

RADIOSENSIBILIDADE DE ESPOROS EM SUSPENSÃO AQUOSA DE FUNGOS QUE AFETAM PAPÉIS

Maria Guiomar Carneiro-Tomazello*, Frederico Maximiliano Wiendl**, Mário Tomazello Filho*** e Silvia Goreti Cardoso de Moraes*

*Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP
Departamento de Física
Caixa Postal 68
13.400-901, Piracicaba, SP, Brasil

**Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares -IPEN-CNEN/SP
Caixa Postal 11049
05422-970, São Paulo, SP, Brasil

***Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz -ESALQ/USP
Departamento de Ciências Florestais
Caixa Postal 09
13400-970, Piracicaba, SP, Brasil

RESUMO

Os papéis e documentos gráficos são afetados por agentes biológicos, químicos e físicos. Dentre os agentes biológicos, os fungos e os insetos são os mais importantes, causando danos aos materiais bibliográficos e provocando deterioração e destruição de documentos de valor científico-histórico ou cultural. Em paralelo às medidas tradicionais de prevenção tais como a aplicação de fumigantes, têm sido conduzidas, a partir da década de 60, experiências utilizando radiação gama na desinfecção de materiais afetados por fungos. Pelo exposto, o presente trabalho tem por objetivos estudar a radiosensibilidade dos fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger* e *Penicillium purpurogenum* que atacam papéis, na fase de esporos. Os resultados permitem concluir que os esporos dos fungos em suspensão aquosa, irradiados com diferentes doses de radiação gama apresentam diferentes níveis de sensibilidade. As doses D_0 - sobrevivência de 37% dos esporos - variaram de 1,43 (*Cladosporium cladosporioides*) a 0,077 kGy (*Penicillium purpurogenum*).

I. INTRODUÇÃO

Os papéis e documentos gráficos são afetados por agentes biológicos, químicos e físicos. Dentre os agentes biológicos os fungos e os insetos são os mais importantes, causando os maiores danos aos materiais bibliográficos e provocando a deterioração e destruição de documentos de valor científico, histórico ou cultural.

Os métodos tradicionais de prevenção do ataque de fungos consistem (i) no controle da temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade, circulação do ar (ii) na aplicação de fumigantes como o óxido de etileno, timol, formaldeído e outros. No entanto, atualmente, são maiores as restrições para a aplicação de fumigantes pela toxicidade, efeitos cancerígenos, poluição ambiental e prejuízos em algumas

propriedades dos materiais tratados. Em paralelo a essas medidas têm sido conduzidas, a partir do final da década de 60, na Rússia, experiências com métodos físicos - como a radiação gama - em materiais afetados por fungos e insetos.

O primeiro trabalho utilizando a radiação gama no controle de fungos em papéis foi realizado por BELYAKOVA [1] com 30 diferentes espécies de fungos. Em sua pesquisa a autora concluiu que a dose de 6,50 kGy foi suficiente para a desinfecção dos livros contaminados. Posteriormente, inúmeros autores pesquisaram o efeito da radiação em papéis de filtro e livros artificial e naturalmente infectados por fungos e bactérias [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

O presente trabalho tem como objetivo determinar a dose D_0 , que corresponde a uma sobrevivência de 37% para esporos dos fungos *Cladosporium cladosporioides*,

Aspergillus niger e *Penicillium purpurogenum*, em suspensão aquosa.

A irradiação de esporos de fungos em suspensão aquosa proporciona a obtenção de importantes informações sobre a radiosensibilidade das espécies para a posterior utilização desse método de controle em papéis ou em outros materiais afetados por esses microrganismos.

II. METODOLOGIA

Os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger* e *Penicillium purpurogenum* foram isolados de papéis de livros e revistas apresentando manchas de coloração típica, indicativas de contaminação por microrganismos pelas condições de conservação inadequadas, especialmente temperatura e umidade [11].

De colônias desses fungos com 15 dias de idade, desenvolvidas em placas de Petri com meio de BDA, foram preparadas suspensões aquosas de esporos. Dessas suspensões de esporos foram transferidos 5 ml para tubos de ensaio e irradiados em câmara de irradiação de ^{60}Co com doses até 6,00 kGy e taxas de dose variando de 4,130 a 4,242 kGy/h.

A fonte de ^{60}Co utilizada nos experimentos foi a GAMMA BEAN modelo 650, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, Piracicaba.

