INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**APLICAÇÃO DA RADIAÇÃO POR FEIXE DE
ELÉTRONS COMO AGENTE ESTERILIZANTE DE
MICRORGANISMOS EM SUBSTRATO TURFOSO**

DAVID TSAI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências, na
Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

Orientador:

Dr. Paulo Roberto Rela

São Paulo – SP

2006

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**APLICAÇÃO DA RADIAÇÃO POR FEIXE DE ELÉTRONS
COMO AGENTE ESTERILIZANTE DE MICRORGANISMOS
EM SUBSTRATO TURFOSO**

DAVID TSAI

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências,
na Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

Orientador:

Dr. Paulo Roberto Rela

São Paulo – SP

2006

“Exemplar Revisado pelo Autor”

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tsai Chang Lwan (*in memorian*) e Young Lei Dran (*in memorian*), pelos ensinamentos ao longo de suas vidas de coragem e luta e por acreditarem em um mundo melhor.

Às minhas irmãs, Theresa, Fátima e Mara, pelos apoios irrestritos e presenças constantes em toda a minha formação pessoal.

E em especial, à Marisa, minha esposa querida, pelo carinho, incentivo e dedicação, presentes em todos os momentos.

Ao Samuel, meu filho,

Dedico este trabalho, com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização do presente trabalho e, especialmente:

Ao Dr. Paulo Roberto Rela do CTR-IPEN, pela co-orientação e orientação.

À Dra Maria Helena de Oliveira Sampa do IPEN, pela orientação e co-orientação.

À M.Sc. Célia Marina Napolitano do IPEN, pelo auxílio na dosimetria.

A todas as equipes de irradiação do CTR do IPEN, em especial ao pessoal da operação de irradiação por feixe de elétrons do CTR pelo trabalho de irradiação.

À Dra. Siu Mui Tsai, pelo trabalho experimental executado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA- USP e análise dos dados obtidos.

Ao técnico de laboratório Wagner Picinini do CENA- Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pelo excelente auxílio nas análises microbiológicas no trabalho de laboratório.

Às empresas produtoras de inoculantes Stoller do Brasil Ltda. e Turfal – Ind. e Com. de Produtos Biológicos e Agronômicos Ltda., pelo fornecimento de substrato para o estudo.

Ao Prof. Jefferson Luís Meirelles Coimbra, da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro Agroveterinário, Depto. de Fitotecnia – Lages, SC, pela colaboração nas análises estatísticas dos dados.

À Dra Helena Gemignani Peterossi, responsável pela pós-graduação tecnológica (“strictu-sensu”) do Centro Paula Souza (CEETEPS), pelo incentivo constante.

Ao Dr. Oduvaldo Vendrametto, responsável pela pós-graduação da Engenharia de Produção da Universidade Paulista, pela primeira valorização do curso de pós-graduação pelos professores da FATEC-SP.

Aos colegas professores, responsáveis de disciplinas, coordenadores e diretora da FATEC-SP e a todos os amigos do IPEN que tornaram mais agradável o meu percurso.

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

DAVID TSAI

RESUMO

A inoculação de sementes de leguminosas de grãos tais como soja [*Glycine max.* (L.)], feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e pastagens tem sido uma estratégia efetiva e conveniente para introduzir estirpes eficientes de *Bradyrhizobium/Rhizobium* em solos agrícolas sem histórico de cultivo anterior dessa cultura ou quando as estirpes nativas são ineficientes no processo biológico de aquisição de nitrogênio. Através do uso de substrato turfoso previamente esterilizado como veículo da bactéria, os efeitos ambientais adversos podem ser amenizados, pois este substrato atua diretamente, na sobrevivência da bactéria através do fornecimento de nutrientes. O Brasil requer que os substratos turfosos sejam pré-esterilizados através de radiação gama de cobalto-60 (^{60}Co), 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 aceleradores de elétrons foi considerada uma nova alternativa de radiação para pré-esterilização da turfa, pois, por se constituir de processo oxidativo avançado, gera radicais altamente reativos, eficientes na eliminação de agentes contaminantes. Esta técnica é considerada ecologicamente mais segura que a radiação gama, além de ser um processo mais rápido. Há, porém, a característica de ter menor profundidade de penetração da radiação em relação ao ^{60}Co . O presente estudo comparou o método usando doses crescentes de radiação gama por ^{60}Co e por feixe de elétrons (0, 10, 20, 30, 40 e 50 kGy). Os dados experimentais (7, 14, 21 e 28 dias para a fase curta e 150, 180 e 210 dias para a fase longa de incubação) mostraram um elevado número de células da bactéria *Rhizobium tropici* CM-01 *gusA*⁺ inoculada em substratos turfosos submetidos aos dois processos de esterilização, sendo que ambos processos atenderam aos padrões mínimos requeridos pelas normas brasileiras (validade de 180 dias e presença acima de 1×10^8 células/g de substrato). Sob doses mais elevadas, acima de 40 kGy, o método por feixe de elétrons foi mais eficiente em eliminar actinobactérias, consideradas sérias antagonistas de bactérias inoculantes em turfas e que surgiram após 150 dias. Em um segundo estudo, usando o isolado CM-01 *celB*⁺ por um período de 30 dias, os resultados confirmaram a eficiência do método por feixe de elétrons na fase de crescimento bacteriano, mesmo para dose baixa de 10 kGy.

APPLICATION OF ELECTRON BEAM RADIATION FOR PEAT STERILIZATION AND SUPPRESSION OF MICROBE CONTAMINANTS

DAVID TSAI

ABSTRACT

Inoculation of root nodule bacteria into legume seeds such as soybean [*Glycine max.* (L.)], common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and forage pasture has been effective and convenient as this simple procedure may introduce effective strains of *Bradyrhizobium/Rhizobium* into agricultural soils without a past history of successful cropping systems with the legume hosts. Peat-based substrates previously sterilized have been used for decades as bacteria carrier, protecting them from the prevailing harsh conditions in tropical soils and ensuring their survival with nutrient and protection against the soil antagonists. The Brazilian Government requires that all peat-based substrates must be gamma-sterilized from a cobalt-60 (^{60}Co) source, prior the introduction of the root nodule bacteria into the package. The recommendation is for a dose up to 50 kGy for an effective suppression of pathogens and saprophytes, in order to avoid competition among the substrate microbiota. Recently, the use of the electron beam (EB) accelerator has shown to be a new alternative for peat pre-sterilization, as this technique may promote reactive free-radicals which are efficient to suppress microbial contaminants. This fast technology is considered more environment and ecology friendly-sound than gamma radiation (γ). The disadvantage of not reaching higher depth than gamma rays from ^{60}Co must be considered, and attempts of optimizing the technique are crucial. This study compared both methods by using increasing rates of radiation by ^{60}Co by the EB method - 0, 10, 20, 30, 40 e 50 kGy in a commercial peat used for inoculants. Experimental data from days 7, 14, 21 and 28 days (growth period) and 150, 180 and 210 days (storage period) indicated high numbers of the strain *Rhizobium tropici* CM-01, labelled with *gusA*⁺ (Study 1) and *celB*⁺ (Study 2) from both eat-sterilizing techniques, reaching values above the minimum of 1×10^8 cells g⁻¹ peat. At high rates, above 40 kGy, and after long incubation periods (ex. after 150 days), EB method was more efficient to suppress actinobacteria, one serious antagonist for rhizobia. Strain CM-01 *celB*⁺, data for the period of bacterial growth confirmed the efficiency of the method even at rates as low as 10 kGy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HISTÓRICO	3
1.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)	9
1.3. A TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS DE GRÃOS FORRAGEIRAS	14
1.3.1. Turfa como substrato para inoculantes biológicos	15
1.3.2. Preparo de inoculantes comerciais.....	17
1.3.3. Esterilização da turfa usada como veículo na produção de inoculantes biológicos.....	21
1.4. PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO.....	23
1.4.1. Meios para executar os meios de esterilização.....	25
1.4.2. Tipos de radiações ionizantes utilizantes nos processamentos industriais	29
1.4.3. Equipamentos utilizados como fontes de radiações no processo de esterilização.....	35
1.5. ANÁLISE ECONÔMICA NO USO DA TECNOLOGIA DAS RADIAÇÕES (GAMA E FEIXE DE ELÉTRONS) PARA PRODUÇÃO DE INOCULANTES BIOLÓGICOS.....	40
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. SUBSTRATO TURFOSO	44
3.2. IRRADIAÇÕES	45
3.2.1. Irradiador gama	45

3.2.2. Acelerador de elétrons	48
3.2.3. A dosimetria no controle do processo de irradiação.....	52
3.2.4. A composição físico-química da turfa comercial	57
3.3. CONTROLE DE QUALIDADE DA TURFA IRRADIADA	57
3.3.1. Preparação de amostras de turfas irradiadas e inoculadas	57
3.3.2. Inoculação das amostras irradiadas de turfa	61
3.3.3. Contagem do número de microrganismos	63
3.4. USO DE MARCADOR MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Rhizobium tropici</i> CM-01 <i>gusA</i> ⁺ e CM-01 <i>celB</i> ⁺	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1. PROCESSO DE IRRADIAÇÃO.....	65
4.2. ENSAIO 1 - SOBREVIVÊNCIA DE <i>Rhizobium tropici</i> CM-01 <i>gusA</i> ⁺ ATRAVÉS DA CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS	71
4.3. ENSAIO 2 - SOBREVIVÊNCIA DE <i>Rhizobium tropici</i> CM-01 <i>celB</i> ⁺ ATRAVÉS CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS	79
4.4. ESTUDO DA VIABILIDADE ECONÔMICA	83
4.4.1. Acelerador de elétrons	83
4.4.2. Irradiador gama	86
5. CONCLUSÃO	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
7. APÊNDICE	93

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. O ciclo biológico do nitrogênio.....	6
FIGURA 2. O ciclo do nitrogênio no solo	7
FIGURA 3. Esquema da fixação biológica de N em uma planta de alfafa.....	10
FIGURA 4. Demonstração em pequena escala da inoculação da semente de soja	12
FIGURA 5. Exemplos das várias áreas que usam e aplicam a turfa	16
FIGURA 6. Ilustração de tipos de radiação ionizante utilizados em processos industriais e comparação do nível de penetração entre raios gama (cobalto-60), elétrons e raios-X.....	30
FIGURA 7. Fontes radioativas tipos C188, fabricadas pela empresa canadense MDS Nordion Ion Technologies.....	31
FIGURA 8. Montagem esquemática do “rack” de fontes radioativas dos irradiadores Gama industriais, a partir dos cilindros sinterizados de ⁵⁹ Co (99,98%), cápsulas de Zircaloy com ⁶⁰ Co, lápis de ⁶⁰ Co e magazine.....	32
FIGURA 9. Esquema do decaimento radioativo para o cobalto-60	33
FIGURA 10. Desenho esquemático das principais estruturas que compõem o acelerador de elétrons	34
FIGURA 11. Embalagens do substrato turfoso comercial, tendo à esquerda um pacote não inoculado e à direita, um pacote de turfa irradiada a 30 kGy, inoculado com <i>Rhizobium tropici</i> cel B ⁺	44
FIGURA 12. A unidade de irradiação de cobalto-60, Gammacell 220, instalada no CTR - IPEN.....	46
FIGURA 13. Irradiador de cobalto-60 com 48 lápis e suporte de montagem das fontes ...	47
FIGURA 14. Processamento de irradiação da turfa pelo irradiador Gammacell 220.....	48
FIGURA 15. Diagrama funcional do acelerador industrial de elétrons tipo Dynamitron, da Radiation Dynamics Inc.	50

FIGURA 16. Irradiação dos pacotes de turfas no acelerador de elétrons	51
FIGURA 17. Sistema contendo rolo de filme e suporte ou pacote para utilização de filmes de triacetato de celulose.....	52
FIGURA 18. Esquema de funcionamento do espectrofotômetro Shimadzu UV – 1601PC.....	53
FIGURA 19. Corte vertical do posicionamento dos dosímetros nas embalagens de turfa.....	55
FIGURA 20. Corte vertical e vista superior da montagem de uma bandeja com a disposição dos 6 pacotes de turfa e respectivos dosímetros.....	56
FIGURA 21. Homogeneizador de fabricação nacional, marca Marconi e modelo MA440/CF, utilizado para misturar o meio de cultivo com bactéria.....	62
FIGURA 22. Nódulos de feijoeiro contendo estirpes marcadas com o gene <i>ceIB</i> ⁺ (azul), estirpes <i>gusA</i> ⁺ (magenta) e estirpes nativas (coloração natural).....	64
FIGURA 23. Ensaio 1 – Gráficos e equações de regressão em função dos métodos (Método 1 = EB e Método 2 = Radiação Gama)	75
FIGURA 24. Ensaio 1 (Fase curta) – Contagens de colônias (UFC)	76
FIGURA 25. Ensaio 1 (Fase longa) – Contagens de colônias bacterianas (UFC)	77
FIGURA 26. Ensaio 1 (Fase longa) – Contagem de colônias <i>R. tropici gusA</i> ⁺ (A, B, C).....	78
FIGURA 27. Ensaio 1 (Fase longa) - Contagem de colônias <i>R. tropici gusA</i> ⁺ (A, B).....	78
FIGURA 28. Ensaio 2 (Fase curta) – Amostras de contagens (diluição x 10 ⁸)(A, B, C) – 40 kGy – radiações gama e EB.....	80
FIGURA 29. Ensaio 2 (Fase curta) – Amostras de contagens (diluição x 10 ⁸)(A, B, C) – 10, 10 e 50 kGy - radiações e EB	81
FIGURA 30. Ensaio 2 (Fase curta) – Gráficos e equações de regressão em função do método (Método 1 = EB, Método 2 = radiação gama).....	82

INDICE DE TABELAS

TABELA 1. Inoculação de <i>Rhizobium</i> em feijoeiro usando turfa esterilizada com radiação gama.....	11
TABELA 2. Termos usados para definir os níveis de redução de carga microbiana	24
TABELA 3. Comparação das fontes de radiação Co-60 e feixe de elétrons para esterilização.....	38
TABELA 4. Meio convencional para o crescimento de <i>Rhizobium/Bradyrhizobium</i>	58
TABELA 5. Meio Peptona Glicose com Púrpura de Bromocresol	59
TABELA 6. Meio para bactérias aeróbicas, contaminantes	59
TABELA 7. Meio de cultura para contagem de actinomicetos	60
TABELA 8. Meio YMA (Yeast Manitol Agar)	60
TABELA 9. Dosimetria do irradiador Gammacell.....	66
TABELA 10. Dosimetria do acelerador de elétrons, dose alvo 20 kGy	67
TABELA 11. Dosimetria do acelerador de elétrons, dose alvo 40 kGy.....	68
TABELA 12. Dosimetria do acelerador de elétrons, dose alvo 50 kGy.....	69

TABELA 13. Contagem de colônias bacterianas ($\times 10^9$ UFC) nos tratamentos de irradiação e inoculados com CM-01 <i>gusA</i> ⁺	72
TABELA 14. Contagem de colônias bacterianas ($\times 10^9$ UFC) nos tratamentos de irradiação e inoculados com CM-01 <i>ceiB</i> ⁺	79
TABELA 15. Valor do capital investido para construção de uma planta de irradiação de turfa utilizando-se de elétrons	83
TABELA 16. Estimativa anual de custos operacionais da unidade móvel utilizando-se de elétrons	84

1. INTRODUÇÃO

Dados recentes sobre a disponibilidade dos recursos naturais do planeta para produção agrícola revelam que somente 20% foram considerados próprios para a mecanização e, dessa área, somente metade era passível de uso econômico^[1]. Com base nesses dados e devido à crescente preocupação mundial com o aumento da população e a problemática do desenvolvimento econômico das nações, uma alta prioridade deve ser dada na adoção de sistemas de produção agrícola, eficientes e sustentáveis. Neste contexto, uma agricultura sustentável é considerada, sob a ótica atual da economia da produção agrícola, a demanda por elevados níveis de eficiência e conservação e uma intensificação na necessidade de redução dos custos dos insumos agrícolas, porém, com a manutenção de um ambiente favorável para a evolução de todas as espécies. Como ponto fundamental, o componente ambiental deve ser considerado para minimizar a poluição e outros efeitos considerados indesejáveis como, por exemplo, pelo uso intensivo de fertilizantes nitrogenados e outros agroquímicos^[1]. Para tanto, o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, formadoras de nódulos em leguminosas, tem sido uma excelente alternativa, pois o processo simbiótico pode contribuir com substituições médias de adubos nitrogenados entre 40 a 80 kg N/ha, respectivamente em feijão e soja^[2]. Uma das formas de introdução dessas bactérias é feita através da sua inoculação em um substrato, no caso, solo turfoso, que permite o crescimento e posterior armazenamento da bactéria neste substrato.

Para a melhoria da qualidade das turfas usadas como substrato e 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 há a necessidade de uma solução de irradiação dos substratos em larga escala. A técnica de autoclavagem a 120°C e a 1 atm de pressão, foi testada em escala laboratorial e mostrou ser um método trabalhoso, caro e longo em um contexto comercial, podendo também comprometer a qualidade do produto pelo risco de produzir toxinas durante a esterilização.

Através da radiação, podem ser eliminados microrganismos patogênicos ao homem e animais, sendo essa propriedade usada para a esterilização de produtos farmacêuticos e médicos, irradiação de alimentos e desinfestação de solos e substratos e lodo de esgoto. Na agricultura, o uso da radiação ionizante tem contribuído para o controle de insetos e pragas em produtos agrícolas em geral na forma primária (“commodities”) e na forma de alimentos processados.

A irradiação gama obtida através de isótopos ou o de aceleradores de feixes de elétrons energizados tem sido usada com sucesso para a irradiação de materiais complexos, contendo alto número de agentes potencialmente patogênicos. A utilização de aceleradores industriais de elétrons é a mais recente tecnologia usada para a esterilização de substratos na produção de inoculantes em países do hemisfério norte. Este processo depende principalmente da utilização de feixe de elétrons com energia de 10 MeV com a qual a turfa é irradiada, e desse modo, esterilizada. 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. O Uruguai, por exemplo, é um país onde existe uma legislação para o controle rigoroso da qualidade de inoculantes, mas não tem grandes depósitos de turfas nem as facilidades para uma rotina de esterilização de turfas. Uma alternativa encontrada pelos uruguaiois foi importar turfas pré-esterilizadas por feixe de elétrons do Canadá, para uso como substratos de inoculantes comerciais no Uruguai.

O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-SP) iniciou o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa para o tratamento de lodo de esgoto, submetendo o material para a esterilização através do feixe de elétrons, obtendo, de acordo com as doses de irradiação, a esterilização e ou a desinfestação de agentes patogênicos. Esta tecnologia pode ser aplicada na esterilização de turfas para a produção de inoculantes comerciais havendo, portanto, a necessidade de determinar a eficiência desse novo método em relação à radiação gama e às doses necessárias para a sobrevivência do *Rhizobium*, na fase inicial de crescimento e ao longo do período regulamentado para a sua comercialização (180 dias).

1.1. HISTÓRICO

A adubação é o capítulo da agronomia que cuida da aplicação dos adubos na terra, de maneira e em quantidades tais que as plantas possam aproveitá-los, dando resultados econômicos. Viver da terra não é cultivá-la desordenadamente, a ponto de esgotá-la. Isto seria o que se pode chamar de depredação. O uso da terra requer trato bem orientado. Sem isto, ela se esgota, deixa de dar colheitas remuneradoras. A adubação constitui excelente fator, que pode e deve ser usado pela agricultura, para ter sempre suas terras em condições desejáveis de fertilidade. É a prática da adubação, que permite levar ao terreno o adubo, que é toda a matéria útil para planta e de que os solos revelam carência.

Existem, basicamente, três tipos diferentes de adubações que é a adubação química, a adubação orgânica e a adubação verde^[3]. A adubação química, conhecida também como fertilização química é baseada nos adubos nitrogenados, adubos fosfatados, adubos potássicos e na mistura desses três adubos, a partir dos quais são originados a grande maioria da indústria extrativista e petroquímica. Os principais fertilizantes nitrogenados são apresentados na seguinte forma:

- Amônia anidro - Contém 82% de nitrogênio (N), portanto é o mais concentrado, o mais barato e o mais usado.
- Uréia - Contem 46% de nitrogênio e o mais popular devido à forma granular que facilita a manipulação. Tem sido a fonte de N mais utilizada no Brasil.
- Nitrato de amônia - Contém 34% de nitrogênio, sendo metade na forma de amônia e metade na forma de nitrato, porém tem custo elevado.
- Fosfato de amônia - Contém tanto nitrogênio como fósforo em porcentagens diversas combinadas. São mais conhecidos como fertilizantes fosfatados. O seu uso está aumentando no Brasil, pois proporciona economia no transporte, manuseio e armazenamento.
- Sulfato de amônia - Está diminuindo o seu uso, pois só contém 21% de nitrogênio.

O segundo tipo de adubação é a adubação orgânica, que consiste, na prática, em levar aos terrenos de cultura, todos os resíduos orgânicos de que se disponha na propriedade, desde os de constituição mais rica, como o estrume dos animais, os de constituição média, como as camas dos estábulos ou cocheiras e resíduos de culturas, até os de constituição mais pobre, como as varreduras, lixos, capins e serragem de madeira. Neste caso, o importante é que tais resíduos sejam incorporados aos solos em estado de completo curtimento ou combustão, isto é, sejam transformados ou mineralizados em massa preta ou mais conhecido como húmus.

O terceiro e último tipo de adubação é mais conhecido como adubação verde, que constitui o meio mais fácil e econômico para melhorar os terrenos. Este último tipo de adubação é considerado também uma adubação orgânica, porém o material do adubo é produzido no próprio local a ser adubado, pelo plantio de certas espécies de plantas, sendo as leguminosas as mais indicadas, se estiverem vivendo em certos nódulos de suas raízes as bactérias do gênero *Rhizobium*, que tem a propriedade de fixar ao solo o nitrogênio do ar atmosférico e por produzirem bastante massa vegetal, e estas serem de fácil decomposição para chegar ao estado de húmus.

