

INFLUÊNCIA DA CHAPA AQUECEDORA E AUTOCLAVE SOBRE O PH DO MEIO DE CULTURA¹

MOACIR PASQUAL², VALTEMIR GONÇALVES RIBEIRO e INÁCIO DE BARROS³

RESUMO - Objetivou-se, com o presente trabalho, determinar as variações de pH provocadas pela chapa aquecedora e autoclave, usadas no preparo e esterilização do meio de cultura. Os tratamentos consistiram do meio 'MS' integral, 3/4, 1/2, 1/4 e 0/4, associado a várias concentrações de ágar (0, 2, 4, 6, 8 e 10 g/l). O pH foi ajustado para 5,7, e novamente medido após o derretimento do ágar em chapa aquecedora e após a esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos. A chapa aquecedora e autoclave provocam variações no pH do meio de cultura. A variação de pH é mínima na ausência de ágar. Os efeitos da chapa aquecedora e da autoclave são similares sobre a variação do pH quando em concentrações mais elevadas de ágar (8 a 10 g/l). Há uma redução crescente do pH na chapa aquecedora e decrescente na autoclave, à medida que se aumenta a concentração do meio 'MS'. O pH se altera, em média, em 0,3 a 0,5, com valores extremos de 0,8 unidades.

Termos para indexação: cultura de tecidos, meio de cultura, pH.

EFFECTS OF HOT PLATE AND AUTOCLAVE ON PH OF NUTRIENT MEDIA

ABSTRACT - The purpose of the present work was to determine the pH variations by hot plate and autoclave used for preparation and sterilization of nutrient media. The treatments were 'MS' media (4/4, 3/4, 2/4, 1/2 and 0/4) and agar concentrations (0, 2, 4, 6, 8 e 10 g/l). The pH was adjusted at 5,7 and it was registred after melting of agar on hot plate and after autoclaving at 120°C for 20 minutes. Hot plate and autoclave induce pH variations. The pH variation is very little when agar is absent. The effects of hot plate and autoclave are similar on pH variation at high agar concentrations (8 and 10 g/l). There is an increasing reduction of pH on hot plate and a decreasing reduction of pH in autoclave when the 'MS' media length increase. The pH change 0,3-0,5 units to average, and the highest variation is 0,8 units.

Index terms: tissues culture media, pH.

INTRODUÇÃO

Os meios nutritivos utilizados para cultura de células, tecidos ou órgãos vegetais, por ocasião de seu preparo, são infestados por micro-organismos existentes no ar, na água, nos recipientes, em outras fontes de contaminação.

A assepsia do meio é obtida através da autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Segundo Skirvin et al. (1986), há uma queda do pH, com a autoclavagem, de 0,3 a 0,5 unidades, em média, podendo chegar a 1,3 unidades. Durante o armazenamento dos meios, antes de sua utilização, também há uma tendência de acidifi-

cação dos meios, provavelmente por causa da dissolução do gás dióxido de carbono (Mellor & Stace-Smith 1969, Bohagel 1971).

Singha (1982) observou que em presença de ágar há um menor grau de acidez; que a redução depende do valor do pH aferido antes da autoclavagem, e que mudanças nos valores de pH provocadas pela autoclave acontecem com maior intensidade nos valores que variam entre 5,2 e 5,8.

Objetivou-se, com o presente trabalho, determinar as variações do pH que ocorrem durante o derretimento do ágar em chapa aquecedora e esterilização do meio em autoclave.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, em Lavras, MG.

¹ Aceito para publicação em 23 de setembro de 1991.

² Eng.-Agr., Dr., Prof.-Adj., Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

³ Em curso de Agronomia na ESAL. Bolsista do CNPq.

Os tratamentos consistiram do meio de cultura 'MS' (Murashige & Skoog 1962) integral, 3/4, 1/2 e 1/4 da concentração, e um tratamento com apenas água, associado a várias concentrações de ágar (em g/l): 0, 2, 4, 6, 8 e 10, em todas as combinações possíveis. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro repetições.

Os nutrientes do meio 'MS' foram pipetados e colocados em um recipiente, onde se completou o volume com água bidestilada, até a metade do volume final necessário. A outra metade, contendo somente água bidestilada, foi utilizada para derreter o ágar em chapa aquecedora. Ambos os volumes tiveram o pH ajustado para 5,7, através do uso de KCl ou NaOH. Após a solução contendo ágar ter atingido o ponto de fusão, as duas soluções foram misturadas, distribuindo-se 10 ml por tubo (150 x 20 mm). Nesta fase, o pH foi novamente medido, e esta tomada foi denominada "variação de pH na chapa aquecedora".

