

ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS NUTRITIVOS PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS EM FORNO DE MICROONDAS¹

Sílvia Lopes Teixeira²
Raquel Tavares S. de Sousa³
Márcia Torres Teixeira⁴

RESUMO

A autoclavagem de vidraria e meios de cultura em laboratório é uma técnica dispendiosa, tanto devido ao custo do aparelho quanto ao gasto elevado de energia. Além disso, ela pode levar à decomposição de componentes orgânicos do meio de cultura. Por isso, o emprego de forno de microondas com esta finalidade tem sido tentado, mas os resultados não têm sido consistentes. Esta pesquisa investigou algumas alternativas de uso do forno de microondas, combinando distintas potências de trabalho com diferentes durações do tratamento, bem como diferentes maneiras de esterilização química da água previamente à sua utilização no preparo dos meios de cultura, combinadas com a esterilização final dos frascos de cultura no forno de microondas. Os resultados permitiram concluir que a eficiência do tratamento no forno de microondas é inversamente proporcional à taxa de contaminação inicial do meio de cultura e que o tratamento prévio da água de preparo do meio de cultura com H₂O₂ ou NaOCl, combinado com o tratamento final no forno de microondas, permite a esterilização completa das culturas, embora

¹ Aceito para publicação em 05.08.2004.

² Laboratório de Fitotecnia, Universidade Estadual do Norte Fluminense. Av. Alberto Lamego, 2.000, 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.

algumas dúvidas ainda precisam ser esclarecidas antes que a técnica possa vir a ser empregada.

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

ABSTRACT

MICROWAVE OVEN STERILIZATION OF PLANT TISSUE CULTURE MEDIUM

The use of laboratory glassware autoclaving and culture media is an expensive procedure due to the high cost of the equipment and energy.

Also, autoclaving may lead to the decomposition of organic compounds in the culture medium. Thus, the use of microwave oven for this purpose has been attempted, but the results have been inconsistent. Some alternatives of using microwave oven for this purpose were used in this research by combining distinct work powers with treatment duration, as well as different chemical treatments of the water used to prepare the culture media, combined with the final treatment of the flasks in the microwave oven. The results allowed to conclude that the efficiency of the microwave treatment is inversely proportional to the initial contamination rate of the culture medium and that the water treatment with H_2O_2 or $NaOCl$ prior to the preparation of the culture medium, combined with the final treatment in the microwave oven allowed complete sterilization of the cultures, although some points need to be further investigated before the technique can be applied.

Key words: micropropagation, 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 do consumo de energia. Além disso, a autoclavagem pode levar à decomposição de componentes orgânicos do meio de cultura, como a sacarose (1, 19). Por estes motivos, 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 com resultados variáveis. Sua eficiência já foi comprovada na destruição de bactérias (8) e fungos (6) localizados sobre superfícies secas (5), como instrumentos odontológicos (12) e de laboratório (13), recipientes plásticos para meios de cultura (15) e outros equipamentos (2), além de alimentos sólidos (4, 9, 10, 14, 16). Todavia, para líquidos a sua eficiência é prejudicada pela ebulição e transbordamento dos mesmos antes da completa esterilização (20). Mesmo para a esterilização de materiais sólidos, o uso eficiente do forno de microondas depende do controle de uma série de fatores (18). A

presente pesquisa teve como objetivo investigar a possibilidade de se usar o forno de microondas na esterilização de frascos de cultura contendo meio nutritivo no estado líquido.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado um forno de microondas doméstico marca Cònsul, 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 um total de 75 tubos de ensaio de 25 mm de diâmetro, 150 mm de altura e 1 mm de espessura na posição vertical. Nos testes iniciais, o meio de cultura utilizado foi o BDA (Batata-Dextrose-Ágar), apropriado ao desenvolvimento de microrganismos, composto de 200 g de batata, 20 g de dextrose e 15g de ágar por litro de meio de cultura, dispensado à base de 20 mL por tubo de ensaio, os quais foram fechados com tampas transparentes de polipropileno. Os dois primeiros testes foram efetuados sem delineamento experimental, visando apenas encontrar a potência e o tempo mais aproximados do ideal por meio de testes do tipo “tentativa e erro”, para a esterilização dos 75 tubos de ensaio de uma só vez.