O nitrogênio representa um componente das moléculas de proteína, que é a matéria-prima das estruturas complexas, responsáveis pelas reações ou metabolismos que se processam no interior das células vivas e, portanto, um elemento indispensável a qualquer manifestação de vida^[3]. Depois dos fertilizantes nitrogenados serem aplicados no solo tanto na forma inorgânica ou na orgânica, o N converte-se rapidamente na forma de nitrato e nesta forma está sujeito a ação da lixiviação dos solos e conseqüentemente a ação da desnitrificação pelos microrganismos, permitindo a sua saída ou perda para a atmosfera. Portanto, o suprimento útil de N disponível nos solos para a nutrição e o bem estar das plantas, está armazenado na matéria orgânica contida nos solos. O mecanismo das plantas que absorvem o nitrogênio é principalmente na forma de íon amônia, NH_4^+ , ou de íon nitrato, NO_3^- ^[4]. Apesar de haver preferências das plantas de absorver o N na forma de amônia, os solos férteis são normalmente convertidos mais rapidamente à forma de nitrato

que, exceto para o arroz, é a forma abundante mais absorvida. Portanto, as maneiras de transformação do nitrogênio^[4] são apresentadas na FIG. 1 e descritas a seguir :

- Amonificação - A amônia (NH_3) forma-se pela ação dos microrganismos nos compostos orgânicos nitrogenados, isto é, a amônia é formada como subproduto da decomposição da matéria orgânica. Este processo suporta uma grande diversidade de tipos de solos.
- Nitrificação - Embora um grande número de microrganismos participe da oxidação da amônia para nitrato, há um consenso que os principais agentes nos solos são os grupos de bactérias nitrificantes que primeiro oxida a amônia em nitrito, feito pelo grupo das nitrosomas, e depois oxida o nitrito em nitrato, feito pelo grupo das nitrobactérias. Este processo é conhecido como de nitrificação dos íons amônia, onde são convertidos para a forma de ácido nítrico, portanto os fertilizantes na forma de amônia tem um efeito de acidez nos solos.
- Desnitrificação - É a redução biológica do nitrato ou nitrito para a forma de N gasoso que se desloca do solo para a atmosfera e aí se perde. Este processo é executado por numerosas espécies de bactérias que normalmente usam o oxigênio do ar, mas que também podem usar o oxigênio das fórmulas do nitrato e/ou nitrito sob condições anaeróbicas.

FIGURA 1. O ciclo biológico do nitrogênio^[4].

O ciclo de N possui o seu grande reservatório de N na atmosfera, onde em 100 partes do volume de ar atmosférico são encontradas 79 partes de nitrogênio, 20 partes de oxigênio e uma parte de outros gases, enquanto que a quantidade de N existente na crosta terrestre se aproxima de 0,016%. Por aí se vê, o grande desequilíbrio existente entre o N contido no ar e o N contido na terra. Portanto, tudo que puder ser feito, ao alcance do ser humano, no sentido do solo receber mais N ou o solo não perder N, tanto melhor será para o problema da fertilidade da terra^[3]. O ciclo do N no solo é apresentado na FIG. 2.

FIGURA 2. Ciclo do nitrogênio no solo^[5].

A saída ou perda de N do solo pode se dar pelas seguintes formas^[3]:

- remoção pelas culturas
- perda pelas águas de drenagem e pela erosão
- evolução, sob a forma de amônia ou N elementar, em virtude de processos biológicos favorecidos por condições anormais do solo
- perda pelas queimadas.

O solo pode ganhar ou receber nitrogênio pelas seguintes formas^[3]:

- pela água das chuvas, tendo em solução compostos nitrogenados
- pela aplicação, pelo ser humano, de adubos nitrogenados
- pela fixação biológica por meios assimbiótico e simbiótico. Este último, processa a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) com o auxílio de bactérias que vivem nos nódulos das raízes das leguminosas.

O processo da FBN por bactérias do gênero *Rhizobium/Bradyrhizobium* presentes em nódulos, que se aderem aos sistemas radiculares das plantas leguminosas, é eficientemente e amplamente utilizado como adubos verdes. Esta propriedade de FBN no solo, através das bactérias simbióticas, faz com que se diga que as leguminosas constituem uma espécie de "fábrica de N na fazenda"^[6]. Só este fato, seria o suficiente para recomendar a prática deste tipo de adubação, porém esta, ainda hoje, não é devidamente utilizada pela totalidade dos agricultores.

Até o início dos anos 70, praticamente ninguém acreditava que a FBN podia competir com o uso indiscriminado de fertilizantes químicos. Devido à crise do petróleo nos anos 70 e o aumento da poluição ambiental causado pela maciça adubação por fertilizantes químicos minerais, principalmente nos Estados Unidos, o uso alternativo de inoculantes biológicos por pesquisadores brasileiros culminou no grande sucesso desta estratégia em nosso país. Naquela época, pesquisava a FBN em legumes tropicais e o Programa Brasileiro da Soja teve o seu início oficialmente em 1964 e, portanto sob a sua grande influência este Programa utilizou a estratégia da soja depender totalmente da FBN^[7]. A grande contribuição dos microbiologistas de solo, da equipe da EMBRAPA (RJ) e das equipes FEPAGRO e UFRGS, ambas do Rio Grande do Sul, foi justamente mostrar a potencialidade do uso de sistemas simbióticos e associativos na região tropical, como no caso da soja, leguminosas forrageiras e gramíneas, em substituição ao uso parcial ou total de fertilizantes nitrogenados^[7].

Hoje em dia, muitos países estudam a inoculação das suas culturas com microrganismos benéficos, o que pode elevar ainda mais o aumento de suas produtividades, tanto na safra de grãos como na de forrageiras. Entretanto, foram os resultados obtidos na cultura da soja, que conseguiram atingir os maiores aumentos de produção, e que colocou o Brasil como o segundo maior produtor mundial de grãos de soja e um dos maiores exportadores mundiais dessa leguminosa, tornando o produtor nacional competitivo nos mercados internacionais. O grande impacto foi a redução dos custos no plantio de soja, possibilitando uma economia entre US\$ 1 bilhão e US\$ 2 bilhões de dólares por ano, devido à não utilização dos caros fertilizantes nitrogenados. O outro impacto foi o ambiental, diminuindo a poluição das águas pelos fertilizantes agrícolas^[5].

1.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

A disponibilidade de uma fonte útil de N para a planta é um fator necessário para a produtividade agrícola. Na agricultura moderna, existe uma preocupação com a intensificação do uso de fertilizantes químicos nitrogenados para suplementar o N do solo, pois este tem contribuído para o aumento dos custos de produção e da poluição do solo ^[8,9]. A contribuição da FBN pelas leguminosas pode ser uma alternativa para a substituição de fertilizantes nitrogenados como no caso da soja [*Glycine max.* (L.)] e do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) onde é possível utilizar, de forma eficiente, o processo simbiótico da FBN em associação com seu microssimbionte, as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, desde que sejam fornecidas as condições de solo e ambientais que assegurem a formação dos nódulos nas raízes para a obtenção de taxas significativas de N para as plantas^[10]. Uma das práticas de manejo agrícola recomendável, que tem sido adotada, é a introdução de estirpes melhor selecionadas de bactérias como uma alternativa cara para a otimização do processo de FBN em culturas da soja, alfafa, trevo e feijão.

A necessidade de obter um inoculante de alta qualidade, isto é, contendo elevados números de células de uma bactéria fixadora selecionada tem sido considerada

em programas nacionais e internacionais do uso da FBN como forma alternativa e eficiente de substituir a adição de elevadas doses de N químico no solo. Em caso de uso de substratos turfosos como veículos dessas bactérias, uma das melhores estratégias tem sido a adoção de técnicas de esterilização pré-inoculação dos substratos turfosos por radiação, que tem demonstrado grande eficiência, conforme observado na TAB. 1, com economia de consumo variando de 40 a 60 kg de N por hectare, sendo esta economia de 40 a 55% de N obtido para as leguminosas na produção de grãos^[11] e até 110 kg de N por hectare, com média de 80% de economia de N, para as leguminosas na produção de forrageiras^[11,12, 13], conforme visto no caso da alfafa (FIG. 3).

FIGURA 3. Esquema da fixação biológica de N em uma planta de alfafa^[12].

TABELA 1. Inoculação de *Rhizobium* em feijoeiro usando turfa esterilizada com radiação gama em campo experimental desenvolvido por David Hume e Joe Omielan, University of Guelph, Guelph - Ontario, Canadá. Plantio: 20 de Junho, 2000^[14].

Tratamento	Média Número Nódulos / Planta	Nódulos Massa Seca / Planta	Produção Média (kg/ha)	Valor Bruto (\$/ha)	Inocu- lante Custo (\$/ha)	N Fertil. Custo (\$/ha)	Retorno Líquido (\$/ha)	Benefício Líquido (\$/ha)
HiStick® Exp A + 15kg N/ha	30,2 ^{ab}	91,8 ^{ab}	3.057 ^a	1345,08	10,23	9,90	1344,75	235,07
Inoculante Granular + 15 kg N/ha	49,6 ^a	136,5 ^a	3.000 ^a	1320,00	19,66	9,90	1291,40	181,72
Sem Inoculante + 15 kg N/ha	3,7 ^c	10,3 ^c	2.790 ^a	1227,60	-	9,90	1217,70	108,02
Sem Inoculante + 30 kg N/ha	24,2 ^b	47,4 ^{bc}	2.567 ^a	1129,48	-	19,80	1109,68	-

- = Produto comercial à base de turfa esterilizada a 50 kGy. Valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente a 5% . Feijão Branco var. Envoy. N calculado a US\$ 0,66 kg. Taxa de cultivo a 50kg/ha.

No Brasil, a inoculação nas sementes de leguminosas como os grãos de soja [*Glycine max.* (L.)], de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e de outros grãos para produção de pastagens em geral, tem sido uma estratégia efetiva e conveniente para introduzir estirpes eficientes de *Bradyrhizobium/Rhizobium* em solos agrícolas, sem histórico de cultivo anterior dessas culturas ou quando as estirpes nativas foram anteriormente ineficientes no processo biológico de aquisição de N. Através do uso de substrato turfoso previamente esterilizado como veículo da bactéria *Bradyrhizobium/Rhizobium*, os efeitos adversos ao meio ambiente podem ser amenizados, pois este substrato atua diretamente para a sobrevivência das bactérias, através do fornecimento de nutrientes. A esterilização por radiação gama de substratos, tais como a turfa, usados como veículo de bactérias fixadoras de N ou inoculante, tem sido recomendada há quase quatro

décadas^[12,13] devido a pelo menos quatro grandes preocupações na produção comercial dos inoculantes turfosos que são:

- eliminação ou inativação dos microrganismos que poderiam competir com a reprodução da bactéria inoculada,
- a boa especificação da composição orgânica do substrato turfa que se tornará veículo dos inoculantes,
- a eficiência da nodulação na planta e da fixação de N pelas bactérias do solo,
- as boas práticas de manejo do veículo ou substrato durante o processamento industrial da cultura de microrganismos para a obtenção de um alto número de células viáveis durante a fabricação dos inoculantes e quanto da aplicação do produto acabado no solo.

O processo de inoculação é uma prática que não oferece maiores dificuldades, consistindo em se misturar o inoculante em pó com as sementes, imediatamente antes do plantio. Essa operação pode, inclusive, ser feita na própria semeadeira. Nessa oportunidade, é importante evitar a ação do solo para não ocorrer a desidratação das células de *Bradyrhizobium/Rhizobium*, sobre o inoculante ou sobre as sementes após a inoculação (FIG. 4).

FIGURA 4. Demonstração em pequena escala da inoculação da semente de soja^[15].

O uso dos inoculantes comerciais tem o objetivo da promoção da FBN nas leguminosas (grãos e forrageiras) com o incremento da produtividade destas plantas hospedeiras e conseqüentemente uma produção mais econômica. Esta capacidade de fixar nitrogênio tem apresentado resultados positivos, nas últimas quatro décadas, para as empresas produtoras de inoculantes comerciais em diversos países e continentes, porém o uso amplo e indiscriminado de inoculantes nas leguminosas sem a adoção de padrões internacionais de qualidade em diversos países, resultou em muitos casos, em inadequado e baixo rendimento dos inoculantes e no abandono do seu uso em alguns casos^[13].

Na produção de inoculantes de qualidade existem ainda algumas lacunas que podem ser complementadas com alguns esforços voltados na área de pesquisa de tecnologia básica de produção de inoculantes biológicos. Como exemplos, existem alguns avanços recentes que têm sido alcançados com novas formulações de inoculantes, como a veiculação de bactérias em meio líquido, que tem facilitado a comercialização do produto^[13].

Tradicionalmente os inoculantes são veiculados em substratos turfosos, para áreas novas ou quando fatores de estresse ambiental (como solos ácidos ou altas temperaturas) são prevalentes, pois os inoculantes líquidos são mais facilmente afetados por esses fatores^[15]. No Brasil, os inoculantes contendo turfa como substrato, são pré-esterilizados segundo recomendação técnica da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia e Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE). As recomendações da RELARE contemplam avaliação da estirpe, do inoculante e da tecnologia, sendo aceito o mínimo de 10 milhões de células viáveis por grama de turfa, durante, por exemplo, a comercialização das cooperativas ao produtor rural e com o prazo mínimo de validade de 180 dias^[15].

1.3. A TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS DE GRÃOS E FORRAGEIRAS

Em leguminosas, o objetivo do uso de inoculantes é promover o maior número de bactérias adequadas durante a formação do nódulo^[11,12,15,16]. O alto número de *Bradyrhizobium/Rhizobium* na semente favorece a sobrevivência desta bactéria no momento do plantio, pois aumenta a probabilidade da raiz receber os estímulos da rizosfera e se multiplicar, formando uma nodulação cada vez mais precoce. Para introduzir um alto número de células bacterianas e aumentar a sobrevivência do inoculante no solo, diversas alternativas têm sido adotadas para a tecnologia de inoculação, sendo uma delas, o uso de substratos com elevados teores de carbono, a mais tradicional como veículo que pode atuar no aumento da sobrevivência do inóculo, pois fornece um ambiente favorável e protetor contra as condições desfavoráveis do solo^[17].

Muitos substratos e protocolos têm sido estudados e adotados ao longo das últimas quatro décadas para uso de inoculantes em leguminosas^[18]. A forma mais simples tem sido o uso de suspensões líquidas, que estão sendo gradualmente melhoradas 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^[13,18].

Desse modo, os substratos mais comumente usados mundialmente, têm sido os compostos naturais tais como turfas, que são solos contendo materiais vegetais e compostos orgânicos. 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 de turfas, devido à variabilidade de sua composição e da idade da turfeira, que pode afetar muito a composição da matéria orgânica e daí produzir algum elemento

tóxico durante o processamento de produção industrial do inoculante^[18, 19].

1.3.1. Turfa como substrato para inoculantes biológicos

A turfa ocorre em ambientes lagunares ou em planícies de inundação de rios, cujos ambientes são saturados. Ela se constitui como uma substância mineral composta de material orgânico, de origem vegetal, parcialmente decomposto e de material inorgânico. Para sua prospecção e exploração, as turfeiras em geral podem ser reconhecidas e delimitadas através de sensores remotos (fotos convencionais, imagens de radares e satélite). A sua amostragem sistemática é feita com trados especiais de pistão, que recuperam a amostra indeformada, mantendo as suas características físicas e químicas. O número de furos e o número de amostras a analisar, por turfeira, é a função da variação da espessura e dos teores de cinza da turfa. Uma vez decidida a realização da lavra da turfeira, estudos hidrológicos e meteorológicos são imprescindíveis para estabelecer os parâmetros necessários à drenagem da mesma, a época mais conveniente para a produção da turfa e o método de lavra a ser adotado. A turfa pode ser explorada e produzida sob diversas formas (FIG. 5), de acordo com o tipo:

- Moída, extrudada ou cortada à mão – tem múltiplas aplicações como insumo energético (ex.: produção de gás de cozinha):
 - a) turfa granulada (“milled peat”) – produzida pelo revolvimento e picagem de uma camada de até 35 mm de turfa, usada basicamente para termoelétricas. A secagem é feita na própria turfeira.
 - b) Turfa em briquetes – produzida por seleção, uniformização, moagem, peneiragem e prensagem da turfa.
 - c) Turfa em blocos (“machined peat”) – produzida por corte profundo, uniformizada, conformada e lançada na superfície da própria turfeira para secagem.
- Novos sub-produtos – diversos outros usos e aplicações podem ser citados, em sua maioria sob forma experimental (ex.: tratamento de lixo), conforme FIG. 5.
- Uso agrícola e pecuário – empregada como adubo em forma de esfagno (“peat moss”), que é a parte superficial e mais nova da turfeira.

FIGURA 5. Exemplos da várias áreas que usam e aplicam a turfa^[20].

1.3.2. Preparo de inoculantes comerciais

Os inoculantes comerciais apresentam dois constituintes essenciais: a bactéria que vai ser colocada em contato com a semente e o substrato ou veículo, que deve manter a matéria viva por alguns meses (6 meses, segundo normas da RELARE), desde a produção do inoculante até o seu uso pelo agricultor. Os inoculantes são sempre específicos para plantas do mesmo grupo de inoculação cruzada, isto é, devem conter a espécie de *Rhizobium* capaz de se associar à leguminosa que se pretende inocular. Dentro de uma mesma espécie de *Rhizobium* existem altas variações quanto à capacidade de FBN de estirpe para estirpe. Para o preparo de inoculantes, é necessário selecionar, através de ensaios sobre a capacidade competitiva entre muitas linhagens da mesma espécie de *Rhizobium*, selecionando-se aquelas que apresentam maior eficiência na capacidade de fixação. Nesta seleção de *Rhizobium/Bradyrhizobium*, deve-se considerar os requisitos^[12]:

- eficiência em fixar nitrogênio
- capacidade de formar nódulos
- capacidade de competir com microrganismos do solo
- sobrevivência a condições adversas do solo e na semente
- crescer em meio líquido e veículo orgânico, para seu uso industrial
- tolerância a condições de estresse ambiental – ex.: pH baixo do solo e a agroquímicos
- capacidade de formar nódulos e fixar nitrogênio em presença de N mineral

A tecnologia de produção de inoculantes representa uma etapa muito crítica para o êxito do uso da FBN em leguminosas. As práticas de inoculação usando protetores de células ou DNA (polivinilacetato, gel de poliacrilamida) ou turfa sob diversas formas (pó, granular ou pastilha comprimida) trazem benefícios já comprovados em alguns países ^[12].

Dentre os substratos utilizados para a produção de inoculantes para leguminosas, o mais utilizado é a turfa, que reduzida a pó, apresenta algumas características importantes, das quais é importante citar três delas: a) é praticamente inerte, não afetando a viabilidade das bactérias, b) pelo alto teor de C orgânico, pode estimular o crescimento da bactéria inoculada durante as primeiras fases de incubação no substrato, c) é capaz de reter e elevar o teor de umidade, altamente necessário para o crescimento bacteriano quando o caldo é inoculado juntamente com as células bacterianas. O preparo de inoculantes, em linhas gerais, obedece à seqüência apresentada a seguir ^[18]:

- a) Seleção de estirpes de *Rhizobium* de alta eficiência de fixação, determinada em ensaios em vasos com solução nutritiva e isenta de N-mineral;
- b) Multiplicação das estirpes escolhidas, em meio de cultura líquida, em tanques hermeticamente fechados e previamente esterilizados. A multiplicação se desenvolve durante cinco a dez dias, sendo necessário, durante este tempo, o arejamento do meio líquido pela injeção de ar filtrado;
- c) Misturas da cultura assim obtidas, com o veículo inerte geralmente em turfa pulverizada, cujo pH foi corrigido com adição de calcário e posteriormente, esterilizadas, já empacotadas para favorecer a sobrevivência da cultura de microrganismo. A mistura se processa em tambores providos de pás rotativas ou pela pulverização da cultura de bactérias sobre uma fina camada de turfa distribuída em esteira rolante. A proporção de turfa e de cultura pura empregada no processo deve ser tal que a umidade final do produto esteja ao redor de 40%;
- d) Inoculação do produto por período variável de 24 a 48 horas;
- e) Embalagem, atualmente feita em sacos plásticos com capacidade de cerca de 250 g (por pacote) de produto, com tamanho – largura e comprimento no formato A8 e espessura de alguns milímetros (1 a 5 mm);
- f) Armazenamento, transporte e distribuição do produto, feitos sempre em condições que permitam que as células bacterianas misturadas à turfa permaneçam viáveis até o processo da inoculação nas sementes e posterior semeadura.

No Brasil, em que se pese o interesse de alguns órgãos oficiais na divulgação da prática de inoculação de sementes, o emprego de inoculantes ainda deixa muito a desejar, devido também aos critérios de controle de qualidade das turfas não serem muitas vezes seguidos, resultando em um produto de baixa qualidade, não obstante a existência, em nosso mercado, de alguns produtos comerciais destinados principalmente à inoculação da soja serem produzidas com alta qualidade técnica.

De um modo geral, a produção de inoculantes tem se apresentado tecnicamente com alguns problemas na fase de produção, como por ex., no preparo de caldos para o crescimento bacteriano, cujas perdas são atribuídas à contaminação. A esterilização adequada do material é altamente recomendada e os custos maiores que advém desse procedimento são diluídos em função da certeza do alto número de bactérias que a turfa esterilizada conteria.

De qualquer forma, nos estudos da sobrevivência do *Bradyrhizobium/Rhizobium* no solo, deve-se considerar os fatores bióticos e abióticos que agem sobre esse organismo, além dos longos períodos de armazenamento que podem provocar outro problema como a alta temperatura nas regiões tropicais, que tem sido apontado como o determinante da baixa sobrevivência do *Bradyrhizobium/Rhizobium* durante o transporte e a distribuição do produto ao agricultor.

Testes realizados pelo projeto INTSOY (Porto Rico – EUA) mostraram que essas preocupações são em parte infundadas. As características ou propriedades, tais como tolerância a pH baixo e a fatores correlacionados, resistência à seca através da produção de cápsulas bacterianas, tolerância a altas temperaturas e a condições salinas do solo seriam mais importantes, de acordo com a característica de cada área de estudo^[18].

Os fatores bióticos, tais como competição, antagonismo e predação, são também comuns em turfa não esterilizada e devem ser considerados na avaliação dos efeitos do antagonismo entre bactérias, fungos e actinobactérias, que poderiam ser amenizados

utilizando-se a esterilização prévia do material usado como substrato, até antes de viabilizar a seleção de estirpes mais eficientes e mais tolerantes a altas temperaturas.

Dependendo da turfa, as doses de radiação não são suficientes para a eliminação completa de microrganismos, especialmente os radio-resistentes ou os que apresentem outras formas de reprodução, mais resistentes à radiação (com exemplo, temos as formas de resistência das actinobactérias). Dessa forma, o número de bactérias inoculadas decresce muito rapidamente ao longo do seu armazenamento, muitas vezes devido à presença de produtores de compostos inibidores de microrganismos, por exemplo os antibióticos^[19].

