, espalhar com alça Drigalski
- incubar a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 3 dias (1ª leitura), deixando na incubação por mais 5 dias (2ª leitura).

- Fazer a 1ª leitura com **2 dias** com a monitoria – 5C ou 5D e anotar o resultado;
- Fazer a 2ª leitura na próxima aula (26/08) calcular a **UFC/g** e anotar os resultados

AULA PRÁTICA Nº2

ANÁLISE DE SALMONELLA

Método tradicional - Presença e ausência

Pré- enriquecimento

- Recuperação de células injuriadas
- Incubação em condições não seletivas- 18horas- no mínimo
- Opções: Água peptonada (ISO 6579), caldo lactosado (BAM/FDA)

Enriquecimento em caldo seletivo

- Inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover o crescimento preferencial da *Salmonella*, 18 a 24H
- Dois meios- cepas resistentes
 - RV (Rappaport- Vassiliadis modificado) ou RVS (Rappaport- Vassiliadis Soja)- verde de malaquita, pressão osmótica (cloreto de magnésio em alta concentração) e pH ácido (5,1)- seleção da *Salmonella*
 - TT (tetrionato)- Verde brilhante, bile, iodo e tiosulfato de sódio- crescimento de bactérias redutoras do tetrionato- *Salmonella*
 - Inibição de coliformes e enterobactérias não redutoras
 - *Proteus* – pode crescer- adição de novobiocina.

Plaqueamento seletivo diferencial

- Desenvolvimento preferencial de *Salmonella*, com características típicas
- Distinção das competidoras
- Recomenda-se plaqueamento em mais de um tipo de meio
- HE (agar Entérico de Hectoen), XLD (Ágar Xilose Lisina Deoxicolato)...- fermentação da lactose e produção de H₂S.
- Ágar Verde brilhante (BG)- fermentação da lactose se produção de H₂S- cepas não produtoras
- Ágar bismuto sulfito (BS)- não fermentação da lactose, com produção de H₂S.

Confirmação

- Verificar se as colônias típicas são mesmo *Salmonella*
- Provas bioquímicas e sorologia

Procedimento

2.1) Preparo das amostras – pré- enriquecimento

- diluição da amostra e água peptonada 25g e 225mL de água peptonada
- Incubação à 37°C por 18 +- 2H

2.2) Fase de Enriquecimento Seletivo das amostras

- Da mistura pré-enriquecida, deve-se transferir com o auxílio de uma pipeta automática, 0,1mL e 1mL para tubos contendo 10 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e 10 mL de caldo Tetrionato, respectivamente...
- Caldo RV deverá ser incubado por 24 ± 2 h à 42 ± 0.2°C

- Caldo TT por 24 ± 2 h à 37°C - banho-maria ou estufa.

2.3) Fase de plaqueamento em meios seletivos

- A partir dos caldos de enriquecimento seletivo, realizar estrias em placas com ágar Sulfito de Bismuto (BS), ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e ágar Hektoen (HE),
- Incubar em estufa bacteriológica por 24 ± 2 h at 35°C .
- Morfologia típica de colônias de *Salmonella*:
- **Ágar BS:** colônias marrons ou pretas com ou sem brilho metálico. O meio ao redor das colônias muda gradativamente para uma coloração marrom a preta, com o prolongamento do tempo de incubação.
- **Ágar XLD:** colônias cor de rosa escuro, com ou sem centro preto. Cepas fortemente produtoras de H_2S podem produzir colônias com centro preto grande e brilhante, ou mesmo inteiramente pretas.
- **Ágar HE:** colônias verde-azuladas, com ou sem centro preto. Cepas fortemente produtoras de H_2S podem produzir colônias inteiramente pretas.

Morfologia de colônias atípicas de *Salmonella*:

- Na ausência de colônias típicas ou suspeitas de *Salmonella*, procura-se por colônias atípicas, como as descritas a seguir:
- **Ágars HE e XLD:** as salmonelas podem aparecer na forma de colônias amarelas, com ou sem centro negro Na ausência de colônias típicas após 24 ± 2 h de incubação, então tome 2 ou mais das atípicas para confirmação bioquímica posterior.
- **Agar BS:** algumas cepas podem se apresentar na forma de colônias verdes com pouco ou nenhum escurecimento do meio adjacente. Na ausência de colônias típicas após 24 ± 2 h de incubação, reincube as placas por mais 24 ± 2 h

adicionais. Se não houver colônias suspeitas após esse período, então tome duas ou mais colônias atípicas e transfira para tubos de TSI e LIA.

