

MANUAL

Técnico do Estagiário

Renata Lopes S. da Silva
Victor Manuel C. F. Balcão
Marta Maria D. C. Vila



 **VBlab**
Laboratório de Vírus Bacterianos da UNISO

Laboratório de Vírus Bacterianos da Uniso

VBlab - Uniso

Manual técnico do estagiário

Renata Lopes S. da Silva
Victor Manuel C. F. Balcão
Marta Maria D. C. Vila

Manual técnico do estagiário

Eduniso
Sorocaba/SP
2025

© 2025 Renata Lopes S. da Silva, Victor Manuel C. F. Balcão, Marta Maria D. C. Vila.
Manual técnico do estagiário.

As imagens e os textos apresentados nesta edição são de total e exclusiva responsabilidade dos autores, que mantêm os respectivos direitos autorais, mas atribuem à Editora da Universidade de Sorocaba (Eduniso) o direito de primeira publicação.

Os autores são responsáveis por quaisquer violações de direitos autorais (ou outros direitos) de terceiros.

Qualquer parte desta publicação pode ser reproduzida, desde que a fonte seja citada.



4.0 internacional

Créditos

Capa, projeto gráfico: Renata Lopes Simão da Silva

Normalização: Vilma Franzoni

Produção editorial e diagramação: Silmara Pereira da Silva Martins

Revisão gramatical: os autores

Ficha Catalográfica

S583m	Silva, Renata Lopes S. da Manual técnico do estagiário / Renata Lopes S. da Silva, Victor Manuel C. F. Balcão, Marta Maria D. C. Vila – Sorocaba, SP : Eduniso, 2025. 55p.; il. e-ISBN: 978-65-89550-28-0 DOI: https://doi.org/10.22482/eduniso.62 1. Laboratório de Vírus Bacterianos – Uniso (Sorocaba, SP) – Manual técnico. 2. Estagiário de laboratório – Manual técnico. I. Título. II. Balcão, Vitor Manuel C. F. III. Vila, Marta Maria D. C.
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Renata Lopes S. da Silva
Victor Manuel C. F. Balcão
Marta Maria D. C. Vila

Manual técnico do estagiário

Reitor: Rogério Augusto Profeta

Pró-Reitoria de Graduação e Assuntos Estudantis (Prograd): Fernando de Sá Del Fiol

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa, Extensão e Inovação (Propein): José Martins de Oliveira Jr.

Direção Editorial: Rafael Ângelo Bunhi Pinto

Editores Assistentes: Silmara Pereira da Silva Martins; Vilma Franzoni

Conselho Editorial

Adilson Rocha

Daniel Bertoli Gonçalves

José Ferreira Neto

José Martins de Oliveira Junior

José Renato Polli

Marcos Vinicius Chaud

Maria Ogécia Drigo

Rafael Ângelo Bunhi Pinto

Vidal Dias da Mota Junior

Editora da Universidade de Sorocaba (Eduniso)

Biblioteca "Aluísio de Almeida"

Rodovia Raposo Tavares KM 92,5

18023-000 – Jardim Novo Eldorado

Sorocaba | SP | Brasil

Fone: 15 – 21017018

E-mail: eduniso@uniso.br

Site: <https://editora.uniso.br>

DEDICATÓRIA

Existe um provérbio africano que diz: *“Se quer ir rápido, vá sozinho; mas, se quiser ir longe, vá acompanhado”*. Portanto, este manual é dedicado a todos os que já passaram pelo VBlab e colaboraram na construção de sua história.

Dedicamos também a todos os futuros estagiários, alunos de iniciação científica, de mestrado e de doutorado que, certamente, levarão a história deste laboratório muito além do que podemos imaginar.

Renata Lopes

APRESENTAÇÃO

Estágios representam um importante papel na formação dos alunos, pois proporcionam a vivência inicial aos futuros profissionais em ambiente que possibilita a aplicação dos conceitos teóricos e teórico-práticos adquiridos ao longo das aulas dos cursos de graduação, desenvolvendo suas competências. A combinação de conhecimentos, habilidades e atitudes em atividades laboratoriais promove o crescimento de competências para o desempenho profissional. O estágio permite desenvolver atividades práticas por meio de atribuições e funções referentes à profissão que será exercida, futuramente, pelo estudante. Além disto, o estágio pode ser encarado como um instrumento de integração do aluno ao mundo do trabalho, saberes e relações interpessoais.

Assim, entendendo o estágio como ferramenta significativa para a formação dos alunos, os responsáveis pelo Laboratório de Vírus Bacterianos da Uniso (VBlab) tem oferecido sistematicamente oportunidades de estágio para alunos de diversos cursos da instituição. Adicionalmente, verificando-se que os alunos devem ser supervisionados em suas atividades para um real aprendizado, vislumbrou-se a possibilidade de desenvolver um manual técnico ilustrando as principais atividades desenvolvidas. Ao longo dos anos, foram sendo observadas algumas dificuldades encontradas pelos alunos ao iniciarem um estágio no VBlab. Neste sentido e, por iniciativa da aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Uniso (PPGPTA-UNISO), Renata Lopes, surgiu o “Manual Técnico do Estagiário do VBlab”.

O Manual foi concebido com linguagem simples e direta, de modo a ser um elemento esclarecedor naquilo que é básico e fundamental no trabalho em um laboratório de pesquisas em Microbiologia e Biotecnologia. O Manual traz algumas das técnicas e principais atividades realizadas no VBlab, para o estudante poder tirar o máximo proveito durante seu estágio.

Este Manual foi preparado para você, aluno, que está começando sua jornada no mundo das vidrarias, reagentes e equipamentos laboratoriais! Esperamos que este Manual possa ser útil nesta sua caminhada. Da nossa parte, é um prazer e uma honra ver um estagiário se tornar um especialista!

Seja muito bem-vindo ao VBlab!

Victor M. Balcão

Marta M. D. C. Vila

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 O LABORATÓRIO.....	8
3 TAREFAS DO ESTAGIÁRIO	10
4 CUIDADOS BÁSICOS	11
5 ESTERILIZAÇÃO.....	13
6 MEIOS DE CULTURA.....	23
7 PROCEDIMENTOS BÁSICOS.....	26
8 ROTEIRO DO ESTAGIÁRIO.....	45
REFERÊNCIAS e sugestões de leitura	46

1 INTRODUÇÃO



O estágio é, na verdade, um momento fundamental na vida de qualquer estudante universitário, pois é aqui que você irá conseguir ver conteúdos que aprendeu em sala de aula sendo utilizados na prática!

Portanto, seja bem-vindo ao nosso laboratório, caro estagiário!

Este manual irá te auxiliar naquilo que você precisa saber antes de começar um estágio em laboratório, condutas que você deve seguir, procedimentos básicos e, saber o que fazer em algumas situações que podem acontecer nas atividades laboratoriais. E aí, vamos lá?

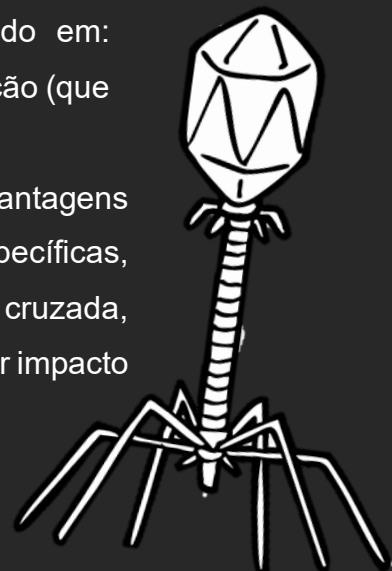
Aqui no VBlab-Uniso trabalhamos com algumas bactérias como a *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas ssp.*, *Xanthomonas spp.*, *Escherichia coli*, entre outras. Mas, trabalhamos principalmente com bacteriófagos.

Bacteriófagos (ou fagos) são vírus que infectam exclusivamente bactérias e as levam a sua morte. Por isso, hoje são vistos como uma grande aposta frente ao crescente problema de resistência bacteriana que a humanidade vem enfrentando.

Um bacteriófago se parece com um vírus comum, subdividido em: capsídeo (onde fica seu material genético), cauda e peças de fixação (que são usadas para fixação na célula hospedeira).

As terapias com bacteriófagos ou fagoterapia apresentam vantagens importantes no combate as bactérias. São altamente específicas, apresentam elevado potencial para dose única, sem resistência cruzada, diversas opções de aplicação, boa penetração em biofilme e menor impacto ambiental.

Para saber mais sobre os bacteriófagos, visite o nosso manual **“Explorando o universo viral dos predadores bacterianos: Procedimentos laboratoriais básicos”**.



2 O LABORATÓRIO

Vamos começar então?

Inicialmente, vamos conhecer o nosso laboratório.

Figura 1 – Laboratório de Vírus Bacterianos da Uniso



Fonte: Arquivo pessoal.

O Laboratório de Vírus Bacterianos da Universidade de Sorocaba (VBlab-Uniso) foi fundado em 2016, sob supervisão dos professores Drs. Victor M. Balcão e Marta M. D. C. Vila. Está localizado no Campus Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, no prédio Apoio 04.

O laboratório foi fundado com o objetivo de desenvolver sistemas antimicrobianos inovadores visando o tratamento de infecções bacterianas causadas por cepas resistentes aos antibióticos ou de interesse na saúde pública mundial. Também busca desenvolver formas de veiculação para as partículas fágicas em aplicações biotecnológicas nas áreas alimentar, (bio)farmacêutica e ambiental.

Inicialmente o laboratório foi equipado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e, conta atualmente com pesquisadores dos Programas de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e em Processos Tecnológicos e Ambientais, Iniciação Científica e estagiários de diferentes áreas do conhecimento.

Nosso laboratório também já contou com um aluno de intercâmbio, o doutorando Stephen Chijioke Emencheta, da Universidade da Nigéria, que veio até à Uniso para estudar um fago contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae*.

3 TAREFAS DO ESTAGIÁRIO









Ufa, agora você já conhece o nosso laboratório e deve estar se perguntando: Mas o que eu, estagiário, irei fazer aqui?

Bom, no nosso laboratório desenvolvemos diversos testes e análises que, muitas vezes, são extensos e trabalhosos, portanto, sempre estamos precisando de ajuda.

Portanto, além de auxiliar os mestrandos e doutorandos em suas pesquisas e testes rotineiros, você será responsável por muitas outras coisas.