Os tubos devidamente vedados foram submetidos à autoclavagem por 25 minutos, a uma temperatura de 120°C e pressão de 1 kg/cm². Imediatamente após a autoclavagem, com o meio a uma temperatura entre 45 e 65°C, fez-se uma nova leitura do pH de todos os tratamentos, a qual foi chamada de 'Variação do pH pós-autoclave'. Para esta medição, tomou-se o cuidado de ajustar o aparelho de acordo com a temperatura apresentada pelo meio de cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se, na Tabela 1, que a concentração de ágar, a concentração do meio 'MS' e a interação entre estes dois fatores apresentaram res-

postas significativas para o efeito da chapa, efeito da autoclave e efeito total da variação do pH.

A Tabela 2 evidencia que na ausência de ágar a variação total de pH foi mínima. Esta variação esteve por volta de 0,3 unidades para as concentrações de 2 a 6 g/l de ágar, e com 8 g/l o pH foi reduzido em, aproximadamente, 0,5 unidades. Estes resultados estão de acordo com afirmações de Skirvin et al. (1986) de que a autoclavagem provoca uma redução do pH do meio em 0,3 a 0,5 unidades, em média.

O efeito chapa (Tabela 2 e Fig. 1), analisado individualmente, mostra um pequeno aumento de pH em ágar 2 g/l, com uma redução significativa e tendendo a aumentar em concentrações mais elevadas de ágar até 8 g/l, quando, então, começa a diminuir. Esta observação discorda, em parte, dos dados de Singha (1982), os quais atribuem à presença do ágar um menor grau de acidez do meio de cultura.

Variações acentuadas se fizeram notar quando o meio foi submetido à autoclavagem (Tabela 2 e Fig. 1), especialmente na mais baixa concentração de ágar (2 g/l). Analisando-se a variação percentual da chapa e autoclave, verifica-se que na ausência de ágar a redução do pH é totalmente devida à autoclave, e que em baixos níveis de ágar (2 e 4 g/l) a variação é significativamente maior na autoclave, enquanto que em concentrações mais elevadas de ágar (6 a 10 g/l) os efeitos de chapa e autoclave são similares. A redução de pH apresentada pela chapa aquecedora e autoclave reafirma a necessidade de se

TABELA 1. Análise de variância para os efeitos da chapa aquecedora e autoclave sobre as variações de pH em função das concentrações de ágar e meio 'MS'. Lavras, MG, 1990.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios		
		Efeito da chapa	Efeito autoclave	Efeito chapa + autoclave
Ágar	5	0,2943952**	0,2616741**	0,4691491**
Meio 'MS'	4	0,9976134**	0,4444361**	2,571901**
Ágar x soluções	20	0,063203**	0,3810578**	0,1940072**
Resíduo	90	0,0009377268	0,01270330	0,01176724
** - P < 0,01	CV =	-26,136	-49,982	-31,657

evitar que o meio seja fervido em chapa aquecedora para derreter o ágar, uma vez que terá obrigatoriamente que passar pelo processo de autoclavagem para esterilização.

Os efeitos da chapa aquecedora e da autoclave sobre as diferentes concentrações do meio 'MS' são vistos na Tabela 3. Na concentração zero do meio 'MS', ou seja, na presença apenas de água destilada, houve uma elevação do valor do pH, especialmente na chapa aquecedora. Com a elevação das concentrações do meio 'MS', registrou-se uma redução crescente do pH do meio na chapa aquecedora, e decrescente quando o meio foi autoclavado. Desta forma, estabelece-se uma compensação, levando a uma redução total de pH de, aproximadamente, 0,5 unidades, independentemente do nível do meio

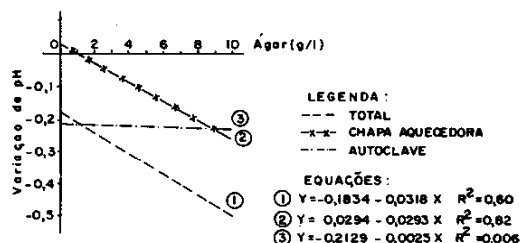


FIG. 1. Variações de pH devidas à chapa aquecedora e autoclave, nas diversas concentrações de ágar. Lavras, MG, 1990.

