

Apoio à luta contra doenças e pragas do cajueiro na Guiné-Bissau



Manual de laboratório para realização de Isolamento de fungos e bactérias

Elaborado por:

Inês Diniz, Filipa Monteiro, Luís Catarino, Dora Batista
Lisboa, 2021

Elaboração: Inês Diniz, Dora Batista, Luís Catarino, Filipa Monteiro. **Contactos:** inesdiniz@isa.ulisboa.pt, dorabatista@isa.ulisboa.pt, fimonteiro@fc.ul.pt, lmcatarino@fc.ul.pt.

Fotografias: Inês Diniz

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9610/98).

Guia elaborado no âmbito do projeto FAO TCP/GBS/3081 | Apoio à luta contra doenças e pragas do cajueiro (*Anacardium occidentale*) na Guiné-Bissau (em Pt) | Appui à la lutte contre les maladies, les ravageurs et les parasites d'anacardier (*Anacardium occidentale*) en Guinée-Bissau (em Fr.)

Financiamento: Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas (UN) no âmbito do Programa de Cooperação Técnica (TCP)

cE3c, Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

LEAF, Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

Índice de conteúdos

Esterilização de material de laboratório para isolamento de fungos e bactérias	1
Distribuição de meios de cultura	3
Isolamento de fungos a partir de material vegetal:.....	6
Repicagem de fungos	9

Esterilização de material de laboratório para isolamento de fungos e bactérias

A esterilização do material de laboratório é um passo muito importante no isolamento de fungos e bactérias a partir de amostras vegetais, pois ele permite eliminar ou destruir todos os microorganismos vivos da superfície/interior de um material (tesoura, pinças ect). Assim se garante que apenas os fungos/bactérias patogénicas sejam transferidas do material vegetal para os meios de cultura.

A esterilização de materiais (como tesouras, pinças e agulhas) pode ser feito de várias maneiras, consoante a finalidade e a disponibilidade de recursos. Assim, esterilização de pinças, tesouras e bisturis para serem usados no isolamento pode ser feito recorrendo apenas a uma lamparina de álcool, contudo, se houver essa possibilidade, deverá ser antes feita em estufa a 120°C durante 2h. A esterilização de meios de cultura, por sua vez, deverá ser feita num autoclave. Na falta desta última, uma simples panela de pressão pode ser usada, com o mesmo fim. No entanto, porque a panela de pressão convencional não foi desenhada para uso em laboratório, esta deve ser manuseada com cuidado e só depois de testada.

1- **Autoclave:** Consultar sempre o manual do equipamento. Por norma, para o tipo de esterilização que se pretende, o autoclave deve estar regulado para 121°C, 1 Bar (15psi) de pressão e 20 minutos de esterilização.

2- **Panela de pressão:** A panela de pressão pode ser utilizada para esterilizar diversos materiais de laboratório como pinças, tesouras, agulhas, gaze entre outros, assim como para esterilizar meios de culturas.

Como fazer:

2.1 - Numa panela de pressão colocar alguns centímetros (5cm) de água.

2.2 - Colocar uma rede ou um escorredor de metal dentro da panela de pressão de forma a evitar que o que se coloque lá dentro, não fique em contacto directo com o fundo da panela.

2.3 – Enrolar as pinças, tesouras e outros em folhas de alumínio e colocar dentro da panela, em cima da rede ou escorredor. No caso de meios de cultura, estes devem ser preparados à parte e colocados em frascos com a tampa **NÃO** totalmente fechada. Deve-se cobrir a tampa do frasco com uma folha de alumínio. Fechar a panela

2.4 – (opcional) Depois de colocar tudo o que se quer esterilizar dentro da panela, tapar com uma folha de alumínio. Assim se evita que o conteúdo fique molhado com a água de condensação da panela.

2.5 – Aquecer a panela de pressão e esperar que se atinga a pressão. Quando começar a sair vapor, esperar 20 minutos.

2.6 - Após 20 minutos, desligar a panela ou lume e **ESPERAR** que arrefeça o suficiente para se abrir.

2.7 – Depois de abrir a panela, retirar o material. No caso de líquidos em frascos, fechar a tampa que tinha ficado meio aberta.

