

Avaliação da viabilidade de Culturas de *Paecilomyces* preservadas em Óleo Mineral na Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA

Lima H.D.S¹; Jesus M.A¹; Oliveira D.A.S¹

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM. E-mail: hunterdouglasshd@gmail.com, ranna@inpa.gov.br,

Resumo

A Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultura do INPA abriga linhagens de diferentes fungos anamorfos de importância biotecnológica, agrossilvicultural e de saúde. O gênero *Paecilomyces* (Moniliaceae) se destaca por ter diversos potenciais, tais como: agroindustrial, biotecnológico e patológico. Os isolados estão preservados nos métodos de Óleo mineral, Sílica gel e Baixa temperatura. O presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade das culturas de *Paecilomyces* armazenadas em Óleo mineral, visando à reativação das cepas ao mesmo tempo verificar as vantagens e desvantagens deste método de preservação. Foi realizado um levantamento das linhagens de *Paecilomyces* preservadas em Óleo mineral depositadas no acervo citado. Com os dados devidamente organizados, foi retirado o óleo das culturas mantidas em tubos criogênicos, com o auxílio de papel de filtro placa de Petri com, ambos estéreis em câmara de fluxo laminar devidamente fechada, visando à retirada total do óleo. Em seguida, dois papéis de filtros pequenos estéreis e umedecidos em caldo glicosado foram colocados sobre na parte da colônia com possível micélio, sob condições assépticas, visando o crescimento micelial em todo o papel de filtro. Os papéis filtro já colonizado foram inoculado em placa de Petri com meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e levados à estufa a 25°C por um período até o crescimento do fungo no meio de cultivo. As culturas contaminadas ou morfológicamente descaracterizadas foram descartadas e outras amostras da linhagem foram reativadas até a obtenção da cultura pura. As características morfológicas e fenotípicas do fungo foram observadas sob estereomicroscópio. O presente estudo contribuiu para a recuperação de todas as (94) linhagens preservadas pelo método de Óleo mineral. O método de preservação em óleo mineral pode ser considerado eficiente na conservação de cepas de *Paecilomyces*, no entanto, recomenda-se o uso de recipiente com total vedação o que minimiza o risco de contaminação.

Palavras Chaves: Viabilidade, Óleo Mineral, *Paecilomyces*.

Introdução

Diante da imensa diversidade genética de microrganismos da região Amazônica, as coleções apresentam um importante papel na preservação e manutenção das linhagens destes microrganismos (Sola *et al.*, 2012). Para tal, a conservação do estado

inicial do microrganismo é essencial para evitar mutações indesejáveis, garantindo assim a vitalidade e quantidade das células (Paoli 2005; Okafor 2007).

Os métodos de preservação das culturas são classificados de acordo com o tempo de conservação, são eles de curto prazo: repique contínuo; médio prazo: meios líquidos como, preservação em Óleo mineral e Água destilada e longo prazo: Liofilização e Criopreservação (Costa e Ferreira 1991; Pires et al. 2012). O método de preservação em óleo mineral consiste na aplicação de óleo mineral esterilizado sobre a cultura, a fim de limitar a quantidade de oxigênio disponível, assim reduzindo o metabolismo e a taxa de multiplicação do microrganismo (Romero 2014; Sales-Campos *et al.*, 2015).

Na Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA, estão depositadas linhagens de *Paecilomyces* isoladas de diversas espécies florestais de importância econômica da região amazônica, resíduos madeireiros, produtos florestais, dentre outros substratos lignocelulolíticos avaliados em estudos de tecnologias da madeira e biotecnologia realizados no INPA.

O gênero *Paecilomyces* pertence ao filo Eumycota, Classe Deuteromycetes, Ordem Moniliales e Família Moniliaceae (Santin, 2008) suas colônias são de crescimento rápido, variando de cor em ouro, verde-ouro, amarelo-marrom, lilás ou castanho, mas nunca em uma cor uniforme (Samson, 1974). O gênero é de ampla distribuição em diferentes substratos lignocelulolíticos. *Paecilomyces* é associado a contaminações, pois pode provocar infecções em humanos tais como úlcera de córnea, ceratite e endoftalmite por uso incorreto de lentes de contato ou cirurgias oculares mal realizadas, além de serem associados a micoses oportunistas e doenças alérgicas (Chan-Tack *et al.*, 1999). As linhagens de *Paecilomyces* encontravam-se preservadas em diferentes métodos tais como: Baixa temperatura, Óleo mineral e Sílica gel. Neste estudo analisou-se a viabilidade das culturas armazenadas no método Óleo mineral, visando à preservação das características biológicas de *Paecilomyces*, assim como as vantagens e desvantagens da preservação destas culturas armazenadas por longo período.