Após a irradiação, as suspensões de esporos foram diluídas em concentrações de 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 esporos/ml e transferidos 0,2 ml para placas de Petri com meio de BDA com três repetições, incubadas por 7 dias a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ com regime ininterrupto de luz. Após esse período, realizou-se a contagem do número de colônias dos fungos, formadas a partir da germinação dos esporos, por placa de Petri, obtendo-se o número médio para cada tratamento.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da irradiação de esporos de *Cladosporium cladosporioides* apresentados na Figura 1 mostraram que o plaqueamento dos esporos deu origem a colônias do fungo em meio de cultura até as doses de 1,0 e 2,0 kGy, para as suspensões de 10^3 , 10^4 e 10^5 esporos/ml, respectivamente. Essa figura indica a curva de sobrevivência dos esporos sendo que, dentre os pontos experimentais, foi traçada a reta que melhor se ajustou à parte retilínea da curva. A partir dessa reta foram obtidos para o *Cladosporium cladosporioides* o coeficiente de correlação linear (r), coeficiente angular (b), e a dose D_0 , que corresponde a uma sobrevivência de 37% dos esporos (Tabela 1), de acordo com BONETTI *et alii* [6].

Para o *Aspergillus niger* observou-se a formação de colônias até a dose de 0,9 kGy após o plaqueamento de suspensões de 10^2 e 10^3 esporos/ml. A partir da curva de sobrevivência dos esporos (Figura 2) foram obtidos os valores do coeficiente angular (b), coeficiente de correlação linear (r) e da dose D_0 , que corresponde a uma sobrevivência de 37% dos esporos (Tabela 2).

Para o *Penicillium purpurogenum*, em suspensões de 10^2 a 10^5 esporos/ml, expostos a doses crescentes de radiação (até 0,70 kGy) não foi verificada a formação de colônias nas suspensões mais diluídas (10^2 e 10^3 esporos/ml) em doses de radiações mais baixas (0,30 kGy). Por outro lado, nas suspensões mais concentradas (10^5 esporos/ml) somente em doses de radiação acima de 0,5 kGy, houve inibição completa no desenvolvimento de colônias. A partir das curvas de sobrevivência foram obtidos os valores de b, r e D_0 (Tabela 3)

Tabela 1 - Valores do coeficiente angular (b), coeficiente de correlação linear (r) e D_0 relativos à curva de sobrevivência do *Cladosporium cladosporioides* (Figura 1).

Fungo	Diluição	b	r	D_0 (kGy)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10^5	-0,69315	-0,966578	1,43
Suspensão inicial: 10^5 esp/ml	10^4 10^3	-0,5495 -	-0,866026	1,80

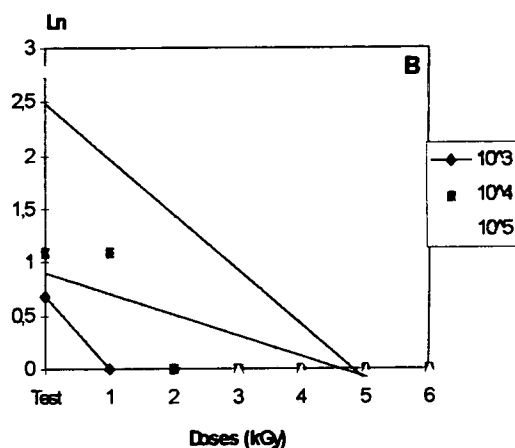


Figura 1 -Curvas de sobrevivência, em meio de cultura, a partir de esporos de *Cladosporium cladosporioides* irradiados em doses crescentes de radiação gama nas suspensões de 10^3 , 10^4 e 10^5 esporos/ml.

Tabela 2 - Valores do coeficiente angular (b), coeficiente de correlação linear (r) e D_0 relativos à curva de sobrevivência do *Aspergillus niger* (Figura 2)

Fungo	Diluição	b	r	D_0 (kGy)
<i>Aspergillus niger</i>	10^3	-5,89394	-0,970341	0,168
Suspensão inicial: $2,5 \cdot 10^2$ esp/ml	10^2	-6,0900	-0,994826	0,163

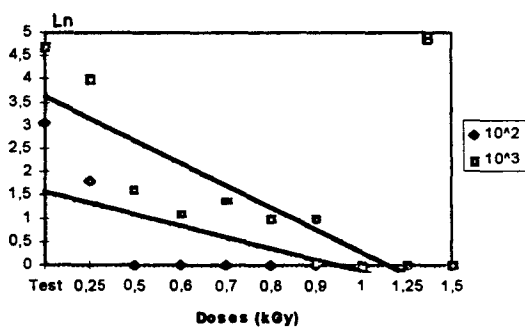


Figura 2 - Curvas de sobrevivência, em meio de cultura, a partir de esporos de *Aspergillus niger* irradiados em doses crescentes de radiação gama nas suspensões de 10^3 e 10^2 esporos/ml.