3- **Lamparina de álcool:** A lamparina de álcool (álcool a 70%) pode ser utilizada para esterilizar vários instrumentos como tesouras e pinças a serem usadas durante o isolamento

Esterilização de material de laboratório

de fungos e bactérias a partir de material vegetal. Para além disso, uma lamparina acesa garante que ao seu redor exista uma área estéril e segura para a abertura de placas de *petri* com meio de cultura, por poucos segundos.

Como fazer:

3.1 – Ligar a lamparina. Encostar à chama as pontas da lâmina de bisturi, da tesoura, pinça, etc e esperar 5 segundos.

3.2 – Mergulhar a ponta em álcool (90% ou 70%) e levar novamente à chama. Esperar que a chama se apague. A ponta do instrumento está agora estéril e pode ser usada. Opcional – na ausência de álcool, o instrumento pode apenas ser levado a chama até ficar incandescente. Será necessário esperar uns segundos até que o instrumento arrefeça. Desta forma se garante que o material vegetal não seja queimado durante o manuseamento.

Distribuição de meios de cultura

Depois da esterilização dos meios de cultura, estes devem ser distribuídos placas de *Petri* em condições assépticas. Assim se garante que o crescimento de fungos e bactérias têm proveniência apenas do material vegetal analisado.

A distribuição do meio de cultura deve ser feita logo de seguida à esterilização estando meio ainda líquido, ao qual se poderá acrescentar um antibiótico ou antifúngico, caso seja necessário.

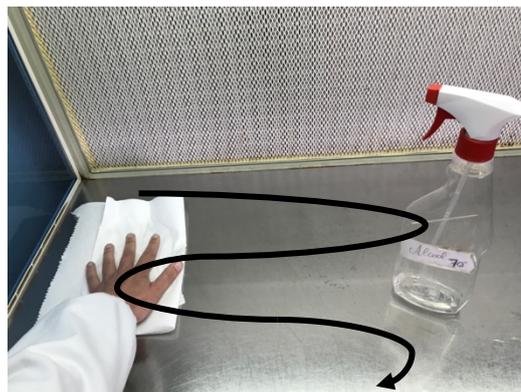
A distribuição deve ser idealmente numa câmara de fluxo laminar. Caso não exista essa possibilidade, poderá ser distribuído na proximidade de uma lamparina de álcool.

Como fazer:

- 1- Ligar a câmara de fluxo laminar cerca de 20 minutos antes de a usar, usando o fluxo no máximo. Passando esse tempo, colocar o fluxo em fluxo de trabalho (menor fluxo).



- 2- Desinfetar a câmara de fluxo com álcool 70%. A limpeza deve no sentido da parte mais funda para a parte mais exterior, em movimentos da esquerda para a direita. Desta forma se garante que a bancada não contaminada com elementos do exterior.



- 3- Antes de colocar o saco com placas de *Petri*, borrifar o saco com álcool 70%. Dentro da câmara, abrir o saco e retirar as placas.

Distribuição de meios de cultura

- Colocar dentro da câmara o que se vai precisar, como por exemplo, o meio de cultura, as placas de *Petri*, eventualmente o antibiótico/antifúngico



- Verificar a temperatura do meio de cultura. Deste deve estar ainda líquido, mas morno ao toque. Um meio de cultura distribuído muito quente vai produzir condensação dentro da placa, o que dificulta a sua secagem. Para além disso, quando adicionado a um meio muito quente, o antibiótico/antifúngico pode degradar-se e perde a sua eficácia.

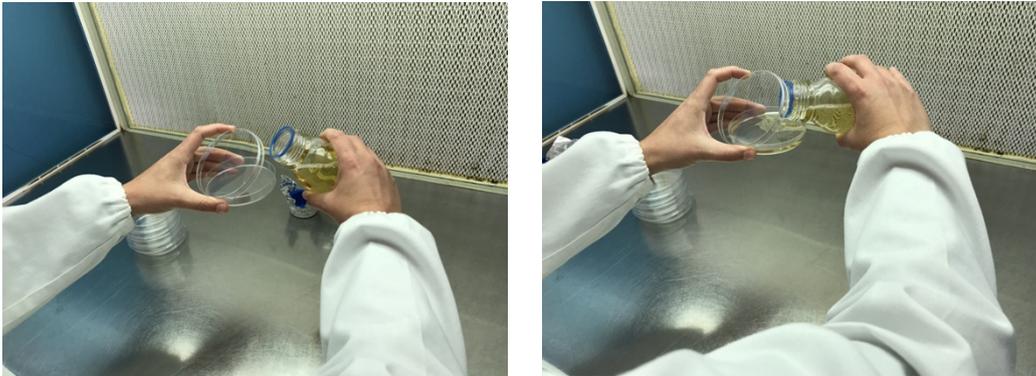


- Quando se justificar, adicionar o antibiótico/antifúngico. Agitar o meio de forma a dissolver o antibiótico/antifúngico. Esperar alguns minutos de forma que as bolhas desapareçam.