Material e Métodos

Inicialmente, foi realizado um levantamento das linhagens de *Paecilomyces* mantidas pelo método de preservação em Óleo mineral, que se encontram depositadas no acervo. Posteriormente as culturas foram agrupadas em ordem crescente de acordo com a data do repique. Com os dados de cada linhagem devidamente organizados e as culturas agrupadas, foi retirado o óleo dos tubos criogênicos, os mesmos foram colocados invertidos em Papel de Filtro Whatman (esterilizado a 120°C), por dois dias em uma placa de Petri na câmara de fluxo laminar, as placas foram deixadas na câmara devidamente fechada por um período 03 a 05 dias, visando à retirada total do óleo conforme (Ista, 1978; EL-Aziz, 2015), os papéis de filtros encharcados foram trocados por outros secos. Dois papéis de filtros pequenos estéreis e umedecidos em caldo glicosado foram colocados sobre a colônia do fungo, sob condições assépticas (Figura 1a). Os tubos com os papéis foram mantidas em estufa a temperatura de 25 a 27 °C até o crescimento micelial em todo o papel filtro.

O papel de filtro colonizado pelo fungo foi colocado no centro de uma placa de Petri com meio de cultura BDA, visando o crescimento micelial nas placas, as quais foram mantidas em estufa a temperatura 25 e 27 °C por 07 dias, tempo suficiente para formação das colônias com características macroscópicas da cultura tais como: velocidade de crescimento (lento, relativamente lento, rápido), textura (algodonosa, granular ou pulverulenta), topografia (umbiliforme, elevada e outras), coloração (variando suas cores em ouro, verde-ouro, amarelo-marrom, lilás ou castanho), presença de pigmentos (exsudado) de acordo com os critérios estabelecidos por Neufeld (1999). Em caso de contaminação, procedeu-se o processo de descontaminação através de repiques contínuos até a purificação da cultura (Figura 1b). Também, no caso de perda total da cultura, outra cepa mantida em outro método foi reativada, no sentido de se obter maior número de culturas, e assim a preservação do acervo de *Paecilomyces*.

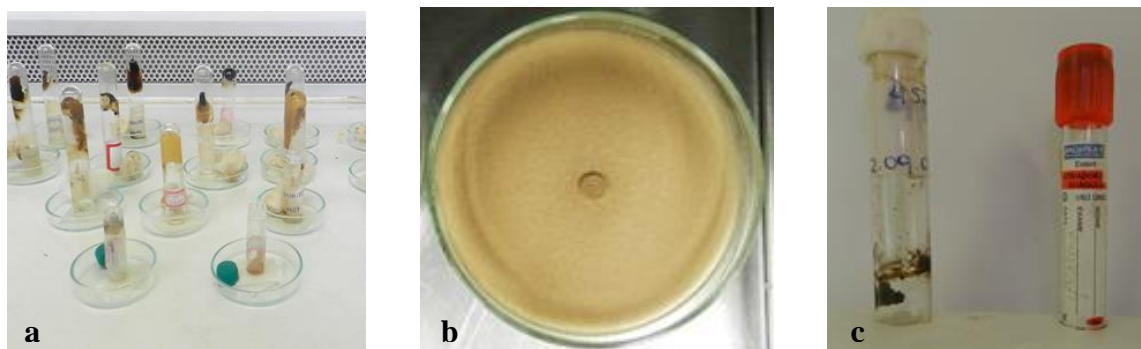


Fig. 1 - Metodologia utilizada para verificação da viabilidade dos espécimes de *Paecilomyces* armazenados em método de preservação Óleo Mineral. a) Tubo de ensaio invertido para retirada do óleo mineral. b) Cultura de *Paecilomyces* purificadas. c) Tubo de ensaio com tampão de algodão e tubos criogênicos com inoculo de *Paecilomyces*.

Resultados e Discussão

Na coleção estão depositadas 124 linhagens de *Paecilomyces* preservadas nos diferentes métodos de armazenamento. Destas, 94 estavam preservadas em Óleo mineral.

Um total de 94 culturas foi reativado, no entanto somente 19 linhagens não apresentavam qualquer tipo de contaminação e/ou alteração em suas características morfológica, portanto 75 linhagens apresentaram contaminações externas de microrganismos, tais como, bactérias, leveduras e outros fungos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, dentre outros.