A esterilização, portanto, deve ser mais efetiva na eliminação desses microrganismos, sem, no entanto, alterar o substrato^[19], isto é, a esterilização deve ser utilizada para melhorar a qualidade da turfa no substrato e no solo e portanto atualmente o uso da radiação ionizante 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 baixo teor de umidade, porém se as doses aplicadas forem sub-ótimas (como exemplo, 10 kGy), ocorrerá o aparecimento de microrganismos indesejáveis como os produtores de metabólitos antagônicos à sobrevivência dos rizóbios inoculados no substrato^[18, 19].

Desta maneira, a maioria dos países requer a esterilização do substrato (como exemplo a turfa) e dentre os diversos métodos de esterilização adotados para o acondicionamento dos substratos quando usados como veículos de bradirizóbios/rizóbios, o mais comumente usado tem sido a radiação gama por uma fonte de cobalto 60 (⁶⁰Co), com dose de radiação de 50 kGy.

Como ponto chave de uma boa qualidade dos substratos turfosos e dos microrganismos, deve-se considerar 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 com alta qualidade^[21]. Para a produção de inoculantes em larga escala industrial, a natureza da turfa, o número de pacotes, a quantidade contida em cada embalagem e o seu arranjo físico no tratamento de radiação, podem interferir no tempo necessário para obtenção de uma esterilização pré-inoculação completa. A aplicação dos fatores de qualidade no processo de esterilização pré-inoculação dos substratos tem produzido inoculantes superiores com elevado número de células de rizóbios capazes de nodular e fixar N em seu hospedeiro específico, com um mínimo ou sem contaminação alguma.

Nesta 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 característica do seu custo superior, portanto há a necessidade de uma solução alternativa tão boa quanto a radiação gama a partir de cobalto-60, mas mais econômica e efetiva para realizar as irradiações de substratos em larga escala.

Recentemente, novos dados vêm indicar que doses acima de 50 kGy devem ser usadas pois, dependendo do substrato há a necessidade de eliminação de actinomicetos, fungos e invertebrados em solos^[22] e outros microrganismos sobreviventes à radiação em turfas que são usualmente os gram-positivos e formadores de esporos tais como os actinomicetos e os *Bacillus* que são considerados mais resistentes à radiação ionizante^[23].

1.3.3. Esterilização da turfa usada como veículo na produção de inoculantes biológicos

O processamento de esterilização desse substrato tem sido regulamentado por lei no Brasil, mas desde 1967, com o trabalho pioneiro de Roughley e Vincent^[11], ficou evidenciado que substratos (veículos) esterilizados apresentavam maior capacidade de

suporte de populações, com elevação de muitas meias-vidas do produto inoculante. Nesses estudos, o uso de turfa esterilizada aumentou a qualidade do produto inoculante através da eliminação de contaminantes, um dos fatores de maior risco para a introdução da tecnologia da inoculação em leguminosas. Um outro fator a ser considerado é o destino do produto final, período após a produção na indústria, o armazenamento nas cooperativas e o transporte do inoculante ao longo da sua produção até o consumidor final, o produtor rural. Neste contexto, a esterilização prévia do substrato é ainda mais fundamental para garantir a viabilidade de maior número de células bacterianas dentro do seu prazo de validade.

O controle e a avaliação da qualidade do inoculante é feita geralmente com a contagem das células de *Rhizobium/Bradyrhizobium* viáveis no substrato, sendo este índice preciso para avaliação do potencial de inoculação do produto^[13]. No Brasil, há uma legislação que controla o número mínimo de células viáveis dentro do prazo de sua validade. Em outros países, como Austrália, Índia, Nova Zelândia, África do Sul, há um compromisso informal das empresas de participarem desse sistema de qualidade. Há, porém, uma grande preocupação em todos os setores produtivos de que a qualidade dos inoculantes não tem sido satisfatória.

Desde 1977, porém, a recomendação de Date e Roughley^[23] tem sido confirmada com o uso de substratos esterilizados, que têm garantido uma sobrevivência maior às estirpes inoculadas, ao redor de 100 vezes mais, sendo esta diferença ampliada ao longo do período de armazenamento^[24]. Em uma avaliação realizada com os principais 40 produtos inoculantes comerciais para leguminosas usando a turfa não esterilizada que foram produzidas na América do Norte, constatou-se que somente um dos inoculantes apresentou número de rizóbios (*Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* spp.) superior ao número de contaminantes^[23]. Os contaminantes mais frequentes foram as bactérias (de 10^9 a 10^{10} g⁻¹), os actinomicetos ou actinobactérias (de 10^8 a 10^9 g⁻¹) e os fungos (de 10^5 a 10^7 g⁻¹). Nestes estudos, observou-se que as actinobactérias contaminantes são capazes de inibir o crescimento de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ou de *R. meliloti*, estando estes presentes em todos os substratos das empresas produtoras^[24].

1.4. PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO

Nos ciclos das plantações e das transformações das colheitas em alimentos existem forças da natureza que reduzem os seus rendimentos, sendo uma delas a contaminação microbiana. A noção de que certos tipos de bactérias fazem mal a saúde ou são causadoras de doenças é bem antiga, mas o surgimento e o manejo de uma técnica que controlasse a vida destas bactérias, a bacteriologia, iniciou com os trabalhos de Louis Pasteur (1822-1895) e Robert Koch (1843-1910). Neste caso, o objetivo era eliminar os microrganismos patógenos ou evitar a contaminação microbiana no ser humano através do ar, da água e dos alimentos contaminados ingeridos. Com o tempo, a tecnologia da bacteriologia estendeu-se além da área médica e da saúde pública para ser aplicada na agricultura para aumentar a sua produtividade e subseqüentemente foi aplicado nas indústrias em geral, principalmente para a melhoria da qualidade dos alimentos.

Atualmente esta tecnologia está inserida na chamada indústria da biotecnologia, que tem evoluído e desenvolvido devido principalmente à procura do aumento de rendimentos e/ou redução de custos ou constantes prejuízos financeiros causados pela contaminação biológica e que levou a várias outras áreas produtivas como a indústria farmacêutica, de cosmética e da nanotecnologia além de muitas outras, a exigir uma remoção mais segura e completa destes microrganismos contaminantes. Portanto, a sua descontaminação ou sua eliminação, tem sido um objetivo constante e almejado pela indústria da biotecnologia que precisa manter o controle e o equilíbrio biológico nos seus processos existentes de produção industrial.

Existem vários graus de redução de carga microbiana e os termos específicos mais usados para definir cada nível de remoção dos microrganismos patogênicos, são apresentados na TAB. 2.

TABELA 2. Termos usados para definir os níveis de redução de carga microbiana^[25]

Classificação	Definição	Grau de remoção	Agentes mais utilizados	Sinônimos
Limpeza	Não mata, só remove fisicamente.	Pode remover ou até matar alguns germes da colônia gerando assim no local uma "segunda geração de lixos"	Água e sabão, Detergentes, Ultrasom Sanitizantes	Assepsia Higienização com agente bacteriostático (inibe o crescimento da bactéria mas não os mata)
Desinfestação	Combate os veículos transmissores de pragas (vetores animais).	Ação de extermínio somente aos vetores transmissores de doenças e moléstias como roedores, pequenos animais e insetos (mosquitos, pulgas, piolhos, etc).	Processos físicos, biológicos (predadores, parasitas, vírus) e químicos (agrotóxicos, herbicidas, pesticidas)	Desinsetização Detetização
Desinfecção	Remoção dos organismos em fase ativa de crescimento, porém sem a inativação ou eliminação total de todos os microrganismos existentes,.	É o caso de redução do número de microrganismos patogênicos até o ponto de não poder mais causar um mal, envolve a remoção dos patógenos vegetativos não esporulantes, seguindo-se os padrões de saúde pública.	Antissépticos Desinfetantes Germicidas Sanitização Cloração	Descontaminação Pasteurização (de alimentos) Sanitização
Esterilização	Mata as bactérias e livra todo tipo de vida ou ficar livre de todos os microrganismos, incluindo os esporos bacterianos (formas mais resistentes).	Destruição de todos os organismos vivos em nível biológico, não implica a inativação do total das enzimas celulares, toxinas, etc. Portanto. considera-se normalmente que somente sobreviverá um micróbio em um milhão de eliminados.	Calor (30 min 170°C), Vapor e pressão (autoclavagem) Radiação ultravioleta e radiação ionizante Químico (cloro e óxido de etileno)	Sanitização completa

1.4.1. Meios para executar os processos de esterilização

Segundo a definição apresentada na TAB. 2, a palavra estéril/esterilidade, significa ficar livre de todos os organismos vivos, enquanto que a palavra esterilização, significa o processo de destruição de todos tipos e formas de microrganismos, isto é, a eliminação absoluta, a completa destruição ou a remoção de todas as formas de vida, porém o seu significado prático e real não tem este significado de todo absoluto. O objetivo de qualquer tratamento de esterilização é produzir a esterilidade nos materiais tratados, mas com poucas ou nenhuma mudança estrutural. Na verdade a esterilidade é um conceito probabilístico que não se importa com quantas vezes os testes foram realizados, pois suas conclusões estão limitadas ao tamanho que cada amostra tem ao ser analisada, isto é, ela depende principalmente do nível inicial de contaminação^[26].

Portanto, podemos definir que o conceito de esterilidade na prática pode ser descrito da seguinte forma^[26]: "A esterilidade, na prática, é a condição produzida pela:

- (1) a escolha de um método confiável de esterilização,
- (2) pela boa amostragem e confirmação estatística dos resultados obtidos através dos testes realizados nas amostras selecionadas aleatoriamente e
- (3) pelas boas práticas de manipulação em todo o processo que já tenham sido confirmadas historicamente".

A esterilização começa quando uma população de organismos viáveis está sendo reduzida gradualmente nos seus valores numéricos durante certo período de tempo e sob uma dada condição, até que haja a probabilidade de menos de um sobreviver. Neste caso há um relacionamento logarítmico entre o número de microrganismos viáveis e as condições em que esta população, durante certo período de tempo, esteja sob dada condição de esterilização, ou seja, o número de organismos viáveis é reduzido em 90% em um período dado de tempo e em seguida sob uma nova exposição para um outro período de tempo igual, reduz-se à população de 90% mais uma vez, e assim por diante.

Isto é expresso geralmente nos termos dos valores de D (tempo em minutos para uma dada temperatura é necessário para que haja uma redução da população viável por um fator de 10% de seu valor prévio). Por exemplo, para um organismo com um valor de D de quatro minutos, a população será reduzida em 90%, em quatro minutos, sob uma dada condição especificada de esterilização. Para a maioria das condições, é recomendado que se reduza a probabilidade de um microorganismo sobreviver para menos de um em um milhão. Isso é geralmente considerado como o nível de garantia da esterilidade SAL (do inglês Safety Assurance Level - SAL) de 10^{-6} . Um SAL de 10^{-6} significa a probabilidade estatística, de que não mais de um em cada milhão da população carrega um organismo viável. A importância deste valor pode ser considerada no caso de esterilização de um alimento enlatado, quando a produção é anual em larga escala. Obviamente, não é prático testar toda a produção para demonstrar que este nível de garantia de esterilidade tenha sido obtido, pois além do mais há a possibilidade de contaminação durante os testes de esterilidade e de se concluir falsamente que um produto estéril não seja estéril^[26].

Quando o número médio de microrganismos de um dado tipo puder ser determinado, toda a produção carregará um nível desconhecido de contaminação, e a resistência destes organismos ao processo de esterilização não será tão fácil de determinar. Conseqüentemente, um simples teste de esterilidade de um produto naturalmente contaminado não pode ser tão facilmente usado para se obter o nível de SAL desejado. Nas condições reais, não é fácil resolver este problema, isto é, para definir a condição de esterilidade total. Portanto, é empregado, neste texto, o termo "esterilização", mas neste caso, não há plena garantia que seja atingida a esterilidade total, como no caso de solos ou substratos turfosos. Neste caso, poder-se-ia empregar o termo "processo de esterilização", como o que explique melhor a realização da "redução da carga microbiana", apesar de mesmo no meio técnico-científico ainda ser largamente empregado o termo "esterilização". Portanto, para realizar o processo de esterilização ou de redução de carga microbiana, os seguintes métodos práticos são os mais amplamente utilizados^[27]:

Aquecimento utilizando-se de calor

(a) Calor úmido (do vapor) - O vapor usado como fonte de calor deve ser saturado de maneira que uma pequena queda de temperatura provoque a liberação do vapor de condensação. A esterilização pode ser em lotes (processos descontínuos) ou em fluxo contínuo.

Os processos descontínuos ou em lotes mais conhecidos são:

- Autoclave – utilizados mais em ambientes do tipo laboratórios cujos volumes não passam de dezenas de litros.
- Aquecimento indireto por vapor – é feita através da passagem do vapor de água através de uma camisa ou de uma espiral onde ocorre a troca de calor.
- Injeção direta de vapor – executado por tubos e válvulas inserido diretamente nos processos dos grandes fermentadores, por exemplo.

A esterilização por *fluxo continuo* está embutida nos processos industriais e tem a vantagem de ser rápida e de melhorar a qualidade do meio através das três etapas características do seu ciclo que são o aquecimento rápido, a manutenção durante um certo tempo da temperatura de esterilização e finalizando com um resfriamento rápido via:

- indireta – utiliza-se de trocadores de calor.
- direta – utiliza-se de um misturador do tipo Venturi para injetar o vapor diretamente no meio que flue.

(b) Calor Seco – utiliza-se de fornos providos de ventiladores para a circulação do ar quente para esterilização, geralmente de material estável e de instrumentos. Devido a grande utilização do método de esterilização produzido através de calor, particularmente devido à umidade de vapor, ela é conhecida como o método mais efetivo e confiável de esterilização, tanto que ela é a mais aplicada na indústria de alimentos, a fim de realizar a pasteurização (tratamento térmico relativamente suave, utilizando temperaturas inferiores a 100 °C, com o objetivo da eliminação da flora microbiana

patogênica sem alterar as características do alimento tratado) e para outros tratamentos, como por exemplo, o branqueamento, a tindalização, a apertização e para outros pré-tratamentos como evaporação, desidratação e congelamento e outras operações de conservação em geral, mas mesmo assim ela pode se tornar inadequada devido a qualquer um dos seguintes fatores:

- Medição incorreta de pressão
- Fuga de ar
- Agrupamentos de amostras impróprios
- Tempo insuficiente para aquecer e atingir a temperatura desejada
- Embalagem “blindada” e indevidamente insensível
- Material inadequado para ser usado na esterilização por vapor
- Presença de microrganismos desconhecidos resistentes

É extremamente importante que todas variáveis estejam sob controle, senão até os melhores processos de esterilização não funcionam corretamente.

Uso de agentes químicos na forma de soluções, vapores e gases

- Óxido de etileno
- Formaldeído
- Peróxido de hidrogênio
- E outros, como óxido de propileno, β -propionolactona, brometo de metila, etc.

Os agentes químicos são mais aplicados como agentes desinfestantes do que para esterilização química, cujos seguintes fatores são importantes:

- Concentração adequada do agente
- Toxicidade e difusibilidade
- Duração e temperatura adequada
- Condição de umidade
- Condensação e/ou polimerização do agente
- Influência da matéria orgânica no agente

Métodos Mecânicos

- Filtração
- Centrifugação
- Outros (absorção, sedimentação, etc.)

Os métodos mecânicos não matam mas removem fisicamente os microrganismos. Para os vários tipos de filtros, estes devem ser esterilizados previamente, antes da montagem no processo, por algum outro método. Os métodos mecânicos são considerados antieconômicos comparativamente com os térmicos, quando usados em larga escala.

Irradiação

- Luz ultravioleta, microondas e vibrações ultra-sônicas
- Radiação ionizante por raios gama, raios-X e feixe de elétrons.

1.4.2. Tipos de radiações ionizantes utilizados nos processamentos industriais

Na interação da radiação com a matéria ou substrato turfosos, ocorrem reações complexas em frações de segundos, quando o material é atravessado pelo campo de radiação. O bombardeamento dos produtos ou por (a) radiação gama ou (b) por elétrons ou (c) por raios X, são técnicas efetivas no processamento por radiação ionizante, sendo a principal diferença entre essas técnicas, o tipo da radiação primária que interage com o produto a ser tratado, conforme mostrado na FIG. 6. Após a primeira interação, o mecanismo de transporte de energia no interior do produto é o mesmo para os três tipos de radiação, prevalecendo os elétrons secundários (elétrons expulsos de suas órbitas) que produzem a maioria das excitações e ionizações, provocando os efeitos químicos^[28].

FIGURA 6. Ilustração de tipos de radiação ionizante utilizadas em processos industriais e comparação do nível de penetração entre raios gama (cobalto-60), elétrons e raios-X^[29].

A radiação eletromagnética gama através de ^{60}Co e Raios X, assim como a radiação ionizante produzida por feixe de elétrons, são capazes de promover reações químicas, físicas e biológicas de interesse no substrato. Para ter uma validade prática, em geral esta radiação deve:

- penetrar o meio a ser tratado com certa uniformidade e ser quase que totalmente absorvido pelo substrato tratado,
- não induzir radiação,
- não induzir alterações nas propriedades do substrato a não ser provocar danos letais aos microrganismos,
- ter controle confiável, operação segura,
- custo razoável de processamento em função da fonte de radiação escolhida.

Os tipos de radiações ionizantes considerados são:

a) Fontes gama

Os irradiadores industriais utilizam as fontes seladas radiotivas industriais de cobalto-60 (^{60}Co), tipos C-188 e RSL-2089, das empresas canadense MDS Nordion Ion Technologies e inglesa Reviss-Puridec Irradiation Technologies, respectivamente, são produzidas a partir do cobalto-59 metálico, disponível na crosta terrestre (0,001%), com a pureza de 99,98%, recoberto com níquel e encapsulado em Zircaloy. As cápsulas soldadas pelo processo TIG (Tungsten Inert Gas), as quais contém pequenos cilindros sinterizados (“pellets”) de cobalto-59 são ativadas em reatores nucleares tipo CANDU. Após o período de 18 a 25 meses de irradiação (função do fluxo neutrônico do reator), obtém-se o cobalto-60, com atividade específica de 4 TBq/g (120 Ci/g), necessária nos irradiadores industriais para o processamento por radiação gama. As cápsulas de cobalto-60 são então duplamente encapsuladas em aço inoxidável AISI 316L, resistente à corrosão, em conformidade com as Normas ISO 2919 e ISO 9978, conforme é mostrado na FIG. 7^[30].

FIGURA 7. Fontes radioativas tipo C-188, fabricadas pela empresa canadense MDS Nordion Ion Technologies^[30].

Os lápis de ^{60}Co e lápis frios em aço inoxidável AISI 316L, ou seja, sem ^{60}Co (“dummies”), são distribuídos de forma planejada, em posições predeterminadas nos magazines dos “racks” de fontes radioativas, conforme é mostrado na FIG. 8^[30]. As configurações dos magazines e dos “racks” de fontes dependem do tipo dos irradiadores gama industriais. Com o planejamento e distribuição dos lápis obtêm-se melhores eficiências e fatores de uniformidade de dose por “rack”, para diferentes densidades dos produtos a serem processados por radiação gama.

FIGURA 8. Montagem esquemática do “rack” de fontes radioativas dos irradiadores gama industriais, a partir dos cilindros sinterizados de ^{59}Co (99,98%), cápsulas de Zircaloy com ^{60}Co , lápis de ^{60}Co e magazines^[30].

O cobalto-60 (^{60}Co) decai por duas possíveis emissões betas a níquel (^{60}Ni) estável com energias de 1,486 e 0,313 MeV, e dois fótons, com energias de 1,17 e 1,33 MeV, os quais são responsáveis pelo processamento dos materiais por radiação, nos irradiadores gama. A meia-vida do cobalto-60 é 5,261 anos, ou seja, há uma redução de 12,34% da atividade ao ano. Assim novos lápis de ^{60}Co devem ser adicionados aos “racks” de fontes, se desejar manter a atividade total requerida pelo irradiador gama. Os lápis de ^{60}Co são eventualmente removidos dos “racks” de fontes e retornam ao fabricante, após a vida útil de 20 anos. Na FIG. 9 é mostrado o esquema do decaimento radioativo para o cobalto-60^[30].

FIGURA 9. Esquema do decaimento radioativo para o cobalto-60^[30].

b) Elétrons

Os elétrons são produzidos em aceleradores de elétrons, que podem ser definidos como sistemas onde se estabelece um potencial de alta voltagem entre um cátodo e um ânodo. Os aceleradores de elétrons são máquinas semelhantes a um tubo de televisão, onde o diferencial é a tensão de aceleração do

feixe de elétrons. Para o televisor, a tensão é da ordem de 20.000 Volts, enquanto para os aceleradores industriais esta tensão varia entre 200.000 Volts a 10.000.000 Volts, cabendo, neste momento, mostrar o seu esquema de funcionamento conforme a FIG. 10.

FIGURA 10. Desenho esquemático das principais estruturas que compõem o acelerador de elétrons.

É importante mencionar que os aceleradores de elétrons industriais disponíveis no mercado mundial são projetados e fabricados para usos específicos, podendo-se classificar os aceleradores por faixa de energia que definem suas características construtivas.

Os aceleradores de elétrons para aplicação industrial cobrem a faixa de energia de 0,3 MeV a 10 MeV, sendo que na faixa de 0,3 MeV a 0,5 MeV se encontram os aceleradores de baixa energia, tipo transformador no qual o potencial de aceleração é obtido a partir de indução eletromagnética como nos transformadores de tensão convencionais^[31]. A principal utilização destes aceleradores é na reticulação de polímeros constituintes de filmes finos para embalagens tipo termoretrátil e também na cura de tintas e vernizes para recolhimento de diversos substratos.

Entre as faixas de baixa e alta energia, de 0,5 MeV a 3 MeV encontram-se as máquinas do tipo ICT (“isolated core transform”) e Dynamitron fabricadas pela Radiation Dynames Inc. USA; são máquinas do tipo DC (corrente direta) que por serem máquinas industriais apresentam robustez e alta confiabilidade, permitindo uma disponibilidade operacional de no mínimo 8.000 horas por ano. As principais aplicações destes aceleradores de elétrons estão centradas na modificação da propriedade de polímeros, predominando a reticulação de isolantes de fios e cabos e de filmes para embalagens e pneus^[31].

