

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA,
EM LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTASEVALUATION OF MICROBIAL CONTAMINATION LEVEL IN A PLANT TISSUE
CULTURE LABORATORYOLIENAIDE RIBEIRO DE OLIVEIRA¹, DANIEL TERAQ², ANA CRISTINA PORTUGAL PINTO DE CARVALHO³,
ELISANGELA MARIA DOS SANTOS⁴, JEFTÉ FERREIRA DA SILVA⁵, JOÃO PAULO SARAIVA MORAIS⁶¹Estudante do Curso de Agronomia – Universidade Federal do Ceará/UFC – Av. da Universidade, 2853 – Benfica – 60020-181 – Fortaleza, CE – pinto@gmail.com²Dr. em Fitopatologia, Laboratório de Fitopatologia – Embrapa Agroindustrial Tropical – Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 – Pici – 60511-110 – Fortaleza, CE – daniel.terao@cpatsa.embrapa.br³Dra. em Ciências Biológicas, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical – Rua Dra. Sara Mesquita, 2.270 – Pici – Cx. P. 3761 – 60511110 – Fortaleza, CE – cristina@cnpat.embrapa.br⁴Estudante do Curso de Agronomia – Universidade Federal do Ceará/UFC – Av. da Universidade, 2853 – Benfica – 60020-181 – Fortaleza, CE.⁵Programa de pós-graduação de Agronomia/Fitotecnia – Universidade Federal do Ceará/UFC – Av. da Universidade, 2853 – Benfica – 60020-181 – Fortaleza, CE – jeftferreira@gmail.com⁶Graduação em Farmácia, Embrapa Agroindustrial Tropical, Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical – Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 – Pici – Cx. P. 3761 – 60511-110 – Fortaleza, CE – saraiva@cnpat.embrapa.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar e caracterizar os níveis de contaminação microbiana, em diferentes ambientes de um laboratório de cultura de tecidos de plantas. No Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal na Embrapa Agroindústria Tropical foi efetuado um levantamento dos níveis populacionais de contaminação fúngica e bacteriana. Foram avaliados os seguintes ambientes: sala de lavagem e esterilização, sala de recebimento de material vegetal, sala de preparo de meio de cultura, sala de manipulação asséptica, câmara de crescimento, capela de fluxo laminar ligada e desligada. Placas de Petri com meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar) foram distribuídas, aleatoriamente, em diferentes locais dentro do laboratório, e abertas durante 60 minutos. Foi efetuada a contagem de colônias fúngicas e bacterianas durante quatro dias de incubação, e após esse período, os contaminantes fúngicos foram isolados e identificados. Destacaram-se os seguintes fungos, encontrados com maior frequência no ambiente do laboratório: *Aspergillus niger* Tiegh. (1867), *Fusarium* sp., e *Penicillium* sp.

De todos os ambientes avaliados do laboratório, observou-se que, na capela de fluxo laminar ligada, não foi detectada incidência de colônias desses microrganismos. Tal fato justifica-se por ser o local asséptico pois é onde se faz a repicagem dos explantes *in vitro*. Conclui-se que a identificação e monitoramento de contaminantes, em ambiente do laboratório de culturas de tecido de plantas é importante para se estudar formas de controles desses microrganismos.

Termos para indexação: Contaminação, micropropagação, assepsia, fungo, bactéria.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate and characterize the rate of microbial contamination in several environments of a plant tissue culture laboratory. A research of

population levels of fungi and microbial contamination was performed at the Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal, of Embrapa Agroindústria Tropical. The following environments were evaluated: washing sterilization room, plant material reception room, media preparation room, inoculation room, growth room and laminar hood (turned-on and off). Petri dishes with PDA (potato-dextrose-agar) culture medium were randomly displayed inside the laboratory and opened for 60 minutes. The fungi and bacterial colonies were counted for four days since the inoculation day. After this period, isolated fungi contaminants were identified. The following fungi were frequently found in the laboratory: *Aspergillus niger* Tiegh. (1867), *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. Only on turned-on laminar hood, no incidence of microorganism colonies was detected. Therefore, the identification of contaminants in plant tissue culture laboratory environments is important in order to study ways of control for these microorganisms.

Index terms: Contamination, micropropagation, asepsis, fungi, bacterium.

INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana é uma das causas principais de perdas de material vegetal, em laboratórios de cultura de tecido de plantas. Em muitos casos, as fontes contaminantes não são determinadas facilmente. Entretanto, as mais comuns são associadas com os microrganismos do ambiente e do indivíduo manipulador (LEIFERT et al., 1994), e microrganismos oriundos do material.