Tabela 3 - Valores do coeficiente angular (b), coeficiente de correlação linear (r) e D_0 relativos à curva de sobrevivência do *Penicillium purpurogenum* (Figura 3)

Fungo	Diluição	b	r	D_0 (kGy)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	10^2	-12,7822	-0,98034	0,077
Suspensão inicial:	10^4	-13,4195	-0,9694	0,074
$1,8 \cdot 10^4$ esp/ml	10^2	-	-	-
	10^3	-	-	-

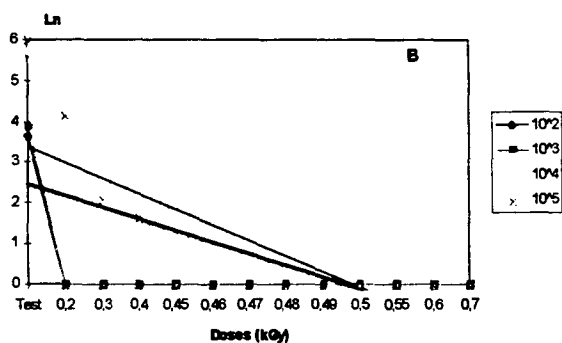


Figura 3 - Curvas de sobrevivência, em meio de cultura, a partir de esporos de *Penicillium purpurogenum* irradiados em doses crescentes de radiação gama, nas suspensões 10^2 a 10^5 esporos/ml.

Os resultados dos ensaios demonstram que os esporos dos fungos apresentam diferentes níveis de sensibilidade (ou de resistência) às doses de radiação gama, quando em suspensão aquosa. As inclinações das retas obtidas indicam a sensibilidade de cada fungo, na forma de esporos, ao tratamento com radiação gama.

Para uma interpretação correta da radiosensibilidade de diferentes fungos deve-se levar em conta a concentração da suspensão de esporos em água no momento da irradiação [6] evidenciando a importância do estudo das curvas de sobrevivência.

Quanto às diluições para o plaqueamento dos esporos, após a irradiação, os resultados permitem concluir que, de um modo geral, as melhores suspensões estão entre 10^5 e 10^4 esporos/ml, possibilitando a formação, desenvolvimento e a contagem de efetivo número de colônias de fungos em meio de cultura/placa de Petri. Isto deve-se a significativa redução do número de colônias dos fungos nos tratamentos testemunha e irradiados, formadas a partir do plaqueamento das suspensões mais diluídas de esporos viáveis (10^2 e 10^3 esporos/ml).

Doses em torno de 5 kGy foram suficientes, segundo BONETTI *et alii* [6], para inviabilizar os esporos em suspensão em água, de espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium notatum*, *P. digitatum*, *Trichoderma* sp., *Byssoclamys fulva*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Chaetomium spirale*, *C. elatum* e *C. globosum*, com exceção do *Helminthosporium* que exigiu 6 kGy devido, provavelmente, à morfologia e ao número de células dos esporos.

Resultados semelhantes foram obtidos por VERO *et alii* [4] ao irradiar 11 espécies de fungos, em suspensão aquosa. Segundo os autores 5 kGy de radiação gama foram suficientes para matar todos os esporos das espécies estudadas, com exceção do *Rhizopus* sp., que necessitou de dose entre 5 e 10 kGy. O *Aspergillus terreus* e o *Penicillium jantinelum* irradiados com 2 kGy apresentaram pequeno número de esporos viáveis, ao contrário do *Cladosporium* sp., que apresentou ainda grande número de esporos viáveis sendo, portanto, necessário uma dose entre 2 e 5 kG. Dos outros fungos os mais sensíveis à radiação foram *Chaetomium globosum*, *Trichoderma lignorum*, *Stysanus* sp., *Scopulariopsis brevicaulis* e *Paecilomyces* sp., todos exterminados com 2 kGy de radiação gama.

A maior sensibilidade dos esporos dos fungos à radiação gama, quando em suspensão aquosa, se deve à radiólise da água que provoca a formação de íons e radicais ativados que contribuem para a alteração celular

Por outro lado, as moléculas dissociadas, excitadas possuem, graças à água, uma mobilidade que facilita sua migração aumentando assim os pontos de contato [5].

As taxas de dose utilizadas no presente trabalho em torno de 4 kGy/h foram as maiores possíveis de serem obtidas no equipamento de radiação gama utilizado nos experimentos. Taxas de dose elevadas causam alterações traumáticas nos microrganismos que não são observadas em taxas menores. PAVON-FLORES [5] obteve os melhores resultados na esterilização de papéis afetados por fungos utilizando taxa de 5,16 kGy/h.