'MS' usado. Estes valores corroboram os de Skirvin (1986), que indicam uma variação média de 0,3 a 0,5 unidades durante o processo de esterilização do meio de cultura.

A interação entre concentrações de ágar e concentrações do meio 'MS' mostra nas Tabelas 4, 5 e 6 e Fig. 2, 3 e 4, as alterações de pH em presença da chapa aquecedora, autoclave e chapa mais autoclave, respectivamente.

Com relação ao efeito chapa, percebe-se, na Tabela 4 e Fig. 2, que houve uma baixíssima variação de pH na ausência de ágar, enquanto que na ausência do meio 'MS' o pH aumentou, porém em níveis decrescentes, com o aumento das concentrações de ágar. A utilização de meio 'MS' nos níveis de 1/4 e 2/4 levou a uma acidificação crescente com a elevação da concentração de ágar, até o máximo de, aproximadamente, 0,3 unidades, registrado com 2/4 do meio 'MS' e 8 ou 10 g/l de ágar. Quando o meio 'MS' foi usado em 3/4 ou 4/4 de sua concentração, a acidificação foi crescente até 8 g/l de ágar, quando atingiu uma variação de 0,53 unidades, e decresceu com 10 g/l. Estas informações evidenciam a presença de componentes do meio 'MS' que interagem com o ágar, induzindo a uma acidificação do meio.

Diferenças marcantes provocadas pela auto-

TABELA 2. Variações de pH, devido à chapa aquecedora e autoclave, e suas respectivas contribuições em porcentagem da variação total, em função das concentrações de ágar. Lavras, MG, 1990.

Ágar (g/l)	Variação de pH				
	Total (Unidades)	Devido à chapa aquecedora (Unidades)	(%)	Devido à autoclave (Unidades)	(%)
0	-0,0605	0,0000 A	0,00	-0,0606 A	100,00
2	-0,3765	0,0380 B	-33,85	-0,4145 C	110,09
4	-0,3395	-0,0975 C	28,71	-0,2420 B	71,28
6	-0,3410	-0,1575 D	46,18	-0,1835 B	53,81
8	-0,5165	-0,2755 F	53,34	-0,2410 B	46,66
10	-0,4220	-0,2105 E	49,88	-0,2115 B	50,12
DMS	0,1	0,3		0,1	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 3. Variações de pH, devido à chapa aquecedora e autoclave e suas respectivas contribuições em percentagem da variação total, em função das concentrações do meio 'MS'. Lavras, MG, 1990.

Meio 'MS' concentrações	Variação de pH				
	Total	Devido à chapa aquecedora		Devido à autoclave	
	(Unidades)	(Unidades)	(%)	(Unidades)	(%)
0/4	0,2425 A	0,2358 C	97,23	0,0067 A	2,77
1/4	-0,4700 B	-0,1575 A	33,51	-0,3125 B	66,49
2/4	-0,4867 B	-0,1708 A	35,09	-0,3158 BC	64,88
3/4	-0,4954 B	-0,2042 B	41,21	-0,2912 C	58,78
4/4	-0,5037 B	-0,2892 D	57,41	-0,2146 C	42,60
DMS	0,09	0,02		0,09	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 4. Diferenças de pH provocadas pela chapa aquecedora na interação entre as concentrações de ágar e do meio 'MS'. Lavras, 1990.

	0/4	1/4	2/4	3/4	4/4
0	-0,1862 x 10 ⁻⁷ Aa	-0,1080 x 10 ⁻⁶ Aa	-0,2980 x 10 ⁻⁷ Aa	-0,2980 x 10 ⁻⁷ Aa	-0,5960 x 10 ⁻⁷ Aa
2	-0,6375 Ce	-0,0525 Ab	-0,1100 ABb	-0,1175 Bb	-0,1675 Bb
4	+0,3750 Cd	-0,1775 Bc	-0,1000 Ab	-0,1950 Bc	-0,3900 Cd
6	+0,2000 ABc	-0,1950 Acd	-0,2175 ABc	-0,3200 Cd	-0,2550 Bc
8	+0,09250 Ab	-0,2425 Bde	-0,2950 Bd	-0,3975 Ce	-0,5350 De
10	+0,1100 Ab	-0,2775 Ce	-0,3025 Cd	-0,1950 Bc	-0,3875 Dd

As médias seguidas da mesma letra (maiúscula para concentrações do meio 'MS' e minúscula para concentrações de ágar) não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

TABELA 5. Diferenças de pH provocadas pela autoclave na interação entre as concentrações de ágar e meio 'MS'. Lavras, MG, 1990.