- Validação: Nessa fase de plaqueamento seletivo devem ser utilizadas cepas padrões de *Salmonella* para evidenciamento de reações características e não características do patógeno nos três meios de cultura empregados.
- - cepa controle com morfologia típica: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)
- - cepas controle com morfologia atípica: *Salmonella diarizonae* (ATCC 12325) – lac (+) e H₂S (+), *Salmonella abortus equi* (ATCC 9842 ou de bacterioteca nacional) – lac (-) e H₂S (-)

2.4) Confirmação preliminar das colônias de *Salmonella*

- É feita com as colônias típicas e atípicas de *Salmonella* isoladas nos ágaros seletivos já citados.
- A transferência das colônias é feita com o auxílio de uma agulha de inoculação.
 - Ágaros TSI e LIA.
- Incubar por 35°C for 24 ± 2 h.

Reação típica de *Salmonella* em TSI: rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do ágar). Reação atípica em TSI, que não deve ser descartada se as demais reações em LIA se apresentarem típicas: rampa e fundo ácidos (amarelos), com ou sem produção de H₂S (Fig. 1).

- **Reação típica de *Salmonella* em LIA:** fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem a produção de H₂S (escurecimento do meio). Reação atípica em LIA, que não deve ser descartada se as demais reações em TSI se apresentarem típicas: fundo amarelado com rampa alcalina, com ou sem produção de H₂S (Fig. 1) .



Fig1:TSI e LIA típicos

2.5) Testes sorológicos e bioquímicos para confirmação definitiva

- Serão realizados os seguintes testes a partir das colônias puras:
 - Teste de urease (-)*
 - Teste de lisina descarboxilase (+)*
 - Teste VP (-)*
 - Teste de indol (-)*

- Teste de B- galactosidase (-)*

Ou Kit AP20E

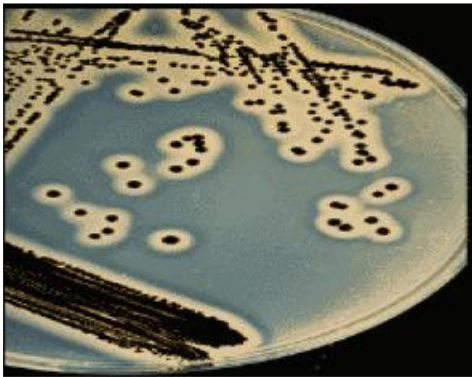
* Serão consideradas como *Salmonella* todas as colônias que apresentarem as características

2.6) Testes sorológicos e bioquímicos para confirmação definitiva

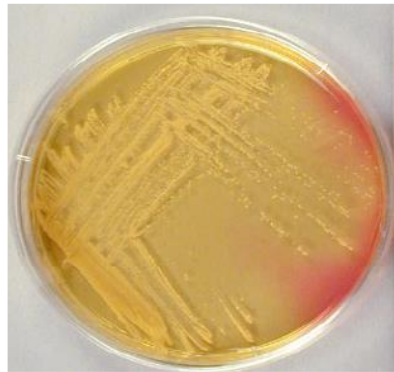
- Detecção dos antígenos somáticos O ou polivalente(A, B, C1, C2, D, E1, E2, E3, E4)
- Detecção de antígeno Vi (capsular)
- Detecção de antígenos flagelares (poli H)
 - Interpretação:

Procedimentos

- Diluição das amostras- 1:10, 1:100, 1:1000
- Inoculação em Ágar Baird-Parker (BP) (0,1mL)
- Incubação e contagem de colônias- 35-37°C por 48H
 - Contagem- placas com 20 a 200 colônias- somente as típicas
 - Circulares, pretas ou cinzas escuras, lisas, convexas, bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por zona opaca e/ou halo transparente
 - Confirmação das colônias típicas- BHI-Teste da coagulase
 - TSA- reservar colônias testes adicionais
 - Calculo dos resultados:
 - UFC/g ou mL- N° de colônias x diluição x10 x% de confirmadas



BP



MANITOL

Testes adicionais

- TSA
- Teste da catalase, teste da termonuclease, teste de sensibilidade à lisostafina, teste de utilização anaeróbica da glicose e do manitol.