Dentre elas:

-  **Organização** dos materiais do laboratório;
-  **Limpeza e descontaminação** das vidrarias;
-  **Esterilização de materiais** solicitados pelos pesquisadores;
-  **Preparo de materiais** para os experimentos;
-  **Preparo de meios de cultura** e placas de cultivo;
-  **Organização** da bancada, armários e geladeiras.

Sabemos que são muitas atividades, mas fique tranquilo, **você não estará sozinho!** Sempre haverá um professor, doutorando ou mestrando por perto para lhe ajudar e sanar possíveis dúvidas.

O nosso laboratório também conta com uma sala de estudos, portanto, fique à vontade para fazer pesquisas para se aprofundar sobre diversos temas científicos ligados a temática bacteriófagos.








E caro estagiário, sempre recomendamos que você leve uma caderneta que caiba no bolso do seu jaleco para poder anotar todos os procedimentos que aprender!

4 CUIDADOS BÁSICOS






Bom agora que já sabemos as funções do estagiário e já conhecemos o nosso laboratório. Precisamos entender que acidentes acontecem, mas a chave pode estar em saber o que fazer e como se prevenir deles.

Então eis aqui uma listagem de coisas que levam a um bom desempenho nas atividades a serem realizadas no laboratório

-  Antes de se iniciar qualquer atividade, **tenha certeza da técnica a ser utilizada, dos equipamentos, as vidrarias, o que precisa ser esterilizado, etc.** Em caso de dúvida, não se acanhe. **PERGUNTE!**
-  **FOCO nas atividades!** Não se distraia com celulares e conversas. Lembre-se, toda a atenção é pouca!
-  **Materiais** como bolsas, sacolas, pacotes, mochilas, cadernos etc., **não devem ser deixados nas bancadas!** O nosso laboratório conta com armários para os estagiários guardarem seus materiais e ainda com uma sala de estudos.
-  **Nunca se esqueça da paramentação adequada**, avental de manga longa, calçado fechado, óculos de segurança e máscara (se houver necessidade) e cabelos presos! Mexemos com bactérias potencialmente nocivas ao ser humano, portanto, **CUIDADO!**
-  **Não comer ou beber enquanto realiza as atividades** do laboratório;
-  **Não fumar no laboratório;**
-  **Todo material do laboratório utilizado deve ser mantido em ordem** e limpo. Sempre verificar a limpeza das balanças, vidrarias, autoclave e bancada, e ainda, colaborar com a sua organização.

Em casos de acidente (queimaduras, cortes, vidrarias quebradas, etc.), comunique **IMEDIATAMENTE** ao mestrando ou ao doutorando responsável e aos professores.

Em casos de acidentes

-  **Cortes ou ferimentos** mesmo que leves precisam ser desinfectados, lavados (com água abundante e clorexidina) e cobertos;
-  **Queimaduras** produzidas por fogo ou material quente devem ser lavadas em água em temperatura ambiente por cerca de 1 minuto e procurar atendimento para tratamento adequado.
-  **Em caso de vestimentas pegarem fogo** ou a própria bancada utilizar os extintores ou o chuveiro.

5 ESTERILIZAÇÃO



Vamos então, começar pela parte mais importante de qualquer trabalho no laboratório. Garantir que nossos experimentos não irão contaminar o ambiente e de que os nossos materiais estarão limpos e prontos para um novo experimento!

Primeiramente, o que é uma esterilização? A esterilização é um processo que visa destruir todas as formas de vida microbiana que possam estar contaminando um produto, material ou objeto.

Assepsia ou Antissepsia?

Assepsia é o conjunto de medidas que usamos para impedir a penetração de um microrganismo em um ambiente onde ele não é natural.

Antissepsia é o processo de eliminação ou inibição do crescimento de microrganismos na pele ou tecidos vivos.

É importante lembrarmos que o processo de esterilização precisa ser precedido por uma limpeza já que muitos dos produtos germicidas (como álcool) não são eficientes na presença de matéria orgânica.

Abaixo você vai encontrar uma lista dos principais produtos germicidas que usamos aqui e, em qualquer outro laboratório de microbiologia. Importante salientar que por se tratarem de produtos químicos e bactérias nocivas à saúde humana, o uso de equipamento de proteção individual (EPI) é indispensável.

CLORO (hipoclorito de sódio)

É um germicida químico facilmente encontrado e, com ação em grande número de bactérias. Geralmente usamos a solução de hipoclorito de sódio a 1% (m/v). Em casos mais extremos, seja pela presença de matéria orgânica, ou microrganismos mais resistentes, podem ser usadas soluções de até 5% (m/v).



ÁLCOOIS

Com propriedades semelhantes ao cloro, são eficientes contra bactérias, fungos (exceto esporos) e vírus. Porém para garantir eficácia é necessário, concentrações próximas a 70% (v/v). Sua grande vantagem é que não deixa vestígios nos materiais tratados com essa solução.



PERIÓXIDO DE HIDROGÊNIO e PERÁCIDOS:

São fortes oxidantes que atuam contra muitos microrganismos. Geralmente, esses compostos estão disponíveis na concentração de 3% (v/v), mas desta forma apresenta uma ação limitada contra os microrganismos. Portanto, em laboratórios, se prioriza a utilização de concentrações de 30% (v/v).

Apesar da sua eficácia, pode ser corrosivo em alumínio, cobre, latão e zinco, sem falar nos efeitos danosos à pele humana. Portanto, esse produto deve ser manipulado com luva e após o uso, o material deve ser lavado abundantemente com água. Também deve ser armazenado longe de fontes de calor e protegidos da luz.

Mas, como eu aplico isto na rotina do laboratório?



DESCONTAMINANDO O LOCAL DE TRABALHO

A bancada é o nosso principal local de trabalho, e deve ser um ambiente além de organizado, limpo e asséptico, exigindo uma combinação de agentes desinfetantes.

Portanto, primeiramente deve ser limpo e retirado todo o material orgânico, para que as soluções desinfetantes possam agir corretamente.

Para as superfícies podem ser utilizadas uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (m/v) ou mesmo a solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v).



DESCONTAMINAÇÃO DO FLUXO

O fluxo (ou cabine de segurança biológica) é outro ambiente de trabalho que usamos. Como o nome indica, as cabines de segurança são usadas para conter agentes de risco biológico, diminuindo a possibilidade de contaminação do profissional, das amostras e do ambiente.

Para a limpeza do fluxo usamos solução de álcool 70% (v/v) para a limpeza física da parte interna e luz ultravioleta (UV) para a degradação das partículas microbianas que podem ter restado.

Portanto, **SEMPRE** antes da utilização do fluxo é importante passar a luz UV, por 15 minutos, para garantir a limpeza do meio.

No caso, nosso laboratório possui dois fluxos, sendo um manual (Figura 2) e um automático (Figura 3). Abaixo você verá um esquema de como ligar o fluxo e a UV em cada um deles.

Figura 2 – Fluxo laminar manual



Fonte: Arquivo pessoal.

Para ligar a cabine fluxo de operação manual você deverá seguir o passo a passo descrito abaixo:














- a) Pressionar botão **LIG/DESL**, para ligar o fluxo;
- b) Pressionar botão **MOTOR**, para ligar o ventilador;
- c) Pressionar botão **L/UV**, para começar a desinfecção com luz UV;
- d) Contar 15 minutos;
- e) Pressionar botão **L/UV**, para desligar a luz UV;
- f) Pressionar botão **L/FRIA**, para acender as luzes do fluxo.

Figura 3 – Fluxo laminar automático



Fonte: Arquivo pessoal.

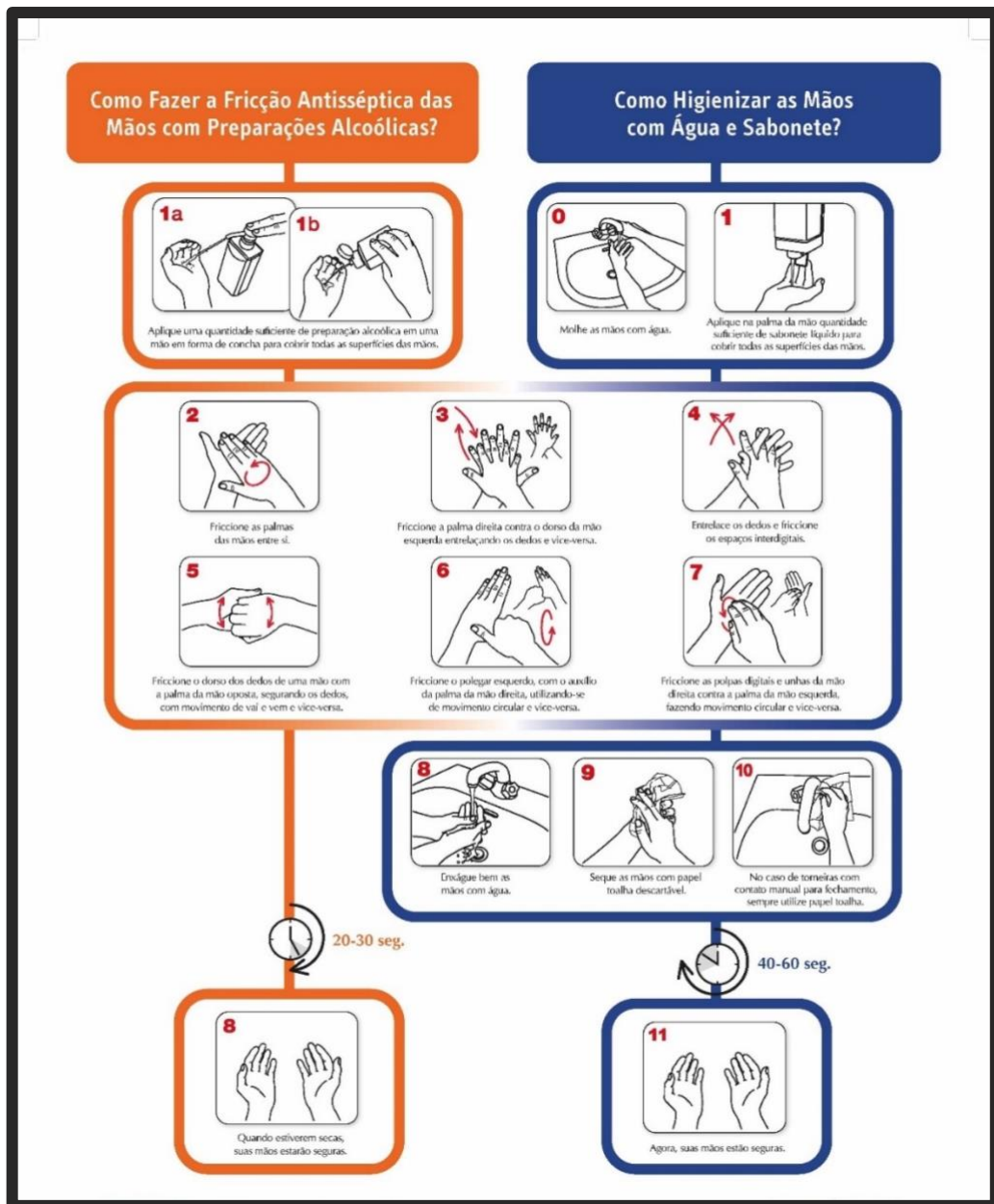
Para ligar a cabine de fluxo com operação automática você deverá seguir o passo a passo descrito abaixo:

- a) Pressione o botão  para ligar o fluxo;
- b) Usando a tecla , digite a senha do fluxo (0000);
- c) Usando os botões da lateral, selecione o símbolo , e selecione com a tecla  para iniciar a desinfecção;
- d) Digite a senha do fluxo (0000), utilizando a tecla  e selecione a opção  e, novamente ;
- e) Na próxima tela, selecione a opção  e novamente . E pronto, o temporizador do fluxo já está configurado para desligar depois de 15 minutos;
- f) Após os 15 minutos, a luz irá desligar automaticamente;
- g) Usando a tecla , selecione o símbolo ;
- h) Para acender a luz de trabalho, selecione na tela principal o símbolo , utilizando a tecla ;
- i) Para desligar, basta repetir o processo apresentado em 1 e 2.

LAVAGEM e/ou DESCONTAMINAÇÃO DAS MÃOS

Quando estamos falando de um laboratório de microbiologia, principalmente um que trabalhe com bactérias com potencial nocivo ao ser humano, o uso de luvas (de nitrilo) é ESSENCIAL, porém não dispensa a lavagem correta e regular das mãos. Geralmente a lavagem com água e sabão é o suficiente para eliminar mecanicamente as bactérias das mãos. Porém, em casos de elevado risco biológico recomenda-se a utilização de sabões germicidas. Abaixo, segue um modelo exemplificando e orientando sobre a lavagem correta das mãos.

Figura 4 – Esquema para lavagem de mãos



Fonte: SÃO PAULO (Cidade). Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal da Saúde. Higiene das Mãos. São Paulo, 2 maio 2024. Disponível em:

https://capital.sp.gov.br/web/saude/w/vigilancia_em_saude/doencas_e_agrivos/328460.

Acesso em: 25 fev. 2025.

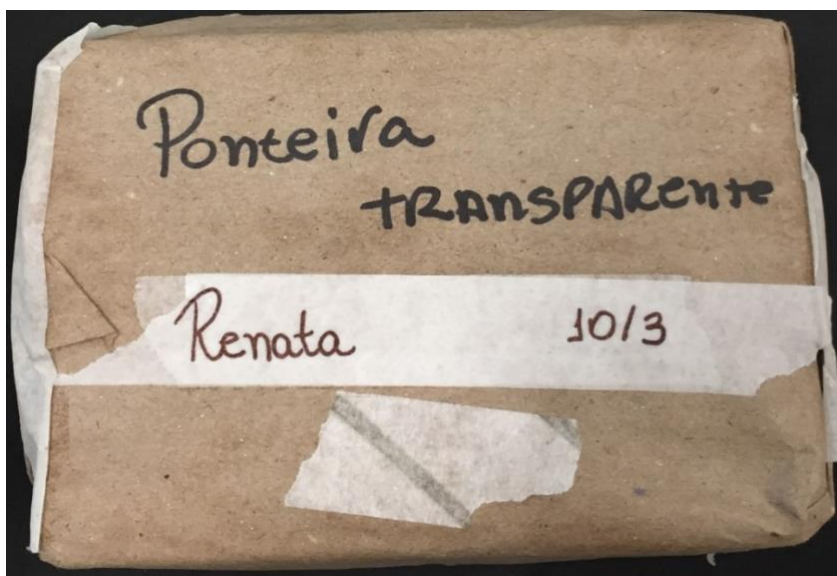
ESTERILIZAÇÃO EM AUTOCLAVE

A esterilização por vapor saturado sob pressão (na autoclave) é o método mais eficaz e seguro para esterilizar os materiais do laboratório.

Uma autoclave pode ter diferentes ciclos. O ciclo que usamos aqui no VBlab é o de 30 min a 121°C. Porém, é importante frisar que os materiais contaminados são descontaminados nas autoclaves do Apoio 2 da Uniso e, aqui no nosso laboratório, usamos para esterilizar materiais já limpos e para fazer soluções estéreis.

Antes de falarmos de como funciona a autoclave, é importante lembrarmos que os materiais ANTES de serem autoclavados precisam ser embalados em papel Kraft, identificados quanto ao seu conteúdo, datado e com o nome do pesquisador responsável (Figura 5). Importante também dizermos que os materiais autoclavados e embalados em papel Kraft apresentam duração de uma a duas semanas. Aqui no VBlab também é usual colocarmos um pedaço de fita identificadora de autoclave, que consiste em uma fita com frisos, que quando atinge a temperatura correta muda de cor, colaborando com a identificação de materiais autoclavados.

Figura 5 – Exemplo de material autoclavado embalado em papel Kraft



Fonte: Arquivo pessoal.

Portanto, após autoclavar um reagente, este deve ser guardado na geladeira de reagentes, se não for ser usado na hora. Materiais, como, pipetas, ponteiros e tubos *Eppendorfs*, podem ser deixados na bancada na parte indicada como “materiais autoclavados”.

Abaixo (Figura 6) está explicado como é feito a esterilização dos materiais no nosso laboratório, pois são duas autoclaves automáticas.

Figura 6 – Autoclave automática do VBlab e etapas para seu funcionamento



Fonte: Arquivo pessoal.

- a) Verifique o nível da água (acima do “X”);
- b) Coloque a bacia da própria autoclave;
- c) Coloque os materiais a serem esterilizados;
- d) Feche a tampa e rosqueie as travas (sempre em “X” para criar pressão);
- e) Abra a válvula de segurança;
- f) Ligue a autoclave;
- g) Aguarde a autoclave começar a pegar a pressão (emitirá um estalo);
- h) Feche a válvula de segurança;
- i) Aguarde o ciclo completo (30 min.);

- j) Quando finalizar o ciclo, espere sair toda a pressão e abra a válvula de segurança e as travas. **CUIDADO COM O VAPOR QUENTE que irá sair quando abrir a autoclave.**

Já para a descontaminação dos materiais lá no Apoio 2, é um pouco diferente, pois as autoclaves são manuais. Abaixo (Figura 7), seguem as explicações passo a passo.

Figura 7 – Autoclave manual Apoio 2 e etapas para seu funcionamento



Fonte: Arquivo pessoal.

- a) Verifique o nível da água (acima do "X");
- b) Coloque a bacia da própria autoclave;
- c) Coloque os materiais a serem esterilizados dentro de dois sacos de autoclave;
- d) Feche a tampa e rosqueie as travas (sempre em "X" para criar pressão);
- e) Abra a válvula de segurança;
- f) Coloque a autoclave no **MÁX**;
- g) Quando a autoclave começar a pegar pressão (essa autoclave começa a pingar na válvula de segurança) feche a válvula;
- h) Aguarde a autoclave atingir 121°C;
- i) Quando atingir a temperatura (121°C), diminua a potência para **MED**;
- j) Conte 30 minutos;

- k) Depois do tempo, **DESLIGUE** a autoclave e abra a válvula de segurança devagar para liberar a pressão;
- L) Quando atingir o zero, abra a autoclave e retire os materiais;
- m) Confira a água da autoclave se está limpa.

Se acaso a água estiver suja:

- a) Aguarde a autoclave esfriar e retire toda a água (abra a válvula na lateral da autoclave);
- b) Com uma bucha e detergente, lave o interior da autoclave, o suporte e a bacia;
- c) Enxague bem;
- d) Feche a válvula lateral e reponha a água, suporte e bacia.

6 MEIOS DE CULTURA



Primeiramente, o que são meios de cultura? São meios que oferecem nutrientes para o crescimento e desenvolvimento de fungos e bactérias. Os meios podem ser classificados em:


CLASSIFICAÇÃO FÍSICA:

- 🧫 Líquido (caldos): crescimento com turvação do meio – Tryptic Soy Broth (TSB), Brain Heart Infusion (BHI);
- 🧫 Semi-sólidos: menos ágar para permitir mobilidade bacteriana – Molten;
- 🧫 Sólidos: crescimento de colônias isoladas – Ágar, Agar Tryptic Soy (TSA), Ágar MacConkey;

CLASSIFICAÇÃO quanto a APLICAÇÃO:

- 🧫 Meio de Enriquecimento: geralmente líquido, rico em nutrientes com a função de permitir que as bactérias da amostra aumentem em número – BHI, caldo nutritivo (CN), TSB;
- 🧫 Meio de Transporte: meio isento de nutrientes, com um agente redutor, pH favorável, previne desidratação, evita oxidação e autodestruição – Meio de Stuart, Meio de Cary-Blair;
- 🧫 Meio Seletivo: esse meio seleciona as espécies que se deseja isolar e impede o desenvolvimento de outros microrganismos – Ágar Manitol, Ágar *Shigella-Salmonella*;
- 🧫 Meio Diferencial: possibilita a distinção entre gênero/espécie de um microrganismo sendo através de uma mudança de coloração ou morfologia – Ágar Macconkey, Ágar Hektoen;
- 🧫 Meio Indicador: permite o estudo das propriedades bioquímicas das bactérias para a sua identificação – TSI, Ágar Citrato De Simmons.

E aí, quais são os meios de cultura que mais usamos no VBlab?


 **TSB:** *Tryptic Soy Broth (caldo soja triptona)*: é um meio líquido de enriquecimento, com diversas aplicações, principalmente para cultivo e manutenção de fungos e bactérias, presentes em amostras (clínicas ou ambientais).

24g (TSB) → 800 mL (água ultrapura)

Esse caldo pode ser distribuído em tubos de ensaio (de 4 a 5ml por tubo) e também deve ser **autoclavado!**


 **TSB 2X:** mesma coisa que o TSB, porém concentrado duas vezes.

48g (TSB) → 800 mL (água ultrapura)

 **CN:** *caldo nutriente*: meio líquido de enriquecimento usado para crescimento e cultivo de diferentes bactérias e fungos.


