



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agrobiologia  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
Caixa Postal 74505 - CEP 23851-970 - Seropédica, RJ  
Fone (021) 682-1500 Fax (021) 682-1230  
E-mail: acn@cnpab.embrapa.br

# COMUNICADO TÉCNICO

Nº 32, out/99, p.1-2



## ÁGUA COMO VEÍCULO DE PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Liamara Perin<sup>1</sup>  
Veronica Massena Reis<sup>2</sup>

O isolamento de bactérias diazotróficas tem como etapa final a sua estocagem em uma coleção de culturas. A Embrapa *Agrobiologia* possui uma vasta coleção destes microrganismos e o método de preservação deste material tem sido a liofilização.

A partir de 1995, o Laboratório de Gramíneas deu início a um método simples, barato, rápido e eficiente de preservar uma grande quantidade de isolados de bactérias diazotróficas. Estes isolados, após estudos mais aprofundados de caracterização, também são liofilizados, como outra forma de manter as estirpes em estoque. O novo método utiliza a água como veículo de preservação. A seguir será descrito o procedimento para a estocagem das estirpes em água.

Colocar 0,5 mL de água deionizada em tubos de plástico novos do tipo Eppendorf novos com capacidade de 1,5 mL. Os tubos devem possuir trava de proteção, pois permitem que sejam autoclavados

<sup>1</sup> Estudante do curso de Licenciatura em Ciências Agrárias, bolsista de PIBIC, UFRRJ-Embrapa *Agrobiologia*

<sup>2</sup> Pesquisadora da Embrapa *Agrobiologia*, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970 Seropédica, RJ

sem abrir. Os tubos devem ser colocados dentro de um vidro tipo maionese com tampa para serem autoclavados.

As culturas, após serem testadas quanto a pureza em placas de Petri, são transferidas com o auxílio de uma alça para os tubos de plástico contendo água deionizada esterilizada. Deve-se tomar cuidado para que o meio onde as bactérias foram crescidas não seja transferido para os tubos, apenas as colônias. A seguir transfere-se cada cultura em, no mínimo, 5 tubos contendo, pelo menos, 3 colônias cada. Após a transferência, os tubos devem ser agitados para que ocorra a homogeneização das colônias com a água. Para que a perda de água seja mínima, todos os tubos devem ser lacrados com parafilme. Os tubos devidamente identificados, devem ser mantidos em pé, presos a um suporte (folha de isopor com 3 cm de espessura). As culturas assim estocadas devem ser datadas e armazenadas em lugar seco e escuro.

A eficácia deste método foi conferida utilizando-se culturas de *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* mantidas nestas condições desde 1995. Todas as estirpes testadas mantiveram a sua viabilidade. Hoje este procedimento é usado como rotina no nosso laboratório. Por ocasião de utilização deste estoque, faz-se a homogeneização da suspensão de células e retira-se uma alíquota de 20 µl que pode ser inoculada em meio líquido, semi-sólido ou sólido de acordo com o organismo que se deseja crescer.

O único problema que foi verificado até o momento foi a perda de água dos tubos, mesmo aqueles cobertos com parafilme. Neste caso recomenda-se que o nível de água seja repostado, usando-se água esterilizada e preenchendo-se os tubos na capela de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações. Nesta ocasião recomenda-se a reposição dos tubos.