IV. CONCLUSÕES

Os esporos de fungos em suspensão aquosa, irradiados com diferentes doses de radiação gama apresentam diferentes níveis de sensibilidade:

- as doses D_0 - sobrevivência de 37% dos esporos - foram de 1,39; 0,165 e 0,077 kGy para o *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger* e *Penicillium purpurogenum*, respectivamente.

- as doses letais foram de 2,0 - 3,0; 0,90 - 1,0 e 0,50 - 0,60 kGy para *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger* e *Penicillium purpurogenum*, respectivamente.

V. REFERÊNCIAS

[1]- BELYAKOVA, L.A. Gamma-radiation as a disinfecting agent for books infected with mould spores. *Microbiology*, New York, 29: p. 548-550, 1961.

[2]- BORS, J.; KÜHN, W.; BARDON, A. A possible control of paper destroying fungi by means of gamma rays. *Das Papier*, Darmstadt, 22 (4) :p. 180-185, 1968.

[3]- BECK, W. Utilisation de rayons ionisants pour l'assainissement des papiers et de vieux bois. *INTERNATIONALER GRAPHISCHER RESTAURATORENTAG*, Vienna, 69: p. 39-51, 1972.

[4] VERO, L.B.; MAGAUDDA, G.; ROSSI, P.D.; LAURENZI, M.T. Radiosterilizzazione di tavole dipinte: azione sui microorganismi e effetti collaterali sulla colla di coniglio e su alcuni pigmenti. In: *Congresso Internazionale di Applicazione dei Metodi Nucleari nel Campo delle Opere d'Arte*. Maggio, p. 24-29, 1973.

[5]- PAVON-FLORES, S.C. Contribution a l'étude des propriétés fungicides des rayonnements gamma et leurs effets sur des papiers de différentes qualités. These - École Pratique des Hautes Etudes. Paris, 1974.

[6] BONETTI, M.; GALLO, F.; MAGAUDDA, D.; MARCONI, C.; MONTANARI, M. Essais sur l'utilisation des rayons gamma pour la sterilisation des matériaux libraires. *Studies in Conservation*, London, 24: p. 59-68, 1979.

[7]- RAMIÈRE, R. Protection de l'environnement culturel par les techniques nucléaires. In: *CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES APPLICATIONS INDUSTRIELLES DE LA TECHNOLOGIE DES RADIOISOTOPES ET DES RAYONNEMENTS.*, Grenoble, Actes, p. 1-19, 1981.

[8]- HORÁKOVÁ, H.; MARTINEK, F. Desinfection of a archive documents by ionizing radiation. *Restaurator*, Copenhagen, 6: p. 205-216, 1984.

[9]- JUSTA, P. Gamma radiation as an alternative means for disinfection of archives. In: *SECOND INTERNATIONAL*

CONFERENCE ON BIODETERIORATION OF CULTURAL PROPERTY, Yokohama, *Proceedings*, 4 p., 1992.

[10]- FLIEDER, F.; RAMIÈRE, R.; LEROY, M.; DECALLE, P. Recherches sur l'effect du rayonnement gamma pour la désinfection des papiers. In: *ACTES DES DEUXIÈMES JOURNÉES INTERNATIONALES d'ETUDES DE L'ARSAG - Association pour La Recherche Scientific sur les Arts Graphiques*. Mai, 16-20, Paris, France. p.79-86, 1994.

[11]- CARNEIRO-TOMAZELLO, M.G. A aplicabilidade da radiação gama no controle de fungos que afetam papéis. Tese de Doutorado - IPEN-CNEN/SP, 1994.

[12] CARNEIRO-TOMAZELLO, M.G; WIENDL, F.M. The applicability of gamma radiation to the control of fungi in naturally contaminated paper. *Restaurator*, Copenhagen, 16:p. 93-99, 1995

ABSTRAT: The paper and graphic documents can be affected by biological, chemical and physical agents. Among the biological agents, the most important are the fungi and insects, causing damage to bibliographic materials and promoting the deterioration and destruction of scientific-historical or cultural valuable documents. Together with the traditional methods of fungal prevention, like the application of fumigants, studies have been made since the late sixties, with the employment of gamma radiation for the desinfection of materials affected by fungi. The objective of this paper was to study the radiosensitivity of the spores of the principal fungi that attack papers. The results showed that the spores in water suspension have different levels of sensibility when irradiated with different doses of gamma radiation. The D_0 doses - survival of 37% of the spores- varied from 1,43 (*cladosporium cladosporioides*) to 0,077 kGy (*Penicillium purpurogenum*).