

RADIAÇÃO POR FEIXE DE ELÉTRONS E SUA APLICAÇÃO COMO AGENTE ESTERILIZANTE DE MICRORGANISMOS EM SUBSTRATO TURFOSO

David Tsai¹; Paulo R. Rela²; Siu Mui Tsai S³ e Maria Helena de O. Sampa²

¹ Faculdade de Tecnologia de São Paulo – FATEC/ SP
Praça Coronel Fernando Prestes, 30
01124-060 São Paulo, SP
david.tsai@terra.com.br

² Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN – SP
Av. Professor Lineu Prestes, 2242
05508-000 São Paulo, SP
prela@ipen.br, mhosampa@ipen.br

³ Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA
Universidade de São Paulo
Av. Centenário – 303
13416-000 Piracicaba, SP
tsai@cena.usp.br

RESUMO

A legislação brasileira requer que os substratos turfosos sejam pré-esterilizados através de radiação gama (⁶⁰Co), sendo recomendada a dose de 50 kGy para uma efetiva eliminação de patógenos e saprófitas, que podem competir com a bactéria introduzida. Recentemente, a utilização de feixe de elétrons foi considerada uma nova alternativa de radiação para pré-esterilização da turfa, com vantagens sobre a primeira técnica, por ser considerada ecologicamente mais segura e apresentar a vantagem de ser mais rápida. Há, porém, a desvantagem de ter menor profundidade de penetração da radiação em relação ao ⁶⁰Co. O presente trabalho comparou o método usando doses crescentes de radiação gama por ⁶⁰Co (0, 10, 20, 30, 50 e 50 kGy) e o método por feixe de elétrons (0, 10, 20, 30, 50 e 50 kGy). Nos dados experimentais observou-se um elevado número de células da bactéria *Rhizobium tropici* CM-01 Gus⁺ inoculada em substratos turfosos submetidos aos dois processos de esterilização, sendo que ambos processos podem atender aos padrões mínimos requeridos pelas normas brasileiras e internacionais de qualidade de inoculantes pelo prazo de validade de 180 dias - acima de 1×10^7 ufc/g de substrato, após realizados os devidos testes de sobrevivência com a bactéria inoculante. Pelos dados apresentados neste trabalho conclui-se que a esterilização por radiação por feixe de elétrons se apresenta como uma alternativa efetiva para a produção de inoculantes de alta qualidade, por controlar melhor os agentes antagonistas da bactéria.

1. INTRODUÇÃO

A indústria de inoculantes para leguminosas tem contribuído de forma significativa para a economia de adubos em todo o mundo. Isto porque, segundo Faggiani [1], Romani [2], Roughley [3] e Saito [4], observou-se que o aumento de células viáveis de *Bradyrhizobium/Rhizobium* aplicadas nas sementes de leguminosas normalmente aumenta a nodulação e fixação de nitrogênio, especialmente sob condições de estresse ambiental

causado por fator abiótico (temperatura elevada, baixo pH, entre outros) ou biótico (presença de rizóbios nativos ou agentes antagônicos). O objetivo básico da inoculação é de promover o número máximo de uma bactéria adequada na rizosfera no momento da formação do nódulo. O aumento do número de *Bradyrhizobium/Rhizobium* na semente favorece a sobrevivência da bactéria no momento do plantio, pois aumenta a probabilidade de receber os estímulos pela ação da rizosfera e se multiplicar, formando uma nodulação precoce. Para facilitar a introdução de um alto número de células bacterianas e aumentar a sobrevivência do inoculante no solo, diversas alternativas têm sido adotadas para a tecnologia da inoculação, sendo o uso de substratos com elevados teores de carbono um dos mais tradicionais veículos de bactérias segundo Somasegaran e Hoben, 1994 [5]. Esses veículos podem atuar no aumento da sobrevivência do inóculo através do fornecimento de um ambiente mais favorável e protetor contra as condições normalmente mais desfavoráveis do solo.

