

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

MANUTENÇÃO E VALIDAÇÃO DA COLEÇÃO DE CULTURA DE MICROFUNGOS DO PROGRAMA DE PESQUISA DE BIODIVERSIDADE DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO – PPBIO

**Adrielle Simões Macêdo; Luis Fernando Pascholati Gusmão; Sheila Miranda
Leão Ferreira e Quarto Autor.**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: adrielesimoes3434@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lgusmao.uefs@gmail.com
3. Sheila Miranda Leão Ferreira, Participante do projeto ou núcleo tal, Departamento Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sheila1leao@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: culturas; microorganismo; reativação.

INTRODUÇÃO

As coleções de culturas são repositórios de organismos relevantes para o desenvolvimento científico e biotecnológico. Coleções de culturas de microrganismos são centros de conservação de recursos genéticos *ex-situ*, que tem como função principal a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição de microrganismos e células autenticadas e reagentes biológicos certificados (Vazolle *et al.*, 2005). O número estimado de espécies de microrganismos no mundo gira em torno de 1.800.000, sendo que somente pouco mais de 2% deste total esta sendo preservado em coleções de culturas (Guedes *et al.*, 2014). Existe cerca de 600 coleções de cultura registradas atualmente no World Data Center for Microorganisms (WDCM) e quando juntas, elas detêm quase 1,8 milhões de cepas de uma ampla gama de microrganismos (mais de meio milhão são fungos) (Smith, 2012). Além de seus papéis ecológicos como decompositores, os fungos são importantes em vários aspectos da aplicação pesquisa (Sette *et al.*, 2013). Portanto, o material biológico conservado por métodos adequados em coleções de culturas tem uma ampla gama de aplicações nas áreas de saúde, agropecuária, indústria e meio ambiente (Vazolle *et al.*, 2005). Essas aplicações colaboram para que a importância das coleções de culturas de microrganismos seja reconhecida e também para o aumento da exploração desse material por parte de universidades, institutos de pesquisa e empresas.

Um dos motivos que impossibilita o desenvolvimento ambiental no Brasil é fato de incentivo e de recursos às coleções de cultura ainda que muitas tenham sido referências em pesquisa de biodiversidade e sistemática. As coleções de cultura, em geral, não dispõem sequer do mínimo indispensável para a sua manutenção em condições satisfatórias para atender a demanda de um país em franco desenvolvimento (Canhos, 1994). A implantação e manutenção de coleções de culturas proporcionam estoques de linhagens nativas, que podem ser utilizadas em diversos programas de interesse da sociedade (Canhos, 1994; Guedes *et al.*, 2004). Visto que as coleções de cultura podem

promover o conhecimento sobre diversidade, conservação e exploração biotecnológica de microorganismos e de fungos em específico.

O Laboratório de Micologia – LAMIC/UEFS desenvolve atividades de pesquisa com taxonomia, sistemática molecular e preservação de microfungos do semiárido brasileiro e implementou a Coleção de Cultura de Microfungos da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAMIC/UEFS). Ele também interage com a Coleção de Cultura de Microorganismos do estado da Bahia (CCMB), além de ser vinculada ao Programa de Pesquisa em Biodiversidade do Semiárido a coleção dá suporte à estudos de grupos de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, com o fornecimento de espécies precisamente identificadas com potencial biotecnológico para o desenvolvimento de teses e dissertações, e possíveis futuras aplicações biotecnológicas desses microrganismos. O presente plano de trabalho pretende dar continuidade a manutenção e estudo (morfológico e molecular) dos espécimes da Coleção de Cultura de Microfungos do LAMIC/UEFS, atuando na reativação dos isolados, verificação da pureza das culturas, inspeção da coleção, validação e re-preservação em, no mínimo, dois métodos, além do isolamento e depósito de espécimes coletadas recentemente pelos projetos do LAMIC.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