13g (CN) → 1000 mL (água ultrapura)

Esse meio deve ser **autoclavado!**

 **BHI:** *Brain Heart Infusion*: é um meio líquido de enriquecimento não seletivo usado para isolamento e cultivo de uma variedade de bactérias.

37g (BHI) → 1000 mL (água ultrapura)

Esse meio deve ser **autoclavado!**

 **TSA:** *Agar Tryptic Soy*: é um meio de cultura sólido, amplamente usado para o crescimento de fungos e bactérias. Não é seletivo nem diferencial.

**24g (TSB) + 9,6g (ágar) → 800 mL
(água ultrapura)**

Esse meio deve ser **autoclavado!**

👤 **Ágar SS:** *Ágar Shigella-Salmonella*: é um meio de cultura sólido, específico e diferencial para bactérias *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella*.

63g (SS) → 1000 mL (água ultrapura)

Esse meio **NÃO deve ser autoclavado**. Apenas fervido.

👤 **Molten**, ou Top-ágar, ou MTA-TSB: é um meio de cultura semissólido, usado para distribuir o bacteriófago e células bacterianas, uniformemente em uma camada fina sobre uma placa de Petri contendo meio TSA, por exemplo.

**15g (TSB) + 3g (ágar) → 500 mL
(água ultrapura)**

Esse meio deve ser **autoclavado!**

As vezes, ainda usamos a famosa **Solução Salina**, que é uma solução indicada para o preparo, diluição e transporte de microrganismos ou amostras clínicas. E também é um meio que necessita ser autoclavado após o preparo.

3,6g (NaCl) → 400 mL (água ultrapura)

E ainda, usamos muito a **Solução Tampão Fágico (ou SM Buffer ou Tampão Fágico)** que é uma solução empregada para manter a estabilidade e viabilidade dos vírus durante experimentos e armazenamento. Depois do preparo, a solução precisa ser autoclavada.

6,06g (Tris-base) → 50 mL (água ultrapura)

Ajustar o pH para 7,5. Depois adicionar:

**5,8g (NaCl) + 2g (MgSO₄) → Completar o que falta para 1000 mL
(água ultrapura)**

7 PROCEDIMENTOS BÁSICOS



Então, vamos colocar a mão na massa? Nesse capítulo apresentamos grande parte dos procedimentos básicos que realizamos no nosso laboratório.

Porém, querido estagiário, uma coisa é você lê-los em um papel, outra bem diferente, é realizá-los na prática no laboratório. Portanto, antes de qualquer atividade, se você não tem certeza, **PERGUNTE** a qualquer um do laboratório. Sem julgamentos e sem caras feias, no fundo no fundo, desde o estagiário mais recente até o doutorando mais experiente, estamos todos aqui para aprender e todos aqui começamos igual a você.

Então, “bora” lá!



A PIPETA

A pipeta é um dos instrumentos que usamos mais rotineiramente, e servem para que consigamos pegar quantidades exatas de um líquido.

Aqui no VBlab usamos pipetas de microlitros (μL). O que você precisa saber sobre elas é que **1mL equivale a 1000 μL** .

Pensando na durabilidade das pipetas é essencial que você se lembre de duas coisas.

- Nunca** se deve inclinar a pipeta, pois assim o líquido pode escorrer para dentro do mecanismo e danificar o equipamento;
- Depois de usar a pipeta **volte para o limite máximo dela** indicada no topo.



E como é feita a pipetagem correta (Figura 8)?

- Pressione até sentir a primeira resistência;
- Insira a pipeta no líquido a ser extraído e solte devagar;
- Não balance a pipeta e leve-a para onde você deseja liberar o líquido;
- Pressione novamente até sentir resistência.

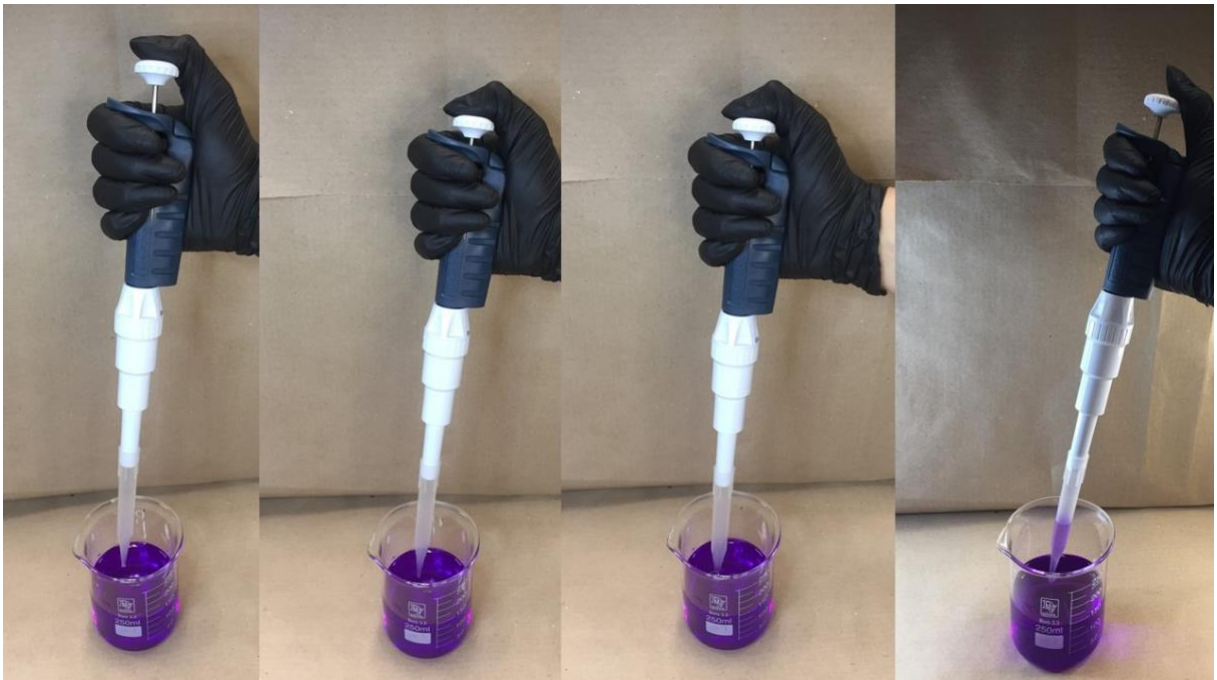
Figura 8 – Passo a passo da pipetagem.



Fonte: Arquivo pessoal.

Se atente aos marcadores da pipeta. Na parte de cima (a colorida) você irá ver que possui dois números (exemplo 0,2 – 200), isso indica o limite mínimo (0,2) e máximo da pipeta (200) em microlitros. Porém no visor da pipeta são marcados somente três números, portanto, no caso das pipetas de 500 – 5000 μL , quando o visor estiver aparecendo 050, é o equivalente a 500 μL e quando marcar 500, significa 5000 μL (Figura 9).

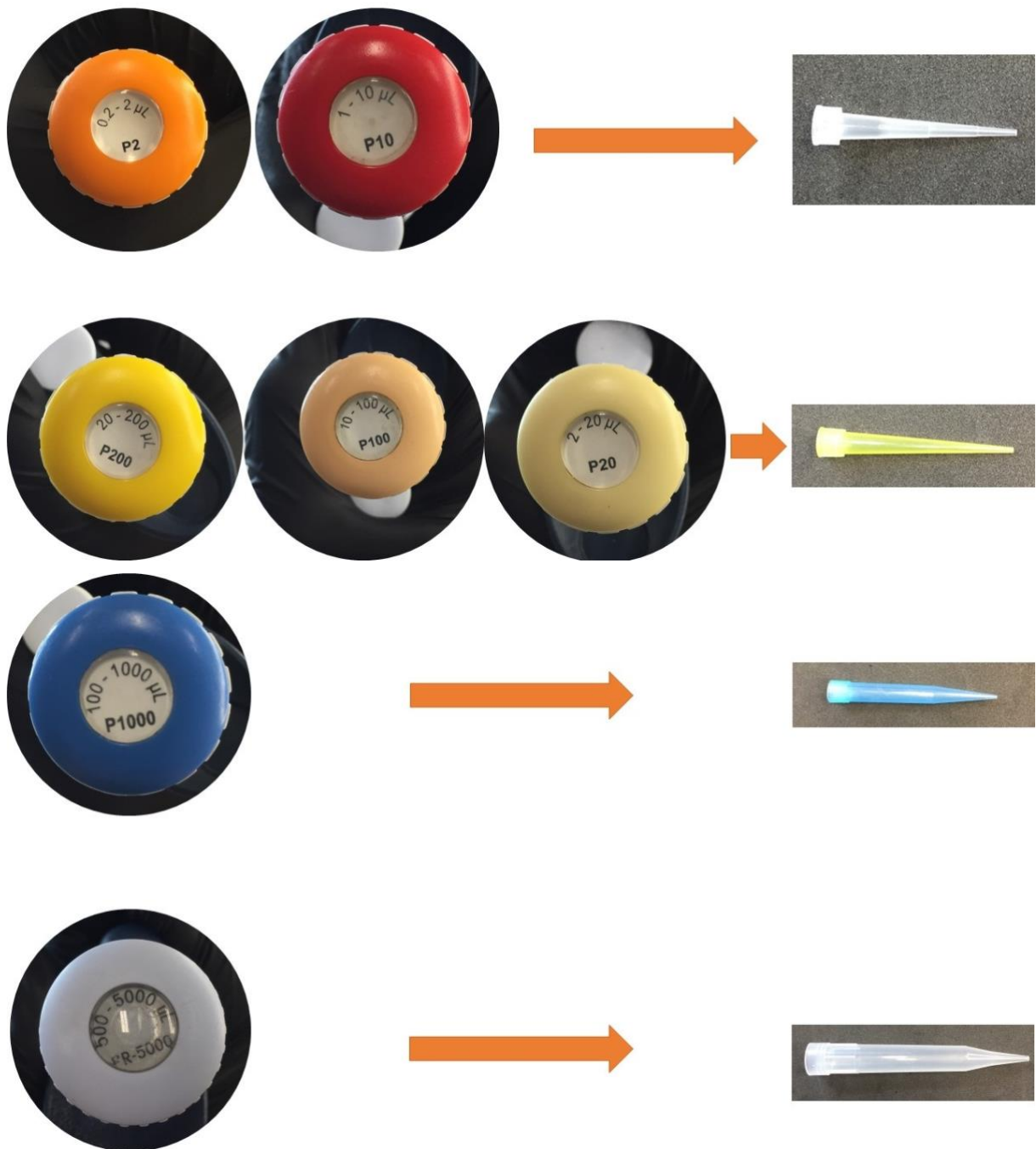
Figura 9 – Passo a passo da pipetagem



Fonte: Arquivo pessoal.