Na faixa de 3 MeV a 10 MeV encontram-se os aceleradores lineares do tipo Linac, adequados para aplicação na esterilização de produtos de pequena espessura, onde ondas eletromagnéticas são, injetadas em uma cavidade formando um guia de onda, permitindo em seu interior o surgimento de campos elétricos que se repetem em fase com o deslocamento dos elétrons, acelerando-os até altas energias (superior a 10 MeV)^[31]. Recentemente foi lançado comercialmente pela IBA (Bélgica) o acelerador tipo Rodhotron com eficiência superior aos Linacs, onde os elétrons descrevem órbitas circulares e ganham um incremento de energia a cada passagem pelo centro do acelerador até serem extraídos em direção ao alvo.

c) Raio-X

A geração dos raios X é feita em aceleradores^[32], onde o feixe de elétrons incide sobre um alvo de material pesado gerando, por efeito de freamento, os raios X, este efeito também é conhecido como efeito Bremsstrahlung. A eficiência desse tipo de gerador é bastante baixa, sendo que não mais que 10% de energia dos elétrons incidentes se convertem em energia na forma de ondas eletromagnéticas (raios X).

1.4.3. Equipamentos utilizados como fontes de radiações no processo de esterilização

Os irradiadores que utilizam como fontes os radioisótopos cobalto-60 e cério-137, foram, inicialmente, os mais adotados no processamento de esterilização,

devido à sua inerente simplicidade, facilidade de controle e às quebras quase inexistentes. Desse modo, devido à alta confiabilidade do processamento via radiação com fontes isotópicas, esse método tem sido considerado como o melhor que qualquer outro método de esterilização, pois o único fator que precisa ser controlado é a velocidade da esteira transportadora. Quanto ao desempenho dos aceleradores de elétrons como fonte de radiação, elas não foram as mais utilizadas inicialmente devido às dificuldades de serem controladas, pelo grande número de variáveis envolvidas como a energia, a varredura, a largura, a intensidade do feixe de corrente, a velocidade da esteira transportadora que influenciavam na dose absorvida. Outras dificuldades também são atribuídas ao fato destas máquinas possuírem sistemas eletrônicos complexos que poderiam necessitar de reparos mais constantes.

Porém, atualmente os feixes de elétrons produzidos por aceleradoras tem sido os mais usados devido às vantagens inerentes à preocupação ambiental e de radioatividade, como a não utilização do cézio-137 como fonte industrial devido este ser um sal solúvel e de fácil contaminação, apesar de apresentar mais vantagens técnicas sobre outras fontes radioativas. Como exemplo, a legislação brasileira permite, para irradiar alimentos, o uso de fontes do radioisótopo cobalto-60 e aceleradores de elétrons^[33]. A TAB. 4 apresenta as vantagens e desvantagens comparativas do uso da fonte de radiação Co-60 e de feixe de elétrons no processo de esterilização.

Além do mais, com o grande desenvolvimento tecnológico nuclear, há a evolução nas aplicações industriais que anteriormente usavam mais as radiações ionizantes a partir das fontes isotópicas para uma nova forma de esterilização com o maior uso das máquinas aceleradoras lineares, que passam a ser uma nova forma na escala industrial de esterilização, pois com o uso do feixe de elétrons de alta energia, pode-se ter uma esterilização mais rápida, enquanto que a esterilização com raios gama

é um processo mais demorado. Mas como os raios gama têm uma capacidade de penetração muito maior do que os elétrons de alta energia (FIG. 6), os elétrons são mais utilizados para a esterilização de material com formato predominante mais de casca ou volumes com predominância de duas dimensões.

Na seleção de fonte apropriada de radiação ionizante para aplicação em processos de esterilização, devem ser consideradas as variáveis apresentadas na TAB. 3, de acordo com a(s) necessidades em cada caso^[33].

TABELA 3. Comparação das fontes de radiação Co-60 e feixe de elétrons para esterilização^[33].

	Cobalto-60	Feixe de elétrons
Penetrabilidade	Boa penetração	Baixo poder de penetração
Operabilidade	Multidirecional, não pode ser focado, flexionado e escaneado a não ser por colimação, com implicações na eficiência	Unidirecional estreito, mas pode ser focado, flexionado e escaneado com mais flexibilidade na eficiência, mas com consumo alto de energia
Flexibilidade	Inflexível, não pode ser desligado	Flexível, pode ser desligado (desperdício minimizado)
Escalabilidade	Crescimento escalar mais fácil (começa com pouca atividade e pode crescer, se necessário)	Favorece grandes instalações pois não permite o crescimento escalar (a máquina é um sistema fechado com a potência fixada)
Consumo de energia	Insensível ao consumo de energia elétrica, baixo e relativamente barato	Sensível ao consumo de energia elétrica, alto e relativamente caro
Nível tecnológico	Simple e confiável	Novo e tecnologia sofisticada que está aumentando o seu uso regularmente
Aceitabilidade	Utiliza material radioativo	A fonte de radiação pode ser desligada
Relação custo-benefício	Linear	Não linear

Penetração da radiação ionizante

Para todas as fontes de radiação ionizante a penetração é inversamente proporcional a densidade do produto a ser beneficiado. A espessura do material a ser tratado e a sua densidade são fatores determinantes na aplicação gama "versus" feixe de elétrons. O poder de penetração do feixe de elétrons é menor do que o do gama. Por exemplo, para um material com densidade de 1 g/cm³ (semelhante a da água) o poder de penetração de um feixe de elétrons com energia de 10 MeV é de 5 cm, enquanto que para um irradiador gama utilizando cobalto-60 com energia média de 1,25 MeV é de cerca de 50 cm^[31].

Taxa de Dose

Devido à característica do decaimento radioativo, o processamento utilizando radiação gama (cobalto-60) torna-o mais lento do que os que utilizam aceleradores de elétrons. Como exemplo, os irradiadores gama utilizados para esterilização e/ou redução de carga microbiana de diversos produtos e que operam em escala comercial, apresentam uma taxa de dose (dose absorvida por unidade de tempo) em torno de 20 kGy/h em contraste com os aceleradores que apresentam uma taxa de dose muito maior chegando a 20 kGy/seg (72.000 kGy/h) para um acelerador de energia de 10MeV e potência de 50 kW^[31].

As considerações acima são determinantes do ponto de vista de desempenho técnico do processo a ser utilizado e dos valores dos exemplos acima apresentados, observa-se que a taxa de dose oferecida pelo acelerador é predominante na seleção da fonte de irradiação. Além das variáveis técnicas apresentadas, outros fatores dos aceleradores de elétrons com relação as fontes radioativas são importantes na definição da fonte de irradiação, merecendo serem citados: otimização do capital investido, custos operacionais, segurança de operação e nível de aceitação pelo público.

1.5. ANÁLISE ECONÔMICA NO USO DA TECNOLOGIA DAS RADIAÇÕES (GAMA E FEIXE ELÉTRONS) PARA PRODUÇÃO DE INOCULANTES BIOLÓGICOS

A esterilização por radiação gama de substrato turfoso tem sido consolidada comercialmente no Brasil, após a implantação de irradiadores comerciais no Estado de São Paulo e a obtenção de resultados muito superiores em relação a outras técnicas de esterilização, por exemplo, por calor úmido através da autoclavagem, devido ao seu maior consumo de tempo, por ser laborioso e de alto custo, além da indicação de efeito fitotóxico pela liberação de metais, com a elevação da pressão e temperatura durante a esterilização. A esterilização através da radiação gama, a partir de fontes de cobalto 60 (^{60}Co), tem sido a mais utilizada para a esterilização de produtos médicos, farmacêuticos, biológicos e solos.

O projeto que utiliza feixe de elétrons será viável economicamente se existir lucro econômico ou benefícios associados à melhoria da qualidade técnica ou aspectos ambientais e, neste caso, o projeto de irradiação via feixe de elétrons poderá ser adotado no lugar da radiação gama. Para tanto, é necessário inicialmente obter os custos em relação ao método convencional de esterilização via radiação gama; em seguida, é necessário calcular os custos em caso da adoção do processo de esterilização via radiação de feixe de elétrons.

Finalmente, recomenda-se comparar os custos totais do processo de esterilização por feixe de elétrons com o do processo tradicional via raios gama, chegando-se assim no resultado da viabilidade econômica ou não. Podem-se definir os benefícios trazidos por esta substituição com a transformação de todas as macro-vantagens (de âmbito mais abrangente) em valores monetários. Estes valores numéricos obtidos das estimativas, mesmo que sejam considerados relativamente grosseiros, podem ser utilizados para definir se o processo de esterilização via feixe de elétrons da turfa é um desenvolvimento que incrementa a inovação no processo de esterilização do substrato turfa ao serem comparados os seus custos totais referentes com os seus benefícios estimados relativos. Se positivos, esses resultados contribuirão para um novo paradigma, a utilização da tecnologia de radiação por feixe de elétrons no País^[34].

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação é avaliar a eficiência e os custos do processo de irradiação por feixe de elétrons, para o tratamento de esterilização ou redução de carga microbiana em turfa comercial brasileira, utilizada na produção de inoculantes agrícolas para aplicação em leguminosas, comparando com a técnica de utilização de raios gama, convencionalmente utilizada para essa finalidade.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar amostras de substrato turfoso brasileiro, como veículo de microrganismos para ser inoculado em leguminosas, especificamente aplicado em *Rhizobium tropici*, estirpe CM-01, microsimbionte do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.);
- Determinar a eficiência das doses de radiação por raios gama do cobalto-60 (^{60}Co) e por feixe de elétrons quanto à capacidade de fornecer nutrientes para a bactéria inoculante e ao mesmo tempo, de supressão de contaminantes (actinobactérias) durante duas fases – curta (até 30 dias) e longa (até 6 meses);

3. MATERIAL E MÉTODOS

No Brasil, os pesquisadores que atuam na área de fixação biológica do nitrogênio (FBN) têm se preocupado com a eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas tropicais e de clima temperado, especialmente de grãos e forrageiras, tendo formado, em 1985, a RELARE – Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia e Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola, com a finalidade de avaliar e recomendar estirpes, inoculantes e outras tecnologias ligadas ao processo da FBN. Nas normas elaboradas pela RELARE, há a descrição de métodos e a definição de termos que devem ser considerados na avaliação da qualidade dos inoculantes^[35].

As recomendações técnicas e/ou suas revisões são precedidas de análise conjunta dos resultados obtidos, por instituições de pesquisa credenciadas junto ao Ministério da Agricultura e Abastecimento, por ocasião da apresentação dos resultados nas RELAREs. Toda estirpe, para ser recomendada e registrada no Ministério da Agricultura e do Abastecimento, advinda de inoculantes microbianos de interesse agrícola, deverá ser, previamente, discutida e aprovada na RELARE. Novos produtos, contendo estirpes, tecnologia e outras recomendações discutidas e aprovadas nas RELAREs, deverão receber parecer provisório para fins de registro pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Para obtenção do parecer definitivo deverão ser submetidos a testes de eficiência agrônômica.

Seguindo as normas da RELARE, a irradiação prévia de substrato deve ser feita através da radiação gama a uma dose mínima de 50 kGy, a um custo viável, com a finalidade de eliminação de fungos, bactérias antagonistas ao *Rhizobium* e eliminação das actinobactérias, produtoras de antibióticos por exemplo.

No presente trabalho, foram utilizados substratos turfosos de marca brasileira comercial e esterilizada através de radiação ionizante utilizando feixe de elétrons, em seguida inoculado com *Rhizobium*. Os resultados da contagem das células viáveis destes microrganismos inoculados ao longo de períodos curtos e longos de armazenamento foram monitorados em duas séries de ensaios:

Ensaio 1 – incubações de 0, 7, 14, 28 dias (fase curta) e 150, 180 e 210 dias (fase longa) e Ensaio 2 – incubações de 10, 20 e 30 dias, com os seguintes objetivos:

- Contagem curta (7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias) foi realizada para acompanhar a sobrevivência das células viáveis microbianas que se formaram.
- Contagem longa (5 meses, 6 meses e 7 meses) foi realizada para verificar se há a viabilidade de garantir a qualidade necessária de 6 meses ao consumidor final após a inoculação.

No Ensaio 1 as amostras foram inoculadas com a estirpe CM-01 *gusA*⁺, que possui o gene marcador *gusA*⁺, associado à presença de p-nitrofenol produzido pela atividade de β -glucuronidase do substrato p-nitrofenil glucuronide gerando a coloração azul e no Ensaio 2 as amostras foram inoculadas com a estirpe CM-01 *celB*⁺, cujo gene marcador utiliza IPTG (isopropiltiogalactoside) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside), produzindo coloração azul intenso.

Dessa forma, foram também aplicadas, segundo a recomendação da RELARE, as doses de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 kGy com o propósito de comparar e avaliar a eficiência do método de irradiação por feixe de elétrons em relação à

radiação gama. Os tratamentos de irradiação de substratos turfosos foram realizados, com seis repetições (Ensaio 1) e cinco repetições (Ensaio 2).

3.1. SUBSTRATO TURFOSO

Para fabricar o inoculante com alta qualidade microbiana é importante que o substrato turfoso seja pré-embalado e irradiado, antes da inoculação, pois isto permite que haja uma multiplicação microbiana desejada dentro de uma situação menos competitiva e conseqüentemente, garantindo a sua manutenção em um ambiente mais rico em nutrientes. O substrato turfoso utilizado, baseado em complexos de carbono, foi obtido de tradicionais fabricantes brasileiros de inoculantes agrícolas, já pré-embalado (configuração do pacote igual a 20,0 cm x 15,0 cm e espessura de $1,0 \pm 0,2$ cm) em embalagem do tipo pacote (plástico de polietileno com 50 μ m de espessura), contendo 150-200 gramas de turfa triturada e peneirada (com umidade média de 23% e densidade média total de $0,45 \text{ g/cm}^3$). Na FIG. 11 são mostradas as embalagens contendo o substrato turfoso, inoculado e não inoculado. Neste estudo, foi empregada a palavra turfa como sinônimo de substrato turfoso.

FIGURA 11. Embalagens do substrato turfoso comercial, tendo à esquerda um pacote não inoculado e à direita, um pacote de turfa irradiada a 30 kGy, inoculado com *Rhizobium tropici* CM-01 *celB*⁺.

3.2. IRRADIAÇÕES

Para a irradiação da turfa, foi utilizado o irradiador gama de Cobalto-60^[36] e o acelerador industrial de feixe de elétrons^[37] do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) em São Paulo.

3.2.1. Irradiador gama

O CTR do IPEN possui um irradiador de Cobalto-60 do tipo Gammacell 220 apresentado na FIG. 12, que durante as irradiações, apresentava uma atividade de 6.261Ci e uma taxa de dose de 5,1kGy/h. Esse irradiador possui 48 lápis de ⁶⁰Co de 20cm de altura que circundam internamente a câmara primária totalmente isolada; essa disposição do material radioativo, apresentada na FIG. 13, garante uma certa uniformidade de dose numa altura de 10 cm do material pois as regiões superior e inferior do cilindro recebem uma dose 15% menor. As amostras são colocadas na câmara secundária, com dimensões limitadas a altura de 20,47 cm por diâmetro de 15,49 cm e volume total de 3,9 litros, utilizando-se na base desta câmara um calço de isopor para centralização. A câmara secundária desce até a meia altura da fonte por um sistema de elevador numa velocidade de 2,8 m/s. O tempo de irradiação para cada alvo foi calculado em função da taxa de dose do irradiador.

FIGURA 12. A unidade de irradiação de Cobalto 60, Gammacell 220, instalado no CTR - IPEN.

O irradiador tipo Gammacell 220 é autoblindado de Categoria I segundo classificação da International Atomic Energy Agency (AIEA) – Radiation Safety of Gamma and Eletron Irradiation Facilities – Safety Series 107, Viena (1992).

FIGURA 13. Irradiador de Cobalto-60 com 48 lápis e suporte de montagem das fontes^[36].

Para a irradiação, as amostras foram agrupadas em 5 embalagens contendo cada uma 7 unidades de substrato turfoso e irradiadas nas doses previamente estabelecidas de 10, 20, 30, 40 e 50 kGy. A disposição das 5 embalagens antes de colocar no irradiador é conforme mostrada na FIG. 14.

Sacos contendo 7
amostras/pacote

FIGURA 14. Processamento de irradiação da turfa pelo irradiador Gammacell 220.

3.2.2. Acelerador industrial de elétrons

Procurou-se no presente trabalho estudar no acelerador industrial de elétrons, a melhor condição de operação de modo a otimizar os parâmetros de operação e minimizar o custo unitário para o beneficiamento da turfa.

No caso do acelerador industrial de elétrons, tipo Dynamitron, instalado no IPEN, o esquema elétrico principal é indicado na FIG. 15, onde o circuito multiplicador de tensão é alimentado por um transformador que opera com alta frequência (para minimizar os valores dos capacitores) e voltagem, da ordem de 100 kHz e 100kV, operando em radiofrequência (R.F.) através dos eletrodos A e B, carregando os capacitores C_1 ; C_2 a C_n constituídos pelos anéis de corona e os próprios eletrodos de R.F., formando os sucessivos circuitos dobradores de tensão ^[37].

No acelerador industrial de elétrons, tipo Dynamitron, uma vez estabelecida a tensão no terminal de alta tensão indicada na FIG. 15, os elétrons são gerados por meio de aquecimento de um filamento de tungstênio, onde são acelerados em um tubo chamado de acelerador, à velocidade próximas a da luz (cerca de 99% do seu valor, ou seja, a uma velocidade próxima a 300.000 km/s). A pressão no interior do tubo acelerador é de ordem de 10^{-6} mmHg. Os elétrons após serem acelerados e acumularem energia cinética no interior do tubo acelerador, são focalizados e em seguida defletidos por meio de um campo magnético oscilante, possibilitando um ajuste na largura de varredura do feixe, e finalmente atravessando uma janela de titânio (com espessura da ordem de 50 microns), abandonando a região com vácuo, incidindo nos produtos a serem beneficiados.

O acelerador industrial de elétrons do IPEN opera com os seguintes parâmetros^[37]:

- Tensão de alimentação: 440 V;
- Frequência do circuito oscilador (radiofrequência): 100 kHz;
- Tensão de circuito oscilador: 100 kV;
- Tensão máxima do acelerador de feixes de elétrons (tensão de aceleração dos elétrons): 1,5 MeV;
- Corrente máxima do feixe de elétrons: 25 mA;
- Potência máxima do feixe de elétrons (produto da tensão máxima de aceleração de 1,5 MeV, com o valor da corrente máxima do feixe de elétrons 25 mA: 37,5 kW;
- Largura ajustável do feixe de elétrons: de 30 cm a 120 cm;
- Frequência de varredura do feixe de elétrons: 100 Hz;
- Diâmetro do feixe de elétrons ao incidir nos materiais a uma distância média de 20 cm da janela de titânio: 2 cm

FIGURA 15. Diagrama funcional do acelerador industrial de elétrons tipo Dynamitron, da Radiation Dynamics Inc.^[37].

As amostras de turfa, durante a irradiação, foram posicionadas em bandejas conforme disposição apresentada na FIG. 16, após a primeira passagem sob o feixe de elétrons do acelerador, estas amostras foram manualmente invertidas (180°) e retornaram para novo processo de irradiação de modo a garantir que o feixe de elétrons do acelerador, utilizado com energia de 1,5 MeV, atingisse toda a espessura da embalagem contendo a turfa..

FIGURA 16. Irradiação dos pacotes de turfas no acelerador de elétrons.

Os parâmetros de operação do acelerador foram:

- tensão de aceleração dos elétrons: 1,5 MeV
- corrente de feixe de elétrons: variável de acordo com a dose requerida
- largura de feixe de elétrons: 100 cm
- frequência de varredura do feixe de elétrons: 100 Hz
- velocidade das bandejas: 6,72 m/min

3.2.3. A Dosimetria no controle do processo de irradiação

O dosímetro e o correspondente sistema de leitura utilizados foram os que são normalmente aplicados nos processos de irradiação com doses altas como os dosímetros por absorção ótica tipo triacetato de celulose (CTA) e a correspondente leitura por espectrofotometria, usando o espectrofotômetro marca Shimadzu^[38].

Dosímetros de triacetato de celulose (CTA)

São rolos de filmes fabricados pela Fuji Film Co do Japão, com 100 m de comprimento, 0,8 cm de largura e 0,125 mm de espessura média. A sua composição química é de 85% de triacetato de celulose ($C_{12}H_{16}O_6$) e 15% de trifenilfosfato ($C_{18}H_{15}PO_4$) que age como incorporador do filme e aditivo estabilizador da absorbância, após a irradiação (FIG. 17). Possui densidade de $1,32 \text{ g cm}^{-3}$ e é recomendável que a sua aplicação seja feita para leitura de doses de radiação na faixa de 10 kGy até 300 kGy^[39].

FIGURA 17. Sistema contendo rolo de filme e suporte ou pacote para utilização de filmes de triacetato de celulose.

Espectrofotômetro utilizado nas leituras dos dosímetros

Foi utilizado o espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo UV-1601PC, que está conectado a um microcomputador com sistema operacional e programas aplicativos relacionados em padrão Windows da Microsoft. Com este aparelho, fez-se a leitura da absorbância dos filmes CTA no comprimento de onda em 280 nm (FIG. 18) ^[38].

O princípio de seu funcionamento é baseado na emissão de luz, a partir de duas lâmpadas, uma de deutério (D2) que emite na faixa de luz ultravioleta do espectro eletromagnético e a outra lâmpada é de tungstênio (W) que emite luz na faixa do espectro visível. Na cela de depósito das amostras a serem analisadas existem duas posições: uma posição de referência ou ar e a outra posição para a amostra de filme.

FIGURA 18. Esquema de funcionamento do espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC.

O sistema fotométrico compõe-se de dois feixes de luz, paralelas e transmitidas para as duas amostras, a de referência e a do filme, que logo se direcionam em seus respectivos sistemas de espelhos refletores compostos também de janelas. A luz que por aí passa, atravessa, finalmente, a lente final, e daí se direcionará para ser analisada pelos detectores do tipo foto diodo de silício (FD). A luz detectada pelo foto diodo será tratada pelo sistema elétrico embutido no equipamento que converte o sinal de saída do foto diodo em voltagem e depois ajusta esta voltagem, através dos amplificadores, e logo em seguida converte-a em corrente através dos conversores e daí, finalmente, o sinal elétrico é lido pelo microprocessador, que está conectado a um microcomputador, que permite que se faça o tratamento de dados por software que geram informações pertinentes à absorbância do material ensaiado ^[38].