O trabalho realizado na Coleção de Cultura do LAMIC é constante e diário. A reativação dos isolados puros se faz necessária geralmente de três em três anos, desta forma, os isolados deste período devem ser reativados, verificados, validados e purificados em meios de cultura. Após a reativação e verificação dos isolados estes foram encaminhados para depósito na CCMB. Dois métodos foram utilizados de acordo com Hawksworth & Kirsop (1998).

a) Método de Castellani (água estéril) (**figura 2, A e B**). É um dos métodos mais usuais para depósito de fungos filamentosos tropicais, sendo extremamente barato e eficaz para a maioria dos fungos. O método consiste na retirada de pedaços de meio de cultura de fungos isolados em cultura pura e esporulados para frascos tipo penicilina com água destilada esterilizada estéril. Para os fungos fitopatogênicos há relatos na literatura que, após fechados os frascos, estes foram reativados 30 anos após de sua preservação, e houve a manutenção de suas características fisiológicas e patógenas.

b) Método em óleo mineral (**figura 2,C**). Este método é utilizado em larga escala nas coleções de cultura de diversos países. Embora seja uma forma bastante utilizada, pode-se perder alguns isolados, pois como colocado anteriormente, de 3 em 3 anos deve-se reativar a coleção. A coleção LAMIC/UEFS está preservada totalmente em óleo mineral.

A identificação (validação) dos espécimes foi realizada através de literatura especializada e para a descrição das culturas puras foi realizada de acordo com (de Hoog *et al.* 2005).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Durante o período de 02/2019 até 03/2020, foram selecionados 50 espécimes depositados na Coleção de Cultura do LAMIC que foram inseridos nos anos de 2008 e 2016, nesse grupo foram incluídos aqueles que possuíam gêneros registrados, mas não confirmados, espécimes sem identificação e/ou com escassez de exemplares na coleção. No intuito de mantê-los ativos, preservados e aumentar o número desses exemplares foi realizada a reativação em laboratório. O meio de cultivo designado foi o

CMA (Cenoura- Malt-Ágar) (**figura 1,A e B**) vertido em placa de *Petri* (**figura 1,C**), onde duas amostras de cada espécime foram mantidas isoladas (**figura 1, E**). O desenvolvimento de cada cultura foi variado e durante esse processo elas foram acompanhadas, controladas e vistoriadas afim de que se mantivessem livres de agentes contaminantes como *Cladosporium* e *Penicillium*. Assim que uma cultura pura atingia a fase de esporulação era levada ao microscópio (**figura 1, F**) para ser observada, identificada ou validada. A cultura que apresentava contaminação era repicada ou descartada, e o espécime de origem submetido a uma ou outras reativações até que se obtivesse uma cultura pura. Se a contaminação era proveniente do próprio espécime este também era descartado e substituído por outro da coleção, porém na ausência de material para a reativação o fungo era considerado “perdido” e assim excluído da coleção.



Figura 1. A- Conservação de CMA em estado sólido; B-Preparo de meio de cultura CMA; C- Placas de CMA em refrigerador; D- Culturas de diferentes tipos de crescimento; E- Fungos repicados e mantidos para crescimento; F- Observação das culturas em microscópio (lupa).

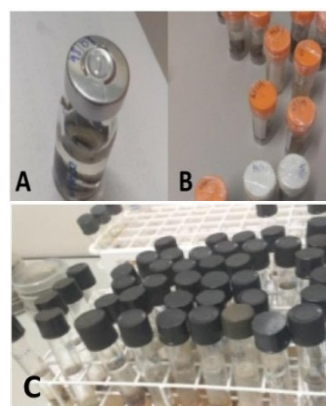


Figura 2. A e B- Fungos preservados em água destilada estéril; C- Fungos preservados em óleo mineral.



