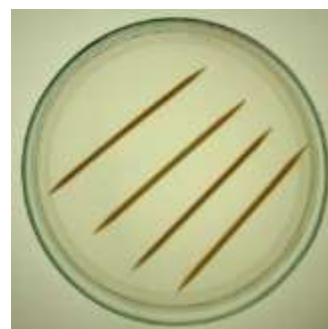


## A DESINFECÇÃO DOS INSTRUMENTOS

Como indicado no Guia 8 0: *Micropropagação no laboratório de ensino*, as técnicas de cultivo de tecidos vegetais consistem na transferência de um explante a um meio de cultura estéril, em condições assépticas. Evitar a contaminação microbiana do meio de cultura é uma das maiores dificuldades técnicas, porque demanda tanto a desinfecção dos explantes como a esterilização dos instrumentos utilizados.

Palitos acondicionados individualmente podem ser adquiridos no comércio a baixo custo. Resultam estéreis e são descartáveis (Figura 1).

Figura 1: Palitos incubados em ágar nutriente, durante uma semana a temperatura ambiente.



Facas e pinças embrulhadas em papel alumínio devem ser esterilizadas por calor úmido (autoclave, 25 minutos na panela de pressão), ou por calor seco (no forno, 3 horas a 160 °C). A escolha de um ou outro método depende da presença de partes de plástico que possam derreter se o calor for excessivo.

Do ponto de vista prático, a utilização de facas e pinças estéreis resulta inviável ao longo de todo o procedimento de transferência dos explantes. Contudo, os instrumentos podem ser reutilizados uma vez desinfetados adequadamente, por imersão em uma solução com hipoclorito de sódio, álcool ou água oxigenada.

As concentrações desses produtos podem variar em função das condições de armazenamento e nem todos são eficientes na eliminação dos esporos bacterianos. Por isso consideramos indispensável testar a desinfecção dos instrumentos antes de começar a trabalhar com cultura de tecidos.

## BIBLIOGRAFIA

SMITH R. A. Plant Tissue Culture Studies. Reston, Virginia. National Association of Biology Teachers, 1997.

## MICROPROPAGAÇÃO / A DESINFECÇÃO DOS INSTRUMENTOS

### ATIVIDADE PRÁTICA

#### OBJETIVO

Comparar a eficiência dos desinfetantes usuais do laboratório, na limpeza dos instrumentos que serão utilizados nas culturas de tecidos vegetais.

#### MATERIAIS

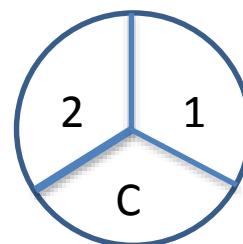
Duas placas de Petri com ágar nutriente estéril, 1 tubo com caldo nutriente inoculado com *Bacillus subtilis*, 1 tubo com caldo nutriente inoculado com *Escherichia coli*, 2 pinças esterilizadas previamente por calor úmido ou seco, dois béqueres com o desinfetante a avaliar (um para *B. subtilis*, outro para *E.coli*).

#### PROCEDIMENTO



Seguir as normas de trabalho *standard* detalhadas no Guia 67: *trabalhar em segurança*.

1. Dividir a placa de Petri em 3 setores, como indicado no esquema ao lado (Controle, 1 e 2).
2. Com a pinça estéril, fazer um traço no setor C.
3. Molhar a ponta da pinça no cultivo de *Escherichia coli* e fazer um traço no setor 1.
4. Deixar a pinça em um dos béqueres com desinfetante, durante 15 minutos.
5. Retirar a pinça, deixando escorrer o excesso de líquido, e fazer um traço no setor 2
6. Repetir o procedimento anterior na segunda placa, com outra pinça estéril, o outro béquer com desinfetante e o cultivo de *Bacillus subtilis*.
7. Incubar ambas as placas a temperatura ambiente, até que o crescimento bacteriano no setor 1 seja evidente.
8. Analisar os resultados.



### NOSSO COMENTÁRIO

Em função da limitação de material e do alto número de contaminações ocorridas no laboratório de ensino, procedemos a testar a eficiência de vários desinfetantes com *Escherichia coli* e com *Bacillus subtilis*, uma bactéria que esporula.

Os desinfetantes escolhidos foram os de uso habitual: água sanitária (marca Globo), água oxigenada 30%, etanol 92,8<sup>o</sup>, etanol 70<sup>o</sup> e CLOR-in 10 (Dicloro-S-Triazinetione de Sódio). Adaptou-se o procedimento detalhado anteriormente a cada desinfetante, como a seguir:

#### 1. Água sanitária

Imersão da pinça contaminada em uma solução de água sanitária 50% (v/v) durante 20 minutos e posterior enxague em uma solução de água sanitária 5 % (v/v).