Interpretação dos resultados

característica	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i>
catalase	+	+	+
coagulase	+	-	-
termonuclease	+	-Interpretação dos resultados	-
lisostafina	sensível	sensível	resistente
Utilização anaeróbica da glicose	+	+	-
Utilização anaeróbica do manitol	+	-	-

AULA PRÁTICA N°3:

CONTAGEM DE *STAPHYLOCCOCUS* COAGULASE POSITIVO

Material (3 grupos)

- **Coagulase**

Tubos com 0,5 mL de meio líquido BHI da aula passada

Prova da coagulase

3,0mL Plasma coagulase EDTA

Lamparina ou bico de Bunsen

- **Peroxidase**

Laminas de vidro

Ponteiras azuis e amarelas estéreis

P100

Fazer previamente um controle para a aula

- **Controle positivo- Peroxidase**

0,5 mL de meio líquido BHI com *S. aureus* Crescido por 24H à 37°C

- Salmonella- XLD, HE e BS

Prática I: Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo

Legislações sanitárias dos alimentos – verificação de adequação dos resultados obtidos durante as práticas

Material (3 grupos)

Amostras da aula anterior para a prova da coagulase

Fazer previamente um controle para a aula

- **Controle positivo - Coagulase**

0,5 mL de meio líquido BHI com *S. aureus* + 0,5mL de Plasma coagulase EDTA-
incubação 24-48h.

Salmonella- leitura do XLD, HE e BS

Inoculação das provas bioquímicas

Leitura das provas bioquímicas.

DISCIPLINA: MICROBIOLOGIA BUCAL

AULA PRÁTICA N°1

ANÁLISE DOS PADRÕES SALIVARES

Objetivo: Avaliar a viscosidade, fluxo saliva e capacidade tampão da saliva

Materiais:

1. Frasco para coleta
2. Pipeta graduada
3. Cronometro
4. Dique de borracha
5. Solução de ácido clorídrico 0,005
6. Fita indicadora de pH

Métodos:

1. Fluxo salivar: Sialometria em repouso

- Tempo de coleta: 5 minutos
- Paciente sentado
- Olhos abertos, sem conversar ou abrir a boca
- Pescoço inclinado frontalmente e para baixo para favorecer o escoamento passivo da saliva
- Não deglutir a saliva durante o tempo de coleta
- Medir a quantidade de saliva coletada
- Secreção salivar expressa em ml/min
-

Valore sialométricos (repouso)	
0,0ml/min	assialia
0,1 a 0,24ml/min	hipossialia
0,3 a 0,4ml/min	ideal

2. Fluxo salivar: Sialometria estimulada

- Paciente sentado mastigando (goma sem açúcar, pedaço de dique de borracha ou parafina com ponto de fusão de 42 a 44°) por 1 min

- Despreza-se essa saliva e coleta-se a saliva formada nos 5 minutos subsequentes em proveta graduada
- A secreção salivar – expressa em ml/min

Valore sialométricos (estimulado)	
1,0 a 3,0 ml/min	normal
0,7 a 1,0 ml/min	baixo
< 0,7 ml/min	hipossalivação

3. Capacidade Tampão(capacidade da saliva em neutralizar o ácido formado)

- Adiciona-se 3 ml de ác. clorídrico 0,005 em 1 ml de saliva estimulada
- Após 2 minutos medir o pH com fita indicadora
- Valores abaixo de pH 4,0 – baixa capacidade tampão

4. Fiabilidade

-Coleta da saliva em repouso

Qualidade-Fiabilidade	
Serosa	Não forma fio
Fluida	± 2 cm de fio
Viscosa	≥ 5 cm de fio

AULA PRÁTICA 2:

IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NO BIOFILME DENTAL



OBJETIVO:

Avaliar as características morfológicas e os aspectos relativos à coloração de Gram de amostras biofilme dental supra e subgengival.

