

CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, PELA COMBINAÇÃO DE ESTERILIZANTES QUÍMICOS E FORNO DE MICROONDAS¹

Silvio Lopes Teixeira²
Márcia Torres Teixeira³
Marilaine Campanati⁴
Robson Ferreira de Almeida⁵

RESUMO

Dados obtidos pelos autores em experimento anterior, ainda em fase de publicação, mostraram a baixa eficiência do forno de microondas na esterilização de meios de cultura no estado líquido e sugerem a necessidade de modificação na metodologia até agora proposta. Esta fase da pesquisa permitiu vislumbrar a possibilidade de se desenvolver uma metodologia que combine a esterilização química do meio nutritivo pelo emprego de baixa concentração de NaOCl, com a esterilização complementar dos frascos contendo o meio de cultura, em forno de microondas. Quando o NaOCl foi adicionado ao meio de cultura 15 minutos antes do tratamento no forno de microondas, ocorreu redução do pH a níveis que impediram a solidificação do agar, mas quando se adotou um intervalo de quatro horas entre estas duas operações, a redução do pH não teve importância prática, embora a eficiência da esterilização tenha sido reduzida.

Palavras-chave: micropropagação, forno de microondas, esterilização.

¹ Aceito para publicação em 05.08.2004.

² Laboratório de Fitotecnia, Universidade Estadual do Norte Fluminense. Av. Alberto Lamego, 2000, 28013-600 Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: s.lopes.teixeira@uol.com.br

³ Bolsista de Iniciação Científica, FENORTE/TECNORTE. Laboratório de Fitotecnia, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

⁴ Bolsista de Apoio Tecnológico – Graduação, FENORTE/TECNORTE. Laboratório de Fitotecnia, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

⁵ Bolsista de Apoio Tecnológico – Mestrado, FENORTE/TECNORTE.

ABSTRACT

STERILIZATION OF PLANT TISSUE CULTURE NUTRIENT MEDIA BY COMBINING CHEMICAL STERILIZERS AND MICROWAVE OVEN TREATMENT

Unpublished data obtained by the authors in a previous experiment showed the low efficiency of the microwave oven in sterilizing liquid nutritive media for plant tissue culture, suggesting changes in the current methodology. This research showed the possibility of developing a new methodology combining chemical sterilization of nutrient medium by NaOCl with sterilization of the culture flasks in microwave oven. When NaOCl was added to the nutrient medium 15 minutes before the microwave oven treatment, the pH decreased, preventing agar solidification, but when a 4-hour interval was allowed between the two operations, pH decrease was not important, although sterilization efficiency decreased.

Key words: micro-propagation, microwave oven, sterilization.

INTRODUÇÃO

A esterilização de vidraria, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório, feita normalmente por meio de autoclavagem (3), é uma técnica dispendiosa, devido ao elevado custo do equipamento e elevado consumo de energia. Além disso, a autoclavagem pode levar à decomposição de componentes do meio de cultura, como a sacarose (1, 12). Por isso, a substituição desta técnica de esterilização por alguma outra menos dispendiosa ou que não afete a composição do meio de cultura seria altamente desejável. O uso do forno de microondas com esta finalidade tem sido tentado, mas sem completo sucesso, quando se trata de meio líquido. A eficiência do forno de microondas já foi comprovada na destruição de bactérias (6) e fungos (5) localizados sobre superfícies secas, como instrumentos odontológicos (8) e de laboratório (9), recipientes plásticos para meios de cultura (10) e outros equipamentos (2, 4). Todavia, em meios de cultura líquidos o equipamento não apresenta eficiência total, devido à ebulição e transbordamento prematuros do líquido, antes da sua completa esterilização (13). Mesmo na esterilização de materiais sólidos, a eficiência do forno de microondas depende do controle eficiente de uma série de fatores (11). Na primeira parte desta pesquisa, dados ainda em fase de publicação confirmaram a baixa eficiência do forno de microondas como único método de esterilização. A presente pesquisa teve como objetivo investigar a possibilidade de se combinar o uso do NaOCl como esterilizante químico do meio de cultura com a esterilização, no forno de microondas, dos frascos contendo o meio.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado um forno de microondas Consul, modelo 400 WAVE (700 Watts), com possibilidade de trabalhar em potências de 1 (10%) a 10 (100%, ou 700 W). O prato do forno foi adaptado com suportes de polipropileno, para manter 75 tubos de ensaio de 25 x 150 mm na posição vertical. A vidraria utilizada na preparação do meio de cultura foi previamente esterilizada por 5 min, em forno de microondas, juntamente com os tubos de ensaio, os quais foram mantidos na capela de fluxo laminar até o momento do seu enchimento com o meio de cultura. Como fonte de NaOCl, foi utilizado o produto comercial “Água Sanitária CAMPINHO[®]”, com 2% de cloro ativo. No primeiro teste, foi adicionada água sanitária ao meio de cultura contido em erlenmeyer, imediatamente antes da correção do pH, o qual foi padronizado em $5,7 \pm 0,1$. Após 15 minutos, o ágar já fundido no forno de microondas foi incorporado ao meio de cultura e vertido em tubos de ensaio de 25 mm de diâmetro, 150 mm de altura e 1 mm de espessura, à razão de 20 mL por tubo de ensaio, na capela de fluxo laminar. Os tubos foram fechados com tampa de polipropileno e novamente esterilizados no forno de microondas, por 10 minutos, à potência máxima. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco tratamentos, 15 repetições e um tubo de ensaio por unidade experimental.