Também se as culturas de *Paecilomyces* mantidas pelo método de Óleo mineral entre o período de 2007 até 2014 em temperatura ambiente não apresentaram contaminação, enquanto que a maioria das culturas preservadas entre os anos de 2000 e 2006 apresentaram contaminação. Constata-se que, a vedação dos tubos de ensaio com tampão de algodão não é indicada, pois pode facilitar a entrada de outros microrganismos entre os espaços do tubo e o algodão durante o período de armazenamento. Por outro lado, as culturas preservadas em método Óleo mineral, armazenadas em tubos criogênicos tampados com rosca entre o período de 2007 e 2014, não apresentaram quaisquer contaminações, pois o tubo é bem vedado, o que dificulta a entrada de microrganismos nas culturas (Figura 1c).

Do total de 94 culturas de *Paecilomyces* avaliado nesse estudo, 50 mantidas em óleo mineral foram reativadas e outras 44 foram recuperadas de outros métodos de preservação, de modo que todo o acervo deste gênero de fungo foi reativado e preservado em três métodos: Óleo mineral, Sílica gel e Repicagem contínua.

Os dados adquiridos corroboraram com os descritos por Sola *et al.* (2012) e Dellaretti (2014), onde afirmam a eficiência dos métodos de preservação em Óleo Mineral, quando comparado às vantagens que do Repique contínuo, diferindo somente na longevidade da preservação da cultura, por até cinco anos.

De modo que a preservação de cepas do gênero *Paecilomyces*, torna-se necessária considerando que apresenta diversos potenciais, tais como: biotecnológico, agroindustrial e/ou medicinal, por ser um fungo bastante comum, podendo ser encontrado no ar e no solo de ambientes subtropicais e/ou tropicais (Rheea, 2016). *P. variotii* se destaca na coleção, pois está representada por várias linhagens, como também, encontra-se associada a micoses oportunistas, infecção cutânea em órgãos ou sistema do corpo humano como os tecidos moles, pulmonares, sendo o maior índice de contaminação cutânea como sinusite, otite média, endocardite e outras (Chan-Tack *et al.*, 1999; Zaki *et al.* 2015).

Outras espécies de *Paecilomyces* estão associadas a doenças alérgicas, tais como infecções relacionadas à hialohifomicoses em gatos, tartarugas, cabras e ratos de laboratório (Mandarapu, 2015). No setor agrícola, *P. variotii* é usado com outros fungos para proteger as galhas de raízes de café e de tomate e associado à biodegradação do óleo de palma, de juta, de papel, e de emulsões farmacêuticas (Samson 1974; Costa 2001). Também este fungo é usado em processos agroindustriais como proteção ao ataque de *Aphisgossypii* e *Myzuspersicae* em galhas de pequenos arbustos da família Leguminosae/Fabaceae, Rosaceae e Malvaceae (feijão, grão-de-bico, pessegueiros, algodoeiro, dentre outros) (Zawadneak *et al.*, 2015). Do ponto de vista biotecnológico, a preservação de culturas de *Paecilomyces* torna-se muito importantes, assim como o acesso das cepas viáveis para pesquisas e ensino.

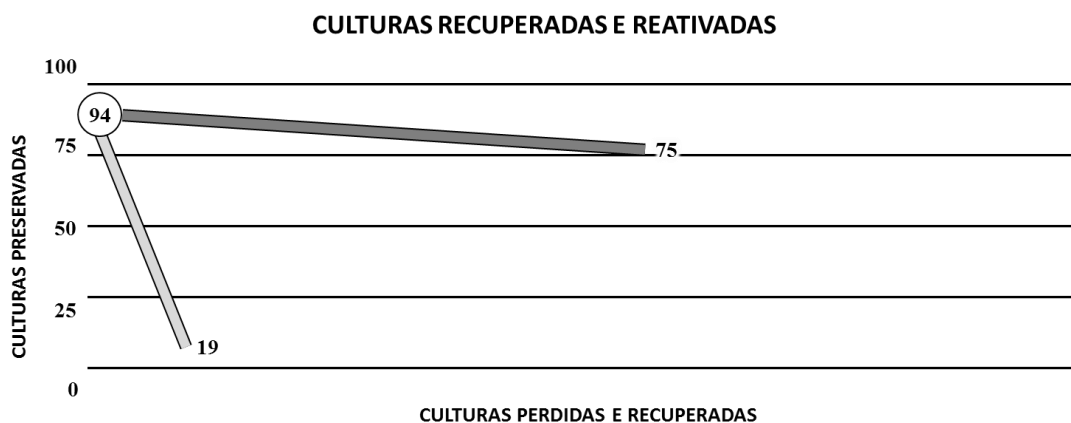


Fig. 2 - Culturas de *Paecilomyces* preservadas em Óleo Mineral, sem contaminação (●) e contaminadas por outros microrganismos (●).

