

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB



PROTOCOLO OPERACIONAL PARA TRANSFERÊNCIA DE CÉLULAS BACTERIANAS PARA MEIO LÍQUIDO

**CNPAB
Seropédica, RJ
Dezembro/1997**

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB



**PROTOCOLO OPERACIONAL PARA TRANSFERÊNCIA DE CÉLULAS
BACTERIANAS PARA MEIO LÍQUIDO**

**Gustavo R. Xavier, José R. de A. Ribeiro, Enderson P. de B. Ferreira,
Norma G. Rumjanek**

**CNPAB
Seropédica, RJ
Dezembro/1997**

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à

Embrapa-Agrobiologia

Antiga Rodovia Rio/São Paulo

Telefone: (021)682-1086; (021)682-1500

Fax: (021)682-1230

Caixa Postal 74505

23851-970 Seropédica, RJ

e-mail: agrob@cnps.embrapa.br

Comitê de Publicações

Helvécio De-Polli(Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Paulo Augusto da Eira

Norma Gouveia Rumjanek

Sebastião Manhães Souto

Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

XAVIER, G.R.; RIBEIRO, J.R. de A.; FERREIRA, E.P. de B.; RUMJANEK, N.G.

Protocolo operacional para transferência de células bacterianas para meio líquido.

Seropédica: *Embrapa-Agrobiologia*, Dez. 1997. 7p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 45).

1. Bactéria. 2. Processamento. 3. Meio de cultura. 4. Método. I. Ribeiro, J.R. de A.. colab. II. Ferreira, E.P. de B., colab. III. Rumjanek, N.G., colab. IV. Embrapa . Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). V. Título. VI. Série.

CDD 579.3

© Embrapa

SUMÁRIO

1. OBJETIVO	4
2. MATERIAL	4
2.1. REAGENTES	4
2.3. EQUIPAMENTOS	4
2.4. VIDRARIAS	4
3. PROCEDIMENTO	5
4. MEMÓRIA DE CÁLCULO.....	7
5. RESULTADOS.....	7
6. ATUALIZAÇÃO	7

PROTOCOLO OPERACIONAL PARA TRANSFERÊNCIA DE CÉLULAS BACTERIANAS PARA MEIO LÍQUIDO

Gustavo R. Xavier¹, José R. de A. Ribeiro², Enderson P. de B. Ferreira³,
Norma G. Rumjanek⁴

1. OBJETIVO

Estabelecer os procedimentos utilizados para transferência de células bacterianas cultiváveis em meio líquido para meio com densidade ótica pré-determinada.

2. MATERIAL

2.1. REAGENTES

Cultura bacteriana crescida em meio líquido em fase exponencial;
Água estéril;
Meios de cultura estéril (em erlenmeyer) com volume conhecido, sem ágar e sem indicador;
Álcool comercial diluído para 70%.

2.3. EQUIPAMENTOS

Balança de prato em nível (passar álcool 70% para assegurar assepsia);
Vórtex;
Pipeta automática e caixa de ponteira estéril (capacidade de 1000µl e de 100µl);
Fluxo laminar
Centrífuga
Espectrofotômetro;

2.4. VIDRARIAS

Tubo de centrifuga estéril de 30ml (= ao nº de amostras);
Copo ou um suporte para os tubos de centrifuga;
Recipiente para descarte de material;
Microtubos de 1,5ml (= ao nº de amostras);

¹ Bolsista de Aperfeiçoamento-CNPq

² Bolsista de Pós-Graduação, MSc., CNPq

³ Bolsista de Iniciação Científica-CNPq

⁴ Farmacêutica, PhD., Embrapa-CNPAB, km 47, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ

3. PROCEDIMENTO

3.1. Transferência de cultura bacteriana crescida em meio líquido para tubo de centrífuga, devidamente esterilizado;

Obs.: A transferência deve ser feita no fluxo laminar. Manter assepsia para evitar contaminação.

3.1.1. ligar a exaustão do fluxo laminar, passar álcool (70%) nas superfícies e ligar o UV por 20 minutos antes de iniciar a transferência;

3.1.2. colocar a balança de prato em nível previamente limpa com álcool (70%) dentro da área de trabalho do fluxo laminar;

3.1.3. colocar um copo ou um suporte na balança, zerar;

3.1.4. colocar o tubo de centrífuga dentro do suporte, mantendo também a tampa sobre o prato da balança;

3.1.5. adicionar ao tubo (de 30ml) cerca de 20ml de cultura bacteriana; a borda do frasco deve ser ligeiramente flambada antes de se verter a cultura;

3.1.6. anotar o peso do tubo + tampa + amostra = P;

3.1.7. fechar o tubo, flambando a borda ligeiramente;

3.1.8. zerar a balança;

3.1.9. repetir as etapas de 3.1.3 até 3.1.7 com uma nova amostra;

Obs₂ : O tubo de centrífuga com a amostra que tiver o peso menor deve ser novamente colocado na balança previamente zerada com o copo ou o suporte para tubo e destampado. Não esquecer de colocar a tampa no prato da balança. Acrescentar água estéril com o repipetador automático e ponteira estéril até que o peso alcance o valor do peso maior. A ponteira deve ser trocada sempre que se estiver trabalhando com uma nova amostra.