Os tratamentos consistiram em água sanitária adicionada ao meio de cultura nas diluições de 1/20; 1/10; 1/6,7; 1/5; e 1/4, de modo que se obtenham, aproximadamente, 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; e 0,5% de cloro ativo no meio. Foi adicionado um tubo de ensaio extra em cada tratamento, para a determinação do pH final após a fusão, esfriamento e solidificação do ágar. Os parâmetros observados foram: pH final, consistência do ágar e porcentagem de culturas esterilizadas.

No segundo teste, ao meio de cultura contido em erlenmeyer foi adicionada a água sanitária, logo após o ajuste do pH; em seguida, o frasco foi fechado com uma mecha de algodão. Quatro horas após, o ágar já fundido no forno de microondas foi incorporado ao meio, sendo este, vertido em tubos de ensaio de 25 mm de diâmetro, 150 mm de altura e 1 mm de espessura, à base de 20 mL por tubo de ensaio, na capela de fluxo laminar. Os tubos foram fechados com tampa de polipropileno e novamente esterilizados em forno de microondas por 10 minutos, à potência máxima. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco tratamentos, 15 repetições e um tubo de ensaio por unidade experimental. Os tratamentos consistiram na adição de 0, 8, 10, 12, e 14 gotas de água sanitária em 300 mL de meio de cultura, de modo que se obtenham, aproximadamente, 0; 0,24; 0,30; 0,36; e 0,42% de cloro ativo. Foi

acrescentado um tubo de ensaio a mais em cada tratamento, para a determinação do pH, 18 horas após a esterilização do meio de cultura, no forno de microondas.

As bases das tampas dos tubos de ensaio foram vedadas com parafilm e as culturas incubadas por todo o tempo em sala de crescimento, com temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $19 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por tubos fluorescentes Osram[®], luz do dia e 40 Watts de potência.

Os parâmetros observados foram: pH final, número e porcentagem de culturas esterilizadas.

A coleta de dados correspondentes à contaminação do meio de cultura foi feita pelo aspecto visual das culturas, após uma semana. Os limites de confiança das porcentagens foram derivados de tábuas de distribuição binomial de Rohlf e Sokal (7).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos dados do Quadro 1, observa-se que todas as diluições de água sanitária, no primeiro experimento, garantiram esterilização completa do meio de cultura, embora tenha ocorrido redução constante do pH e na capacidade de solidificação do ágar à medida que se reduziu a diluição da água sanitária de 1/20 (0,1% de cloro ativo) para 1/4 (0,5% de cloro ativo). À diluição de 1/20 (0,1% de cloro ativo) correspondeu o pH 5,0 e solidificação normal do meio de cultura, permitindo supor que esta seria uma situação favorável ao crescimento e desenvolvimento de tecidos de grande número de espécies. Porém a diluição de 1/10 (0,2% de cloro ativo) já se mostrou imprópria,

QUADRO 1 - pH final, consistência do ágar e porcentagens de culturas esterilizadas, em razão de diferentes diluições de água sanitária no meio de cultura, quando a dissolução do ágar e esterilização do meio foram efetuadas 15 minutos após a adição do produto

Diluições de água sanitária	pH	Consistência do ágar	Culturas esterilizadas* (%)
1/20	5,0	Firme	100 (78,20-100,00)
1/10	2,8	Pastoso	100 (78,20-100,00)
1/6,7	2,4	Líquido	100 (78,20-100,00)
1/5	2,3	Líquido	100 (78,20-100,00)
1/4	2,1	Líquido	100 (78,20-100,00)

* Números entre parênteses correspondem aos intervalos de confiança das porcentagens a 5%.

devido à redução do pH para 2,8, além de redução na consistência do meio, o mesmo observando-se para as diluições inferiores a 1/10 (concentrações superiores a 0,2% de cloro ativo), que resultaram em pHs ainda mais baixos e meio completamente líquido. Diferentemente do verificado no primeiro teste, embora o pH no segundo (Quadro 2) tenha apresentado tendência para queda progressiva com o aumento da concentração de NaOCl (aumento do número de gotas de água sanitária), essa tendência foi muito pequena com o pH mantendo-se entre 5,61 em ausência de NaOCl e 5,44 com a concentração máxima de 0,42% (14 gotas de água sanitária/300 mL de água). Além disso, o ágar solidificou-se normalmente em todos os tratamentos.

