

VIABILIDADE DE FUNGOS PRESERVADOS NA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS MULTIFUNCIONAIS DE CLIMA TEMPERADO

**KARINA FARIAS DE OLIVEIRA¹; IEDA BAADE DOS SANTOS²; MARIA LAURA
TURINO MATTOS³**

¹*Universidade Federal de Pelotas– karinafariasdeoliveira@gmail.com*

²*Embrapa ClimaTemperado – ieda.santos@embrapa.br*

³*Embrapa Clima Temperado – maria.laura@embrapa.br*

1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos microbianos são fontes de variabilidade genética que conferem funções diferenciadas aos microrganismos, bem como no seus subprodutos. Dessa forma, o isolamento, identificação, preservação e o uso de microrganismos são práticas imprescindíveis para o desenvolvimento de pesquisas, processos e a obtenção de produtos de interesse econômico (GIRÃO, et al., 2004). A finalidade da preservação é manter as culturas em estado viável, sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas, assim como manter sua completa viabilidade e estabilidade, permitindo a formação de estoques de cepas que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes linhas de pesquisas. (MORIWAKI et al., 2009; MATTOS et al., 2018; GIRÃO et al., 2004).

Os métodos de manutenção de microrganismos podem ser classificados de acordo com o tempo máximo de preservação (COSTA; FERREIRA, 1991). O método de Castellani é um método de médio prazo e consiste no armazenamento de microrganismos em água destilada esterilizada para a redução do metabolismo com consequente latência das células diante da restrição de fontes nutritivas (COSTA & FERREIRA, 1991; ABREU & TUTUNJI, 2004).

A preservação de fungos pelo método Castellani possibilita, em curto espaço de tempo, provar a viabilidade e a capacidade de esporulação das cepas submetidas aos estudos, sendo a técnica de manutenção em frascos lacrados mais eficaz para preservar as características de esporulação de fungos filamentosos de interesse médico (DIOGO et al., 2005). Em trabalho realizado por Aparecido et al. (2018) com o objetivo de avaliar a viabilidade e a patogenicidade de vinte culturas, pertencentes a diferentes gêneros (*Fusarium*, *Melanconium*, *Pestalotia*, *Phytophthora*, *Venturia*, *Thielaviopsis*, *Elsinoe*, *Fusicoccum* e *Botrytis*), com amostras mantidas por diferentes métodos de preservação, destacou-se o método de Castellani como o mais eficiente quanto à manutenção da viabilidade e patogenicidade das culturas.

A técnica utilizada no método Castellani indica que, preferencialmente, devem ser usadas culturas jovens, com cerca de dez a quinze dias, utilizando-se suspensões concentradas de células, a partir de um crescimento em meio sólido ou a inclusão de blocos de ágar contendo os microrganismos. Quanto à utilização dos blocos de ágar em água, sua aplicação é restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao ágar como bolores e algumas leveduras (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

Considerando bolores e leveduras, resultados satisfatórios têm sido obtidos no que se refere à viabilidade, estabilidade, pureza e patogenicidade. Há relatos de Aparecido et al. (2001) afirmando que este método além de garantir a preservação das características originais da cultura por longos períodos, promove



a ausência de contaminação por ácaros, apresenta baixo custo por utilizar somente água destilada e revela a necessidade de pequeno espaço físico para acondicionar os frascos, além de ser empregado para um grande número de gêneros e espécies de fungos.

Na Coleção de Microrganismos Multifuncionais de Clima Temperado (CMMCT), localizada no laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Clima Temperado, os microrganismos prospectados para o uso agrícola e biotecnológico são preservados por lyophilização, método de Castellani (água destilada) e solo seco estéril. Essa coleção possui um acervo de 1072 acessos, sendo 250 fungos preservados em água (método Castellani) e solo seco estéril. Em cumprimento aos requisitos obrigatórios de qualidade da CMMCT, relacionados à presevação de microrganismos, deve ser verificada, anualmente, a viabilidade de, no mínimo, 1% dos acessos (MATTOS et al., 2018).