Muitos substratos e protocolos têm sido estudados ao longo das últimas três décadas para uso de inoculantes em leguminosas. A forma mais simples tem sido o uso de suspensões líquidas, que está sendo gradualmente melhorada após os primeiros problemas na manipulação e baixa sobrevivência durante o armazenamento e posterior inoculação nas sementes e no solo. Outros métodos alternativos tais como as preparações liofilizadas das bactérias ou as adições de talco ou de carboximetilcelulose foram testadas, mas muitas bactérias não sobreviveram bem em formulações secas. Desse modo, os substratos mais usados mundialmente têm sido os compostos naturais tais como turfas, que são solos contendo compostos e materiais vegetais. A turfa tem contribuído para o aumento da sobrevivência e a eficiência da bactéria quando comparada com outras formulações, mas existem alguns aspectos que devem ser considerados, como, por exemplo, a escolha de uma fonte adequada para turfas, devido à variabilidade de sua composição e a idade da turfeira, que pode afetar a composição da matéria orgânica e que pode produzir algum elemento tóxico durante o processamento industrial.

Dependendo da turfa, as doses de radiação não são suficientes para a eliminação completa de microrganismos, especialmente os radioresistentes ou os que apresentem outras formas de reprodução, mais resistentes à radiação (ex. formas de resistência dos actinobactérias). Dessa forma, o número de bactérias inoculadas decresce muito rapidamente ao longo do seu armazenamento devido, muitas vezes, a presença de produtores de compostos inibidores aos microrganismos, por ex. de antibióticos segundo Saito et al., 1985 [4]. A esterilização, portanto, deve ser mais efetiva na eliminação desses microrganismos, sem, no entanto, alterar o substrato segundo Romani, 1989 [2], isto é, a esterilização deve ser utilizada para melhorar a qualidade da turfa no substrato ou de solo e portanto, anteriormente a autoclavagem e atualmente a radiação tem sido o método mais utilizado no mercado para dar mais sobrevivência aos microrganismos contidos, pois observou-se que em substratos turfosos previamente esterilizados, a sobrevivência dos microrganismos é mantida por mais tempo, mesmo sob temperatura mais alta de armazenamento ou sob teor alto de umidade, porém se as doses aplicadas forem sub-ótimas (ex. 10 kGy), ocorrerá o aparecimento de microrganismos indesejáveis como os produtores de metabólitos antagônicos à sobrevivência dos rizóbios inoculados no substrato segundo Saito et al., 1985, [4]. Desta maneira, a maioria dos países que requer a esterilização do substrato (ex. turfa) para o acondicionamento quando usados como veículos de bradirizóbios/rizóbios, o mais comumente usado tem sido a radiação gama de uma fonte de Cobalto 60 (^{60}Co), com dose de radiação ao redor de 50 kGy.

Como ponto chave de uma boa qualidade de esterilização, deve-se considerar também a necessidade de um sistema efetivo de controle de qualidade, isto é, uma série de checagens de

qualidade durante e após a produção do inoculante que garanta um elevado número de população de rizóbios no substrato e uma nodulação abundante na planta. Diversos fatores contribuem para a produção deste inoculante de alta qualidade. A aplicação desses fatores no processo de esterilização dos substratos tem produzido inoculantes superiores com elevado número de células de rizóbios capazes de nodular e fixar o nitrogênio (N₂) em seu hospedeiro específico, com um mínimo ou sem contaminação alguma. Esta melhoria de qualidade das turfas usadas como substrato para a produção de inoculantes, a radiação gama a partir de Cobalto-60 (⁶⁰Co) tem sido considerada, historicamente, como o melhor método de esterilização, mas com a desvantagem do seu custo relativamente alto, portanto há a necessidade de uma solução alternativa tão boa quanto a radiação gama mas econômica para realizar as irradiações de substratos em larga escala.

A utilização de feixe de elétrons pode ser considerada para a esterilização de substratos na produção de inoculantes. Este processo depende principalmente da energia de aceleração que ao final pode resultar em um feixe de elétrons com energia de até 10 MeV para irradiação da turfa. Um dos maiores benefícios da esterilização por feixe de elétrons é o tempo de irradiação mais curto, pois a turfa pré-embalada fica exposta ao processo de esterilização somente em questões de segundos contra horas para a irradiação gama.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