Distribuição de meios de cultura

- 7- Com uma mão abrir o suficiente a placa de Petri para a distribuição do meio com a outra mão. Evitar estar muito tempo com a placa aberta ou abrir demasiado a placa.



- 8- Colocar a placa de Petri com meio da bancada. Ela poderá ficar ligeiramente aberta com o fluxo da bancada ligado para permitir a secagem do meio. No caso de se usar uma lamparina de álcool, deixar a placa totalmente fechada.



- 9- Apontar numa das placas a data da distribuição.
- 10- Depois de totalmente secas (sem sinais de condensação) as placas de *Petri* podem ser usadas imediatamente, ou podem ser guardadas nos seus sacos originais e mantidas num frigorífico até à sua utilização.

Isolamento de fungos a partir de material vegetal:

O isolamento de fungos e bactérias a partir de material vegetal permite a passagem do agente patogénico, ou seja, o agente causador da doença, do meio vegetal para o meio de cultura. O isolamento de fungos e bactérias é um procedimento simples, mas exige que tanto o material vegetal com sintomas, os instrumentos a utilizar e o meio de cultura estejam estéreis.

Material necessário:

- Lamparina de álcool (álcool 70%)
- Placas de Petri com meio de cultura + Antibiótico
- Bisturi
- Pinça
- 3 copos pequenos
- Álcool 70%/90%
- Lixívia
- Água esterilizada (opção – água mineral)
- Papel absorvente (guardanapo por exemplo)
- Caneta de acetato
- Pelicula aderente/parafilm



Preparação:

Previamente deve-se limpar a bancada com álcool. No primeiro copo colocar uma gota de lixívia em 10ml água e colocar apenas água esterilizada nos restantes 2 copos.



1- Colocar material vegetal em cima de uma folha de papel e localizar a zona com sintomas



Isolamento de fungos e bactérias de material vegetal:

2- Com um bisturi estéril (passado por álcool e chama) cortar um pedaço do tecido vegetal de forma que se apanhe uma parte “doente” e uma parte “saudável”.



3- Colocar o pedaço de tecido vegetal no primeiro copo (água com lixívia) e esperar 30 segundos. Passar o pedaço do primeiro copo para o segundo (que contém só água) e esperar 30 segundos. Passar o pedaço novamente do segundo para o terceiro copo e esperar 30 segundos.



4- Retirar o pedaço do último copo e deixar secar em cima da folha absorvente durante 30 segundos.



Isolamento de fungos e bactérias de material vegetal:

5- Depois de seco, abrir a placa de *petri* e com uma pinça estéril (passada ao álcool e chama), colocar a amostra no meio de cultura. Consoante o material (tamanho da amostra) podem ser colocados até 4 amostras, desde que devidamente separadas.



6- Fechar a placa, selar a mesma com película aderente/parafilme e identificar a placa.



7- A placa de *petri* deve ser guardada num local escuro, à temperatura de 23°C, virada para baixo no caso de se observar condensação de água na tampa. A placa deve ser vista todos os dias de forma a monitorizar o crescimento de novas colónias.

Repicagem de fungos

Após a realização do “isolamento de fungos” a partir do material vegetal infetado, em que este é colocado de forma asséptica em meio de cultura em placas de petri para que os fungos presentes no material vegetal sejam transferidos para os meios de cultura, é realizado o segundo isolamento em que os fungos de interesse são isolados dos restantes. Para tal, as placas contendo o material vegetal em meio de cultura devem ser monitorizadas diariamente, uma vez que os diversos fungos possuem taxas de crescimento diferentes. Assim será de esperar que os mais rápidos a crescer se alastrem mais rapidamente pelo meio de cultura, podendo impedir o crescimento de fungos mais lentos. Este isolamento (a isolar o(s) fungo(s) de interesse dos restantes) deverá ser feito assim que se identifiquem colónias bem definidas, podem ocorrer no dia seguinte ao isolamento do material vegetal ou mesmo semanas depois. Uma vez que o meio de cultura usado no “isolamento de fungos” a partir do material vegetal infetado, contém antibiótico, o meio de cultura usado não necessita de ser suplementado com antibiótico.