MATERIAIS:

Curetas periodontais estéreis

Lâminas

Corantes de Gram

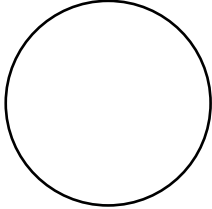
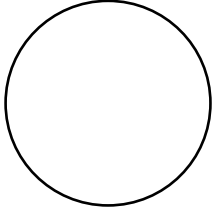
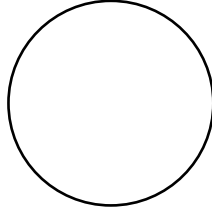
MÉTODOS

- Coletar amostras de biofilme supragengival das faces livres dos dentes, com auxílio de cureta estéril
- Sobre uma lâmina de vidro, colocar uma gota de água e emulsionar o material na gota de água. Deixar secar.
- Passar o esfregaço na chama do bico de Bunsen três vezes a fim de fixar o material.
- Coletar amostras de biofilme subgengival com auxílio de cureta estéril
- Sobre uma lâmina de vidro, colocar uma gota de água e emulsionar o material na gota de água. Deixar secar.
- Passar o esfregaço na chama do bico de Bunsen três vezes a fim de fixar o material.

Executar a coloração de Gram

- Coloração de Gram
- Cobrir o esfregaço seco com violeta genciana e deixar por 1 minuto.
- Esgotar a lâmina e cobrir com solução de lugol e deixar 1 minuto.
- Esgotar a lâmina e, mantendo a mesma inclinada, pingar gotas de álcool até que não se desprenda mais corante da preparação.
- Lavar com água corrente.
- Cobrir a lâmina com solução de safranina e deixar por 30 segundos.
- Lavar a lâmina e cobrir com papel de filtro.
- Examinar ao microscópio com a objetiva de imersão.
- Observar ao microscópio, com objetiva de imersão, as preparações indicadas.
- Desenhar e identificar, nos espaços abaixo, as observações microscópicas.

RESULTADOS

		
Nome:	Nome:	Nome:
Forma:	Forma:	Forma:
Arranjo das células:	Arranjo das células	Arranjo das células
Cor:	Cor:	Cor:
Gram:	Gram:	Gram:

INTERPRETAÇÃO: Houve diferença no perfil microbiológico das amostras de biofilme coletada da região supragengival e subgengival? Justifique

AULA PRÁTICA N°3

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DA CÁRIE DENTAL

OBJETIVO:

Avaliar o risco à cárie dental, de acordo com a contagem de *Streptococcus mutans* na saliva.

MATERIAIS:

- Saliva estimulada
- Placas com ágar Mitis salivarius com sacarose e bacitracina- MSB ou meio SB20
- Tubos com pérolas de vidro
- Tubos com 9ml de diluente
- Alça de Drigalski
- Lamparina

MÉTODOS

Experimento 1:

- Coletar saliva estimulada:
 - Paciente sentado mastigando (goma sem açúcar, pedaço de dique de borracha ou parafina com ponto de fusão de 42 a 44°) por 1 min
 - Despreza-se essa saliva e coleta-se a saliva formada nos 5 minutos subsequentes em frasco de coleta
- Transferir 2ml de saliva para um tubo de ensaio contendo pérolas de vidro
- Homogenizar a saliva por 30 segundos
- Fazer diluições decimais da saliva:
 - Com uma pipeta estéril, adicionar a tubos contendo 9 mL de diluente, 1 mL das amostra a ser analisada (diluição 10^{-1})
 - Agitar para que haja uma perfeita homogeneização
 - Com outra pipeta estéril, transferir 1 mL deste tubo para um segundo tubo contendo 9 mL de diluente (diluição 10^{-2}) proceder assim até completar as diluições necessárias para a análise da amostra
- Semeadura pelo método de espalhamento em placa (“spread plate”)
 - As placas de Petri deverão ser abertas próximas ao bico de Bunsen para evitar contaminação com microrganismos do ar



- Inocular uma alíquota de 0,1 mL de amostra direta ou diluída na placa contendo ágar Mitis salivarius com sacarose e bacitracina- MSB ou SB 20
- Espalhar essa amostra com a alça de drigalski, previamente esterilizada (forno, por 2 horas a 180°C, ou em autoclave, a 121°C por 30 minutos) ou ainda pode-se fazer uma esterilização imediata mergulhando a alça em álcool absoluto e em seguida passando na chama (3 vezes consecutivas).
- Tempo de incubação: 48-72 horas em microaerofilia

AULA PRÁTICA N°4

IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS DOENÇAS PERIODONTAIS

OBJETIVO:

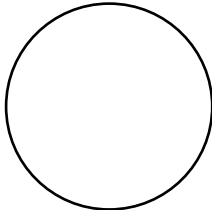
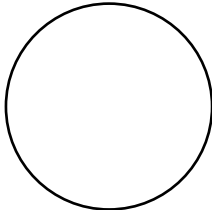
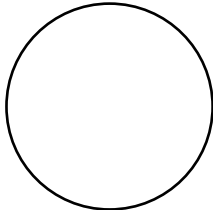
Avaliar as características morfológicas dos microrganismos presentes em amostras biofilme dental supra e subgingival de pacientes com doença periodontal.

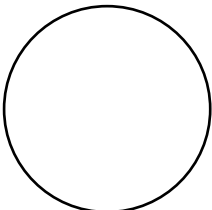
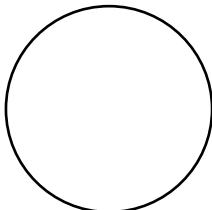
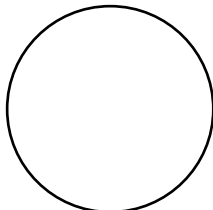
MATERIAIS:

Lâminas preparadas a partir de amostras de biofilme coletadas de pacientes portadores de doença periodontal atendidos nas Clínicas Odontológicas da UCB.

MÉTODOS:

1. Examinar no microscópio ótico com objetiva de imersão, as lâminas preparadas
2. Desenhar e identificar, nos espaços abaixo, as observações microscópicas

		
Nome:	Nome:	Nome:
Forma:	Forma:	Forma:
Arranjo das células:	Arranjo das células	Arranjo das células
Cor:	Cor:	Cor:
Gram:	Gram:	Gram:

		
Nome:	Nome:	Nome:
Forma:	Forma:	Forma:



Arranjo das células:	Arranjo das células	Arranjo das células
Cor:	Cor:	Cor:
Gram:	Gram:	Gram:

1- O que predomina na gengivite? E na Periodontite?

AULA PRÁTICA N°5 **IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS**

• **Introdução:**

A identificação dos fungos é, em grande parte, baseada em sua morfologia. Como eles habitam os mais variados substratos, apresenta em decorrência uma variação de tipos morfológicos, dos mais simples aos mais complexos. Considera-se no seu estudo, aspectos da **morfologia macroscópica** (colônias filamentosas, cremosas, cotonosas, pulverulentas, formação de pigmentação, etc) como também da **morfologia microscópica**.

Materiais

1. Placas de cultivo (Agar Sabouraud) inoculadas
2. Lâminas
3. Microscópio ótico
4. Corantes de Gram

Métodos

Etapa 1: Estudo da morfologia macroscópica

1. Algumas placas de Agar Sabouraud foram inoculadas a partir de esfregaços realizados com SWAB de pacientes com suspeita clínica de Candidíase bucal, atendidos nas Clínicas Odontológicas da UCB.
2. Morfologia macroscópica das colônias (tipo de colônia bem como outras características) presentes em cada seguimento de cada placa de Agar Sabouraud

Etapa 2: Estudo da morfologia microscópica

-flambar a alça de platina

-retirar um poço do crescimento fúngico da placa de Agar Sabouraud com auxílio da alça de platina

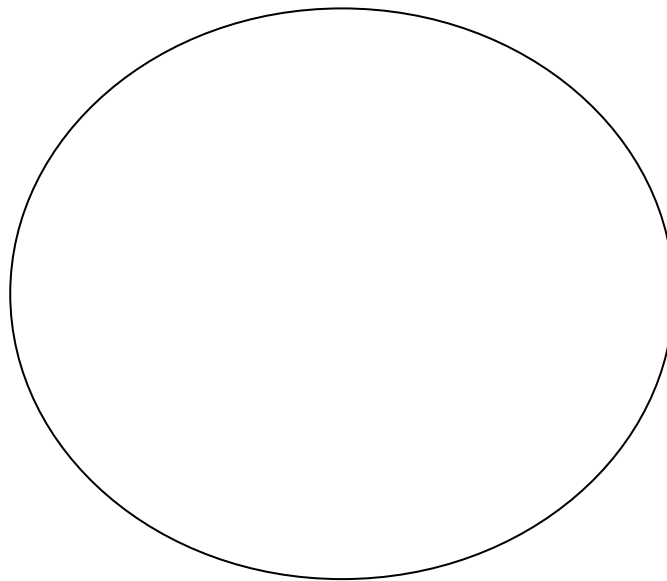
- fazer o esfregaço em lâmina
- flambar a alça de inoculação
- fixar o esfregaço
- Executar a coloração de Gram