As contaminações em laboratório desse tipo podem ser provenientes de várias fontes, como: correntes de ar,

(Recebido em 05 de junho de 2006 e aprovado em 17 de abril de 2007)

partículas do solo carregando esporos e células de microrganismos que penetram nos locais de trabalho pelos condicionadores de ar, podendo ser também transportadas e introduzidas pelo homem, permanecendo no ambiente em condições de assepsia inadequada. Outros equipamentos que podem introduzir a contaminação são aqueles destinados aos tratamentos de água (deionizadores, destiladores, etc.), seja pela falta de manutenção ou por manuseio inadequado (CAPÓ, 1998). Além disso, esterilização inadequada do meio de cultura, pinças, bisturis, vidrarias e outros materiais necessários e desinfecção inadequada das plantas trazidas do campo podem contaminar as culturas (LOPES, 1996).

A câmara de fluxo laminar é o principal local onde a maioria dos contaminantes pode ser introduzida por manipulação (CAPÓ, 1998). Outras contaminações são introduzidas na cultura de tecidos como resultados de práticas de laboratório deficientes, como é o caso de *Bacillus* sp. que pode contaminar os meios de cultura devido à esterilização insuficiente ou inadequado funcionamento da autoclave (MONTARROYOS, 2000).

Assim, em laboratórios de cultura de tecido de plantas, elevado grau de assepsia é condição fundamental em qualquer situação, já que fungos e bactérias encontram, no meio nutritivo utilizado, ambiente apropriado para se desenvolverem rapidamente, ocasionando a morte das culturas. A limpeza e a esterilização de vidrarias e de outros instrumentos seriam outras práticas que, se realizadas isoladas das demais, trariam mais segurança quanto ao risco de contaminação, uma vez que ali são mantidos, por algum tempo, os frascos de culturas contaminadas e a vidraria usada, até o momento de serem lavadas (TEXEIRA & TORRES, 1998).

A contaminação, no laboratório de cultura de tecido de plantas, pode ser evitada a partir do treinamento dos operadores em técnicas assépticas, como emprego de batas, máscaras e toucas, além do cuidado com a manipulação do tecido vegetal e das ferramentas de trabalho utilizadas como: pinças, bisturis, tesouras, entre outros (DANTAS et al., 2002).

Objetivou-se com este trabalho avaliar e caracterizar os níveis de contaminação microbiana, em diferentes ambientes de um laboratório de cultura de tecidos de plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Fitopatologia e no de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical, Campos do Píci, Fortaleza, Ceará, entre os meses de janeiro a outubro de 2005.

O monitoramento dos níveis populacionais de contaminação fúngica e bacteriana foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal, nos seguintes ambientes: sala de lavagem e esterilização, sala de preparo de meio de cultura, sala de manipulação asséptica, câmara de crescimento, sala de recebimento de material vegetal, interior da capela de fluxo laminar ligada e desligada. Para tanto, placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar) foram distribuídas, aleatoriamente, nos sete ambientes, e abertas para exposição do meio de cultura, durante 60 minutos. Após este período, foram fechadas e mantidas em temperatura ambiente (25°C), na sala de incubação com regime de luz intermitente (12/12h), no Laboratório de Fitopatologia.

A seguir, diariamente, foi efetuada a contagem das colônias fúngicas e bacterianas durante quatro dias sucessivos de incubação, e posterior isolamento. Em seguida, as culturas foram mantidas em temperatura ambiente durante sete dias na sala de incubação, no Laboratório de Fitopatologia.

A identificação dos fungos isolados foi realizada através de observações macro e micromofológicas das culturas, sendo aqueles mais frequentes, selecionados.

O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial (ambiente x tempo) inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e 5 repetições, perfazendo 35 unidades experimentais. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri contendo estruturas dos patógenos coletados dos vários ambientes do laboratório (tratamento).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade. Os dados de contagem das colônias fúngicas e bacterianas foram transformados pela $\sqrt{X+3}$ (TERAO, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo monitoramento dos níveis de colônias fúngicas, em diferentes ambientes do Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical, observou-se a presença de colônias no meio de cultura a partir do segundo dia de avaliação. Verificou-se também que houve diferença significativa quanto ao número de colônias fúngicas, entre os ambientes e os dias avaliados (Figura 1).