Ágar 'MS'	0/4	1/4	2/4	3/4	4/4
0	+1,2000 Bc	0,2945 Aab	-0,3900 Aa	-0,4010 Aab	-0,4075 Ab
2	-0,4075 Ab	-0,7850 Bc	-0,3825 Aa	-0,2125 Aab	-0,2845 Aab
4	-0,3145 Ab	-0,1500 Aab	-0,3290 Aa	-0,2150 Aab	-0,2050 Aab
6	-0,0600 Aa	-0,2345 Aab	-0,2725 Aa	-0,2025 Aa	-0,1475 Aa
8	-0,1925 Bab	-0,3225 Bb	-0,3200 Ba	-0,2675 Bab	-0,1025 Aa
10	-0,1850 Aab	-0,0875 Aa	0,2050 Aa	-0,4400 Bb	-0,14 Aa

As médias seguidas da mesma letra (maiúscula para concentrações do meio 'MS' e minúscula para concentrações de ágar) não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

clave sobre o pH são observadas principalmente no desdobramento dos níveis de ágar dentro das proporções do meio 'MS', indicando que a alteração do pH é mais influenciada pelo nível de ágar do que pela proporção do meio 'MS' (Tabela 5 e Fig. 3). Elevação do pH só ocorreu na ausência tanto de ágar como de meio 'MS'. Percebe-se certa uniformidade dos dados, registrando variações médias de 0,2 a 0,4 unidades, à exceção de alguns valores extremos, como 0,78 e também inferiores a 0,2 unidades.

O somatório dos efeitos da chapa aquecedora e da autoclave é visto na Tabela 6 e na Fig. 4. Houve maior uniformidade nos dados em re-

lação aos efeitos isolados, embora para o nível 0/4 de meio 'MS', três níveis de ágar apresentaram aumento, enquanto outros três níveis apresentaram redução do pH. Via de regra, as maiores variações foram observadas nos níveis de 8 e 10 g/l de ágar para as quatro concentrações do meio 'MS', registrando valores de até 0,66 unidades, exceção feita com 2 g/l de ágar em 1/4 do meio 'MS', onde a redução de pH chegou a 0,83 unidades. Considerando-se os níveis do meio 'MS' e concentração de ágar (7 g/l) recomendados por Murashige & Skoog (1962) para uso em cultura de tecidos, tem-se, fatalmente, uma redução de pH dentro dos níveis previstos por

TABELA 6. Diferenças de pH provocadas pela chapa aquecedora e autoclave na interação entre concentrações de ágar e meio 'MS'. Lavras, 1990.

Ágar 'MS'	0/4	1/4	2/4	3/4	4/4
0	+1,2000 Bb	-0,2950 Aa	-0,3900 Aa	-0,4100 Aa	-0,4075 Aa
2	+0,2300 Aa	-0,8375 Cc	-0,4925 Bab	-0,3300 ABa	-0,4525 Bab
4	-0,0600 Aa	-0,3275 Ba	-0,4250 BCab	-0,4100 BCa	-0,5950 Cab
6	+0,1400 Aa	-0,4300 Bab	-0,4900 Bab	-0,5225 Bab	-0,4025 Ba
8	-0,1000 Aa	-0,5650 Bb	-0,6150 Bb	-0,6650 Bb	-0,6375 Bb
10	-0,0750 Aa	-0,3650 Bab	-0,5075 BCab	-0,6350 Cb	-0,5275 BCab

As médias seguidas da mesma letra (maiúscula para concentrações do meio 'MS' e minúscula para concentrações de ágar) não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

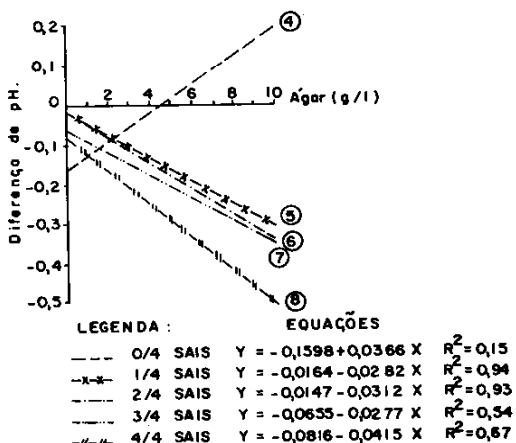


FIG. 2. Variações de pH devidas à chapa aquecedora na interação de concentrações de ágar e do meio 'MS'. Lavras, MG, 1990.