Posicionamento dos dosímetros

Nos experimentos realizados com a fonte de Cobalto-60 tipo Gammacell, os dosímetros CTA foram posicionados no meio de cada uma das faces de cada embalagem contendo a turfa a ser irradiada.

As embalagens de turfa foram irradiadas para absorverem as seguintes doses alvo de 20, 40 e 50 kGy. Cada embalagem continha 7 pacotes de turfa, com os dosímetros posicionados entre eles, conforme esquema mostrado na FIG. 19.

FIGURA 19. Corte vertical do posicionamento dos dosímetros nas embalagens de turfa.

Para os experimentos de irradiação realizados no acelerador industrial de elétrons, os dosímetros foram posicionados nas faces das embalagens (superior e inferior) e contidas em uma bandeja, de acordo com a indicação da FIG. 20.

FIGURA 20. Corte vertical e vista superior da montagem de uma bandeja com a disposição dos 6 pacotes de turfa e respectivos dosímetros.

Fator de uniformidade de dose

O fator de uniformidade de dose ou *dur* (sigla em inglês de *dose uniformity ratio*) é a razão entre a maior dose absorvida pelo produto com a menor dose absorvida e tem nos irradiadores a função de estabelecer o parâmetro da variação de dose durante o processamento de um determinado produto de acordo com sua respectiva configuração de carregamento no irradiador.

3.2.4. A composição físico-química da turfa comercial

Segundo dados fornecidos pelo fabricante, a turfa utilizada nos experimentos apresentava as seguintes características químicas (base seca a 100°C): pH em CaCl₂ 0,01 M - 5,8; densidade - 0,53 g/cm³; umidade total - 8,78%; inertes - 0; matéria orgânica total - 85,09 %; C total e mineral - 47,27 %; resíduo mineral total - 14,91%; N total - 1,27 %; P total (P₂O₅) - 0,03%; K (K₂O) total - 0,10 %; Ca total - 3,16 %; Mg total - 0,34%; S total, 0,10%; Relação C/N (totais) - 37/1; Cu total - 2 mg/Kg ; Mn total - 257mg/Kg; Zn total - 11mg/kg; Fe total - 2571mg/kg; B total - 16mg/kg; Na total - 749mg/kg.

O substrato foi corrigido pelo fabricante quanto ao pH, passando para 6,70 a 6,85 com a adição de cálcio, tendo sido ajustado quanto à variação da umidade inicial, capacidade de absorção de umidade e granulometria do produto final.

3.3. CONTROLE DE QUALIDADE BIOLÓGICO DA TURFA IRRADIADA

A análise da qualidade do substrato turfoso é definida pela contagem de *Rhizobium* sobrevivente após a inoculação nas amostras contendo as turfas irradiadas. Foram realizadas as seguintes etapas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP.

3.3.1. Preparação de amostras de turfas irradiadas e inoculadas

Esta análise 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)^[18]. A metodologia na preparação dos meios para isolamento e contagem de bactérias e contaminantes estão descritas a seguir.

O meio convencional para o crescimento de *Rhizobium/ Bradyrhizobium* (YMB) a partir de Somasegaran e Hoben (1994)^[18], foi preparado a partir de TAB. 4. Para o meio sólido, adicionou-se de 15 g de agar e com a finalidade de prevenir o crescimento de fungos, foi adicionado Actidione (cicloheximida) à base de 20 mg/L. O pH foi corrigido para 6,8.

TABELA 4. Meio convencional para o crescimento de *Rhizobium/Bradyrhizobium* (YMB, Yeast Manitol Broth), modificado a partir de Somasegaran e Hoben (1994)^[18].

Manitol	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Extrato de levedura	0,5 g
NaCl	0,1 g
Água destilada	1 L

O meio de cultura com Peptona Glicose com Púrpura de Bromocresol para observação da velocidade de crescimento (Somasegaran e Hoben (1994)^[18], foi preparado com a concentração de componentes descritos na TAB. 5. Após a dissolução da glicose e a peptona em 1 litro de água destilada, adicionou-se o indicador (estoque) para atingir a concentração de 100 µg/mL por litro. Foi adicionado ágar e após agitação, o meio foi autoclavado a 121°C por 15 min.

TABELA 5. Meio Peptona Glicose com Púrpura de Bromocresol para observação de velocidade de crescimento.

Glicose	5 g
Peptona	10 g
Ágar	15 g
Água destilada	1 L

O meio de cultura para as bactérias aeróbicas (Meio NA) foi preparado com a mistura dos constituintes descritos na TAB. 6. Após a preparação, foi autoclavado a 121°C por 15 min. E as placas de Petri contendo o meio, foram esterilizadas a 28°C, no escuro, por um período de 3 a 5 dias.

TABELA 6. Meio para bactérias aeróbicas, contaminantes (Meio NA).

Peptona	5 g
Extrato de carne	3 g
NaCl	8 g
Extrato de Levedura	1 g
Água destilada	1 L

O meio de cultura para a contagem de actinomicetos, apresentava a composição descrita na TAB. 7 e também foi autoclavado a 121°C por 15 min e incubado por um período de 5 a 7 dias (Somasegaran e Hoben, 1994) ^[18].

TABELA 7. Meio de cultura para a contagem de actinomicetos ^[18].

Caseína (livre de aminoácidos, hidrolisada)	0,3 g
KNO ₃	0,2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	50 mg
CaCO ₃	20 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	10 mg
Agar	20 g
Água destilada	1 L
PH	7,0 – 7,2

O preparo do meio seletivo para avaliação de inoculantes produzidos à base de turfa^[18] foi realizado utilizando-se a composição descrita na TAB. 8. Realizou-se após autoclavagem, e resfriamento até a temperatura de 45°C, quando então adicionou-se o antibiótico e fungicida Actidione e o indicador Vermelho Congo para diferenciação do *Rhizobium* em relação às bactérias contaminantes, e após a mistura foi vertido para placas de Petri esterilizadas.

TABELA 8. Meio YMA (Yeast Manitol Agar) seletivo para avaliação de inoculantes produzidos à base de turfa ^[18]

Manitol	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NH ₄ NO ₃	0,5 g
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Agar	15,0 g
Água deionizada	1 L

Estoques (Freezer)	Solução Estoque/10 ml	Adicionar
Actidione (10 mg mL^{-1})	0,1 g	0,1 mL
Vermelho Congo ($2,5 \text{ g L}^{-1}$)	0,025 g	10 mL

Procedimento analítico utilizado^[18]:

- Um g da turfa inoculada, foi colocada em Erlenmeyer com 9 mL de solução fisiológica a 0,85% esterilizada, agitando-se por 10 min;
- Da solução acima, tomou-se uma alíquota de 1 mL, colocando-a em 9 mL de solução fisiológica a 0,85%, agitando-se por um minuto, obtendo assim a diluição 10^2 ;
- A operação foi repetida por mais 6 vezes obtendo-se, assim, as diluições 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 ;
- Tomou-se 0,1 mL de cada uma das diluições 10^4 a 10^7 para inoculação em placas de Petri (três por diluição) contendo o meio de cultura YM acrescido de Actidione (antimicrobiano) e vermelho congo (controle de contaminantes), segundo Somasegaran e Hoben (1994)^[18]. Dessa forma, chegou-se às contagens das diluições 10^5 a 10^8 , possibilitando leituras de colônias em placas entre 30-300, com o propósito de possibilitar a sua contagem e numerar populações até 10^{10} ;
- As amostras foram incubadas, a 28°C , até o crescimento e posterior contagem, estimando assim o número de células por g ou mL de inoculante.

3.3.2. Inoculação das amostras irradiadas de turfa

O inóculo da bactéria CM-01 *gusA*⁺ e CM-01 *celB*⁺ foi obtido a partir da repicagem de cultura pura da bactéria proveniente da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA-USP), cultivada em tubo inclinado contendo

o meio sólido YM apresentado na TAB. 4. A seguir, utilizando-se uma seringa esterilizada, introduziu-se a solução contendo o inóculo nas amostras contendo turfa irradiada. Vedou-se o pacote e procedeu-se com a homogeneização, utilizando-se o homogeneizador apresentado na FIG. 21 com um ciclo de 60 “batidas” por minuto.

FIGURA 21. Homogeneizador de fabricação nacional, marca Marconi e modelo MA 440/CF, utilizado para misturar o meio de cultivo com bactéria introduzido no pacote contendo substrato turfoso.

A partir desta cultura, a bactéria foi transferida a um frasco Erlenmeyer contendo 25 mL de meio líquido YMB, previamente autoclavado a 121°C e a uma pressão de 1 atm por 20 min. Após 5 dias, sob rotação constante de 80 rpm, e tendo atingido o crescimento ao redor de 10^9 células/mL do meio e após centrifugação, alíquotas de 1 mL foram transferidas a 10 frascos erlenmeyers contendo 150 mL do meio YMB líquido que foram colocados em uma incubadora a 28°C, sob agitação constante de 80 rpm. Após 5 dias, tendo atingido um crescimento ao redor de 10^9 células/mL no meio de cultivo, um volume de 40 mL de cada frasco foi introduzido, através de seringa esterilizada, em cada pacote de turfa.

Os procedimentos para contagem do número de células de *Rhizobium* nas culturas líquidas, inicial e de cultura inóculo, e nos inoculantes nos diferentes períodos de inoculação estão descritos a seguir, segundo recomendações da

RELARE. No Ensaio 2, os tratamentos foram semelhantes, com a diferença que o número de repetições por tratamento foi de 5, totalizando 110 pacotes de turfa.

3.3.3. Contagem do número de microrganismos

Após a introdução da bactéria (inoculação) nas turfas irradiadas, os pacotes foram armazenados em câmara de crescimento a 25°C, no escuro. Para o controle do número de células do inoculante, procedeu-se imediatamente à contagem para se determinar o número de bactérias deste inóculo. A cada época de amostragem, retirou-se uma sub-amostra de 1g de turfa inoculada para a contagem pelo método de plaqueamento em meio YM sólido, usando o meio seletivo apresentado na TAB. 5 e cicloheximida como agente antifúngico e o corante Vermelho Congo para identificação de *Rhizobium*.

O preparo do meio seletivo para avaliação de inoculantes produzidos a base de turfa ^[18], foi realizado utilizando-se os componentes relacionados na TAB. 8. Após a autoclavagem e resfriamento até a temperatura de 45°C, adicionaram-se os antibióticos e fungicidas, e o meio foi vertido para placas de Petri esterilizadas.

3.4. USO DE MARCADOR MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Rhizobium tropici* CM-01 *gusA*⁺ e CM-01 *celB*⁺

As estirpes de *Rhizobium tropici* CM-01 *gusA*⁺ e CM-01 *celB*⁺ são transconjugantes originadas de uma mesma estirpe selvagem CM-01 e foram obtidas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA-USP), com capacidade de utilizarem respectivamente, substratos que produzem pigmentação

azulada (ou magenta) na presença do substrato X-Gluc ou 5-bromo-4-cloro-3-indolil-*B*-D-glucoronidina e azul intenso com X-Gal+IPTG (FIG. 22). Dessa forma, usando esses substratos em meios de cultivo, pode-se rastrear ambas bactérias, a partir de turfas inoculadas. O segundo substrato (X-Gal e IPTG), de menor custo e, portanto, pode ser mais extensivamente usado em testes “*in vitro*”.

FIGURA 22. Nódulos de feijoeiro contendo estirpes marcadas com o gene *ceIB*⁺ (azul), estirpes *gusA*⁺ (magenta) e estirpes nativas (coloração natural).

O delineamento experimental, em ambos os ensaios, foi inteiramente casualizado, com 6 (Ensaio 1) e 5 (Ensaio 2) repetições. Os dados foram submetidos à análise estatística univariada, sendo as médias comparadas pelo teste de Bonferroni a 5% de probabilidade^[40].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes da implementação dos ensaios dos inoculantes, realizaram-se testes de radiação utilizando-se raios gama e feixe de elétrons, para averiguar se as doses aplicadas corresponderiam às doses reais recebidas pelos produtos. As doses de radiação foram medidas utilizando-se dosímetros de CTA – triacetato de celulose e, espectrofotômetro Shimadzu UV 1601 PC. Após essas medidas, realizaram-se os ensaios de inoculação com as estirpes CM-01 *gusA*⁺ (Ensaio 1) e CM-01 *celB*⁺ (Ensaio 2).

4.1. PROCESSO DE IRRADIAÇÃO

As medidas de doses de irradiação realizadas durante as irradiações estão mostradas nas TAB. 9 a 12. Este monitoramento serviu para determinar a dose real que o substrato recebeu de acordo com a posição da amostra no irradiador utilizado.

TABELA 9. Dosimetria do Irradiador Gammacell.

Dose alvo (kGy)	Dose medida (kGy)	Posição do dosímetro (conforme FIG. 19)	Fator de Uniformidade de Dose ou Dur (Dmax/Dmin)
20	17,8	Superior (dosímetro N° 8)	
	17,4	Meio (dos. N° 1).	
	17,5	Meio (dos. N° 2)	
	17,7	Meio (dos. N° 3)	
	18,5	Meio (dos. N° 4)	
	18,4	Meio (dos. N° 5)	
	17,7	Meio (dos. N° 6)	
	16,9	Inferior (dos. N° 7)	
	24,0	Lateral-meia altura (dos. N° 9)	
Média	18,44		1,42
40	35,3	Superior (dos.N° 8)	
	35,3	Meio (dos. N° 1)	
	37,2	Meio (dos. N° 2)	
	38,1	Meio (dos. N° 3)	
	37,2	Meio (dos. N° 4)	
	38,2	Meio (dos. N° 5)	
	35,7	Meio (dos. N° 6)	
	34,0	Inferior (dos. N° 7)	
	47,7	Lateral-meia altura (dos. N° 9)	
Média	37,64		1,40
50	38,5	Meio (dos. N° 1)	
	50,1	Meio (dos. N° 2)	
	39,6	Meio (dos. N° 3)	
	41,2	Meio (dos. N° 4)	
	40,4	Meio (dos. N° 5)	
	39,8	Meio (dos. N° 6)	
	38,2	Meio (dos. N° 1)	
	36,9	Inferior (dos. N° 7).	
	55,8	Lateral-meia altura (dos. N° 9)	
Média	42,28		1,51

Obs.: Os valores indicam que as doses absorvidas foram diferentes às doses solicitadas em no máximo 35,5% com relação à dose alvo.

TABELA 10. Dosimetria do o acelerador de elétrons, dose alvo 20 kGy.

Dose alvo (kGy)	Dose medida (kGy)	Posição do dosímetro (conforme FIG. 20)	Fator de Uniformi- dade de Dose ou Dur (Dmax/D min)
20	29,8	Pacote 1 de turfa Face A	
	28,0	Pacote 1 de turfa Face B	
Média	28,90		1,06
20	28,9	Pacote 2 de turfa Face A	
	25,3	Pacote 2 de turfa Face B	
Média	27,10		1,14
20	29,9	Pacote 3 de turfa Face A	
	28,9	Pacote 3 de turfa Face B	
Média	29,40		1,03
20	27,8	Pacote 4 de turfa Face A	
	25,2	Pacote 4 de turfa Face B	
Média	26,50		1,10
20	26,5	Pacote 5 de turfa Face A	
	26,1	Pacote 5 de turfa Face B	
Média	26,30		1,01
20	23,3	Pacote 6 de turfa Face A	
	22,5	Pacote 6 de turfa Face B	
Média	22,90		1,03
Média Face A	27,70	Pacotes 1 a 6 de turfa Face A	1,33
Média Face B	26,00	Pacotes 1 a 6 de turfa Face B	1,28

Obs.: Os valores indicam que as doses absorvidas foram diferentes às doses solicitadas em no máximo 49,5% com relação a dose alvo.

TABELA 11. Dosimetria do acelerador de elétrons, dose alvo 40 kGy.

Dose alvo (kGy)	Dose medida (kGy)	Posição do dosímetro (conforme FIG. 20)	Fator de Uniformidade de Dose ou Dur (Dmax/Dmin)
40	75,7	Pacote 1 de turfa Face A	
	73,4	Pacote 1 de turfa Face B	
Média	74,55		1,03
40	57,4	Pacote 2 de turfa Face A	
	58,1	Pacote 2 de turfa Face B	
Média	57,75		1,01
40	64,5	Pacote 3 de turfa Face A	
	66,9	Pacote 3 de turfa Face B	
Média	65,70		1,03
40	72,4	Pacote 4 de turfa Face A	
	72,7	Pacote 4 de turfa Face B	
Média	72,55		1,00
40	49,8	Pacote 5 de turfa Face A	
	53,8	Pacote 5 de turfa Face B	
Média	51,80		1,08
40	70,3	Pacote 6 de turfa Face A	
	70,4	Pacote 6 de turfa Face B	
Média	70,35		1,00
Média Face A	65,02	Pacotes 1 a 6 de turfa Face A	1,52
Média Face B	65,89	Pacotes 1 a 6 de turfa Face B	1,36

Obs.: Os valores indicam que as doses absorvidas foram diferentes às doses solicitadas em no máximo 89,2% com relação à dose alvo.

TABELA 12. Dosimetria do acelerador de elétrons , dose alvo 50 kGy.

Dose alvo (kGy)	Dose medida (kGy)	Posição do dosímetro (conforme a FIG. 20)	Fator de Uniformidade de Dose ou Dur (Dmax/Dmin)
50	69,7	Pacote 1 de turfa Face A	
	71,6	Pacote 1 de turfa Face B	
Média	70,65		1,02
50	59,6	Pacote 2 de turfa Face A	
	61,5	Pacote 2 de turfa Face B	
Média	60,55		1,03
50	65,9	Pacote 3 de turfa Face A	
	73,5	Pacote 3 de turfa Face B	
Média	69,70		1,11
50	73,8	Pacote 4 de turfa Face A	
	66,4	Pacote 4 de turfa Face B	
Média	70,10		1,11
50	69,5	Pacote 5 de turfa Face A	
	64,8	Pacote 5 de turfa Face B	
Média	67,15		1,07
50	66,8	Pacote 6 de turfa Face A	
	68,7	Pacote 6 de turfa Face B	
Média	67,75		1,03
Média – Face A	67,62	Pacotes 1 a 6 de turfa Face A	1,24
Média – Face B	67,75	Pacotes 1 a 6 de turfa Face B	1,19

Obs.: Os valores indicam que as doses absorvidas foram diferentes às doses solicitadas em no máximo 47% com relação à dose alvo.

A máxima energia de 1,5MeV disponível no acelerador de elétrons do IPEN, utilizado para irradiar as amostras de turfa não é suficiente para garantir que os elétrons acelerados tenham energia com poder de penetração para interagirem com o produto no interior da embalagem ao longo de toda a espessura de $1,0 \pm 0,2$ cm. Com o propósito de garantir a interação do feixe de elétrons com todo o substrato no interior da embalagem, adotou-se o procedimento de irradiação em duas passadas com inversão de faces entre elas, de modo a garantir que a energia de 1,5 MeV que proporciona uma penetração dos elétrons de 0,6cm em um meio com densidade $0,45\text{g/cm}^3$, e ao mesmo tempo, permitisse a irradiação de todo o produto contido na embalagem.

A limitação do poder de penetração dos elétrons impedindo a irradiação em uma única passagem e a impossibilidade de posicionar o dosímetro no centro da embalagem, fez com que se adotasse durante a dosimetria o posicionamento de dois dosímetros um em cada uma das faces da embalagem, com o inconveniente de serem os dosímetros o primeiro elemento bombardeado com o feixe de elétrons. Também houve em alguns casos durante a irradiação a redução da espessura da embalagem, motivada pela acomodação do produto (pó) induzida pela vibração da esteira de transporte, permitindo a interação do feixe de elétrons com o dosímetro no lado oposto. A combinação destes fatores fez com que os registros das doses absorvidas apresentassem valores de até 87% , superiores aos da dose alvo. Cabe mencionar que na fixação dos parâmetros de operação do acelerador para a irradiação da turfa com as doses alvos requeridas, foi feita com base em dados experimentais de produtos com densidade equivalente, permitindo durante todos os procedimentos de irradiação assegurar que no mínimo a dose alvo foi alcançada em todos os pontos da embalagem. Deve ser objeto de estudo posterior a otimização da distribuição da dose absorvida para as embalagens de turfa no irradiador do IPEN, com o propósito de reduzir a taxa de uniformidade de dose, otimizando o processo de irradiação.

4.2. ENSAIO 1 - SOBREVIVÊNCIA DE *Rhizobium tropici* CM-O1 *gusA*⁺ ATRAVÉS DA CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

A sobrevivência da bactéria usada como inoculante e o controle de qualidade no substrato pós-esterilização foram acompanhados aos 7, 14, 21 e 28 dias (fase curta) e aos 150, 180 e 210 dias (fase longa) após a introdução da bactéria inoculante, no caso, uma estirpe selecionada de *Rhizobium tropici* de feijoeiro – CM-01, contendo o gene *gusA*⁺, que permite que seja identificado *in vitro* e *in vivo* em substrato turfoso e em solos (TAB. 13, FIG. 23).

TABELA 13. Contagem de colônias bacterianas ($\times 10^9$ UFC) nos tratamentos de irradiação e inoculados com CM-01 *gusA*⁺, aos 7, 14, 21 e 28 dias (fase curta) e aos 150, 180 e 210 dias (fase longa) de incubação. Cada ponto representa a média de 6 repetições.