Ainda foi observado que a sala de recebimento de material vegetal foi o local com maior índice populacional de colônias fúngicas a partir do segundo dia de avaliação, diferindo, estatisticamente, dos demais ambientes até o quarto dia. Tal fato justifica-se por ser um local onde se recebe e se armazena material contaminado, proveniente do campo.

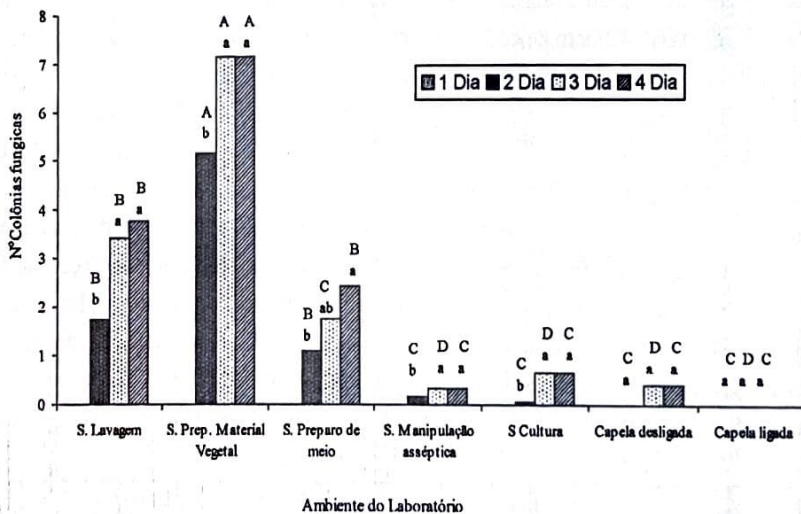
Já nas salas de limpeza e esterilização, sala de preparo de meio de cultura, sala de manipulação asséptica, câmara de crescimento e no interior da capela de fluxo

laminar desligada, houve significativo aumento no número de colônias fúngicas no terceiro e no quarto dia.

Por outro lado, no interior da capela de fluxo laminar ligada não foram constatadas colônias fúngicas, mostrando que, neste ambiente, o nível de assepsia é eficiente. A capela de fluxo laminar ligada força a passagem do ar por meio de um filtro bacteriológico, de maneira que seja criado um ambiente estéril, com pressão positiva, evitando a entrada do ar externo contaminado (PEREIRA & MELO, 2006).

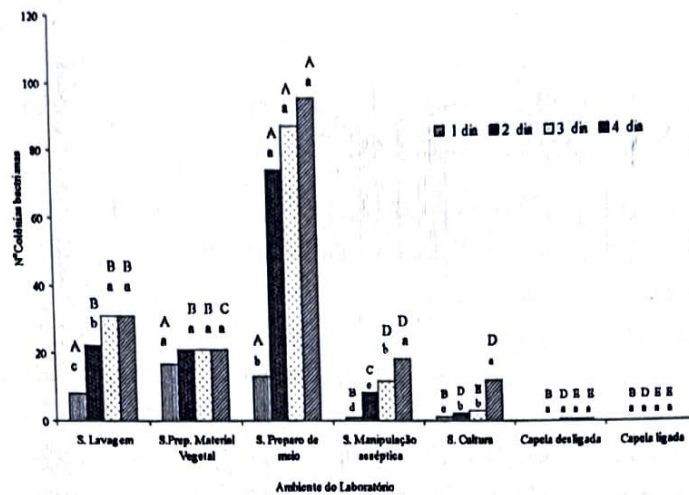
Os principais fungos contaminantes detectados foram: *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp, e *Penicillium* sp. Esses resultados corroboram pesquisas realizadas por Leifert et al. (1994), que encontraram fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Candida*, *Curvularia*, *Neurospora*, *Philophora* e *Fusarium*, isolados nas culturas de tecido de planta, e também por serem conhecidos como patógenos de plantas *in vivo*.

Em relação ao monitoramento dos níveis populacionais de colônias bacterianas, observou-se diferença significativa quanto ao número de colônias bacterianas para os locais e dias de avaliação (Figura 2), observando-se que, na sala de preparo de meio de cultura foi encontrada maior incidência de colônias bacterianas.



Médias seguidas de mesma letra, maiúscula entre época de avaliação e minúscula dentro do mesmo ambiente, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

FIGURA 1 – Níveis de contaminação fúngica, em diferentes ambientes do Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal.



Médias seguidas de mesma letra, maiúscula entre época de avaliação e minúscula dentro do mesmo ambiente, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

FIGURA 2 – Níveis de contaminação bacteriana, em diferentes ambientes do Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal.