A concentração pode parecer muito alta, especialmente em relação a aquelas recomendadas nos protocolos de autores ingleses e norte-americanos. Em seus países, a concentração normal de hipoclorito de sódio na água sanitária comercial é de 5%. No Brasil, essa concentração é de 2 a 2,5 %, de modo que adaptamos as recomendações desses autores a nossas condições.

#### 2. Água oxigenada

Imersão da pinça contaminada em uma solução de água oxigenada 3% (v/v) durante 20 minutos

#### 3. Etanol (92,8<sup>o</sup> e 70<sup>o</sup>)

Imersão da pinça contaminada em etanol 92,8<sup>o</sup> ou em etanol 70<sup>o</sup>, durante 20 minutos

#### 4. Clor-in 10

Imersão da pinça contaminada em uma solução de Clor-in 10 (1 tablete/500 ml) durante 20 minutos.

Paralelamente, realizou-se um controle com água destilada estéril (tempo de imersão, 20 minutos).

## MICROPROPAGAÇÃO / A DESINFECÇÃO DOS INSTRUMENTOS

Os resultados esperados eram os seguintes:

Setor C: sem crescimento microbiano ao longo do traço feito com a pinça (Controle do teste de esterilidade),

Setor 1: crescimento da bactéria inoculada (*Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*)

Setor 2: o crescimento bacteriano indicaria a ineficiência do desinfetante utilizado; a ausência de crescimento mostraria sua eficiência.

Os resultados encontrados estão na Figura 2 e na Tabela 1. Os melhores desinfetantes foram a água sanitária, a água oxigenada e o Clor-in 10. Nenhuma das duas concentrações de etanol se mostrou eficiente em relação a *Bacillus subtilis*.

### COMO MONTAR UM PROJETO

Estudar a eficiência de um desinfetante em função do tempo de imersão dos instrumentos no produto.

## MICROPROPAGAÇÃO / A DESINFECÇÃO DOS INSTRUMENTOS

Figura 2: Eficiência de vários produtos na desinfecção das pinças contaminadas com *Escherichia coli* e com *Bacillus subtilis* (C=traço com a pinça esterilizada, 1=traço com a pinça contaminada; 2=traço com a pinça "desinfetada").

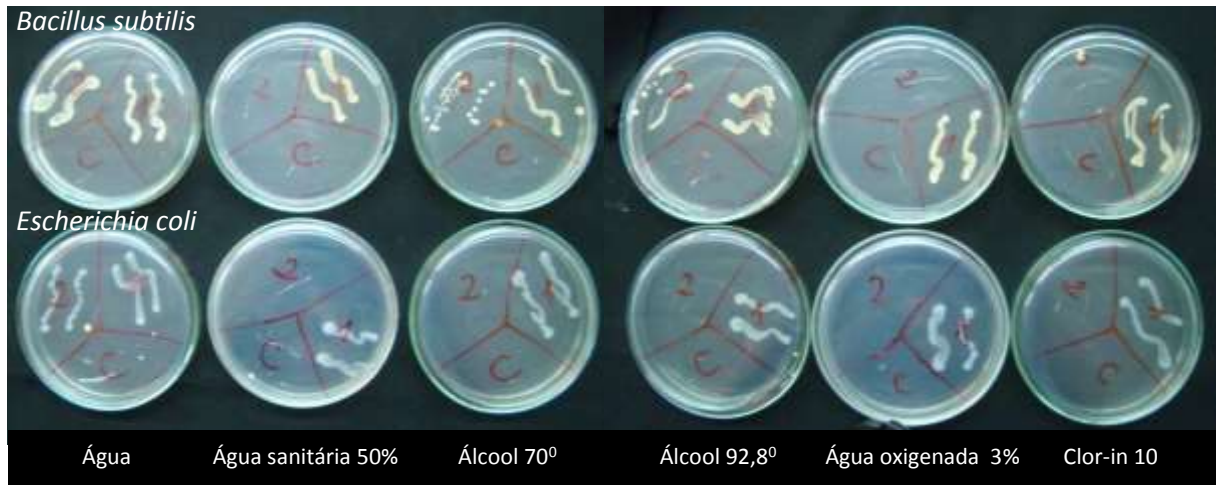


Tabela 1: Eficiência de vários produtos na desinfecção das pinças.

(+: tratamento eficiente; -: tratamento ineficiente)

| TRATAMENTO         | ÁGUA | ÁGUA SANITÁRIA | ÁLCOOL 70º | ÁLCOOL 92,8º | ÁGUA OXIGENADA 3% | CLOR-IN 10 |
|--------------------|------|----------------|------------|--------------|-------------------|------------|
| <i>B. subtilis</i> | -    | +              | -          | -            | +                 | +*         |
| <i>E. coli</i>     | -    | +              | +          | +            | +                 | +          |

(\*): Uma colônia presente no setor 2 se encontra fora do traço causado pela pinça.