Dose	7 Dias	14 Dias	21 Dias	28 Dias	150 Dias	180 Dias	210 Dias
EB - Feixe de Elétrons							
Contro- le – 0 kGy	6,32 opqr	10,2 ghijkl	10,8 fghijk	10,82 fghijk	2,45 tuv	1,39 v	2,08 uv
10 kGy	12,5 bcdefg	12,3 cdefgh	11,8 efghi	9,86 hijklm	9,37 ijklmn	3,48 stuv	3,96 rstu
20 kGy	14,9 ab	13,0 abcdef	14,2 abcd	12,01 cdefgh	13,3 abcde	8,64 klmno	5,62 pqrs
30 kGy	13,3 abcdef	11,1 efghijk	11,1 efghijk	9,15 jklmn	13,0 abcde	4,76 qrst	5,46 pqrs
40 kGy	14,3 abc	9,83 hijklm	12,7 abcdefg	11,18 efghij	12,9 abcdef	8,15 lmno	6,20 opqr
50 kGy	10,4 ghijkl	13,0 abcdef	15,1 a	7,69 mnop	11,0 efghij k	7,20 nopq	6,53 opq
Radiação Gama							
Contro- le – 0 kGy	6,32 mnop	10,2 hij	10,8 ghij	10,8 ghij	2,45 rst	1,39 t	2,08 st
10 kGy	7,73 klm	9,31 jkl	10,8 ghij	7,16 lmno	6,11 mnopq	4,62 pqr	3,66 qrst
20 kGy	10,35 hij	19,9 ab	17,6 bc	14,9 de	7,21 lmno	4,74 opqr	3,69 qrst
30 kGy	13,29 efg	21,4 a	17,2 cd	14,97 de	9,90 hijk	3,89 pqrst	3,66 qrst
40 kGy	12,14 fghi	15,4 cde	13,4 ef	12,04 fghi	10,75 hij	7,52 klmn	4,23 pqrs
50 kGy	12,30 fgh	15,1 de	12,0 fghi	11,05 fghij	9,74 ijk	5,19 nopq	5,17 nopq

Legenda: UFC = unidade formadora de colônia. As letras representam “letter group” (ver o apêndice). * = Letras semelhantes não diferem significativamente entre si a 5% probabilidade.

Na análise do controle de qualidade, os resultados apresentados nos gráficos das FIG. 24 e 25, onde observa-se a contagem de *Rhizobium gusA*⁺ (em UFC) nas amostras para diferentes períodos de incubação em função da dose recebida com feixe 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) – FIG. 25, ainda ocorre boa taxa de sobrevivência da bactéria, enquanto que com a utilização da radiação gama na sua dose mais elevada (50 kGy) e na mesma época, foi detectada a presença de actinobactérias e *Bacillus*, produtoras de metabólitos antibacterianos. Em uma primeira análise conclui-se que 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 150 dias (TAB. 13). 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 pequena tendência de inversão nos resultados, com certa vantagem para o processo com feixe de elétrons, indicando ser uma técnica eficiente. A FIG. 23 apresenta todos dados de contagem de crescimento bacteriano, sob forma de gráficos com as correspondentes equações, permitindo visualizar melhor os efeitos dos dois métodos de irradiação, ao longo do crescimento (fase curta) e armazenamento (fase longa) da bactéria. Os gráficos com as respectivas equações foram obtidos utilizando-se o software estatístico SAS/STAT (<http://www.sas.com.br>), disponibilizado no site da CCE/USP (<http://dat.cce.usp.br/sas9/>) à toda comunidade da USP e cujos fundamentos são apresentados por Coimbra et al. (2004)^[40].

Os dados estatísticos referentes às contagens são apresentados no Apêndice. Pode-se obter uma vantagem na velocidade de processamento da pré-esterilização de substratos, como pode ser observado ao se comparar a FIG. 24 (fase curta) com a FIG. 25 (fase longa). Através das fotos apresentadas nas FIG. 26 e FIG. 27, pode-se também observar a alta frequência de actinobactérias provenientes dos tratamentos com radiação gama (mesmo nas mais elevadas doses).

FIGURA 23. Ensaio 1 – Gráficos e equações de regressão, em função dos métodos (Método 1 = EB e Método 2 = Radiação Gama) e para cada época de amostragem (7, 14, 21, 28, 150, 180 e 210 dias) em seis doses crescentes (0, 10, 20, 30, 40, e 50 kGy).

FIGURA 24. Ensaio 1 (fase curta) - Contagens de colônias (UFC) nos tratamentos de irradiação e inoculados com CM-01 *gusA*⁺, aos 7, 14, 21 e 28 dias de incubação. Médias de 6 repetições.

FIGURA 25. Ensaio 1 (fase longa) - Contagens de colônias bacterianas (UFC) nos tratamentos de irradiação e inoculados com CM-01 *gusA*⁺, aos 150, 180 e 210 dias de incubação. Médias de 6 repetições.
Legenda: UFC = unidade formadora de colônia.

FIGURA 26. Ensaio 1 (fase longa) - Contagem de colônias de *R. tropici* CM-01 *gusA*⁺ presentes em turfa inoculada, após 210 dias de incubação:

- A. Microrganismos presentes em turfa não esterilizada (controle): actinomicetos – colônias brancas pequenas e fungos – colônias cinzas grandes, na diluição 10^5 .
- B. Colônias de *R. tropici* e actinomicetos presentes em turfa que recebeu dose de 40 kGy por radiação gama ^{60}Co , diluição 10^7 .
- C. *R. tropici* presentes em turfa que recebeu dose de 40 kGy de radiação por feixe de elétrons, diluição 10^7 .

FIGURA 27. Ensaio 1 (fase longa) - Contagem de colônias de *R. tropici* CM-01 *gusA*⁺ presentes em turfa inoculada, após 210 dias de incubação:

- A. Colônias de *R. tropici* presentes em turfas que receberam doses de 40 kGy de radiação gama ^{60}Co (com contaminantes – actinomicetos) e por feixe de elétrons, na diluição 10^7 .
- B. Colônias de *R. tropici* nas diluições 10^7 e 10^8 , presentes em turfa que recebeu dose de 40 kGy por radiação gama ^{60}Co .

4.3. ENSAIO 2 - SOBREVIVÊNCIA DE *Rhizobium tropici* CM-O1 *celB*⁺ ATRAVÉS DA CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

No segundo ensaio, observa-se que, de um modo geral, as médias dos tratamentos por feixe de elétrons foram superiores ao tratamento por radiação gama (TAB. 14, FIGs. 28 e 29) na fase de crescimento no substrato turfoso. Esses dados comprovam os resultados obtidos no Ensaio 1 e indicam que o método de irradiação por feixe de elétrons é comparável com a radiação gama, podendo superar na eficiência já na fase inicial de preparo de inoculantes, quando a cultura bacteriana cresce no substrato (FIG. 30).

TABELA 14. Contagem de colônias bacterianas (UFC) nos tratamentos de irradiação e inoculados com CM-01 *celB*⁺, aos 10 ($\times 10^7$), 20 ($\times 10^8$) e 30 ($\times 10^8$) dias de incubação. Cada ponto representa a média de 5 repetições. As letras representam “letter group” (ver o apêndice). * = Letras semelhantes não diferem significativamente entre si a 5% probabilidade.

Ensaio 2	10 Dias (10^7)	20 Dias (10^8)	30 Dias (10^8)
EB – Feixe Elétrons			
Controle – 0 kGy	4,02 cd*	2,00 e	1,52 e
10 kGy	7,48 abc	7,03 abc	4,08 e
20 kGy	8,70 a	6,41 bcd	6,83 abc
30 kGy	7,53 abc	6,61 bcd	6,91 abc
40 kGy	7,70 ab	6,40 bcd	7,80 bc
50 kGy	7,34 abc	7,77 cde	6,86 abc
Radiação Gama			
10 kGy	2,93 de	3,06 de	2,60 de
20 kGy	6,26 ab	6,14 ab	4,10 cd
30 kGy	5,02 bc	6,46 bc	6,09 ab
40 kGy	5,28 abc	6,04 ab	7,01 a
50 kGy	5,34 abc	6,08 ab	6,47 ab

FIGURA 28. Ensaio 2 (fase curta) - Amostras de contagens (diluição $\times 10^8$) UFC = Unidades Formadoras de Colônias aos 10 dias e diluição $\times 10^7$ UFC para 20 e 30 dias, respectivamente) realizadas em turfas previamente esterilizadas por radiação gama (Gama) e feixe de elétrons (EB) – sob dose de 40 kGy aos 10 (a), 20 (b) e 30 (c) dias . Observar que o período de crescimento pleno da bactéria CM-01 *celB*⁺ foi atingido aos 20 dias da inoculação.

FIGURA 29. Ensaio 2 (fase curta) - Amostras de contagens (diluição 10^8) UFC = Unidades Formadoras de Colônias de *R. tropici* CM-01 *celB*⁺, realizadas em turfas previamente irradiadas por radiação gama (γ) e feixe de elétrons (EB). Fotos (a) e (b) demonstram que, sob doses de 10 kGy, o tratamento com EB supera o da radiação γ . Foto (c) mostra que, aos 30 dias, o crescimento bacteriano é normalizado para ambos tratamentos sob dose de 50 kGy.

FIGURA 30. Ensaio 2 – Gráficos e equações de regressão, em função dos métodos (Método 1 = EB e Método 2 = Radiação Gama) e para cada época de amostragem (10, 20 e 30 dias) em seis doses distintas (0, 10, 20, 30, 40, e 50 kGy).

4.4. ESTUDO DA VIABILIDADE ECONÔMICA

4.4.1. Acelerador de elétrons

Os dados referentes ao custo uma planta de irradiação com aceleradores de elétrons disponíveis no mercado, com seus respectivos itens complementares são apresentados na TAB. 15 permitem apurar os valores do capital inicial a ser investido para os três aceleradores estudados. Os valores dos aceleradores foram obtidos por meio de consulta direta aos fabricantes.

TABELA 15. Valor do capital investido para construção de uma planta de irradiação de turfa utilizando de elétrons.

Investimento (x US\$ 1.000)	1,5MeV 90 kW^(a)	3,0MeV 150 kW^(b)	10 MeV 80 kW^(c)
Acelerador de Elétrons	1200	2500	4.500
Sistema de Transporte	200	250	300
Blindagem radiológica	350	500	600
Sistema de segurança	80	80	80
Utilidades	70	100	200
Projeto de Engenharia^(d)	176	324	544
Custo do Licenciamento	60	60	60
CUSTO TOTAL	2136	3814	6284

Observações:

^(a) *Acelerador similar ao utilizado nos experimentos tipo “isolated core transformer” da empresa R D I (USA) que requer a inversão (troca de lado) da embalagem para irradiação completa.*

^(b) *Acelerador tipo “isolated core transformer” da empresa R D I (USA), com energia suficiente para irradiação de um único lado.*

^(c) *Acelerador tipo Rodotron da empresa IBA (Belgica)*

^(d) *Valor do projeto de engenharia correspondente a 10% do custo dos equipamentos da instalação.*

A TAB. 16 apresenta os custos anuais operacionais para os três aceleradores estudados levando-se em consideração os custos fixos e variáveis. Na estimativa dos custos de mão de obra considerou-se a operação do acelerador durante 6000 horas por

ano com 04 equipes (três turnos e revezamento) constituídas de um operador e quatro e manipuladores de carga. Para turno simples (oito horas diárias) um encarregado geral, um engenheiro de manutenção e dois técnicos de manutenção. Sendo que o encarregado e o engenheiro de manutenção assumiriam também a função de Supervisor de Radioproteção da planta.

TABELA 16. Estimativa anual de custos operacionais, utilizando acelerador de elétrons.

Custos Operacionais (US\$ x 1000)	1,5MeV 90kW	3,0MeV 150kW	10MeV 80kW
<i>CUSTOS FIXOS</i>			
Amortização do capital investido^(a)	169,8	303,2	499,6
Remuneração do capital investido^(b)	106,8	190,7	314,2
Custos administrativos^(c)	42,7	76,2	125,7
<i>CUSTOS VARIÁVEIS</i>			
Mão de obra	420	420	420
Energia^(d)	360	600	576
Manutenção^(e)	213	381	628
Custo Operacional Total	1312,3	1971	2563
Custo Operacional Unitário (US\$/Hora máquina)^(f)	328	493	641

Observações:

^(a) Foi adotada a amortização do capital em um período de dez anos e taxa de juros a 5% ao ano (valor internacional)⁽³⁴⁾ ^(b) Taxa de juros adotada de 5% ao ano⁽³⁴⁾

^(c) Valor correspondente a 2% do custo do investimento⁽³⁴⁾

^(d) Consumo de energia assumindo rendimento dos aceleradores de 40% para as máquinas de 1,5 e 3,0 MeV e 25% para máquina de 10MeV. O custo da energia de US\$0,45/kWh⁽³⁴⁾

^(e) Valor correspondente a 5% dos equipamentos da instalação⁽³⁴⁾

^(f) Número total de horas de operação do acelerador igual a 4000

Uma vez determinado o custo operacional anual da unidade móvel de irradiação, admitindo-se uma disponibilidade de 4.000 horas por ano em função dos tempos requeridos para a manutenção do acelerador, a capacidade operacional por hora da instalação (kg/hora) para os aceleradores estudados com os produtos absorvendo uma dose de 50 kGy pode ser determinado utilizando-se a fórmula⁽³⁷⁾:

$$Q = 3600 \frac{V * i}{D_t} \times \eta$$

onde:

Q – vazão, expressa em kg/h;

V – energia do feixe de elétrons, expressa em milhões de elétrons-volts (MeV);

i – corrente do feixe de elétrons, expressa em mili-âmpere (mA);

D_t – dose teórica absorvida pelo produto, expressa em (kGy).

$V \times i$ – potência do acelerador (kW)

η – rendimento do sistema de irradiação (~0,6)

Capacidade de processamento

Acelerador 1,5 MeV 90 kW – 1920 kg/hora

Acelerador 3 MeV 150 kW – 6480 kg/hora

Acelerador 10 MeV 80 kW – 3420 kg/hora

Para estimativa do custo unitário de processamento da turfa, absorvendo uma dose de 50kGy, foi feita para os aceleradores considerados no trabalho a relação entre os custos operacionais unitários e as respectivas capacidades de processamento dos aceleradores, obtendo-se:

Acelerador 1,5 MeV 90 kW – US\$0,18/kg ou US\$180/ton

Acelerador 3 MeV 150 kW – US\$0,076/kg ou US\$ 76/ton

Acelerador 10 MeV 80 kW – US\$0,19/kg ou US\$190/ton

4.4.2. Irradiador Gama

Os valores dos custos de esterilização de turfa (dose 50kGy) com irradiação gama foram obtidos por meio de consulta junto aos prestadores de serviço no Brasil, onde o valor médio para uma dose de 50kGy tem o preço médio de US\$ 920,00/tonelada ou R\$ 2.000,00 (junho/2006).

Os valores calculados para os três tipos de acelerados não levam em consideração os impostos e a margem de lucro para o estabelecimento do preço final, mesmo assim, os valores dos custos estimados, de modo conservador, são altamente competitivos com relação aos preços praticados no mercado local, quando se utiliza o processamento por radiação gama.

5. CONCLUSÃO

Os dados experimentais (7, 14, 21, 28 – fase curta e 150, 180 e 210 dias – fase longa de incubação) mostraram um elevado número de células da bactéria *Rhizobium tropici* CM-01 *gusA*⁺ inoculada em substratos turfosos submetidos aos dois processos de esterilização, sendo que ambos processos atenderam aos padrões mínimos requeridos pelas normas brasileiras validade de 180 dias - acima de 1×10^8 células/g de substrato. Sob doses mais elevadas, acima de 40 kGy, o método por feixe de elétrons foi mais eficiente em eliminar actinobactérias, consideradas sérias antagonistas de bactérias inoculantes em turfas e que surgiram após 150 dias. Usando outro marcador para o mesmo isolado (CM-01 *celB*⁺) por um período de 30 dias, os resultados confirmaram a eficiência do método por feixe de elétrons mesmo a doses mais baixas – 10 kGy.

Através de um estudo avaliando armazenamento por períodos mais longos, observamos um fenômeno interessante. No início, de um modo geral, há uma tendência do tratamento com radiação gama de superar o tratamento com feixe de elétrons. Porém, ao longo tempo, ocorre uma inversão nos resultados, com uma certa vantagem para o processo com feixe de elétrons, demonstrando este último ser uma técnica mais eficiente e com vantagem de maior velocidade de processamento na esterilização do substrato.

A probabilidade de usar doses mais baixas de radiações por feixe de elétrons com eficiência constitui-se de uma excelente alternativa para uma técnica ecologicamente mais adequada, a um custo mais baixo, sem perder a qualidade necessária para a manutenção de microrganismos benéficos em inoculantes biológicos. Esta solução seria mais recomendada em caso de não necessitar de longos períodos de armazenamento para a comercialização do produto, ou quando, em caso de contaminação de lotes de inoculantes, utilizar-se deste recurso a curto prazo. Pelos resultados obtidos, a irradiação da turfa utilizando-se de feixe de elétrons demonstrou ser um processo viável no aspecto técnico e econômico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DE-POLLI, H.; PIMENTEL, M.S. 2005. Indicadores de Qualidade do Solo. In: Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta. Ed. EMBRAPA – Informação Tecnológica, Brasília – DF., P. 17 – 28.
2. REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. 2005. Fixação Biológica de Nitrogênio: Estado da Arte. . In: Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta. Ed. EMBRAPA – Informação Tecnológica, Brasília – DF., P. 151-180.
3. RAPOSO, H. *As três adubações* Ministério da Agricultura / Serviço de Informação Agrícola. Rio de Janeiro. 1967 Introdução. p. 7-8.
4. POSTGATE, J. *Fixação do Nitrogênio*. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária, 1989.
5. MALIK, K.A.; NAQVI, S. H. M.; ALEEM, M.I. H. 1985 *Nitrogen and the environment*. Pakistan Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Ghulamari Printers Lahore. Faisalabad – Pakistan.
6. <http://www.atech.br/agenda21.as/workshop/work016.htm> em 30/11/2005.
7. <http://inorgan221.iq.unesp.br/quimgeral/jornal/dobereiner.html> em 30/11/2005.
8. VAN KAMMEN, A. 1997. Biological Nitrogen Fixation for Sustainable Agriculture. NATO ASI Ser. Vol. G39, Biological Nitrogen Fixation for Sustainable Agriculture. Ed. A. Legocki, H.Bothe, A. Puhler. Springer-Verlag, Berlin, p. 177-178.
9. GARETH, J. D. 1998. Role of legumes in sustainable cropping systems. *Pl. Soil* 83: XI-XIX.

10. VANCE, C.P. 1997. *Enhanced agricultural sustainability through biological nitrogen fixation*. NATO ASI Ser., Vol. G39: *Biological Nitrogen Fixation for Ecology and Sustainable Agriculture*. Ed. A. Legocki, H. Bothe, A. Puhler. Springer-Verlag , Berlin.p. 179-186.

11. ROUGHLEY, R.J.; VINCENT, J.M. 1967. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in plant culture. *J. Appl. Bacteriol.*, 30(2):362-376.

12. BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biol. Biochem.* 27: 683-697.

13. STEPHENS, J.H.G.; RASK, H.M. 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Res.* 65:249-258.

14. <http://www.histick.com/uogwhitebean.htm> em 14/11/2005.

15. HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. 1994. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília – DF. EMBRAPA-SPI: 63-94.

16. HARDARSON, G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Pl. Soil* 152: 1-17.

17. SAITO, S.M.T.; ARAÚJO, J.M.; BARAIBAR, A.; GALLI, L.V. 1985. *Survival of Rhizobium in the carrier*. In: Workshop on *Rhizobium*/Legume Inoculants, Porto Alegre-RS, p. 145-156.

18. SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. 1994. *Handbook for rhizobia: methods in legume Rhizobium technology*. Niftal Project, Paia, HI.

19. ROMANI, V.L. 1989. *Otimização de condições para produção de inoculante de alta qualidade para feijão (Phaseolus vulgaris L.)*. Tese de doutorado. ESALQ, Piracicaba-SP, 166p.

20. 1^o Encontro sobre Turfa, Rio de Janeiro - RJ, 1-2 de Julho de 1983. Promoção do Governo do Estado do Rio de Janeiro, Secretaria de Minas e Energia (Resumos).

21. McNAMARA N.P.; BLACK H.I.J.; Beresford, N.A.; Parekh N.R. 2003. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Appl. Soil Ecol.* 24:117-132.

22. YARDIN, M.R.; KENNEDY, I.R.; THIES, J.E. 2000. Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as bio-fertilizers and bio-pesticides. *Rad. Phys. Chem.* 57:565-568.

23. DATE, R.A.; ROUGHLEY R.J. 1977. *Preparation of legume seed inoculants*. In: A Treatise on Dinitrogen Fixation. Section IV. Agronomy and Ecology. Ed. R.W.F. Hardy e A.H. Gibson., p. 243-275. Wiley, N.Y.

24. OLSEN, P.E.; RICE, W.A.; COLLINS. M.M. 1994. Biological contaminants in North America legume inoculants. *Soil Biol. Biochem.* 27: 699-701.

25. Pesquisa “microorganisms biological sterilization types” no site unimaxsupply.com/sitepgs/1cledisstr11.htm.

26. IAEA - International Atomic Energy Agency, Vienna, 1973. The effect of ionizing radiation on bacteria. In: Manual on Radiation Sterilization of Medical and Biological Materials. Technical Reports Series n^o. 149 Austria: IAEA-Austria. October 1973, p. 37 – 63.

27. AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, Urgel de Almeida. *Biotecnologia Tópicos de microbiologia industrial - Volume2*, Editora Edgard Blucher, 1975, Edit. USP.
28. CHANDRA, R. Iteration of High-Energy Radiation with Matter *In: Introductory physics of nuclear medicine*. Lea & Febiger, USA: 1992, p. 69 – 97.
29. BELLINTANI, A. S. 2000. *Fundamentos de Radioproteção*. IPEN-Cidade Universitária, São Paulo - SP. Diretoria de Segurança Nuclear. Divisão de Desenvolvimento de Recursos Humanos.
30. CALVO, W. A. P. *Desenvolvimento do sistema de irradiação em um irradiador multipropósito de cobalto-60 tipo compacto*. Tese de doutorado na área CNA- Aplicações do IPEN da USP, São Paulo, 2005.
31. SATO, S. 1993. General view of electron accelerator utilization. *In: Proceedings of the workshops on the utilization of electron beams*. JAERI-M/93-160, Bangkok e Jakarta.
32. TAUATA, L. *Radiações Nucleares. Curso programado*. Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN:1984. Vol. II:Radiações Nucleares: Usos e Cuidados. p.1 – 21. ; *Radioproteção e Dosimetria.Fundamentos*. Instituto de Radioproteção e Dosimetria – CNEN: 2002. cap. 3. Interação da radiação com a matéria, cap. 4. Efeitos biológicos da radiação e cap. 5. Grandezas radiológicas e unidades. p.69 – 152.
33. SABATO, S. Introdução à Irradiação de Alimentos. 2005. Material didático de curso de mestrado no CTR do IPEN da USP.