Coloração de Gram

- Sobre uma lâmina de vidro, colocar uma gota de água. Com a alça de platina tocar levemente na superfície da colônia e emulsionar o material na gota de água (caso o microrganismo seja fornecido em suspensão, colocar uma gota desta sobre a lâmina). Deixar secar.
- Passar o esfregaço na chama do bico de Bunsen três vezes a fim de fixar o material.
- Cobrir o esfregaço seco com violeta genciana e deixar por 1 minuto.
- Esgotar a lâmina e cobrir com solução de lugol e deixar 1 minuto.
- Esgotar a lâmina e, mantendo a mesma inclinada, pingar gotas de álcool até que não se desprenda mais corante da preparação.



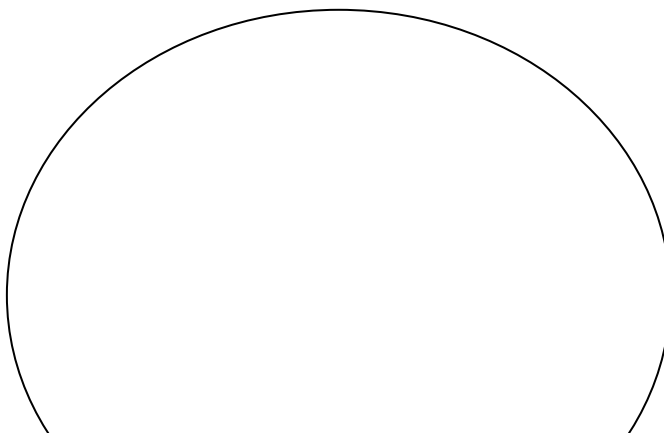
- Lavar com água corrente.
- Cobrir a lâmina com solução de safranina e deixar por 30 segundos.
- Lavar a lâmina e cobrir com papel de filtro.
- Examinar ao microscópio com a objetiva de imersão.
 - a) Observar ao microscópio, com objetiva de imersão, as preparações indicadas.
 - b) Desenhar e identificar, no espaço abaixo, as observações microscópicas.



I. identificação de leveduras - Aspectos microscópicos

- Observar as Lâminas já preparadas
- Identificar os aspectos morfológicos das leveduras
- Procurar as estruturas das pseudohifas

Desenhar e identificar, no espaço abaixo, as observações microscópicas.



8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.
2. MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 3ª ed.; 4ª ed.; ou 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/ Elsevier, 2000; 2004; ou 2006.
3. Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Dunlap,P.V; Clark, D.P. **Microbiologia De Brock**. 12ª edição. ArtmEd,m Brasil. 2004. 624 p.
4. TORTORA, G.L.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000.
5. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.

6. BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. Jawetz, Melnick e Adelberg: **Microbiologia médica**. 22. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2001. 653 p. 2005.
7. MILLER, R.N.G.; CAPDEVILLE, G.; KRUGER, R.H. Manual de práticas laboratoriais em microbiologia. 1ª edição. Brasília: Editora Universa, 2003.
8. MURRAY, P.; DREW L.; KOBAYASHI G.S.; THOMPSON. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1990.
9. 1. EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2ª Ed Atheneu, 1994.
10. 2. ENEO, A. da SILVA Jr. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**, 3ª Ed. Livraria Varela, 1999
11. 3. HOBBS, B. C. & ROBERTS D. **Toxinfecção e Controle Higiênico Sanitário de Alimentos**. 1ª ed. Livraria Varela, 1999
12. ANDRADE, N. J. & MACÊDO, J. A. B. **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo, Varela, 1996.
13. 2. ICMSF *APPCC - Na qualidade e segurança microbiológica de alimentos*, 1ª Ed, Livraria Varela, 1999
14. 3. SILVA, N. & JUNQUEIRA, V. C. **Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos** – Manual Técnico n. 14. ITAL, Campinas, 1995.