3.2. Colocar os tubos com o mesmo peso em posição oposta no rotor da centrífuga, centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos, à 20°C.

Obs₁: Consultar as especificações do rotor de acordo com o manual do fabricante para determinar o nível do freio e a compensação a ser usada que depende do tipo de rotor, da temperatura de trabalho e da velocidade.

Obs₂: Certificar se houve formação do pellet (precipitado). Não realizar movimentos bruscos de modo a evitar que o pellet seja deslocado da parede do tubo após centrifugação.

3.3. Se o pellet formado for pouco, descartar o sobrenadante, adicionar mais 20 ml da cultura bacteriana, repetindo as etapas 3.1 e 3.2;

Obs₁: A quantidade de pellet é relativa. Vai depender da rotina de trabalho do usuário para evidenciar o volume de pellet, bem como do crescimento bacteriano.

Obs₂: O número de meios frescos a serem inoculados vai depender da quantidade de pellet formado.

3.4. Descartar o sobrenadante, flambando ligeiramente a borda do tubo para manter condição asséptica do tubo de centrifuga. O descarte deve ser feito dentro do fluxo laminar no recipiente apropriado para este fim.

Obs: Deve-se ter o cuidado de não ressuspender o pellet formado.

3.5. Adicionar ao pellet, 15 ml de água estéril, medida em proveta estéril, agitar no vórtex até que todo o pellet tenha ficado em suspensão. A borda do recipiente de água estéril deve ser flambada antes de verter para a proveta.

3.6. Repetir as etapas 3.1.2 até 3.1.8, para todas as amostras, modificando a etapa 3.1.5 que deve ser adicionado água estéril ao invés da cultura bacteriana.

3.7. Repetir as etapas 3.2 a 3.4;

3.8. Repetir a etapa 3.5;

3.9. Com auxílio da pipeta automática e ponteira estéril, ao pellet lavado 2 vezes com água estéril, adicionar 5 ml de água também estéril, e agitar no vórtex.

3.10. Retirar 100 µl da amostra com pipeta automática e ponteira estéril, e adicionar em microtubos contendo 900 µl de água estéril (diluição de 10^{-1}), agitar no vórtex e ler a densidade ótica (D.O.) no espectrofotômetro com comprimento de onda a 545 nm.

3.11. Determinar o volume de amostra a ser adicionado ao meio de cultura fresco para iniciar o crescimento, com D.O. desejada, utilizando como descrito no item 4.0.

3.12. Acrescentar o volume calculado de suspensão bacteriana de células lavadas com pipeta automática e ponteira estéril ao frasco contendo o meio de cultura fresco. A borda do frasco deve ser flambada após adição da suspensão.

3.13. Crescer sob agitação na temperatura recomendada. Acompanhar o crescimento da bactéria pela D.O..

Para estirpes de *Rhizobium* spp de crescimento lento a cada 12 horas e para as de crescimento rápido de 2 em 2 horas.

3.14. Para garantir a pureza do material, inocular uma alíquota de 5ul em meio sólido específico de forma a obter colônia isolada. Caracterizar a velocidade de crescimento e a morfologia da colônia e confirmar com as características originais .

4. MEMÓRIA DE CÁLCULO

$$V(\text{ml}) = \frac{\text{Diluição da amostra} \times \text{D.O. desejada}}{\text{D.O. suspensão}} \times V \text{ final (ml)}$$

V(ml) = volume da suspensão de células lavadas a ser acrescentado ao novo meio de cultura fresco;

Diluição da amostra = diluição da suspensão de células lavadas efetuada para determinação da D. O .

Ex. Para 100µl de suspensão com 900µl de água, a diluição foi de 0,1;

D.O. desejada = densidade ótica desejada no meio de cultura fresco após adição da suspensão bacteriana;

D.O. suspensão = densidade ótica obtida para a suspensão de células bacterianas lavadas após a diluição;

V final (ml) = volume total do meio de cultura fresco

5. RESULTADOS

O resultado deve ser expresso em mililitro (ml).

6. ATUALIZAÇÃO

DESCRIÇÃO	REVISÃO	RESPONSÁVEL	DATA