34. MORRISON, R. M. *An economic analysis of electron accelerators and cobalt-60 for irradiated food*. Washington, U.S. Department of Agriculture. Technical Bulletin n° 1762, June 1989.
35. IKUTA, N. *Desenvolvimento de métodos de identificação e quantificação de estirpes de Bradyrhizobium japonicum*. Porto Alegre: Tese de doutorado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 90p.
36. Atomic Energy of Canada Limited, *Instruction Manual. GAMMACELL 220. Cobalt-60 Irradiation Unit*. Edition n°. 6, July, 1968.
37. RELA, P.R. *Desenvolvimento de dispositivo de irradiação para tratamento de efluentes industriais com feixe de elétrons*. Tese de doutorado na área CNA do IPEN da USP, São Paulo, 2003.
38. SHIMADZU CORPORATION. Analytical Instruments division *Spectrophotometer (P/N 206-67501)*. Instruction manual. User system guide. 1997, Kyoto Japan.
39. McLAUGHIN , W. L; BOYD A.W.; CHADWICK, K.H.; McDONALD, J.C.; MILLER, A. *Dosimetry for radiation processing*. Great Britain, 1989. p. 162-163.
40. COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.de; OLIVEIRA, A.C. de. 2004. *Fundamentos do SAS Aplicado à Experimentação Agrícola*. Ed. Universitária – Universidade Federal de Pelotas, 246 p.

7. APÊNDICE

ENSAIO 1

The UNIVARIATE Procedure
Variable: y

Moments

N	504	Sum Weights	504
Mean	111.287698	Sum Observations	56089
Std Deviation	91.8683179	Variance	8439.78784
Skewness	1.42811584	Kurtosis	3.50546659
Uncorrected SS	10487229	Corrected SS	4245213.28
Coeff Variation	82.5502901	Std Error Mean	4.09214012

Basic Statistical Measures

Location		Variability	
Mean	111.2877	Std Deviation	91.86832
Median	104.5000	Variance	8440
Mode	110.0000	Range	591.00000
		Interquartile Range	123.50000

Tests for Location: Mu0=0

Test	-Statistic-	-----p Value-----
Student's t	t 27.19548	Pr > t <.0001
Sign	M 252	Pr >= M <.0001
Signed Rank	S 63630	Pr >= S <.0001

Tests for Normality

Test	--Statistic--	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W 0.891226	Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D 0.114973	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq 1.326844	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq 9.689359	Pr > A-Sq <0.0050

Quantiles (Definition 5)

Quantile	Estimate
100% Max	592.0
99%	400.0
95%	260.0
90%	224.0
75% Q3	158.5
50% Median	104.5
25% Q1	35.0
10%	13.0
5%	5.0
1%	1.0
0% Min	1.0

Extreme Observations

----Lowest----		----Highest---	
Value	Obs	Value	Obs
1	402	404	123
1	401	480	126
1	399	508	129
1	398	564	127
1	366	592	128

The UNIVARIATE Procedure
Variable: Yt

Moments

N	504	Sum Weights	504
Mean	9.58652778	Sum Observations	4831.61
Std Deviation	4.45032561	Variance	19.8053981
Skewness	0.14414729	Kurtosis	-0.2678296
Uncorrected SS	56280.4787	Corrected SS	9962.11522
Coeff Variation	46.4227061	Std Error Mean	0.19823326

Basic Statistical Measures

Location		Variability	
Mean	9.58653	Std Deviation	4.45033
Median	10.24500	Variance	19.80540
Mode	10.51000	Range	23.17000
		Interquartile Range	6.65000

Tests for Location: Mu0=0

Test	-Statistic-	-----p Value-----
Student's t	t 48.35984	Pr > t <.0001
Sign	M 252	Pr >= M <.0001
Signed Rank	S 63630	Pr >= S <.0001

Apêndice

Tests for Normality				
Test	--Statistic--		-----p Value-----	
Shapiro-Wilk	W	0.979907	Pr < W	<0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D	0.074489	Pr > D	<0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.509093	Pr > W-Sq	<0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	2.915469	Pr > A-Sq	<0.0050

=====

Apêndice

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
ensaio	2	1 2
dose	6	0 10 20 30 40 50
dias	7	7 14 21 28 150 180 210
rep	6	1 2 3 4 5 6

Number of observations 504

The GLM Procedure

Dependent Variable: Yt

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	88	9559.909860	108.635339	112.09	<.0001
Error	415	402.205363	0.969170		
Corrected Total	503	9962.115224			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Yt Mean
0.959627	10.26925	0.984464	9.586528

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ensaio	1	0.034172	0.034172	0.04	0.8511
dose	5	1672.565870	334.513174	345.15	<.0001
ensaio*dose	5	204.196080	40.839216	42.14	<.0001
dias	6	5710.588131	951.764688	982.04	<.0001
ensaio*dias	6	533.298702	88.883117	91.71	<.0001
dose*dias	30	755.847981	25.194933	26.00	<.0001
ensaio*dose*dias	30	679.731905	22.657730	23.38	<.0001
rep	5	3.647020	0.729404	0.75	0.5845

Apêndice

The GLM Procedure			
Least Squares Means			
ensaio	dose	dias	Yt LSMEAN
1	0	7	6.3166667
1	0	14	10.2333333
1	0	21	10.8000000
1	0	28	10.8166667
1	0	150	2.4466667
1	0	180	1.3933333
1	0	210	2.0833333
1	10	7	12.5266667
1	10	14	12.2850000
1	10	21	11.7566667
1	10	28	9.8583333
1	10	150	9.3683333
1	10	180	3.4833333
1	10	210	3.9566667
1	20	7	14.9200000
1	20	14	13.0333333
1	20	21	14.2233333
1	20	28	12.0133333
1	20	150	13.3266667
1	20	180	8.6416667
1	20	210	5.6166667
1	30	7	13.2883333
1	30	14	11.0533333
1	30	21	11.1266667
1	30	28	9.1483333
1	30	150	12.9950000
1	30	180	4.7633333
1	30	210	5.4566667
1	40	7	14.2566667
1	40	14	9.8266667
1	40	21	12.6500000
1	40	28	11.1766667
1	40	150	12.9083333
1	40	180	8.1483333
1	40	210	6.2016667
1	50	7	10.3733333
1	50	14	12.9666667
1	50	21	15.1083333
1	50	28	7.6850000
1	50	150	11.0200000
1	50	180	7.1966667
1	50	210	6.5300000
2	0	7	6.3166667
2	0	14	10.2333333
2	0	21	10.8000000
2	0	28	10.8166667
2	0	150	2.4466667
2	0	180	1.3933333
2	0	210	2.0833333
2	10	7	7.7283333
2	10	14	9.3133333
2	10	21	10.8250000
2	10	28	7.1616667
2	10	150	6.1100000
2	10	180	4.6250000
2	10	210	3.6650000
2	20	7	10.3466667
2	20	14	19.8783333
2	20	21	17.6050000
2	20	28	14.9116667
2	20	150	7.2150000
2	20	180	4.7366667
2	20	210	3.6900000
2	30	7	13.2866667
2	30	14	21.5250000
2	30	21	17.1516667
2	30	28	14.9750000
2	30	150	9.9050000
2	30	180	3.8866667
2	30	210	3.6600000
2	40	7	12.1416667
2	40	14	15.4283333
2	40	21	13.3750000
2	40	28	12.0366667
2	40	150	10.7533333
2	40	180	7.5200000
2	40	210	4.2266667
2	50	7	12.2966667
2	50	14	15.1033333
2	50	21	11.9566667
2	50	28	11.0483333
2	50	150	9.7450000
2	50	180	5.1933333
2	50	210	5.1716667

The GLM Procedure					
Least Squares Means					
ensaio*dose*dias Effect Sliced by ensaio for Yt					
ensaio	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
1	41	3411.070552	83.196843	85.84	<.0001
2	41	6145.158116	149.881905	154.65	<.0001

Apêndice

The GLM Procedure										
Class Level Information										
Class		Level s		Values						
ensaio		2		1 2						
dose		6		0 10 20 30 40 50						
dias		7		7 14 21 28 150 180 210						
rep		6		1 2 3 4 5 6						
Number of observations				504						
=====										
The GLM Procedure										
Dependent Variable: Yt										
Source	DF	Sum of Squares		Mean Square		F Value	Pr > F			
Model	88	9559.909860		108.635339		112.09	<.0001			
Error	415	402.205363		0.969170						
Corrected Total	503	9962.115224								
R-Square		Coeff Var		Root MSE		Yt Mean				
0.959627		10.26925		0.984464		9.586528				
Source	DF	Type III SS		Mean Square		F Value	Pr > F			
ensaio(dose*dias)	83	9556.262840		115.135697		118.80	<.0001			
rep	5	3.647020		0.729404		0.75	0.5845			
Contrast		DF	Contrast SS		Mean Square		F Value	Pr > F		
ensaio 1 dia linear para a dose 0		1	74.3010436		74.3010436		76.66	<.0001		
ensaio 1 dia quadratica para a dose 0		1	20.2585075		20.2585075		20.90	<.0001		
ensaio 1 dia linear para a dose 1		1	72.7104135		72.7104135		75.02	<.0001		
ensaio 1 dia quadratica para a dose 1		1	67.0596125		67.0596125		69.19	<.0001		
ensaio 1 dia linear para a dose 10		1	0.0898501		0.0898501		0.09	0.7609		
ensaio 1 dia quadratica para a dose 10		1	4.4646993		4.4646993		4.61	0.0324		
ensaio 1 dia linear para a dose 20		1	74.2179348		74.2179348		76.58	<.0001		
ensaio 1 dia quadratica para a dose 20		1	6.9763631		6.9763631		7.20	0.0076		
ensaio 1 dia linear para a dose 30		1	0.0687888		0.0687888		0.07	0.7901		
ensaio 1 dia quadratica para a dose 30		1	60.6527944		60.6527944		62.58	<.0001		
ensaio 1 dia linear para a dose 40		1	454.1021375		454.1021375		468.55	<.0001		
ensaio 1 dia quadratica para a dose 40		1	42.6820058		42.6820058		44.04	<.0001		
ensaio 1 dia linear para a dose 50		1	48.3842107		48.3842107		49.92	<.0001		
ensaio 1 dia quadratica para a dose 50		1	59.2137654		59.2137654		61.10	<.0001		
ensaio 2 dia linear para a dose 0		1	48.3842107		48.3842107		49.92	<.0001		
ensaio 2 dia quadratica para a dose 0		1	59.2137654		59.2137654		61.10	<.0001		
ensaio 2 dia linear para a dose 10		1	454.3756209		454.3756209		468.83	<.0001		
ensaio 2 dia quadratica para a dose 10		1	89.0082810		89.0082810		91.84	<.0001		
ensaio 2 dia linear para a dose 20		1	4.2229155		4.2229155		4.36	0.0375		
ensaio 2 dia quadratica para a dose 20		1	5.9202849		5.9202849		6.11	0.0139		
ensaio 2 dia linear para a dose 30		1	299.1517996		299.1517996		308.67	<.0001		
ensaio 2 dia quadratica para a dose 30		1	0.0100215		0.0100215		0.01	0.9191		
ensaio 2 dia linear para a dose 40		1	28.0631198		28.0631198		28.96	<.0001		
ensaio 2 dia quadratica para a dose 40		1	203.1738784		203.1738784		209.64	<.0001		
ensaio 2 dia linear para a dose 50		1	181.2811287		181.2811287		187.05	<.0001		
ensaio 2 dia quadratica para a dose 50		1	19.4687701		19.4687701		20.09	<.0001		
=====										
Effect=ensaio		Method=Bonferroni (P<.05)				Set=1				
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Alpha	Lower	Upper	Letter Group
1	1	—	—	9.5948	0.06202	0.0000	0.05	9.4729	9.7167	A
2	2	—	—	9.5783	0.06202	0.0000	0.05	9.4564	9.7002	A

Effect=dose		Method=Bonferroni (P<.05)				Set=2				
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Alpha	Lower	Upper	Letter Group
3	—	20	—	11.4399	0.1074	0.0000	0.05	11.2287	11.6510	A
4	—	30	—	10.8730	0.1074	0.0000	0.05	10.6618	11.0841	B
5	—	40	—	10.7607	0.1074	0.0000	0.05	10.5496	10.9719	B
6	—	50	—	10.0996	0.1074	0.0000	0.05	9.8885	10.3108	C
7	—	10	—	8.0474	0.1074	0.0000	0.05	7.8362	8.2585	D
8	—	0	—	6.2986	0.1074	0.0000	0.05	6.0874	6.5097	E

Effect=ensaio*dose		Method=Bonferroni (P<.05)				Set=3				
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Alpha	Lower	Upper	Letter Group
9	1	20	—	11.6821	0.1519	0.0000	0.05	11.3835	11.9807	A
10	1	40	—	10.7383	0.1519	0.0000	0.05	10.4397	11.0369	B
11	1	50	—	10.1257	0.1519	0.0000	0.05	9.8271	10.4243	BC
12	1	30	—	9.6902	0.1519	0.0000	0.05	9.3916	9.9888	CD
13	1	10	—	9.0336	0.1519	0.0000	0.05	8.7350	9.3322	D
14	1	0	—	6.2986	0.1519	0.0000	0.05	6.0000	6.5972	E

Apêndice

----- Effect=ensaio*dose Method=Bonferroni (P<.05) Set=4 -----										
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
15	2	30	—	12.0557	0.1519	0.0000	0.05	11.7571	12.3543	A
16	2	20	—	11.1976	0.1519	0.0000	0.05	10.8990	11.4962	B
17	2	40	—	10.7831	0.1519	0.0000	0.05	10.4845	11.0817	BC
18	2	50	—	10.0736	0.1519	0.0000	0.05	9.7750	10.3722	C
19	2	10	—	7.0612	0.1519	0.0000	0.05	6.7626	7.3598	D
20	2	0	—	6.2986	0.1519	0.0000	0.05	6.0000	6.5972	E

----- Effect=dias Method=Bonferroni (P<.05) Set=5 -----										
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
21	—	—	14	13.4067	0.1160	0.0000	0.05	13.1786	13.6347	A
22	—	—	21	13.1149	0.1160	0.0000	0.05	12.8868	13.3429	A
23	—	—	7	11.1499	0.1160	0.0000	0.05	10.9218	11.3779	B
24	—	—	28	10.9707	0.1160	0.0000	0.05	10.7426	11.1988	B
25	—	—	150	9.0200	0.1160	0.0000	0.05	8.7919	9.2481	C
26	—	—	180	5.0818	0.1160	0.0000	0.05	4.8537	5.3099	D
27	—	—	210	4.3618	0.1160	0.0000	0.05	4.1337	4.5899	E

Apêndice

----- Effect=ensaio*di as Method=Bonferroni (P<. 05) Set=6 -----										
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
28	1	—	21	12. 6108	0. 1641	0. 0000	0. 05	12. 2883	12. 9334	A
29	1	—	7	11. 9469	0. 1641	0. 0000	0. 05	11. 6244	12. 2695	AB
30	1	—	14	11. 5664	0. 1641	0. 0000	0. 05	11. 2439	11. 8889	B
31	1	—	150	10. 3442	0. 1641	0. 0000	0. 05	10. 0216	10. 6667	C
32	1	—	28	10. 1164	0. 1641	0. 0000	0. 05	9. 7939	10. 4389	C
33	1	—	180	5. 6044	0. 1641	0. 0000	0. 05	5. 2819	5. 9270	D
34	1	—	210	4. 9742	0. 1641	0. 0000	0. 05	4. 6516	5. 2967	D
----- Effect=ensaio*di as Method=Bonferroni (P<. 05) Set=7 -----										
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
35	2	—	14	15. 2469	0. 1641	0. 0000	0. 05	14. 9244	15. 5695	A
36	2	—	21	13. 6189	0. 1641	0. 0000	0. 05	13. 2964	13. 9414	B
37	2	—	28	11. 8250	0. 1641	0. 0000	0. 05	11. 5025	12. 1475	C
38	2	—	7	10. 3528	0. 1641	0. 0000	0. 05	10. 0303	10. 6753	D
39	2	—	150	7. 6958	0. 1641	0. 0000	0. 05	7. 3733	8. 0184	E
40	2	—	180	4. 5592	0. 1641	0. 0000	0. 05	4. 2366	4. 8817	F
41	2	—	210	3. 7494	0. 1641	0. 0000	0. 05	3. 4269	4. 0720	G
----- Effect=dose*di as Method=Bonferroni (P<. 05) Set=8 -----										
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
42	—	20	14	16. 4558	0. 2842	0. 0000	0. 05	15. 8972	17. 0145	A
43	—	30	14	16. 2892	0. 2842	0. 0000	0. 05	15. 7305	16. 8478	A
44	—	20	21	15. 9142	0. 2842	0. 0000	0. 05	15. 3555	16. 4728	A
45	—	30	21	14. 1392	0. 2842	0. 0000	0. 05	13. 5805	14. 6978	B
46	—	50	14	14. 0350	0. 2842	0. 0000	0. 05	13. 4764	14. 5936	B
47	—	50	21	13. 5325	0. 2842	0. 0000	0. 05	12. 9739	14. 0911	BC
48	—	20	28	13. 4625	0. 2842	0. 0000	0. 05	12. 9039	14. 0211	BCD
49	—	30	7	13. 2875	0. 2842	0. 0000	0. 05	12. 7289	13. 8461	BCD
50	—	40	7	13. 1992	0. 2842	0. 0000	0. 05	12. 6405	13. 7578	BCDE
51	—	40	21	13. 0125	0. 2842	0. 0000	0. 05	12. 4539	13. 5711	BCDEF
52	—	20	7	12. 6333	0. 2842	0. 0000	0. 05	12. 0747	13. 1920	BCDEFG
53	—	40	14	12. 6275	0. 2842	0. 0000	0. 05	12. 0689	13. 1861	BCDEFG
54	—	30	28	12. 0617	0. 2842	0. 0000	0. 05	11. 5030	12. 6203	CDEFGH
55	—	40	150	11. 8308	0. 2842	0. 0000	0. 05	11. 2722	12. 3895	DEFGHI
56	—	40	28	11. 6067	0. 2842	0. 0000	0. 05	11. 0480	12. 1653	EFGHI J
57	—	30	150	11. 4500	0. 2842	0. 0000	0. 05	10. 8914	12. 0086	FGHI J
58	—	50	7	11. 3350	0. 2842	0. 0000	0. 05	10. 7764	11. 8936	GHI J
59	—	10	21	11. 2908	0. 2842	0. 0000	0. 05	10. 7322	11. 8495	GHI J
60	—	0	28	10. 8167	0. 2842	0. 0000	0. 05	10. 2580	11. 3753	HI JK
61	—	0	21	10. 8000	0. 2842	0. 0000	0. 05	10. 2414	11. 3586	HI JK
62	—	10	14	10. 7992	0. 2842	0. 0000	0. 05	10. 2405	11. 3578	HI JK
63	—	50	150	10. 3825	0. 2842	0. 0000	0. 05	9. 8239	10. 9411	I JK
64	—	20	150	10. 2708	0. 2842	0. 0000	0. 05	9. 7122	10. 8295	I JK
65	—	0	14	10. 2333	0. 2842	0. 0000	0. 05	9. 6747	10. 7920	I JK
66	—	10	7	10. 1275	0. 2842	0. 0000	0. 05	9. 5689	10. 6861	JKL
67	—	50	28	9. 3667	0. 2842	0. 0000	0. 05	8. 8080	9. 9253	KLM
68	—	10	28	8. 5100	0. 2842	0. 0000	0. 05	7. 9514	9. 0686	LM
69	—	40	180	7. 8342	0. 2842	0. 0000	0. 05	7. 2755	8. 3928	MN
70	—	10	150	7. 7392	0. 2842	0. 0000	0. 05	7. 1805	8. 2978	MNO
71	—	20	180	6. 6892	0. 2842	0. 0000	0. 05	6. 1305	7. 2478	NOP
72	—	0	7	6. 3167	0. 2842	0. 0000	0. 05	5. 7580	6. 8753	NOP
73	—	50	180	6. 1950	0. 2842	0. 0000	0. 05	5. 6364	6. 7536	OPQ
74	—	50	210	5. 8508	0. 2842	0. 0000	0. 05	5. 2922	6. 4095	POR
75	—	40	210	5. 2142	0. 2842	0. 0000	0. 05	4. 6555	5. 7728	PORS
76	—	20	210	4. 6533	0. 2842	0. 0000	0. 05	4. 0947	5. 2120	ORS
77	—	30	210	4. 5583	0. 2842	0. 0000	0. 05	3. 9997	5. 1170	RS
78	—	30	180	4. 3250	0. 2842	0. 0000	0. 05	3. 7664	4. 8836	RS
79	—	10	180	4. 0542	0. 2842	0. 0000	0. 05	3. 4955	4. 6128	ST
80	—	10	210	3. 8108	0. 2842	0. 0000	0. 05	3. 2522	4. 3695	ST
81	—	0	150	2. 4467	0. 2842	0. 0000	0. 05	1. 8880	3. 0053	TU
82	—	0	210	2. 0833	0. 2842	0. 0000	0. 05	1. 5247	2. 6420	U
83	—	0	180	1. 3933	0. 2842	0. 0000	0. 05	0. 8347	1. 9520	U
----- Effect=ensaio*dose*di as Method=Bonferroni (P<. 05) Set=9 -----										
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
84	1	50	21	15. 1083	0. 4019	0. 0000	0. 05	14. 3183	15. 8984	A
85	1	20	7	14. 9200	0. 4019	0. 0000	0. 05	14. 1300	15. 7100	AB
86	1	40	7	14. 2567	0. 4019	0. 0000	0. 05	13. 4666	15. 0467	ABC
87	1	20	21	14. 2233	0. 4019	0. 0000	0. 05	13. 4333	15. 0134	ABCD
88	1	20	150	13. 3267	0. 4019	0. 0000	0. 05	12. 5366	14. 1167	ABCDE
89	1	30	7	13. 2883	0. 4019	0. 0000	0. 05	12. 4983	14. 0784	ABCDE
90	1	20	14	13. 0333	0. 4019	0. 0000	0. 05	12. 2433	13. 8234	ABCDEF
91	1	30	150	12. 9950	0. 4019	0. 0000	0. 05	12. 2050	13. 7850	ABCDEF
92	1	50	14	12. 9667	0. 4019	0. 0000	0. 05	12. 1766	13. 7567	ABCDEF
93	1	40	150	12. 9083	0. 4019	0. 0000	0. 05	12. 1183	13. 6984	ABCDEF
94	1	40	21	12. 6500	0. 4019	0. 0000	0. 05	11. 8600	13. 4400	ABCDEF
95	1	10	7	12. 5267	0. 4019	0. 0000	0. 05	11. 7366	13. 3167	BCDEFG
96	1	10	14	12. 2850	0. 4019	0. 0000	0. 05	11. 4950	13. 0750	CDEFGH
97	1	20	28	12. 0133	0. 4019	0. 0000	0. 05	11. 2233	12. 8034	CDEFGH
98	1	10	21	11. 7567	0. 4019	0. 0000	0. 05	10. 9666	12. 5467	DEFGHI
99	1	40	28	11. 1767	0. 4019	0. 0000	0. 05	10. 3866	11. 9667	EFGHI J
100	1	30	21	11. 1267	0. 4019	0. 0000	0. 05	10. 3366	11. 9167	EFGHI JK
101	1	30	14	11. 0533	0. 4019	0. 0000	0. 05	10. 2633	11. 8434	EFGHI JK
102	1	50	150	11. 0200	0. 4019	0. 0000	0. 05	10. 2300	11. 8100	EFGHI JK
103	1	0	28	10. 8167	0. 4019	0. 0000	0. 05	10. 0266	11. 6067	FGHI JK
104	1	0	21	10. 8000	0. 4019	0. 0000	0. 05	10. 0100	11. 5900	FGHI JK
105	1	50	7	10. 3733	0. 4019	0. 0000	0. 05	9. 5833	11. 1634	GHI JKL
106	1	0	14	10. 2333	0. 4019	0. 0000	0. 05	9. 4433	11. 0234	GHI JKL
107	1	10	28	9. 8583	0. 4019	0. 0000	0. 05	9. 0683	10. 6484	HI JKLM
108	1	40	14	9. 8267	0. 4019	0. 0000	0. 05	9. 0366	10. 6167	HI JKLM
109	1	10	150	9. 3683	0. 4019	0. 0000	0. 05	8. 5783	10. 1584	I JKLMN
110	1	30	28	9. 1483	0. 4019	0. 0000	0. 05	8. 3583	9. 9384	JKLMN