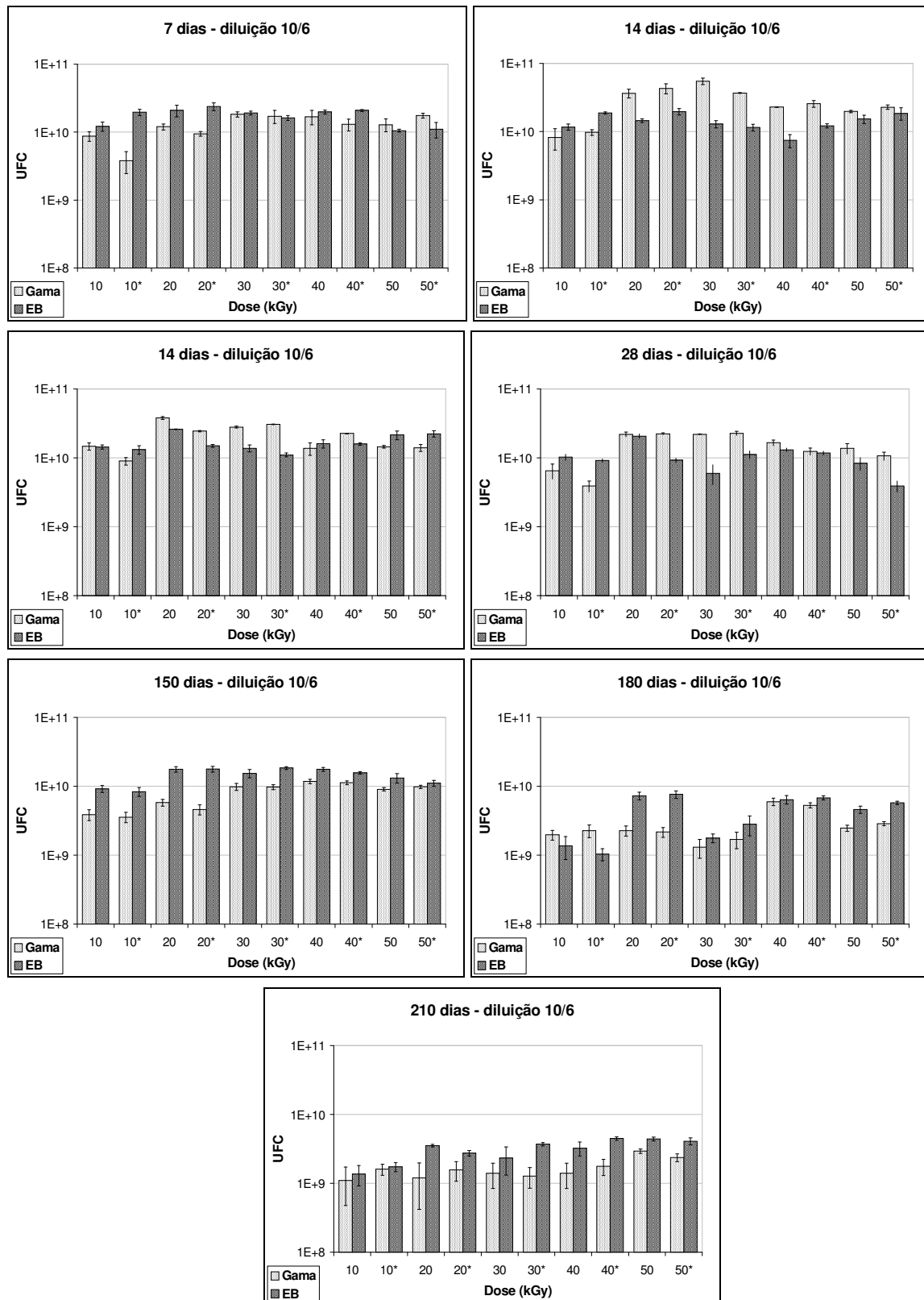
Amostras comerciais de turfa foram empregadas para a determinação da eficiência dos métodos de esterilização e ensaios de crescimento de rizóbios no substrato. Para adequar esse substrato como veículo de *Bradyrhizobium japonicum*, testes iniciais foram conduzidos em laboratório após o processamento da turfa pelos métodos de radiação gama, e radiação por feixe de elétrons. A irradiação da turfa foi realizada no IPEN-CTR, com as doses de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 kGy. A estirpe de *Rhizobium tropici* (CM-01 Gus+A) foi marcada e introduzida (inoculada) nesses substratos tratados para contagem de sua viabilidade e posteriormente inoculados em plantas de feijoeiro. Após os testes de sobrevivência realizados ao 7, 14, 21 e 28 dias (fase curta) e 150, 180 e 210 dias (fase longa) após a inoculação foram realizados os testes de viabilidade e eficiência no substrato irradiado com as diferentes doses utilizando-se o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (laboratório e casa-de-vegetação) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP).