Na sala de limpeza e esterilização, sala de recebimento, sala de manipulação asséptica e câmara de crescimento, foram encontradas uma menor quantidade de colônias bacterianas a partir do segundo dia até o quarto dia de avaliação, e no primeiro dia o nível de contaminação não diferiu da sala de limpeza e esterilização e da sala de recebimento.

Na sala de limpeza e esterilização houve um aumento gradativo do número de colônias bacterianas do primeiro ao quarto dia de avaliação. Já na sala de preparo de meio de cultura houve incremento no número de colônias do primeiro ao quarto dia de avaliação, não havendo diferença a partir de então. Na sala de manipulação e crescimento observou-se um aumento gradativo do número de colônias do primeiro ao quarto dia. Na sala de recebimento, o número de colônias permaneceu constante do primeiro ao quarto dia de avaliação.

Na área de trabalho da capela de fluxo laminar desligada o nível de contaminação foi bastante inferior, quando comparado com os demais ambientes. De forma contrária, nenhuma contaminação por colônias bacterianas dentro da capela de fluxo laminar ligada foi verificada, demonstrando que, neste ambiente, o controle é eficiente, sendo imprescindível para os trabalhos de manipulação asséptica.

Como foi observado nos vários ambientes deste Laboratório, a incidência de contaminação varia de acordo com os ambientes, e que o local que necessita de assepsia total, a capela de fluxo laminar ligada, não foi verificada contaminação por fungos e bactérias, demonstrando-se que os contaminantes que ocorrem nos cultivos *in vitro* deste laboratório provêm dos demais ambientes externos ou do indivíduo manipulador. Isso sugere a necessidade de aplicação de métodos de prevenção para garantir assepsia.

Sugere-se a compartimentalização das atividades dentro do laboratório, separando as atividades que lidam com material contaminado, daquelas que trabalham com material esterilizado e que exigem ambiente mais asséptico, e deve-se também, limitar a circulação de pessoas nas áreas que exigem maior assepsia (TEXEIRA & TORRES, 1998). Outra forma de controle é a realização de treinamento de técnicas assépticas, para as pessoas que trabalham no laboratório, como a utilização de bata e máscaras, tendo ainda o cuidado com a manipulação de ferramentas de trabalho utilizadas como pinças, bisturis, e tesouras. No que se refere às câmaras de fluxo laminar, deve-se proceder, periodicamente, à avaliação da eficiência e troca dos filtros dentro do seu prazo de validade (DANTAS et al., 2002).

Outras medidas de prevenção, sugeridas por Montarroyos (2000), são: limpezas das autoclaves, trocando-se a água contida em seu interior ao final de cada dois dias de trabalho; observar, periodicamente, a base das culturas *in vitro* contra a luz, visando à detecção de bactérias, no seu estágio inicial de desenvolvimento, e fazer um acompanhamento fitossanitário das instalações regularmente, para manter o nível de contaminação no laboratório de cultura de tecido de plantas dentro de 3 à 5%.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os diferentes ambientes do Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal apresentaram níveis diferenciados de contaminação, sendo a capela de fluxo laminar ligada, um local completamente asséptico. Portanto, para evitar a contaminação microbiana deve-se manter elevado grau de limpeza em todo o laboratório, controlar a entrada de pessoas nos ambientes que exigem maior assepsia e, além disso, utilizar métodos preventivos de controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAPÓ, Y. A. Contaminación microbiana em el cultivo *in vitro* de plantas. In: PONCE, J. N. P. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Cuba: GEO, 1998. p. 81-104.
- DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; CÂMARA, T. R. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, [S.l.], v. 10, p. 391-407, 2002.
- LEIFERT, C.; MORAIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S.l.], v. 13, p. 139-183, 1994.
- LOPES, C. A. **Contaminações bacterianas em culturas de tecidos: o que são e como controlar**. Brasília, DF: Embrapa/CNPQ, 1996. 6 p.
- MONTARROYOS, A. V. V. **Contaminação *in vitro* laboratório de cultura de tecidos vegetais**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 2000.
- PEREIRA, C. D.; MELO, B. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/cult_tecidos.htm>. Acesso em: 15 maio 2006.
- TERAO, D. **Identificação e caracterização fisiológica e controle do agente da malformação floral e vegetativa da mangueira**. 2001. 94 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2001.
- TEXEIRA, S. L.; TORRES, A. C. Organização do laboratório de cultura de tecido de plantas. In: TORRES, A. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecido e transformação de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/CNPQ, 1998. v. 1, p. 71-72.