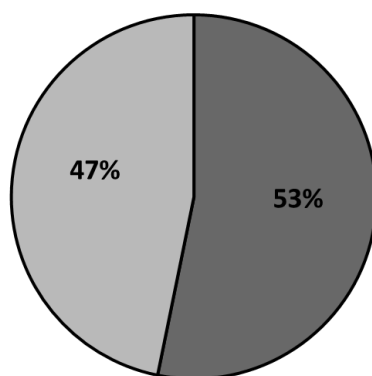


Fig. 3 - Porcentagem das culturas de *Paecilomyces* reativadas de óleo mineral e recuperadas (●) e as recuperadas de (●) outros métodos.

Conclusões

O presente estudo contribuiu para a recuperação de todas as linhagens de *Paecilomyces* preservadas em óleo mineral, além de constatar a eficiência do método de preservação óleo para *Paecilomyces*. No entanto é de fundamental importância o uso de recipientes adequados ao armazenamento destes fungos.

Recomenda-se a utilização de tubos criogênicos com tampa de rosca para a manutenção das culturas, pois a vedação é melhor, dificultando a entrada de microrganismos e reduzindo o risco de contaminação, aumenta a viabilidade cultural.

Agradecimentos

Ao Programa de coleções e acervos científicos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Chan-Tack KM, Thio CL, Miller NS, Karp CL, Ho C, Merz WG (1999) *Paecilomyces lilacinus* fungemia in an adult bone marrow transplant recipient. *Med Mycol.* 37:57-60.
- Costa MJN, Campos VP, Pfenning LH, Oliveira DF (2001) Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira*. Lavras, MG. 26:749-755.
- Costa CP, Ferreira MC (1991) Preservação de microrganismos: revisão. *Revista de Microbiologia*. São Paulo, SP. 22:263-268.
- Dellaretti ÉM (2014) Preservação de fungos em baixas temperaturas. Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, 36p (Monografia. Universidade Federal de São João Del Rei, Programa de Graduação do Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas).
- EL-Aziz ABEA, Awad AAE, Zaki GH (2015) Reduction of olive oil mill waste water phenolic compounds and COD using *Paecilomyces variotii*. *Trends in Industrial Biotechnology Research*. 1:1-9.
- ISTA - International Seed Testing Association (1978) Seed health testing. *Seed Science and Technologic*.4:12.
- Mandarapu SB, Mukku KK, Raju SB, Chandragiri S (2015) Bem sucedida reinserção cateter em um caso de *Paecilomyces varioti* peritonite em um paciente em diálise peritoneal ambulatorial contínua. *Indian J. Nephrol.* 25:177-179.
- Neufeld PM (1999) Técnicas básicas de Diagnósticos. Manual de micologia médica. Rio de Janeiro, RJ, BR. 1:65-67.
- Okafor N (2007) The Preservation of the Gene Pool in Industrial Organisms: Culture Collections. In: Modern industrial microbiology and biotechnology. *Science Publishers*. 8:300-315
- Paoli P (2005) Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, 29:897-910.
- Pires GCC, Aparecido CC, Finatti, D (2012) Preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. *Instituto Biológico*. 74:9-16.
- Rheea YJ, Hillierbc S, Gaddad GM (2016) A new lead hydroxycarbonate produced during transformation of lead metal by the soil fungus *Paecilomyces javanicus*. *Geomicrobiology Journal*. 33:3-4.
- Romero RS (2014) Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006. Avaliado em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni11.pdf>> Acesso em 18 jun. 14.

Sales-Campos C, Gonçalves KM, Jesus MA, Andrade MCN (2015) Avaliação de diferentes métodos de preservação de culturas fúngicas. *Ambiência* Guarapuava (PR) 11:337-343.

Samson RA (1974) *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*. 6:1-119.

Santin RCM (2008) Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no controle de *Meloidogyne inconita* em *Phaseolus vulgaris*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. (Tese) Doutorado em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sola MC, Oliveira AP, Feistel JC, Rezende CSM (2012) Manutenção de Microrganismos: Conservação e Viabilidade. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia. 8:14-13.

Zawadneak MAC, Pimentel IC, Robl D, Dalzoto P, Vicente V, Sosa-Gómezc DR, Porsani M, Cuquel FL (2015) *Paecilomyces niveus* Stolk & Samson, (Ascomycota: Thermoascaceae) as a pathogen of *Nasonoviaribis nigri* (Mosley, 1841) (Hemiptera, Aphididae) in Brazil. *Brazilian Journal Biology*. 75:158-162.