

Aula Prática 04: MICROPIPETAS AUTOMÁTICAS E MANOBRAS ASSÉPTICAS

MICROPIPETAS AUTOMÁTICAS

- 1) Identifique sobre a bancada, as 3 micropipetas automáticas:
 - Vermelha (para volumes de 0,5 μL a 10,0 μL);
 - Amarela (para volumes de 10,0 μL a 100,0 μL);
 - Azul (para volumes de 100,0 μL a 1.000 μL , sendo que 1.000 μL = 1,0 mL).
- 2) A faixa de volume que a micropipeta recolhe está escrita no gatilho que fica em sua extremidade.
- 3) O volume a ser recolhido deve ser alterado através do botão preto que fica entre o gatilho e o visor. Gire o botão preto e visualize a mudança de volume no visor.
- 4) A mudança de cor nos números do visor indica a presença de uma vírgula. Por exemplo:
 - Na micropipeta vermelha, 100 significa 10,0 μL .
 - Na micropipeta amarela, 100 significa 100 μL .
 - Na micropipeta azul, 100 significa 1,0 mL (= 1.000 μL).
- 5) Na ponta da micropipeta, deve ser utilizada uma ponteira plástica descartável para recolher o líquido.
 - Para a micropipeta vermelha, será a ponteira branca.
 - Para a micropipeta amarela, será a ponteira amarela.
 - Para a micropipeta azul, será a ponteira azul.
- 6) As ponteiras são estéreis e estão lacradas dentro da caixa de ponteiras. Ligue o bico de Bunsen e abra a caixa de ponteiras azuis na zona asséptica da chama.
- 7) Regule a micropipeta azul para o volume de 500 μL (=0,5 mL), e sem encostar nas ponteiras, utilize a micropipeta azul para retirar uma das ponteiras da caixa.
- 8) Aperte o gatilho da micropipeta, e repare que ele possui 2 estágios de resistência.
 - **Primeiro estágio:** para **PEGAR** o líquido (aperte até o primeiro estágio, coloque a ponteira dentro do líquido, solte o gatilho, e retire a ponteira de dentro do líquido);
 - **Segundo estágio:** para **SOLTAR** o líquido.
- 9) **ATENÇÃO:** Repare no que acontece se, para **PEGAR** o líquido, você apertar erroneamente o gatilho até o segundo estágio.
 - **Etapa 1:** pegue 500 μL apertando o gatilho corretamente até o primeiro estágio. Utilize a caneta para marcar com um traço o local até onde o líquido chegou na ponteira;
 - **Etapa 2:** agora, pegue os mesmos 500 μL apertando o gatilho erroneamente até o segundo estágio. Utilize a caneta para marcar com um traço o local até onde o líquido chegou na ponteira;
 - **Etapa 3:** compare o que aconteceu em ambos os casos.
- 10) Aperte o botão atrás do gatilho para dispensar a ponteira no descarte contendo 3% de hipoclorito de sódio.

- 11) Guarde a micropipeta automática sempre com o visor no volume máximo.

MANOBRAS ASSÉPTICAS

A. Simulação da transferência de uma cultura bacteriana de um tubo (meio líquido) para outro tubo (meio líquido)

- 1) Esterilize a alça de transferência na chama do bico de Bunsen até que a alça fique vermelha (flambe ao rubro toda a parte que será inserida no tubo de ensaio: a parte metálica).
- 2) Mantenha a alça próxima ao bico de Bunsen e espere cerca de 1 min para esfriar.
- 3) Pegue dois tubos de ensaio (tubo A e tubo 1) com meio caldo nutritivo estéril.
- 4) Remova as tampas com os dedos da mão que segura a alça. **NÃO COLOQUE AS TAMPAS NA BANCADA.**
- 5) Passe as extremidades abertas dos tubos através da chama (flambe os tubos).
- 6) Com a alça, retire uma pequena quantidade de inóculo do tubo A (sem microrganismos).
- 7) Introduza a alça no tubo 1 (com meio estéril).
- 8) Flambe novamente as extremidades dos tubos.
- 9) Tampe os tubos deixando a tampa do tubo 1 semi-aberta.
- 10) Esterilize a alça na chama.
- 11) Incube o tubo 1 a 37 °C, a 150 rpm por 18 h.

B. Transferência de uma cultura bacteriana de um tubo (meio líquido) para outro tubo (meio líquido)

Realize o mesmo procedimento do item “A”, porém transferindo agora um inóculo do tubo B (contém uma suspensão de bactéria) para um tubo estéril 2. Incube o tubo 2 a 37 °C e a 150 rpm por 18 h.

C. Simulação da transferência de uma cultura bacteriana um tubo (meio líquido) para placa de Petri (meio sólido)

- 1) Ajuste uma micropipeta automática para o volume de 50 µL.
- 2) Com a micropipeta automática, retire uma ponteira amarela do suporte de ponteiros, **SEM TOCÁ-LA.**
- 3) Remova a tampa do tubo A (sem microrganismos).
- 4) Flambe a extremidade aberta do tubo A.
- 5) Incline o tubo A e introduza **SOMENTE** a ponteira no tubo, colete 50 µL do inóculo e retire a ponteira do tubo.
- 6) Flambe a boca do tubo A e recoloque sua tampa.
- 7) Deixe semi-aberta uma placa de Petri contendo meio de cultura esterilizado (placa 1).
- 8) Despeje o conteúdo da ponteira na placa 1.
- 9) Dispense a ponteira no descarte contendo hipoclorito de sódio 2%.
- 10) Mergulhe a espátula de Drigalsky em álcool 70%, flambe-a e espere cerca de 1 min para esfriar.
- 11) Confirme o resfriamento da Drigalsky encostando-a no meio de cultura.
- 12) Espalhe o inóculo líquido sobre a superfície do ágar com a espátula de Drigalsky em movimentos circulares, de modo a distribuir os microrganismos uniformemente pelo meio sólido.
- 13) Feche a placa de Petri e deixe-a invertida sobre a bancada.
- 14) Mergulhe a espátula de Drigalsky em álcool 70% e flambe-a novamente.
- 15) Incube a placa 1 a 37 °C por 18 h.

D. Transferência de uma cultura bacteriana um tubo (meio líquido) para placa de Petri (meio sólido)

Realize o mesmo procedimento do item “C”, porém transferindo agora um inóculo do tubo B (contém uma suspensão de bactéria) para uma placa de Petri contendo meio estéril (placa 2). Incube a placa 2 a 37 °C por 18 h.

E. Questões

- 1) Quais foram os resultados obtidos? Quantas colônias cresceram em cada placa? Por quê?
- 2) Qual é a importância do trabalho ser realizado na zona de segurança da chama do bico de Bunsen?
- 3) Qual instrumento se utiliza para transferir um pequeno volume (cerca de 10 μL) de cultura líquida para uma placa de Petri contendo meio sólido?
- 4) Qual instrumento se utiliza para transferir uma colônia isolada de uma cultura sólida para um tubo contendo meio líquido?