O meio de cultura para o primeiro teste foi preparado com água de torneira e inoculado com bactérias não identificadas, provenientes de frascos com culturas contaminadas, obtidos na sala de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos. Não foram feitas a identificação das bactérias nem a concentração de inóculo. O primeiro tratamento (tempo total de 15 min) deste primeiro teste (Quadro 1) consistiu em usar potência máxima (P10), que foi mantida até atingir o ponto de ebulição do meio de cultura (15 min); atingido este ponto, a esterilização foi interrompida. No segundo tratamento (tempo total de 20 min), fixou-se a potência P10 por 10 min, seguida da potência P9, até atingir o ponto de ebulição (10 min). O terceiro tratamento (tempo total de 30 min) seguiu raciocínio semelhante: P10 (10 min) + P9 (10 min) + P8 (até a ebulição, ou 10 min). O segundo teste foi efetuado com meio de cultura preparado com água desionizada, não autoclavada, sem a inoculação de bactérias, e constou de três tratamentos, conforme o esquema seguinte (Quadro 2): tratamento 1 (tempo total 25 min) - P10 (10 min) + P9 (10 min) + P8 (5 min); tratamento 2 (tempo total 30 min): P10 (10 min) + P9 (5 min) + P6 (5 min) + P4 (5 min) + P2 (5 min); e tratamento 3 (tempo total 30 min): manteve-se a potência de trabalho P10 por todo o tempo de esterilização, o qual foi, porém, dividido em intervalos de “liga/desliga”, de modo que, após os 10 min iniciais, o forno ficava desligado por 5 min e ligado por 2,5 min, até

completar o tempo total (ligado) de 30 min. O terceiro teste foi efetuado com delineamento experimental em cinco blocos ao acaso, com cinco tratamentos e três tubos de ensaio por tratamento.

Os tratamentos consistiram em preparar o meio de cultura com água tratada previamente de diferentes maneiras (Quadro 3): água desionizada e autoclavada (A); água desionizada e não autoclavada (D); água de torneira ozonizada (O); água desionizada e autoclavada, adicionada de 30% de água oxigenada (A + H₂O₂); e água desionizada e autoclavada, adicionada de 0,5% de hipoclorito de sódio (A + NaOCl). A adição do H₂O₂ ou do NaOCl à água foi efetuada 2 h antes do preparo do meio de cultura.

Quanto à combinação de potência de trabalho x tempo de esterilização, optou-se pelo esquema P10 (10 min) + P9 (10 min) + P8 (5 min), por ter sido o que forneceu o melhor resultado no teste anterior. A coleta de dados referentes à contaminação do meio de cultura foi feita pelo aspecto visual das culturas, após decorrido o período de uma semana. Computaram-se, como fungos, os contaminantes com aspecto filamentosos típico destes microrganismos, de cor branca, preta ou laranja; como bactérias foram considerados os contaminantes formando placas planas no interior do meio, ou então colônias dispersas em forma de esferas quase transparentes e de aspecto delicado, de cor branca ou amarelada, conforme descrito por Seabrook e Farrel (17). Os limites de confiança das percentagens foram derivados de tábuas de distribuição binomial, de Rohlf e Sokal (11).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes preliminares do tipo “tentativa e erro” mostraram que o fator que mais afetou os resultados foi o estado inicial de contaminação do meio de cultura. Pelos Quadros 1 e 2 nota-se que as taxas de contaminação foram mais elevadas quando se inoculou bactérias no meio de cultura. Embora os microrganismos não tenham sido identificados neste trabalho, Seabrook e Farrel (17) identificaram como sendo dos gêneros *Listerium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Pasteurella* e *Actinobacillus* as bactérias que contaminavam até 100% das culturas de tecidos por eles estudadas. Os dados do Quadro 1 mostram que, quando se aumentou o tempo de esterilização de 15 para 30 min, com redução gradativa de potência de trabalho para evitar a ebulição e transbordamento do líquido, a tendência de aumento da porcentagem de culturas esterilizadas foi pequena, não ultrapassando 16%. A grande diferença ocorreu quando o meio de cultura foi preparado com água desionizada e sem inoculação de bactérias (Quadro 2), tendo a porcentagem de culturas esterilizadas aumentado para 87% no menor

tempo testado, 25 min, e potências mais elevadas: aumentando-se o tempo de esterilização para 30 min houve tendência de redução da porcentagem de culturas esterilizadas, certamente em razão da diminuição excessiva da potência de trabalho nos tratamentos 2 e 3. Estes resultados preliminares permitiram deduzir que o tratamento em forno de microondas não é eficiente e apresenta melhores resultados quando se usam potências de trabalho mais elevadas, com maior duração possível em cada uma delas.