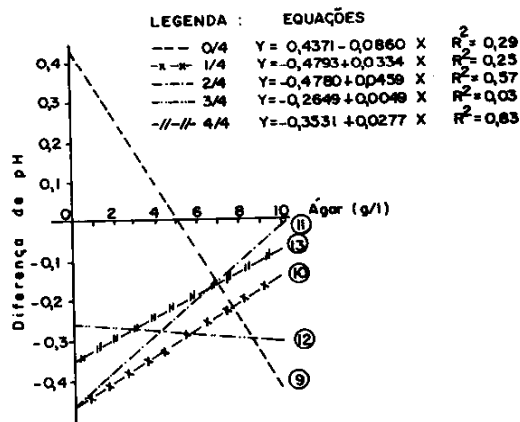


FIG. 3. Variações de pH devidas à autoclave na interação de concentrações de ágar e do meio 'MS'. Lavras, MG, 1990.

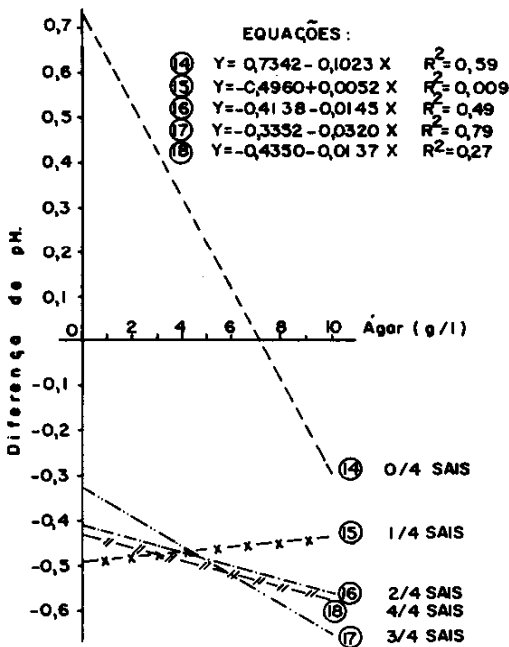


FIG. 4. Variações de pH devidas à chapa aquecedora e autoclave, na interação de concentrações de ágar e do meio 'MS'. Lavras, MG, 1990.

Skirvin et al. (1986). Assim sendo, o derretimento do ágar deve ser feito apenas em água, para, posteriormente, ser acrescido ao meio, uma vez que a água é menos afetada pela chapa aquecedora do que o meio propriamente dito. Se o objetivo é oferecer aos explantes um pH 5,7, por exemplo, deve-se ajustar este pH antes da autoclavagem em 0,4 ou 0,5 unidades a mais, para que no final do processo se tenha o pH desejado.

CONCLUSÕES

1. A chapa aquecedora e a autoclave provocam variações no pH do meio de cultura.

2. A variação de pH é mínima na ausência de ágar.

3. Os efeitos da chapa aquecedora e da autoclave são similares sobre a variação do pH, quando em concentrações mais elevadas de ágar (6 a 10 g/l).

4. Há uma redução crescente do pH na chapa aquecedora e decrescente na autoclave à medida que se aumenta a concentração do meio 'MS'.

5. O pH foi alterado, em média, em 0,3 a 0,5 unidades, com valores extremos de 0,8 unidades.

REFERÊNCIAS

- BOHAGEL, H.A. The pH and sterilization. In: VAN BRAGT, J.; MOSSEL, D.A.A.; PIERIK, R.L.M.; VELDSTRA, H. (Eds.). *Effects of sterilization on components in nutrient media*. Netherlands: Veenman, H. and Zonen, 1971. p.117-120.
- MELLOR, F.C.; STACE-SMITH, R. Development of excised potato buds in nutrient medium. *Canadian Journal of Botany*, v.47, p.1617-1621, 1969.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-479, 1962.
- SINGHA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. *Almey and Pyrus communis* Seckel. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.107, p.657-660, 1982.
- SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, v.5, p.292-294, 1986.