QUADRO 2 - pH final e número e percentagens de culturas esterilizadas, em razão do número de gotas de água sanitária no meio de cultura, quando a dissolução do ágar e esterilização final do meio foram efetuadas quatro horas após a adição do produto				
Diluições de água sanitária			Culturas esterilizadas*	
Nº de gotas em 300 mL	NaClO %	pH final	Nº	%
0	0	5,61	0	0 (0,00-30,85)
8	0,24	5,49	9	60,00 (32,26-83,07)
10	0,30	5,48	11	73,33 (44,86-92,20)
12	0,36	5,48	14	93,33 (68,00-99,83)
14	0,42	5,44	14	93,33 (68,00-99,83)

*Números entre parênteses correspondem aos limites de confiança das percentagens a 5%.

O máximo atingido de esterilização foi de 92,9%, quando se utilizou a concentração máxima de 0,42% de NaOCl (14 gotas de água sanitária/300 mL de água), diferentemente do que aconteceu no primeiro teste, em que todas as concentrações de NaOCl promoveram completa esterilização. Considerando que a fusão do ágar e a esterilização final do meio de cultura foram efetuadas apenas 15 minutos após a adição do NaOCl no primeiro teste e após quatro horas no segundo, é provável que esta diferença de tempo seja responsável pela diferença das reações observadas nos dois testes quanto à manutenção do pH elevado e à solidificação do ágar no segundo teste. Não se encontrou na literatura consultada qualquer referência a este problema, mas pode-se supor que o aquecimento do meio de cultura após apenas 15 minutos da adição do NaOCl tenha acelerado a decomposição do composto, com rápida liberação do cloro nascente e conseqüente aumento do seu poder esterilizante, além de ter promovido reação entre ele e outros componentes

do meio, resultando em queda acentuada do pH e não solidificação do ágar. Após quatro horas, no caso do segundo teste, o NaOCl residual no meio provavelmente já seria desprezível por ocasião do aquecimento durante a fusão do ágar e esterilização final.

CONCLUSÕES

1) A adição de NaOCl ao meio de cultura causa redução do pH, e este efeito parece estar relacionado com o tratamento complementar no forno de microondas.

2) A intensidade de redução do pH do meio de cultura pelo NaOCl parece depender do intervalo decorrido entre a adição do composto ao meio de cultura e o tratamento complementar no forno de microondas.

3) O procedimento que resulta na esterilização completa do meio de cultura é prejudicial à solidificação do ágar, e aquele que permite a solidificação do ágar reduz o poder esterilizante do tratamento.

AGRADECIMENTOS

À FAPERJ, pelo auxílio financeiro ao laboratório de cultura de tecidos.

Ao sistema FENORTE/TECNORTE, pelo suporte técnico, concedendo as bolsas de Iniciação Científica e de Apoio Tecnológico.

REFERÊNCIAS

1. Ball, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media, a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. *Bul. Torrey Bot. Club*, 80:409-11, 1953.
2. BIELA, A.M. Can baby feeding equipment be sterilized in the domestic microwave oven? *Journal Royal Society Health*, 105: 131-2, 1985.
3. BURGER, D.W. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. *HortScience*, 23:1066-8, 1988.
4. JENG, D.K.H. Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Applied Environmental Microbiology*, 54:2133-7, 1987.
5. KELLER, M.D.; BELLOWS, W.K. & GUILLARD, R.R.J. Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 117:279-283, 1988.
6. LATIMER, J.M. & MATSEN, J.M. Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiology*, 6:340-2, 1977.
7. ROHLF, F. J. & SOKAL, R. R. *Statistical Tables*. San Francisco, W.H. Freeman and Co., 1969. 253p.
8. ROHRER, M.D. & BULLARD, R.A. Microwave sterilization. *JADA*, 119:194-8, 1985.
9. ROSASPINA, S.; ANZANEL, D. & SALVATORELLI, G. Microwave sterilization of enterobacteria. *Microbios*, 76:263-70, 1993.

10. SANBORN, M.R.; WAN, S.K. & BULLARD, R. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Appl. Environ. Microbiology* 44:960-4, 1982.
11. SHERBONDY, A.L; COOPER, C.S.; KALINOWSKI, S.E.; BOYT, M.A. & HAWTREY, C.E. Variability in catheter microwave sterilization techniques in a single clinic population. *Journal Urology* 168:562-4, 2002.
12. STREET, H.E. & LOWE, J.S. The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. *Annals Botany* 14:307-29, 1950
13. TISSERAT, B.; JONES, D. & GALLETTA, P.D. Microwave sterilization of plant tissue culture media. *HorScience* 27:358-61, 1992.