QUADRO 1 - Porcentagens de culturas esterilizadas em forno de microondas, em razão de distintas potências de trabalho (P) e diferentes durações do tratamento (min). O meio de cultura utilizado foi o BDA (batata - dextrose - ágar), preparado com água de torneira e inoculado com bactérias			
Tratamentos	Potência * (P)	Duração (min)	Culturas esterilizadas (%)
1	10	15	9
2	10	10	15
	9	10	
3	10	10	16
	9	10	
	8	10	

* Potência P10 = potência máxima ou 700 w.

Uma das alternativas para se completar o desenvolvimento do protocolo seria encontrar a maneira de controlar a ebulição e transbordamento do meio de cultura em potências de trabalho elevadas. Tisserat et al. (20) tentaram isto, optando por introduzir no forno recipientes contendo água para absorver o excesso de energia que causa esta situação, mas a alternativa reduz o espaço útil no ambiente, o que não foi problema para aqueles autores, porque eles usaram meio de cultura contido em um único recipiente coletivo. Neste trabalho, em que o meio estava contido nos frascos de cultura individuais, optou-se pela alternativa de testar diferentes maneiras de reduzir a taxa de contaminação inicial dos recipientes e componentes do meio de cultura, conforme sugerem os resultados da primeira fase desta pesquisa.

O Quadro 3 permite observar a ocorrência de diferenças entre tratamentos quando a água usada na preparação dos meios de cultura foi submetida a diferentes tipos de tratamentos preliminares. O uso de água desionizada, autoclavada ou não, resultou nos índices mais baixos de

esterilização (46,6 e 53,3%, respectivamente). Um teste realizado posteriormente mostrou que o recipiente utilizado para armazenar a água desionizada estava contaminado, o que explica, pelo menos em parte, este índice elevado de contaminação. Todavia, não seria esta a explicação para o índice de contaminação também elevado quando se usou a água desionizada e autoclavada, já que esta foi autoclavada em recipientes que permaneceram fechados até o momento do uso. Neste caso, a hipótese mais provável é que o recipiente onde se preparou o meio de cultura, os tubos de ensaio, e, ou, ainda algum reagente estaria contaminado.

QUADRO 2 - Porcentagens de culturas esterilizadas em forno de microondas, em razão de diferentes potências de trabalho (P) e diferentes durações do tratamento (min). O meio de cultura utilizado foi o BDA (batata-dextrose-ágar), preparado com água desionizada, sem inoculação de bactérias

Tratamento	Potência* P	Duração (min)		Cultura esterilizadas (%)
		Ligado	Desligado	
1	10	10	-	87
	9	10	-	
	8	5	-	
2	10	10	-	52
	9	5	-	
	6	5	-	
	4	5	-	
	2	5	-	
3	10	10	5	60
	10	2,5	5	
	10	2,5	5	
	10	2,5	5	
	10	2,5	5	
	10	2,5	5	
	10	2,5	5	
	10	2,5	5	
	10	2,5	5	

* Potência 10 = potência máxima ou 700w.

QUADRO 3 - Número total de tubos de ensaio contaminados com fungos e com bactérias, número total e porcentagem de tubos esterilizados em função do tratamento prévio da água usada para preparar o meio de cultura

Tratamento prévio da água	Tubos de ensaio contaminados (nº)			Tubos de ensaio esterilizados*	
	Água	Fungos	Bactérias	Total	%
Água deionizada e autoclavada (A)	0	0	8	8	46,6(21,3 - 73,4)
Água simplesmente deionizada (D)	0	0	7	7	53,4(26,6 - 78,7)
Água ozonizada (O)	0	0	3	3	80,0(51,9 - 95,7)
Água + H ₂ O ₂	0	0	0	0	100,0(78,2-100,0)
Água + NaOCl	0	0	0	0	100,0(78,2-100,0)