A contagem do número de células de CM-01 gus+A envolveu a preparação de uma diluição em série a partir da turfa, com a distribuição de uma alíquota de diluições apropriadas (105–108) na superfície do meio Yeast Manitol Ágar (YMA) solidificado e a contagem das colônias resultantes após um período de incubação. A contagem dos contaminantes foi realizada também nas placas adicionais, segundo a metodologia indicada por Somasegaran e Hoben, 1994 [5]. A determinação do número de *R. tropici* usando o gene reporter gus+A. A estirpe CM-01 foi marcada com o gene gus+A no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP. Neste caso, a bactéria marcada foi monitorada através da diluição e da contagem de colônias em placas de Petri contendo o substrato 6-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-glucoronide. Dessa forma, foi determinada também a viabilidade da bactéria introduzida, uma vez que a expressão desse gene é *in vivo*. A essa informação, é possível discriminar o número de contaminantes e determinar a eficiência noduladora e de fixação de nitrogênio (N₂) da bactéria em cada tratamento, através dos testes em planta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da eficiência do processo de irradiação na figura 1, são apresentados os gráficos da microbiota em ufc(uniformidade formadora de colônia) em função da dose recebida pelas amostras para diferentes períodos de incubação. As amostras irradiadas (feixe de elétrons e gama) foram divididas em dois lotes denominados Lote 1 e Lote 2 onde para cada valor de dose (feixe de elétrons e gama) as contagens de microbiota apresentados nos gráficos representam a média da contagem de 3 amostras. Nos gráficos são representados os resultados das amostras do Lote 1 e Lote 2 submetidas a doses de 10, 20, 30, 40 e 50 kGy, com irradiação de raios gama do cobalto 60 e com feixes de elétrons nas respectivas doses, sendo o lote 2 indicado por um asterístico.

Os feixes de elétrons mostraram um efeito positivo sobre a microbiota do substrato, pois a partir de 40 kGy e nos períodos mais longos (180 dias de incubação), ainda ocorre boa taxa de sobrevivência da bactéria, enquanto que com a radiação gama na sua dose mais elevada (50 kGy) e na mesma época, foi detectada a presença de grande número de actinobactérias, muitas produtoras de metabólitos antibacterianos. É possível que a radiação gama não tenha ação direta sobre a eliminação de formas de resistência das actinobactérias, ao passo que com feixe de elétrons, esse efeito seja mais eficaz. Considerando a eliminação de actinobactérias um dos pontos fundamentais para a manutenção da esterilidade de um substrato por um período mais longo e dentro da validade de 180 dias, os resultados aqui observados estimulam o uso dessa alternativa de radiação, especialmente pela eficiência na eliminação de agentes antagonistas à bactéria inoculante. Neste trabalho observa-se um fenômeno interessante na fase mais longa de incubação, após 180 dias. No início, de um modo geral, há uma tendência dos tratamentos com radiação gama superarem os tratamentos com feixe de elétrons, porém, ao longo do tempo, ocorre uma inversão nos resultados, com uma certa vantagem para o processo com feixe de elétrons demonstrando ser uma técnica eficiente nos resultados da eficiência na esterilização do substrato. O processamento com feixe de elétrons ainda tem vantagens na velocidade de processamento.



Obs.: UFC (Unidade Formadora de Colônia) e * indica medidas no lote 2

Figura 1. Contagem de colônias bacterianas nos tratamentos de irradiação e inoculados com CM-01 *gus+*A, de 7 a 210 dias de incubação.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Faggiani, C.C. 1995. Análise da interação *Rhizobium tropici*-FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.):uso da estirpe CM-01 gus^+A . Dissertação (Mestrado) – ESALQ-USP, Piracicaba – SP, 69 p.
2. Romani, V.L. 1989. Otimização de condições para produção de inoculante de alta qualidade para feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese Doutorado. ESALQ, Piracicaba-SP, 166p.
3. Roughley, R.J. e Vincent, J.M. 1967. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in plant culture. *J. Appl. Bacteriol.*, **30(2)**:362-376.
4. Saito, S.M.T., Araújo, J.M., Baraibar, A. e Galli, L.V. 1985. Survival of *Rhizobium* in the carrier. **In**: Workshop on *Rhizobium*/Legume Inoculants, Porto Alegre-RS, P. 145-156.
5. Somasegaran, P. e Hoben, H.J. 1994. Handbook for rhizobia: methods in legume *Rhizobium* technology. Niftal Project, Paia, HI.