Apêndice

111	1	20	180	8.6417	0.4019	0.0000	0.05	7.8516	9.4317	KLMNO
112	1	40	180	8.1483	0.4019	0.0000	0.05	7.3583	8.9384	LMNO
113	1	50	28	7.6850	0.4019	0.0000	0.05	6.8950	8.4750	MNOP
114	1	50	180	7.1967	0.4019	0.0000	0.05	6.4066	7.9867	NOPO
115	1	50	210	6.5300	0.4019	0.0000	0.05	5.7400	7.3200	OPQ
116	1	0	7	6.3167	0.4019	0.0000	0.05	5.5266	7.1067	OPQR
117	1	40	210	6.2017	0.4019	0.0000	0.05	5.4116	6.9917	OPQR
118	1	20	210	5.6167	0.4019	0.0000	0.05	4.8266	6.4067	PQRS
119	1	30	210	5.4567	0.4019	0.0000	0.05	4.6666	6.2467	PQRS
120	1	30	180	4.7633	0.4019	0.0000	0.05	3.9733	5.5534	QRST
121	1	10	210	3.9567	0.4019	0.0000	0.05	3.1666	4.7467	RSTU
122	1	10	180	3.4833	0.4019	0.0000	0.05	2.6933	4.2734	STUV
123	1	0	150	2.4467	0.4019	0.0000	0.05	1.6566	3.2367	TUV
124	1	0	210	2.0833	0.4019	0.0000	0.05	1.2933	2.8734	UV
125	1	0	180	1.3933	0.4019	0.0011	0.05	0.6033	2.1834	V

Apêndice

----- Effect=ensaio*dose*dias Method=Bonferroni (P<.05) Set=10 -----										
Obs	ensaio	dose	dias	Estimate	Standard Error	Ord t	Alpha	Lower	Upper	Letter Group
126	2	30	14	21.5250	0.4019	0.0000	0.05	20.7350	22.3150	A
127	2	20	14	19.8783	0.4019	0.0000	0.05	19.0883	20.6684	AB
128	2	20	21	17.6050	0.4019	0.0000	0.05	16.8150	18.3950	BC
129	2	30	21	17.1517	0.4019	0.0000	0.05	16.3616	17.9417	CD
130	2	40	14	15.4283	0.4019	0.0000	0.05	14.6383	16.2184	CDE
131	2	50	14	15.1033	0.4019	0.0000	0.05	14.3133	15.8934	DE
132	2	30	28	14.9750	0.4019	0.0000	0.05	14.1850	15.7650	DE
133	2	20	28	14.9117	0.4019	0.0000	0.05	14.1216	15.7017	DE
134	2	40	21	13.3750	0.4019	0.0000	0.05	12.5850	14.1650	EF
135	2	30	7	13.2867	0.4019	0.0000	0.05	12.4966	14.0767	EFG
136	2	50	7	12.2967	0.4019	0.0000	0.05	11.5066	13.0867	FGH
137	2	40	7	12.1417	0.4019	0.0000	0.05	11.3516	12.9317	FGHI
138	2	40	28	12.0367	0.4019	0.0000	0.05	11.2466	12.8267	FGHI
139	2	50	21	11.9567	0.4019	0.0000	0.05	11.1666	12.7467	FGHI
140	2	50	28	11.0483	0.4019	0.0000	0.05	10.2583	11.8384	FGHI J
141	2	10	21	10.8250	0.4019	0.0000	0.05	10.0350	11.6150	GHI J
142	2	0	28	10.8167	0.4019	0.0000	0.05	10.0266	11.6067	GHI J
143	2	0	21	10.8000	0.4019	0.0000	0.05	10.0100	11.5900	GHI J
144	2	40	150	10.7533	0.4019	0.0000	0.05	9.9633	11.5434	HI J
145	2	20	7	10.3467	0.4019	0.0000	0.05	9.5566	11.1367	HI J
146	2	0	14	10.2333	0.4019	0.0000	0.05	9.4433	11.0234	HI J
147	2	30	150	9.9050	0.4019	0.0000	0.05	9.1150	10.6950	HI JK
148	2	50	150	9.7450	0.4019	0.0000	0.05	8.9550	10.5350	I JK
149	2	10	14	9.3133	0.4019	0.0000	0.05	8.5233	10.1034	JKL
150	2	10	7	7.7283	0.4019	0.0000	0.05	6.9383	8.5184	KLM
151	2	40	180	7.5200	0.4019	0.0000	0.05	6.7300	8.3100	KLMN
152	2	20	150	7.2150	0.4019	0.0000	0.05	6.4250	8.0050	LMNO
153	2	10	28	7.1617	0.4019	0.0000	0.05	6.3716	7.9517	LMNO
154	2	0	7	6.3167	0.4019	0.0000	0.05	5.5266	7.1067	MNOP
155	2	10	150	6.1100	0.4019	0.0000	0.05	5.3200	6.9000	MNOPQ
156	2	50	180	5.1933	0.4019	0.0000	0.05	4.4033	5.9834	NOPO
157	2	50	210	5.1717	0.4019	0.0000	0.05	4.3816	5.9617	NOPO
158	2	20	180	4.7367	0.4019	0.0000	0.05	3.9466	5.5267	OPQR
159	2	10	180	4.6250	0.4019	0.0000	0.05	3.8350	5.4150	PQR
160	2	40	210	4.2267	0.4019	0.0000	0.05	3.4366	5.0167	PQRS
161	2	30	180	3.8867	0.4019	0.0000	0.05	3.0966	4.6767	PQRST
162	2	20	210	3.6900	0.4019	0.0000	0.05	2.9000	4.4800	QRST
163	2	10	210	3.6650	0.4019	0.0000	0.05	2.8750	4.4550	QRST
164	2	30	210	3.6600	0.4019	0.0000	0.05	2.8700	4.4500	QRST
165	2	0	150	2.4467	0.4019	0.0000	0.05	1.6566	3.2367	RST
166	2	0	210	2.0833	0.4019	0.0000	0.05	1.2933	2.8734	ST
167	2	0	180	1.3933	0.4019	0.0011	0.05	0.6033	2.1834	T

Apêndice

The UNIVARIATE Procedure Variable: y

Moments

N	324	Sum Weights	324
Mean	34.1141975	Sum Observations	11053
Std Deviation	22.6908674	Variance	514.875463
Skewness	1.03192112	Kurtosis	3.85259342
Uncorrected SS	543369	Corrected SS	166304.775
Coeff Variation	66.5144399	Std Error Mean	1.26060374

Basic Statistical Measures Location Variability

Mean	34.11420	Std Deviation	22.69087
Median	37.00000	Variance	514.87546
Mode	40.00000	Range	170.00000
		Interquartile Range	30.50000

Tests for Location: Mu0=0

Test	-Statistic-	-----p Value-----
Student's t	t 27.06179	Pr > t <.0001
Sign	M 161	Pr >= M <.0001
Signed Rank	S 26001.5	Pr >= S <.0001

Tests for Normality

Test	--Statistic--	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W 0.922622	Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D 0.080239	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq 0.582297	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq 4.079792	Pr > A-Sq <0.0050

The UNIVARIATE Procedure Variable: Yt

Moments

N	324	Sum Weights	324
Mean	5.47753086	Sum Observations	1774.72
Std Deviation	2.12193193	Variance	4.50259512
Skewness	-0.3052382	Kurtosis	-0.0864837
Uncorrected SS	11175.4218	Corrected SS	1454.33822
Coeff Variation	38.7388403	Std Error Mean	0.11788511

Basic Statistical Measures Location Variability

Mean	5.477531	Std Deviation	2.12193
Median	6.110000	Variance	4.50260
Mode	6.350000	Range	12.43000
		Interquartile Range	2.85500

Tests for Location: Mu0=0

Test	-Statistic-	-----p Value-----
Student's t	t 46.46499	Pr > t <.0001
Sign	M 162	Pr >= M <.0001
Signed Rank	S 26325	Pr >= S <.0001

Tests for Normality

Test	--Statistic--	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W 0.951181	Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D 0.14808	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq 1.410687	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq 7.230369	Pr > A-Sq <0.0050

ENSAIO 2

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Level s	Val ues
mt d	2	1 2
dose	6	0 10 20 30 40 50
di a	3	10 20 30
rep	9	1 2 3 4 5 6 7 8 9

Number of observations 324

The GLM Procedure

Dependent Variable: Yt

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	43	1172.519633	27.267898	27.09	<.0001
Error	280	281.818592	1.006495		
Corrected Total	323	1454.338225			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Yt Mean
0.806222	18.31559	1.003242	5.477531

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
mt d	1	147.1908160	147.1908160	146.24	<.0001
dose	5	679.4288988	135.8857798	135.01	<.0001
mt d*dose	5	82.6203840	16.5240768	16.42	<.0001
di a	2	53.3244765	26.6622383	26.49	<.0001
mt d*di a	2	48.4056765	24.2028383	24.05	<.0001
dose*di a	10	116.6802938	11.6680294	11.59	<.0001
mt d*dose*di a	10	36.4381012	3.6438101	3.62	0.0002
rep	8	8.4309858	1.0538732	1.05	0.4008

```

=====
                                The GLM Procedure
                                Least Squares Means

                                mtd      dose      di a      Yt LSMEAN
1              0              10      4. 73888889
1              0              20      2. 00111111
1              0              30      1. 52444444
1              10             10      7. 48555556
1              10             20      7. 02777778
1              10             30      4. 08777778
1              20             10      8. 70333333
1              20             20      6. 40888889
1              20             30      6. 83000000
1              30             10      7. 52888889
1              30             20      6. 61000000
1              30             30      6. 91444444
1              40             10      7. 69555556
1              40             20      6. 38888889
1              40             30      6. 79555556
1              50             10      7. 34444444
1              50             20      5. 77777778
1              50             30      6. 86444444
2              0              10      4. 02333333
2              0              20      2. 00111111
2              0              30      1. 52444444
2              10             10      2. 92888889
2              10             20      3. 06666667
2              10             30      2. 59555556
2              20             10      6. 26222222
2              20             20      6. 14222222
2              20             30      4. 09111111
2              30             10      5. 02555556
2              30             20      6. 45888889
2              30             30      6. 09888889
2              40             10      5. 28111111
2              40             20      6. 04444444
2              40             30      7. 01333333
2              50             10      5. 34444444
2              50             20      6. 08777778
2              50             30      6. 47333333

=====

                                The GLM Procedure
                                Least Squares Means

                                mtd*dose*di a Effect Sliced by mtd for Yt

                                mtd      DF      Sum of Squares      Mean Square      F Value      Pr > F
1              17      558. 825048      32. 872062      32. 66      <. 0001
2              17      458. 072783      26. 945458      26. 77      <. 0001

=====

----- Effect=mtd      Method=Bonferroni (P<. 05)      Set=1 -----
Obs      mtd      dose      di a      Estimate      Standard Error      Ord t      Alpha      Lower      Upper      Letter Group
1         1         -         -         6. 1515      0. 07882      0. 0000      0. 05      5. 9964      6. 3067      A
2         2         -         -         4. 8035      0. 07882      0. 0000      0. 05      4. 6484      4. 9587      B

----- Effect=dose      Method=Bonferroni (P<. 05)      Set=2 -----
Obs      mtd      dose      di a      Estimate      Standard Error      Ord t      Alpha      Lower      Upper      Letter Group
3         -         0         -         2. 6356      0. 1365      0. 0000      0. 05      2. 3668      2. 9043      C
4         -         10        -         4. 5320      0. 1365      0. 0000      0. 05      4. 2633      4. 8008      B
5         -         20        -         6. 4063      0. 1365      0. 0000      0. 05      6. 1376      6. 6750      A
6         -         30        -         6. 4394      0. 1365      0. 0000      0. 05      6. 1707      6. 7082      A
7         -         40        -         6. 5365      0. 1365      0. 0000      0. 05      6. 2677      6. 8052      A
8         -         50        -         6. 3154      0. 1365      0. 0000      0. 05      6. 0466      6. 5841      A

----- Effect=mtd*dose      Method=Bonferroni (P<. 05)      Set=3 -----
Obs      mtd      dose      di a      Estimate      Standard Error      Ord t      Alpha      Lower      Upper      Letter Group
9         1         0         -         2. 7548      0. 1931      0. 0000      0. 05      2. 3748      3. 1349      C
10        1         10        -         6. 2004      0. 1931      0. 0000      0. 05      5. 8203      6. 5804      B
11        1         20        -         7. 3141      0. 1931      0. 0000      0. 05      6. 9340      7. 6941      A
12        1         30        -         7. 0178      0. 1931      0. 0000      0. 05      6. 6377      7. 3978      AB
13        1         40        -         6. 9600      0. 1931      0. 0000      0. 05      6. 5799      7. 3401      AB
14        1         50        -         6. 6622      0. 1931      0. 0000      0. 05      6. 2822      7. 0423      AB

----- Effect=mtd*dose      Method=Bonferroni (P<. 05)      Set=4 -----
Obs      mtd      dose      di a      Estimate      Standard Error      Ord t      Alpha      Lower      Upper      Letter Group
15        2         0         -         2. 5163      0. 1931      0. 0000      0. 05      2. 1362      2. 8964      B
16        2         10        -         2. 8637      0. 1931      0. 0000      0. 05      2. 4836      3. 2438      B
17        2         20        -         5. 4985      0. 1931      0. 0000      0. 05      5. 1185      5. 8786      A
18        2         30        -         5. 8611      0. 1931      0. 0000      0. 05      5. 4811      6. 2412      A
19        2         40        -         6. 1130      0. 1931      0. 0000      0. 05      5. 7329      6. 4930      A
20        2         50        -         5. 9685      0. 1931      0. 0000      0. 05      5. 5885      6. 3486      A

----- Effect=di a      Method=Bonferroni (P<. 05)      Set=5 -----

```

Apêndice

Obs	mtd	dose	di a	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
21	—	—	10	6.0302	0.09654	0.0000	0.05	5.8402	6.2202	A
22	—	—	20	5.3346	0.09654	0.0000	0.05	5.1446	5.5247	B
23	—	—	30	5.0678	0.09654	0.0000	0.05	4.8777	5.2578	B
----- Effect=mtd*di a Method=Bonferroni (P<.05) Set=6 -----										
Obs	mtd	dose	di a	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
24	1	—	10	7.2494	0.1365	0.0000	0.05	6.9807	7.5182	A
25	1	—	20	5.7024	0.1365	0.0000	0.05	5.4337	5.9712	B
26	1	—	30	5.5028	0.1365	0.0000	0.05	5.2340	5.7715	B
----- Effect=mtd*di a Method=Bonferroni (P<.05) Set=7 -----										
Obs	mtd	dose	di a	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
27	2	—	10	4.8109	0.1365	0.0000	0.05	4.5422	5.0797	A
28	2	—	20	4.9669	0.1365	0.0000	0.05	4.6981	5.2356	A
29	2	—	30	4.6328	0.1365	0.0000	0.05	4.3640	4.9015	A
----- Effect=dose*di a Method=Bonferroni (P<.05) Set=8 -----										
Obs	mtd	dose	di a	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
30	—	0	10	4.3811	0.2365	0.0000	0.05	3.9156	4.8466	FG
31	—	0	20	2.0011	0.2365	0.0000	0.05	1.5356	2.4666	H
32	—	0	30	1.5244	0.2365	0.0000	0.05	1.0590	1.9899	H
33	—	10	10	5.2072	0.2365	0.0000	0.05	4.7417	5.6727	DEF
34	—	10	20	5.0472	0.2365	0.0000	0.05	4.5817	5.5127	EF
35	—	10	30	3.3417	0.2365	0.0000	0.05	2.8762	3.8071	G
36	—	20	10	7.4828	0.2365	0.0000	0.05	7.0173	7.9483	A
37	—	20	20	6.2756	0.2365	0.0000	0.05	5.8101	6.7410	ABCD
38	—	20	30	5.4606	0.2365	0.0000	0.05	4.9951	5.9260	CDEF
39	—	30	10	6.2772	0.2365	0.0000	0.05	5.8117	6.7427	ABCD
40	—	30	20	6.5344	0.2365	0.0000	0.05	6.0690	6.9999	ABC
41	—	30	30	6.5067	0.2365	0.0000	0.05	6.0412	6.9721	ABC
42	—	40	10	6.4883	0.2365	0.0000	0.05	6.0229	6.9538	ABC
43	—	40	20	6.2167	0.2365	0.0000	0.05	5.7512	6.6821	BCDE
44	—	40	30	6.9044	0.2365	0.0000	0.05	6.4390	7.3699	AB
45	—	50	10	6.3444	0.2365	0.0000	0.05	5.8790	6.8099	ABCD
46	—	50	20	5.9328	0.2365	0.0000	0.05	5.4673	6.3983	BCDE
47	—	50	30	6.6689	0.2365	0.0000	0.05	6.2034	7.1344	ABC
----- Effect=mtd*dose*di a Method=Bonferroni (P<.05) Set=9 -----										
Obs	mtd	dose	di a	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
48	1	0	10	4.7389	0.3344	0.0000	0.05	4.0806	5.3972	DE
49	1	0	20	2.0011	0.3344	0.0000	0.05	1.3428	2.6594	F
50	1	0	30	1.5244	0.3344	0.0000	0.05	0.8662	2.1827	F
51	1	10	10	7.4856	0.3344	0.0000	0.05	6.8273	8.1438	ABC
52	1	10	20	7.0278	0.3344	0.0000	0.05	6.3695	7.6861	ABC
53	1	10	30	4.0878	0.3344	0.0000	0.05	3.4295	4.7461	E
54	1	20	10	8.7033	0.3344	0.0000	0.05	8.0450	9.3616	A
55	1	20	20	6.4089	0.3344	0.0000	0.05	5.7506	7.0672	BCD
56	1	20	30	6.8300	0.3344	0.0000	0.05	6.1717	7.4883	ABC
57	1	30	10	7.5289	0.3344	0.0000	0.05	6.8706	8.1872	ABC
58	1	30	20	6.6100	0.3344	0.0000	0.05	5.9517	7.2683	BCD
59	1	30	30	6.9144	0.3344	0.0000	0.05	6.2562	7.5727	ABC
60	1	40	10	7.6956	0.3344	0.0000	0.05	7.0373	8.3538	AB
61	1	40	20	6.3889	0.3344	0.0000	0.05	5.7306	7.0472	BCD
62	1	40	30	6.7956	0.3344	0.0000	0.05	6.1373	7.4538	BC
63	1	50	10	7.3444	0.3344	0.0000	0.05	6.6862	8.0027	ABC
64	1	50	20	5.7778	0.3344	0.0000	0.05	5.1195	6.4361	CDE
65	1	50	30	6.8644	0.3344	0.0000	0.05	6.2062	7.5227	ABC
----- Effect=mtd*dose*di a Method=Bonferroni (P<.05) Set=10 -----										
Obs	mtd	dose	di a	Estimate	Standard Error	Ord t	Al pha	Lower	Upper	Letter Group
66	2	0	10	4.0233	0.3344	0.0000	0.05	3.3650	4.6816	CD
67	2	0	20	2.0011	0.3344	0.0000	0.05	1.3428	2.6594	E
68	2	0	30	1.5244	0.3344	0.0000	0.05	0.8662	2.1827	E
69	2	10	10	2.9289	0.3344	0.0000	0.05	2.2706	3.5872	DE
70	2	10	20	3.0667	0.3344	0.0000	0.05	2.4084	3.7250	DE
71	2	10	30	2.5956	0.3344	0.0000	0.05	1.9373	3.2538	DE
72	2	20	10	6.2622	0.3344	0.0000	0.05	5.6039	6.9205	AB
73	2	20	20	6.1422	0.3344	0.0000	0.05	5.4839	6.8005	AB
74	2	20	30	4.0911	0.3344	0.0000	0.05	3.4328	4.7494	CD
75	2	30	10	5.0256	0.3344	0.0000	0.05	4.3673	5.6838	BC
76	2	30	20	6.4589	0.3344	0.0000	0.05	5.8006	7.1172	AB
77	2	30	30	6.0989	0.3344	0.0000	0.05	5.4406	6.7572	AB
78	2	40	10	5.2811	0.3344	0.0000	0.05	4.6228	5.9394	ABC
79	2	40	20	6.0444	0.3344	0.0000	0.05	5.3862	6.7027	AB
80	2	40	30	7.0133	0.3344	0.0000	0.05	6.3550	7.6716	A
81	2	50	10	5.3444	0.3344	0.0000	0.05	4.6862	6.0027	ABC
82	2	50	20	6.0878	0.3344	0.0000	0.05	5.4295	6.7461	AB
83	2	50	30	6.4733	0.3344	0.0000	0.05	5.8150	7.1316	AB