NOTA: Muitas vezes, é grande a quantidade de material a ser analisado e, como tal, é necessário usar um método rigoroso para identificar as placas de forma a conseguir estabelecer uma ligação entre o sintoma e os fungos daí isolados. Utilizar sempre a mesma indicação (proveniência do material, indicação de foto e data) assim como o registo escrito são um bom método de registo e monitorização.

Material necessário:

- Lamparina de álcool (álcool 70%)
- Bisturi
- Álcool 70%/90%
- Placas de petri com meio de cultura
- Caneta de acetato

Preparação:

Previamente deve-se limpar a bancada com álcool.

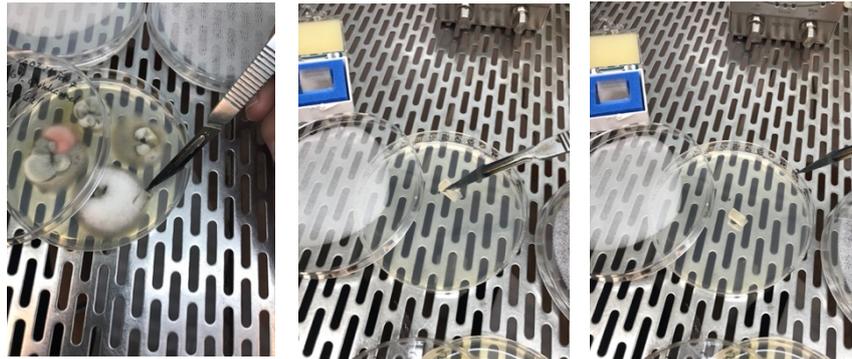
1- Observar a placa (frente e verso da mesma) e identificar os fungos que se pretendem isolar.



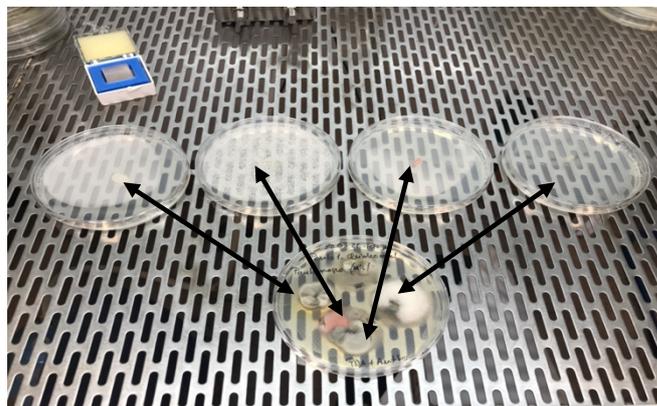
2- Retirar a película aderente que está a fechar a placa e abrir a mesma, sempre perto da chama.

Caraterísticas morfo-culturais de alguns dos fungos

- 3-Esterilizar o bisturi à chama e passar novamente por álcool para arrefecer a lâmina. Certificar-se que a lamina está arrefecida, ao tocar com a mesma num sítio da placa apenas com meio de cultura. O meio de cultura não deve derreter ao toque da lamina.
- 4-Cortar uma pequena secção (cubo por exemplo) do meio de cultura contendo o fungo desejado.
- 5-Retira o cubo com o auxílio do bico de bisturi.
- 6-Transferir o cubo para uma nova placa. Ao inserir deve-se inverter o cubo de forma a que a superfície do mesmo contendo o fungo deva ficar em contacto com o meio de cultura fresco.



- 7-Fechar a placa e selar com película aderente.
- 8-(repetir o mesmo procedimento para todos os fungos que se observem na placa de crescimento).
- 9-Identificar a placa, utilizando sempre a mesma indicação (proveniência do material, indicação de foto e data). Acompanhar com um registo escrito de forma a garantir um acompanhamento dos sintomas no material vegetal e os fungos isolados.



- 10-As placas devem ser guardas nos primeiros dias a 24°C. Depois de se observar o crescimento da colónica, as placas podem ficar guardas no frigorífico, mas sempre invertidas, de forma a evitar que a condensação da água se forma na tampa da placa inunde a superfície da mesma.