E como eu devo escolher qual ponteira usar para cada pipeta? Nosso laboratório trabalha com quatro tipos de ponteiras. As brancas, azuis, amarelas e transparentes. Para saber qual ponteira vai em qual pipeta basta você seguir a linha de cores ou a que melhor se encaixa a ponta do ejetor (Figura 10).

Figura 10 – Esquema para identificação de pipetas e ponteiras



Fonte: Arquivo pessoal.

Fazendo placas de cultura bacteriana

Esta é a atividade que o estagiário realizará com mais frequência. Acredite, você irá fazer muito disso!

Como é feito? Bem simples, segue o passo a passo (Figura 11):

- Após preparado o meio de cultura e autoclavado, aguarde esfriar, de modo que consiga segurar o recipiente;
- Leve o recipiente ao fluxo e verta um pouco do líquido em placas de Petri descartáveis. Para uma placa de Petri padrão (90-100 mm de diâmetro) coloque cerca de 15-20 mL de meio;
- Cada receita inteira de meio de cultura, produz em torno de 60 a 80 placas;
- Tome cuidado para não deixar formar bolhas no meio, portanto verta devagar e sempre realize movimentos circulares na placa para garantir que o meio ficou bem espalhado;
- Aguarde o meio solidificar, tampe e guarde na geladeira de materiais estéreis com a tampa voltada para baixo;
- Atenção, esse procedimento não pode demorar muito (cerca de 15 a 30 min), pois o meio pode solidificar no vidro e não conseguiremos verter para as placas de Petri.

Figura 11 – Esquema para preparar uma placa com meio de cultura

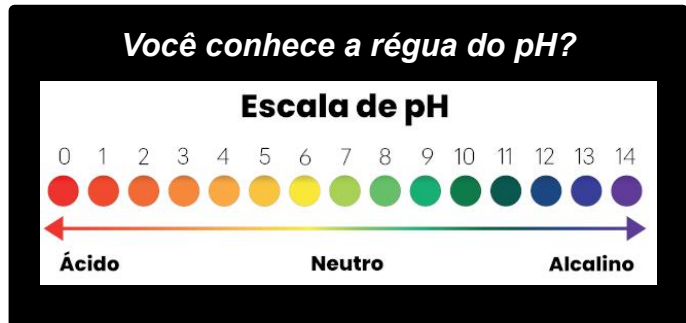


Fonte: Adaptado de American [...], 2021.

Ajuste de pH

O ajuste de pH é um procedimento bem simples do laboratório e que usamos em diferentes ocasiões, mas principalmente no preparo do tampão que já vimos aqui.

Sabemos que soluções mais ácidas possuem pH mais baixos e as soluções mais alcalinas, possuem pH mais alto.



Portanto quando estamos falando de acidificar ou alcalinizar um meio, falamos no ajuste de pH adicionando base ou ácido na solução.

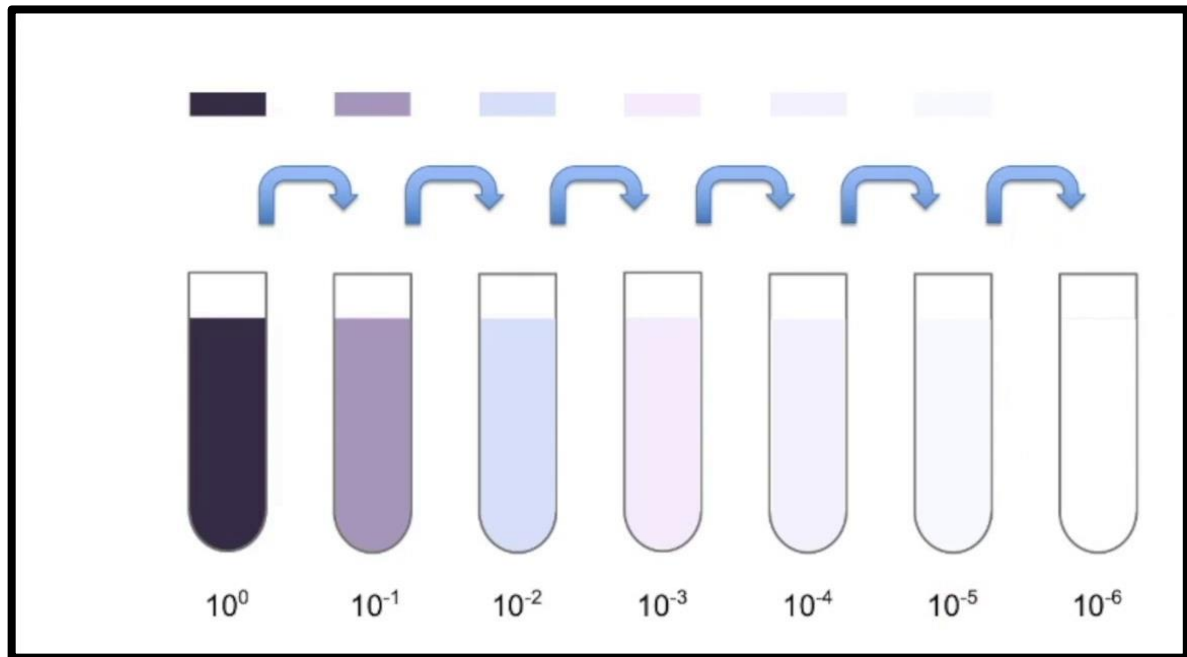
Então:

ACIDIFICAR o meio = REDUZIR pH = adicionar ÁCIDO (HCl);
ALCALINIZAR o meio = AUMENTAR pH = adicionar BASE (NaOH);

Diluição

A diluição é outro procedimento que realizamos muito em laboratórios e, serve para preparar uma solução de menor concentração a partir de outra de maior concentração. A Figura 12 apresenta um esquema do processo de diluição.

Figura 12 – Esquema de diluição de solução



Fonte: Adaptado de Tashima, 2020.

Repique

De todas as técnicas que usamos no VBlab, o repique é um dos procedimentos mais realizados. O repique é uma técnica que permite a manutenção e o cultivo de bactérias a partir de uma colônia.

Abaixo, o passo a passo (Figura 13):

- Retire um **caldo de enriquecimento** da geladeira e aguarde atingir a temperatura ambiente.
- Com uma alça estéril pegue uma colônia bem isolada de bactéria na placa;
- Coloque em um tubo com um caldo de enriquecimento;
- Leve para estufa por 24h até turvar. O turvamento indica crescimento bacteriano.

Figura 13 – Etapas de um processo de repique



Fonte: Arquivo pessoal.



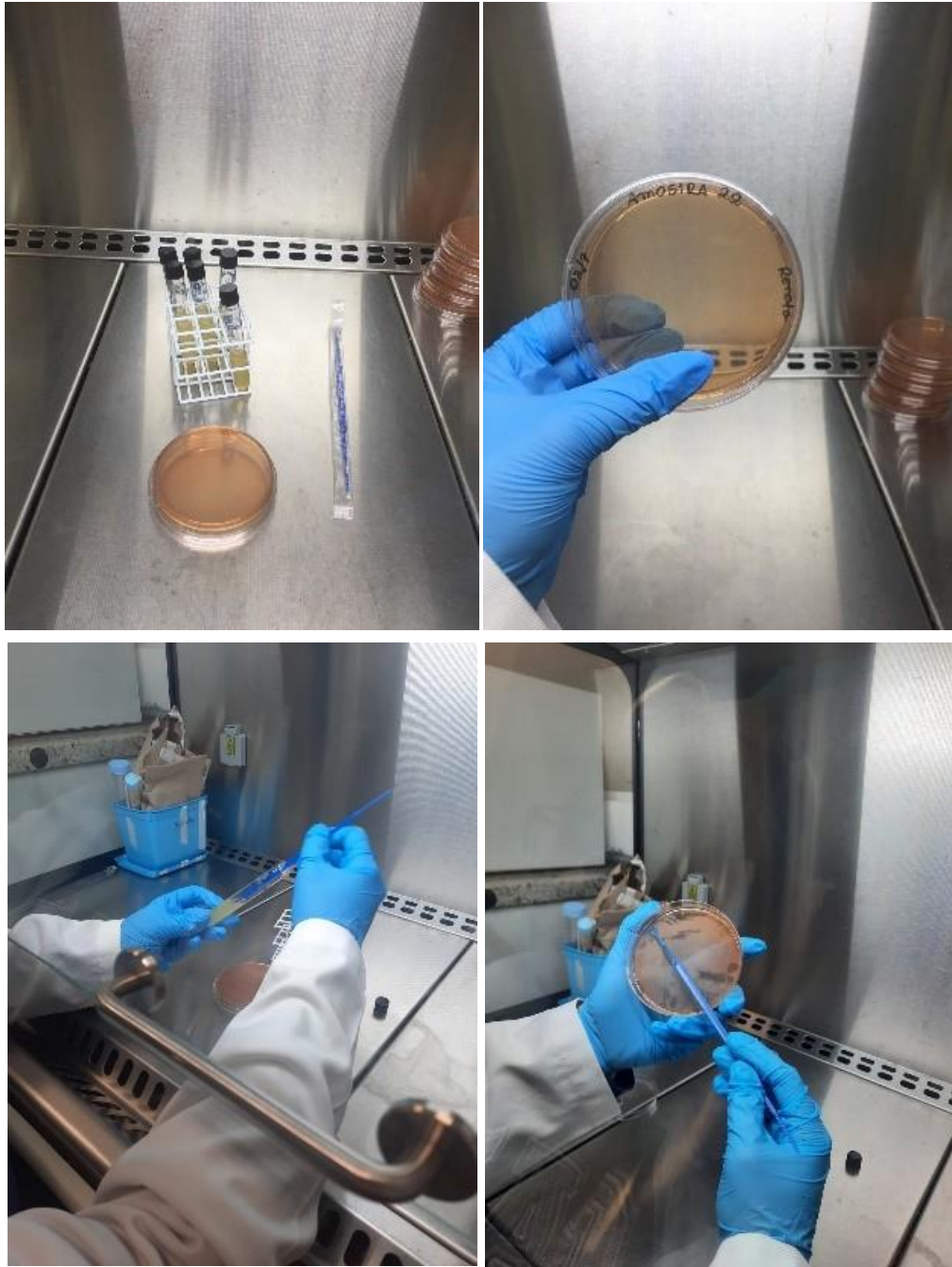
Semeadura em placa

A semeadura de bactérias em placas é o que realizamos após o caldo de enriquecimento ter turvado. Quando o meio fica turvo significa, como já vimos, que existem bactérias crescendo naquele meio de cultura. A próxima etapa, é colocar o caldo (com as bactérias) em um meio sólido observando-se a formação de colônias após incubação.