Por essas razões e de acordo com os resultados, houve perda de 2 exemplares únicos e 3 espécimes substituídos. Do total de espécimes selecionados para a reativação 5 espécimes não foram reativados e outros 26 tiveram a reativação interrompidas. No entanto, entre os 50 espécimes, 45 foram reativados e 17 reinsertos na coleção sendo 14

deles preservados em Castellani e 7 em óleo mineral. Dos fungos reinseridos 4 gêneros foram validados:

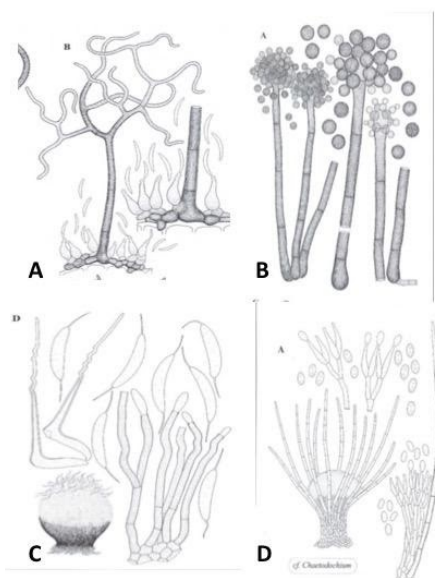


Figura 3. Características morfológicas de alguns gêneros. Ilustrações: SEIFERT, K. *et al.* 2011. The genera of hyphomycetes. CBS Biodiversity Series 9.

- A- *Gyrotrix* sp.
- B- *Periconia* sp.
- C- *Tozentella* sp.
- D- *Volutella* sp.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização das atividades de manutenção e validação da coleção de cultura de microfungos do PPBIO exigiu um trabalho árduo e contínuo de reativação e controle das culturas, visto que o modo e o tempo de desenvolvimento de cada uma delas foram variáveis (**figura 1, D**). No entanto a incidência de agentes contaminantes foi bem mais influente no desenvolver do projeto causando atrasos e perda de material. Com a chegada da pandemia do COVID 19 o trabalho foi estagnado e as atividades em laboratório foram paradas, sendo assim a inspeção das culturas tornou-se inviável e muitas culturas em processo de reativação foram interrompidas e descartadas.

Evidentemente o presente estudo envolveu pesquisa e atividades que devem ser realizadas de forma constante através de recursos humanos bem instruídos e metodologias que colaborem para melhores condições de cultivo, manutenção, identificação e preservação dos fungos. Essa necessidade de aprimoramento visa a continuidade produção de conhecimento, ampliação e valorização também da coleção de cultura de fungos do LAMIC/UEFS e também da Coleção de Cultura de Microrganismos do estado da Bahia (CCMB)

REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB.** Universitas: Ciências da Saúde, Brasília, v.02 n.2, p. 236-251, 2004.

Durães Sette L, Pagnocca FC, Rodrigues A (2013) **Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation.** Fungal Genetics and Biology 60: 2–8.

Vazoller, R.F & Canhos, V.P. 2005. **Coleções de Culturas de Serviços e Centros de Recursos Biológicos.**

Canhos VP, Umino C, Manfio GP. **“Coleções de Culturas de Microrganismos”**. In: Brito MCW, Joly CA (eds.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento no final do século XX. Volume 7: Infra-estrutura de Conservação in situ e ex situ. São Paulo: Fapesp, 1999; pp. 81-101 (disponível em <http://www.biota.org.br>).

Uetanabaro, A. P. T.; Góes-Neto, A., 2006. **Importance of culture collections of microorganisms (CCMs) for the Conservation of Microbial Biotechnological resources of Brazilian Semiarid Region**. Pp. 41-43. In: L. P. Queiroz, A, Rapini, A. M. Giulietti (orgs.) Towards Greater Knowledge of the Brazilian Semi- Arid Biodiversity, Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia/ MCT.

De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. 2005. **Atlas of Clinical Fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures-Universitat Rovira i Virgili.

Hawksworth, D.L. & Kirsop, B.E. 1998. **Filamentous fungi – Living resources for biotechnology**. Cambridge University Press. Cambridge.

SEIFERT, K. *et al.* 2011. **The genera of hyphomycetes**. CBS Biodiversity Series 9: 112, 269.