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

O índice de esterilização de 80%, no tratamento que utilizou água ozonizada, bem como a esterilização completa obtida nos tratamentos que utilizaram água autoclavada e tratada previamente com H₂O₂ ou NaOCl, reforça a segunda hipótese, já que o efeito residual do ozônio e dos dois outros compostos químicos existentes nas águas correspondentes pode ter atuado para reduzir o nível de contaminação que poderia existir nos recipientes durante a preparação do meio de cultura. É importante observar que o efeito das microondas foi letal para os fungos, independentemente da origem da água, e que as bactérias mostraram resistência elevada a este fator. Resistência destes microrganismos a tratamentos químicos tem sido relatada na literatura (7). Apesar de a esterilização do meio de cultura preparado com água autoclavada e previamente tratada com H₂O₂ ter sido completa, este meio não permitiu a gelificação do ágar. Devido a isto, esta alternativa fica inviabilizada na prática, a menos que se encontre uma maneira de contornar a situação. Conseqüentemente, a alternativa mais promissora seria aquela baseada no tratamento prévio da água com NaOCl. Contudo, para que o meio de cultura preparado desta forma torne-se uma forma viável para o cultivo de tecidos vegetais, é preciso que o resíduo final dos íons componentes do NaOCl, no meio de cultura, não ultrapasse os níveis tóxicos aos tecidos, fato que já está sendo investigado. Quanto a um possível efeito negativo das microondas sobre as culturas, há evidências de que não existe (19).

CONCLUSÕES

1) A eficiência do tratamento de esterilização pelo forno de microondas é inversamente proporcional à intensidade da contaminação inicial do meio nutritivo e dos frascos de cultura.

2) A eficiência do tratamento de esterilização é mais elevada quando os frascos contendo o meio de cultura ficam expostos a potências mais altas, por um período contínuo, sem intervalos liga-desliga.

3) Os fungos são mais sensíveis do que as bactérias ao efeito das microondas.

4) A alternativa de se preparar o meio de cultura com água previamente tratada com H_2O_2 fica na dependência de se resolver o problema da não gelificação do ágar.

5) A alternativa de se preparar o meio de cultura com água previamente tratada com NaOCl é a mais promissora, mas depende de confirmação posterior.

AGRADECIMENTOS

1) À Faperj, pelo auxílio financeiro ao laboratório de cultura de tecidos.

2) Ao sistema Fenorte/Tecnorte, pelo suporte técnico, por meio das 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. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 80: 409-11, 1953.
2. BIELA, A.M. Can baby feeding equipment be sterilized in the domestic microwave oven? Journal of the Royal Society of 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. DECAREAU, R.V. Microwave food processing equipment throughout the world. Food Technology, 40: 99-105, 1986.
5. JENG, D.K.H. Mechanism of microwave sterilization in the dry state. Applied and Environmental Microbiology, 54: 2133-7, 1987.
6. KELLER, M. D.; BELLOWS, W. K. & GUILLARD, R. R. J. Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 117: 279-283, 1988.
7. KNEIFEL, W. & LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 29: 139-44, 1992.
8. LATIMER, J.M. & MATSEN, J.M. Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. Journal Clinical Microbiology, 6: 340-2, 1977.

9. LEFORT, J.F.; DURANCE, T.D. & UPADHYAYA, M.K. Effects of tuber storage and cultivar on the quality of vacuum microwave-dried potato chips. *Journal of Food Science*, 68: 690-6, 2003.
10. MUDGETT, R.E. Microwave properties and heating characteristics of foods. *Food Technology*, 40: 84-93, 1986.
11. ROHLF, F.J.& SOKAL, R.R. *Statistical Tables*. San Francisco, W.H. Freeman and Co., 1969. 253p.
12. ROHRER, M.D. & BULLARD, R.A. Microwave sterilization. *JADA*, 119: 94-198, 1985.
13. ROSASPINA, S.; ANZANEL, D. & SALVATORELLI, G. Microwave sterilization of enterobacteria. *Microbios*, 76: 263-70, 1993.
14. ROSEMBERG, U. Microwave pasteurization, sterilization, blanching and pest control in the food industry. *Food Technology*, 41: 92-9, 1987.
15. SAMBORN, M.R.; WAN, S.K. & BULLARD, R.A. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 960-4, 1982.
16. SCHLEGEL, W. Commercial pasteurization and sterilization of food products using microwave technology. *Food Technology*, 46: 62-3, 1992.
17. SEABROOK, J.E.A. & FARRELL, G. City water can contaminate tissue culture stock plants. *HortScience*, 28: 628-9, 1993.
18. 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 of Urology*, 168: 562-4, 2002.
19. STREET, H.E. & LOWE, J.S. The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. *Annals of Botany*, 14: 307-29, 1950.
20. TISSERAT, B.; JONES, D. & GALLETTA, P.D. Microwave sterilization of plant tissue culture media. *HortScience*, 27: 358-61, 1992.