Para isso, segue o passo a passo (Figura 14):

- a) Retire uma placa com meio de cultura da geladeira e aguarde atingir a temperatura ambiente;
- b) Identifique a placa com o nome do pesquisador, tipo de amostra e data do procedimento;
- c) Com o tubo com caldo de enriquecimento retirado da estufa, use uma alça estéril para retirar um pouco do líquido;
- d) Passe suavemente a alça úmida ao longo de toda a placa, fazendo "zig-zags" dividindo a placa em três setores.

Figura 14 – Plaqueamento de bactéria



Fonte: Arquivo pessoal.

A identificação de bactérias é um outro procedimento extremamente comum dentro de qualquer laboratório de microbiologia.

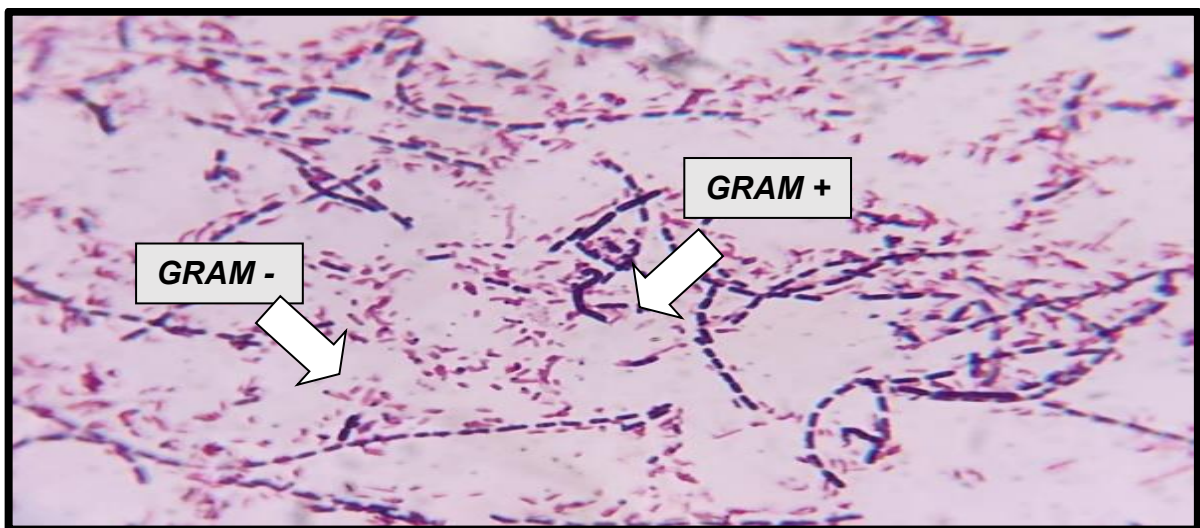
A identificação bacteriana, nada mais é do que a realização de testes de coloração com as bactérias cultivadas. Assim, observamos algumas de suas características, que nos ajudam a identificar a bactéria estudada. Alguns dos destes testes estão descritos logo abaixo.

COLORAÇÃO DE GRAM:

A coloração de Gram é o método empregado na identificação de bactérias que permite separar as bactérias em **Gram positivas (Gram +)** e **Gram negativas (Gram -)**, com base na retenção de corantes, em função de diferentes propriedades da parede celular das bactérias. Assim, as bactérias podem ser visualizadas e analisadas ao microscópio óptico tornando possível a identificação em Gram + e Gram -.

As bactérias identificadas como Gram + ficam na coloração roxa/azul. Já as identificadas como Gram -, ficam na coloração vermelha/rosa, como na Figura 15, abaixo.

Figura 15 – Bactérias Gram + e Gram



Fonte: Arquivo pessoal.

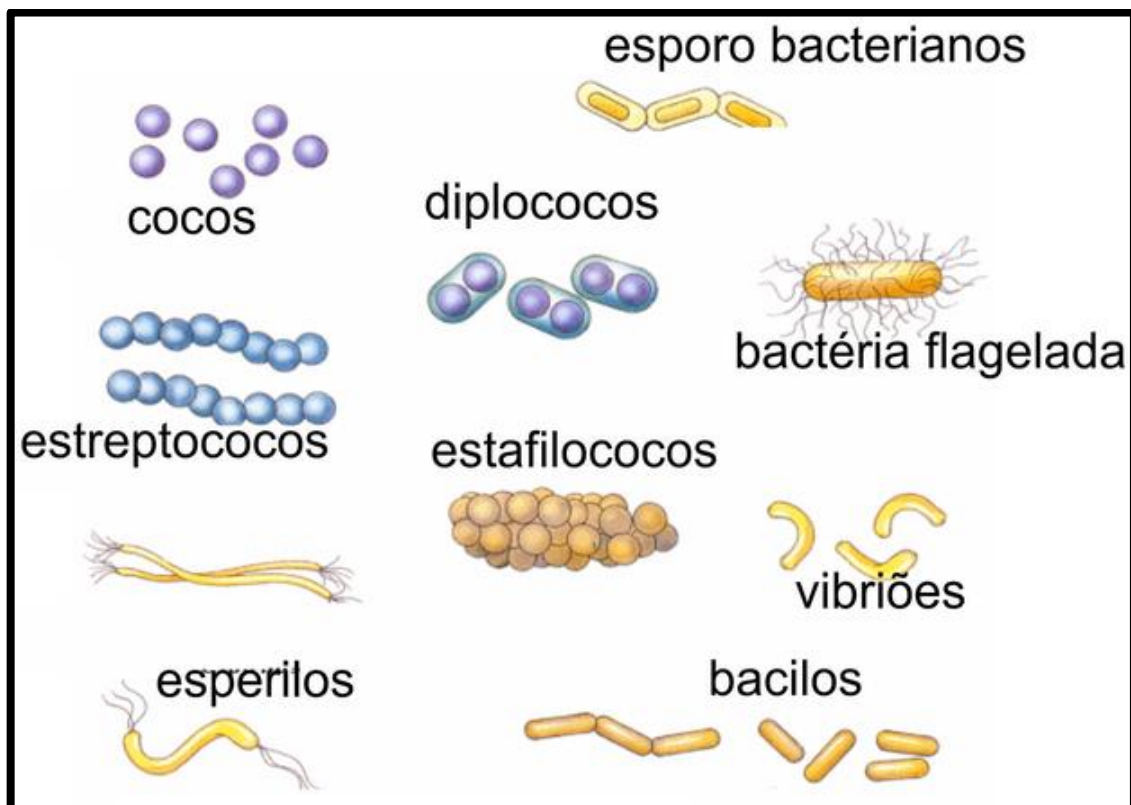
A coloração é feita da seguinte maneira:

- a) Em uma lâmina de microscópio colocar um pouco da bactéria com o auxílio de uma alça estéril;
- b) Diluir com 50 μ L de água ultrapura;
- c) Deixar secar naturalmente;
- d) Colocar uma gota de cristal violeta, esperar 1 minuto;
- e) Lavar em fio de água;
- f) Colocar uma gota de **lugol**, esperar mais um minuto e escorrer;
- g) Colocar uma gota de **álcool**, ou **acetona**, esperar 30 segundos e escorrer;
- h) Colocar uma gota de **fuscina**, esperar 30 segundos e lavar em fio de água.

**Se lembre da frase:
VI LULU ALI Fumando!**

Com a coloração de Gram, também conseguimos identificar a morfologia da bactéria, como mostra o desenho abaixo (Figura 16).

Figura 16 – Morfologia bacteriana



Fonte: Neves, [S. d.].

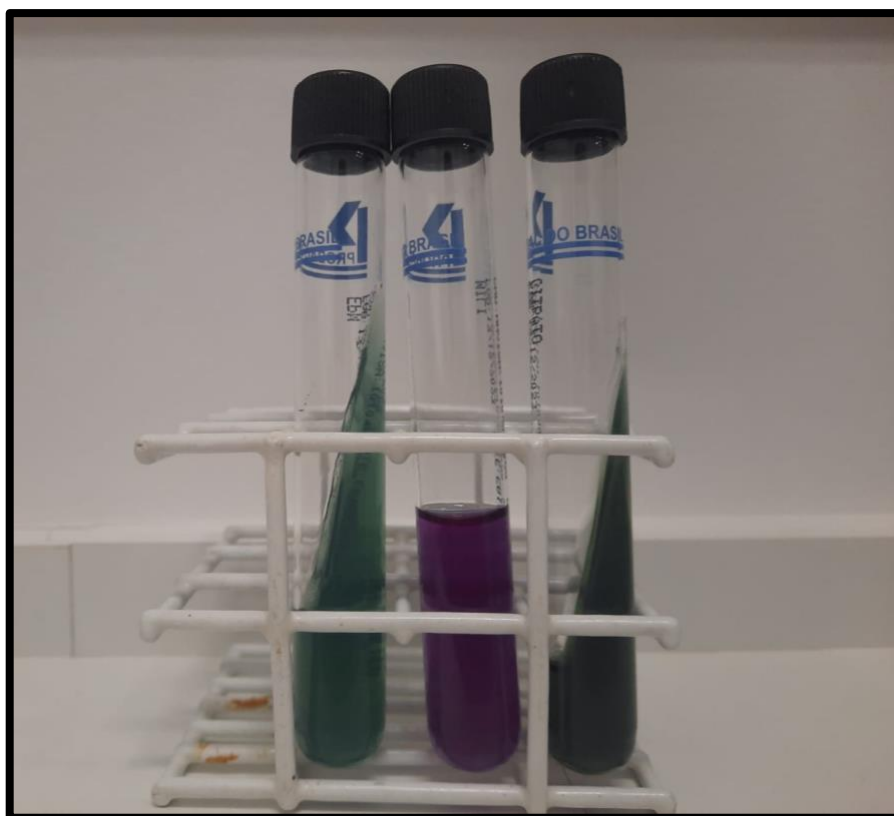
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS UTILIZANDO TESTES ENTEROKIT B:

A segunda parte na identificação de bactérias é feita através de testes bioquímicos, onde iremos ver diferentes características da bactéria.