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo verificar a viabilidade de 17 acessos fúngicos preservados pelo método de Castellani na CMMCT.

2. METODOLOGIA

Foram avaliados 17 acessos fúngicos: CMM 231, CMM 267, CMM 268, CMM 269, CMM 950, CMM 951, CMM 952, CMM 953, CMM 956, CMM 1032, CMM 1033, CMM 1034, CMM 1035, CMM 1036, CMM 1037, CMM 1038 e CMM 1133, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Metarhizium*. Os micélios de fungos estavam preservados pelo método Castellani, desde 2012, em tubos de ensaio com tampa rosqueada, contendo água destilada estéril, em triplicata, armazenados em geladeira à temperatura média de +4°C. O procedimento para a recuperação e avaliação da pureza dos acessos, consistiu em retirar discos de micélio, com o auxílio de alça de platina, e depositar sobre o centro de uma placa de Petri contendo meio agar batata dextrose (BDA), em duplicata. As placas foram incubadas por até 21 dias à 25 °C.

Os acessos que não apresentaram crescimento nesse período, foram repicados novamente utilizando o mesmo procedimento em meio de cultura Martin. A verificação da pureza dos acessos foi feita por meio da observação visual do crescimento das colônias fúngicas e suas características fenotípicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de 21 dias de incubação dos fungos em meio ágar batata dextrose (BDA), verificou-se que os acessos CMM 231, CMM 268, CMM 269, CMM 952, CMM 956, CMM 1032, CMM 1034 e CMM 1035 continuaram o crescimento sem a presença de contaminantes nas placas. Por outro lado, os acessos CMM 267, CMM 950, CMM 953 e CMM 1038 apresentaram contaminação nas placas. Com relação aos acessos CMM 951, CMM 1033, CMM 1036, CMM 1037 e CMM 1133, não apresentaram crescimento nas placas contendo BDA após 21 dias de incubação. Assim, esses acessos que não apresentaram crescimento em BDA, foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura Martin, quando em 14 dias de incubação houve crescimento dos acessos sem a presença de contaminantes.

Deste modo, podemos observar que diferentes microrganismos possuem necessidades nutricionais diferentes, sendo necessária a utilização de meios de



cultura com composições de carboidratos e minerais para a eficiência de recuperação de acessos preservação por longos períodos na CMMCT (nove anos) e com restrição de fontes nutritivas. Além disso, comprovou-se que o método de Castellani é eficiente para a manutenção da viabilidade dos gêneros dos fungos avaliados nessa verificação anual da CMMCT.

4. CONCLUSÕES

O método Castellani demonstra eficácia para manutenção da viabilidade e pureza de micélios de fungos preservados na Coleção de Microrganismos Multifuncionais de Clima Temperado por nove anos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v.2 n.2, p. 236-25, 2004.

APARECIDO, C. C.; ROSA, E. C.; COSTA, I. A. M.; JORGE, C. M. Avaliação de diferentes métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. **Biológico**, São Paulo, v.80, n.1, p.1-7, jan./dez., 2018.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

DIOGO, H. C; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, São Paulo, v.80, n.6, p.591-594, 2005.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malasseziapachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.37, n.3,.p. 229-233, mai/jun. 2004.

MATTOS, M. L. T.; GALARZ, L. A.; SANTOS, I. B. dos; VAZ, JENNIFER. Cumprimento de requisito obrigatório de qualidade de preservação na coleção de microrganismos multifuncionais de clima temperado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**. 5., Fortaleza, 2018. RG News, 2018. p.157.

MORIWAKI, C, Cassiana MAZZER, C; PAZZETTO, R ;MATIOLI, G. Avaliação de métodos para manutenção e preservação de bactéria esporulada produtora da enzima CGTase. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v.31, n.2, p. 113-118, 2009 DOI: 10.4025/actascihealthsci.v31i2.6910.

PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C; FIGUEIREDO, M. B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010.



ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas.** Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL J. C; MINAFRA, C. S. R. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 1 3 9 8, 2012.