Um teste amplamente utilizado em diferentes laboratórios é o Enterokit B® (*S. d.*), comercializado pela empresa Probac do Brasil, e funciona para a identificação de enterobactérias como *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli* e *Yersinia enterocolítica*.

O Enterokit B® (*S. d.*) é composto por três tubos de ensaio com os meios de cultura EPM, MILi e Citrato de Simmons. Sendo que cada um deles faz o teste de algumas propriedades bioquímicas (Figura 17).

Figura 17 – Enterokit B



Fonte: Enterokit B®, (*S. d.*).

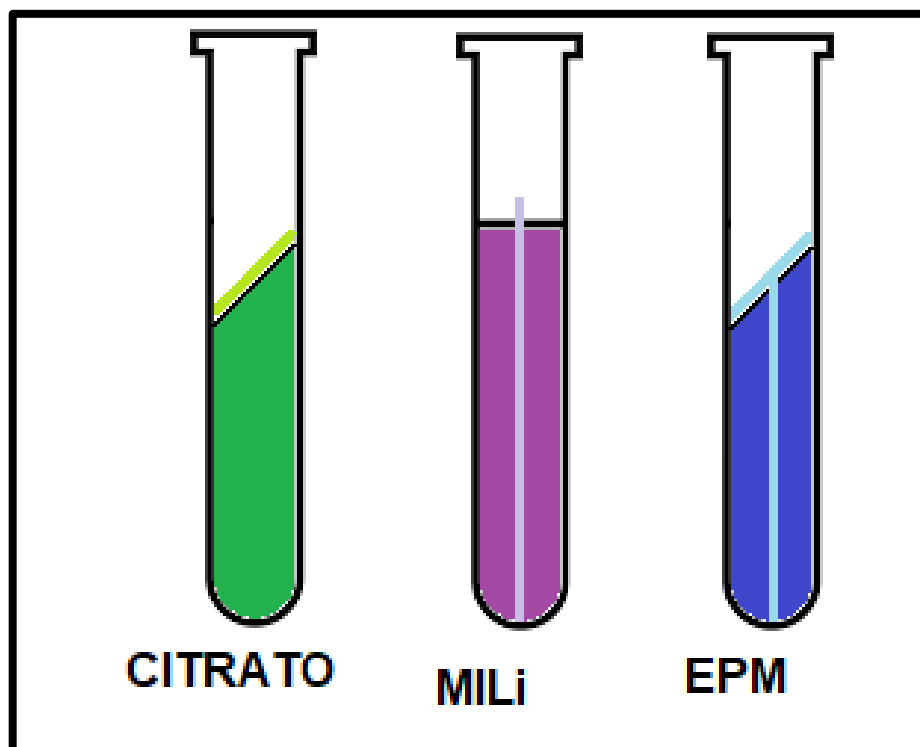
O meio EPM é um meio que analisa a produção de gás por fermentação de glicose, produção de H_2S , hidrólise de ureia e desaminação de triptofano. Já o meio MILi é um meio que tem a intenção de avaliar a motilidade da bactéria, produção de

indol e descarboxilação de lisina. E por último, o meio Citrato de Simmons, avalia a capacidade da bactéria de utilizar citrato como única fonte de carbono.

Para que a identificação seja correta, é necessário inocular a bactéria em cada meio de maneira adequada sendo (Figura 18):

- Com o auxílio de uma alça estéril (ou descartável) pegar uma colônia bem isolada da bactéria.
- Inocular no meio Citrato e Simmons deslizando a alça na superfície inclinada do meio.
- Em seguida, passar para o meio EPM, introduzindo a alça até o fundo do meio, retirá-la e depois estriar na superfície inclinada do meio.
- E por último, no meio MILi introduzir a alça no centro do meio, até atingir o fundo.
- Incubar o Enterokit B® a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24h e fazer a leitura.

Figura 18 – Esquema de inoculação da amostra no Enterokit B®



Fonte: Elaboração própria.

Depois dos tubos Enterokits B[®], ficarem 24h na estufa, os resultados devem ser analisados (Figura 19). Os resultados são dados a partir de alterações no meio, como mudança de coloração, surgimento de bolhas e reação a reagentes adicionados posteriormente. Mas calma! Vamos avaliar tubo a tubo!

MEIO EPM:

Produção de gás: aparecimento de bolhas no meio de cultura;

Produção de H₂S: enegrecimento do meio;

Hidrólise de ureia: aparecimento de cor azul ou verde azulada da base para o meio do tudo;

Desanimação do triptofano (LTD): aparecimento da cor verde-garrafa na superfície do meio.

MEIO MILI:

Motilidade (MOT): cresce uma linha além da picada nas bactérias móveis (olhar contra a luz);

Descarboxilação da lisina: meio adquire uma cor púrpura quando a lisina é descarboxilada, em caso negativo, o meio fica amarelado;

Produção de Indol: após adicionar 3 a 4 gotas do reativo de Kovacs, quando positivo, aparece uma linha avermelhada na superfície.

MEIO CITRATO DE SIMMONS

A utilização do citrato aparece como positiva quando o meio adquire cor azul.

Figura 19 – Enterokit B® após incubação de 24h



Fonte: Arquivo pessoal.

Depois de identificar as alterações ocorridas nos meios, precisamos aprender a ler esses resultados. Para isso, você irá utilizar a tabela abaixo, e para cada resultado positivo, você irá usar o número a frente (Quadro 1):

Quadro 1 – Os 3 conjuntos de provas e seus valores do Enterokit B®

1º ALGARISMO	2º ALGARISMO	3º ALGARISMO
Lactose = 4	Urease = 4	Indol = 4
Gás = 2	LTD = 2	Lisina = 2
H ₂ S = 1	MOT = 1	Citrato = 1
TOTAL:	TOTAL:	TOTAL:

Legenda: LTD = desaminação do triptofano; MOT = mobilidade

Fonte: Elaborado pelos autores.

A soma deles irá resultar em um número de três algarismos. Esse número você irá buscar a bactéria correspondente no manual do próprio Enterokit B® fornecido pela empresa. A Figura 20 apresenta a lista bactérias identificadas no Enterokit B®.

Figura 20 – Lista de bactérias identificadas no Enterokit B®

NÚMERO	ESPÉCIE BACTERIANA
000	<i>Shigella sonnei</i> - <i>Yersinia pestis</i> - <i>Shigella</i> spp
004	<i>Shigella</i> spp - <i>Yersinia enterocolitica</i> - <i>Escherichia coli</i>
006	<i>Escherichia coli</i>
011	<i>Citrobacter freundii</i>
012	<i>Hafnia alvei</i>
013	<i>Serratia marcescens</i> - <i>Hafnia alvei</i>
014	<i>Escherichia coli</i>
015	<i>Citrobacter diversus</i>
016	<i>Escherichia coli</i>
035	<i>Providencia stuartii</i> - <i>Providencia alcalifaciens</i>
040	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> - <i>Yersinia enterocolitica</i>
044	<i>Yersinia enterocolitica</i>
051	<i>Citrobacter freundii</i>
053	<i>Serratia marcescens</i>
055	<i>Citrobacter diversus</i>
070	<i>Proteus penneri</i>
074	<i>Morganella morganii</i>
075	<i>Providencia stuartii</i> - <i>Providencia rettgerii</i>
111	<i>Citrobacter freundii</i>
112	<i>Salmonella Typhi</i>
113	<i>Salmonella</i> spp
151	<i>Citrobacter freundii</i>
170	<i>Proteus mirabilis</i> - <i>Proteus penneri</i>
171	<i>Proteus mirabilis</i>
174	<i>Proteus vulgaris</i>
175	<i>Proteus vulgaris</i>
202	<i>Hafnia alvei</i>
204	<i>Escherichia coli</i>
206	<i>Escherichia coli</i>
210	<i>Salmonella Paratyphi A</i> - <i>Serratia liquefaciens</i>
211	<i>Citrobacter freundii</i> - <i>Serratia liquefaciens</i>
212	<i>Hafnia alvei</i> - <i>Salmonella Choleraesuis</i> - <i>Serratia</i>
404	<i>Escherichia coli</i>
406	<i>Escherichia coli</i>
410	<i>Serratia liquefaciens</i>
411	<i>Citrobacter freundii</i> - <i>Enterobacter cloacae</i> - <i>Serratia</i> sp.
412	<i>Serratia liquefaciens</i>
413	<i>Serratia</i> sp
414	<i>Escherichia coli</i>
415	<i>Citrobacter diversus</i>
416	<i>Escherichia coli</i>
417	<i>Serratia odorifera</i>
443	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
447	<i>Klebsiella oxytoca</i>
451	<i>Citrobacter freundii</i> - <i>Enterobacter cloacae</i>
455	<i>Citrobacter diversus</i>
511	<i>Citrobacter freundii</i>
551	<i>Citrobacter freundii</i>
604	<i>Escherichia coli</i>
606	<i>Escherichia coli</i>
607	<i>Klebsiella oxytoca</i>
610	<i>Serratia liquefaciens</i>
611	<i>Citrobacter freundii</i> - <i>Enterobacter cloacae</i> - <i>Serratia</i> sp
612	<i>Serratia liquefaciens</i>
613	<i>Enterobacter aerogenes</i> - <i>Serratia</i> sp
614	<i>Escherichia coli</i>
615	<i>Citrobacter diversus</i>
616	<i>Escherichia coli</i>
643	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
647	<i>Klebsiella oxytoca</i>
651	<i>Citrobacter freundii</i> - <i>Enterobacter cloacae</i>
655	<i>Citrobacter diversus</i>
711	<i>Citrobacter freundii</i>
751	<i>Citrobacter freundii</i>

Fonte: Adaptado de ENTEROKIT B® [S. d.].

Para mais informações acerca do Enterokit B®, leia a bula oficial do kit, disponibilizado no site da Probac do Brasil.

IDENTIFICAÇÃO UTILIZANDO RÉGUAS API 20E:

Outro método muito usado na identificação de bactérias, são as Réguas API 20E (Biomérieux, S. d.). Também é um método que identifica enterobactérias.

Este método consiste em 20 microtubos que fazem diferentes testes a partir de uma colônia bem isolada da bactéria a ser analisada (Figura 21).

Figura 21 – Régua API 20E, antes do preparo



Fonte: Biomérieux API®, [S. d.].

Inicialmente é preciso preparar a galeria, que consiste em uma régua solta, e uma caixa de plástico, onde serão adicionados 5mL de água destilada ou ultrapura e devidamente identificada.

Em seguida passa-se para a preparação do inóculo. Com uma alça descartável retirar uma colônia fresca (18 a 24 h de cultivo) e bem isolada de bactéria. Emulsionar em 5mL de água ultrapura estéril para obtenção de uma suspensão bacteriana homogênea.

Por último, como auxílio de uma pipeta descartável distribuir essa solução nos poços da galeria. Cuidado para não deixar ocorrer formação de bolhas (incline a galeria para frente para ajudar). Nos poços CIT, GEL e VP encher o tubo e a cúpula, nos outros somente o tubo. Já nos poços ADH, LDC, OD, H₂S e URE adicionar uma gota de óleo mineral para criar um ambiente anaeróbico. Incubar as régua à temperatura de 36°C ± 2°C por 24 h. A Figura 22 apresenta uma régua API20E após a inoculação de bactéria.

Figura 22 – Réguas API 20E, logo após inoculação de bactéria.



Fonte: Biomérieux API®, [S. d.].

A interpretação ocorre depois que três ou mais poços alterarem a sua coloração, com exceção do poço GLU. Caso não haja três poços alterados, pode-se deixar mais 24 h na estufa e analisar no próximo dia. Em caso positivo alguns poços necessitam da aplicação de um reagente.

- TDA: 1 gota do reagente TDA, caso assuma cor acastanhada, indica positividade.
- IND: 1 gota do reagente JAMES, caso assuma cor rosa, indica positividade.
- VP: 1 gota do reagente VP1 e 1 gota do reagente VP2, aguardar 10 minutos, e se aparecer cor rosa/vermelha indica positividade.

Por último realizar o teste com INDOL e não fechar mais a galeria, pois alguns gases emitidos na reação podem alterar outros resultados.

A Figura 23 apresenta uma imagem de uma régua API 20E após 24h de incubação.

Figura 23 – Resultados após 24 h de incubação da régua API 20E



Fonte: Biomérieux API®, [S. d.].

A interpretação do teste se dá pela alteração de cor do meio sendo apresentada no Quadro 2.

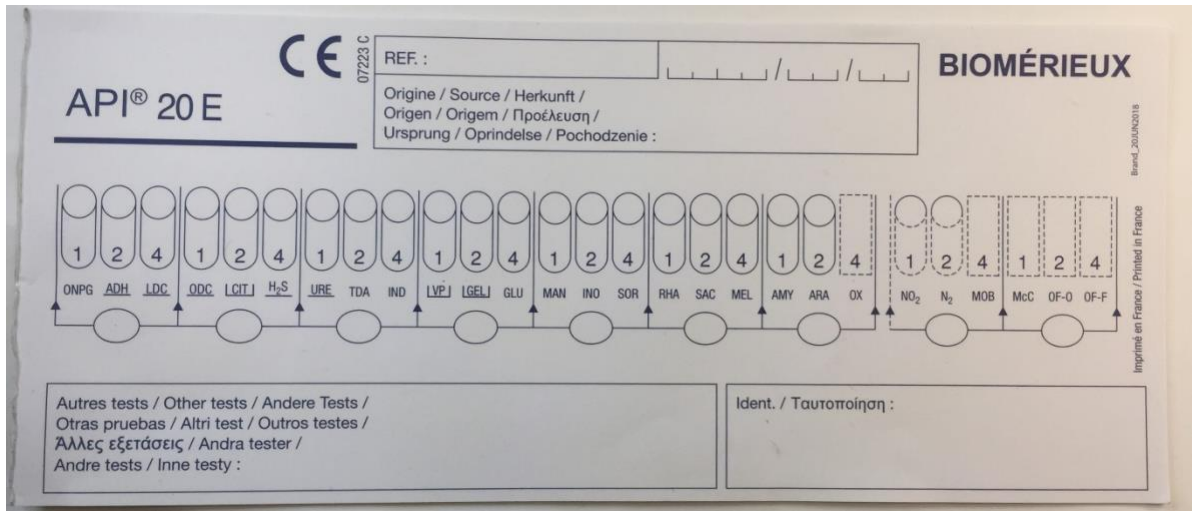
Quadro 2 - Conjuntos de provas e de resultados da Régua API 20E

TESTE	RESULTADO	
	NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	Incolor	Amarelo
ADH	Amarelo	Vermelho alaranjado
LDC	Amarelo	Vermelho alaranjado
OBC	Amarelo	Vermelho alaranjado
CIT	Verde pálido/amarelo	Azul esverdeado/azul
H2S	Incolor/acinzentado	Deposito preto/linha fina
URE	Amarelo	Vermelho alaranjado
TDA	Amarelo	Castanho avermelhado
IND	Incolor/verde amarelo pálido	Rosa
VP	Incolor/rosa pálido	Rosa / vermelho
GEL	Sem difusão	Difusão de pigmento preto
GLU	Azul/ azul esverdeado	Amarelo
MAN	Azul/ azul esverdeado	Amarelo
INO	Azul/ azul esverdeado	Amarelo
SOR	Azul/ azul esverdeado	Amarelo
RHA	Azul/ azul esverdeado	Amarelo
SAC	Azul/ azul esverdeado	Amarelo
MEL	Azul/ azul esverdeado	Amarelo
ANY	Azul/ azul esverdeado	Amarelo
ARA	Azul/ azul esverdeado	Amarelo

Fonte: Adaptado de Biomérieux API®, (S. d.).

Após a identificação dos resultados positivos e negativos, será necessário transcrevê-los para uma ficha fornecida com o teste. A Figura 24 apresenta uma ficha para identificação da bactéria.

Figura 24 – Ficha para identificação de bactérias segundo a Régua API 20E



Fonte: Biomérieux API®, (S. d.).

A ficha irá separar os testes em nove grupos (contendo três testes em cada), e dessa separação e soma dos positivos será obtido um algarismo de 9 números. Este número deverá ser transcrito para o APIWEB (usuário e senha fornecidos no momento da compra do kit) e assim será identificada a bactéria.

8 ROTEIRO DO ESTAGIÁRIO



Neste capítulo você irá encontrar uma espécie de roteiro, só para ficar fácil de você se organizar e saber a ordem que irá aprender cada coisa aqui no BVlab.

- a) **EQUIPAMENTOS:** vamos começar do básico, vamos te ensinar como mexer na maior parte dos equipamentos como fluxo, autoclaves, espectrofotômetros e centrífugas;
- b) **DESCONTAMINAÇÃO:** iremos separar um dia para explicar os cuidados que devem ser tomados na descontaminação dos materiais, como é feito esse processo e vamos ajudar você a se organizar e preparar uma rotina para isso;
- c) **PREPARO DE MATERIAL:** vamos fazer juntos placas de TSA, preparar o Molten, o tampão e tubinhos de TSB ou BHI;
- d) **MEXER COM BACTÉRIAS:** vamos aprender na prática a fazer um repique, plaquear, descongelar uma bactéria do biofreezer e medir a densidade ótica (DO).

Então é isso, agora você já tem todas as ferramentas necessárias para começar o seu estágio. Portanto aproveite MUITO, pergunte sempre e participe! O mais importante é ter certeza de que acima de qualquer coisa você, assim como um doutorando, ou um mestrando, está aqui para aprender! Então não tenha medo de errar e se sinta à vontade em perguntar, questionar e pedir que lhe ensinem algo novo. No fundo, todos nós que estamos aqui, adoramos um estagiário proativo e interessado na pesquisa.

REFERÊNCIAS E SUGESTÕES DE LEITURA



AMERICAN Journal of Physiology, Biochemistry & Pharmacology. [The #pour #plate #method of counting #bacteria is more precise than the #streak #plate method, but, on the average, it will give a lower count as heat sensitive microorganisms may die when they come contact with hot, molten agar medium]. [S. l.], 12 mar. 2021. X: @ajpbp_AME. Disponível em: https://x.com/ajpbp_AME/status/1370273576918474752. Acesso em: 22 jul. 2024.

BALCÃO, V. M.; VILA, M. M. D.C. **Explorando o universo viral dos predadores bacterianos: procedimentos laboratoriais básicos**. Sorocaba: Eduniso, 2023.

BIOMÉRIEUX. API®. Régua API 20E®: teste bioquímico. Marcy-l'Étoile: bioMérieux, [S. d.]. Disponível em: <https://www.biomerieux.com/us/en/our-offer/clinical-products/api.html>. Acesso em: 22 jul. 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde Programa Nacional de DST e Aids. **Técnica de coloração de Gram**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf. Acesso em: 24 fev. 2025.

ENTEROKIT B®: teste bioquímico. Responsável técnico Francisco Donizeti Montagnoli. São Paulo: PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda., [S. d.]. Disponível em: <https://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Identifica%C3%A7%C3%A3o/Enterokit%20B%20re v.03.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2024.

NEVES, R. Bactérias, **Globo.com**, Rio de Janeiro, [S. d.]. Disponível em: <http://educacao.globo.com/biologia/assunto/microbiologia/bacterias.html>. Acesso em: 25 fev. 2025.

PDS HPPC – Programa de Desenvolvimento Setorial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético ABDI, ABIHPEC, SEBRAE. **Guia de microbiologia**. São Paulo: ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2015. Disponível em: <https://abihpec.org.br/guia-microbiologia/files/assets/basic-html/index.html#1>. Acesso em: 24 fev. 2025.

RODRIGUES, A. M. *et al.* **Manual de laboratório do estágio em análises clínicas**: guia de apoio à realização de atividades práticas. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2019.

SÃO PAULO (Cidade). Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal da Saúde. Higiene das Mãos. São Paulo, 2 maio 2024. Disponível em: https://capital.sp.gov.br/web/saude/w/vigilancia_em_saude/doencas_e_agrivos/328460. Acesso em: 25 fev. 2025.

SUS – Sistema Único de Saúde; UFF – Universidade Federal Fluminense. **Manual de biossegurança**. Rio de Janeiro: UFF, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-sudeste/huap-uff/aceso-a-informacao/boletim-de-servico/manual-de-biosseguranca.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2025.

TASHIMA, A. K. **Diluição seriada**. São Paulo: [S. n.], 15 ago. 2020. 1 vídeo (10:17 min). Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=3wRGIU81n0w>. Acesso em: 24 fev. 2025.