

## IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS DE *Aspergillus* DEPOSITADAS NA COLEÇÃO MICROBIOLÓGICA - INPA

Jamile Cristina Figueiredo Barros de MORAES<sup>1</sup>  
Maria aparecida de JESUS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;  
<sup>2</sup>Orientadora COTI/INPA.

### INTRODUÇÃO

No filo Zicomycota, *Aspergillus* pertence à classe Eurotiomycetes da ordem Eurotiales e da família Moniliacea (Ascomycetes) (Pitt e Hocking 1997). São caracterizados pela produção de esporos assexuais (Klich; Pitt 1988). Suas colônias são de crescimento rápido, podendo variar suas cores em: verde, branca, cinza ou preta. Seu conidióforo é asseptado e com a base normalmente em forma de “T” ou “L” comumente chamada de “célula pé”, conectada a uma hifa vegetativa. O conidióforo estende-se a partir da “célula pé” e pode se estender por alguns milímetros de comprimento até chegar à vesícula (cabeça), na qual as células conidiogênicas, métula e fiálides são formadas. A vesícula pode ter varias formas e características podendo ser: colunar, radiada e clavada. Eles podem ser uniseriados sendo que os conídios são ligados diretamente as fiálides, formando uma cadeia os conídios em ou biseriados quando os conídios são ligados diretamente a fiálides e a métula formando a vesícula (Pitt; Klich 2002).

As espécies de *Aspergillus*, segundo (Klich 2002), são cosmopolitas, sendo encontrados em ambientes de clima quentes e temperados. Aproximadamente, 180 espécies anamaorfas são descritas para *Aspergillus*, distribuidas as secções em: *Flavi*, *Nigri*, *Cervini*, *Nidulantes*, *Versicolores*, *Circumdati*, *Sparsi*, *Fumigati* e *Wenti* (Couto 2013). Destas, *Flavi*, *Nigri* e *Circumdati*, produzem micotoxinas como :*A. niger* que causa mofo preto em algumas frutas e legumes como: uvas, cebolas e amendoim, é considerada um contaminante de alimentos. Enquanto que *A. fumigatus* e *A. Flavus* causam a doença chamada *aspergillose*, que ataca o pulmão.

Na Coleção Microbiológica do INPA estão depositadas culturas de *Aspergillus*, as quais estão preservadas nos métodos, repicagem continua, mantidas entre em 5 °C, óleo mineral e sílica gel (Coelho *et al.* 2007). Com o intuito de contribuir com a preservação das linhagens, o objetivo do trabalho proposto é reativar o maior numero de culturas puras, identificá-las e conhecer as espécies de *Aspergillus* depositadas na coleção.

### MATERIAL E MÉTODOS

Um levantamento das linhagens de *Aspergillus* registradas na Coleção de Culturas de Microrganismos do INPA foi realizado. As culturas foram agrupadas de acordo com o nível de risco de perda, aquelas mantidas no método de repicagem e com maior risco de perda, foram repicadas em meio de cultivo de Batata Dextrose-ágar (BDA) e as placas de Petri foram mantidas em estufa com temperatura de 25 °C a 27 °C por 07 dias, até o seu crescimento micelial atingir toda a superfície da placa de Petri. Da colônia pura, foram retirados inóculos, os quais foram usados para a preservação da linhagem em óleo mineral, sílica gel e baixa temperatura. Também, inóculos das mesmas culturas foram submetidas ao método de microcultivo em lâminas (BCA), em que uma lâmina foi colocada na placa de Petri e sobre esta lâmina, um pedaço de Agar foi colocado juntamente com um inóculo de fungo e em cima deste uma lâmina estéril foi colocada, visando o

crescimento dos fungos sobre a mesma. A lâminula colonizada com o fungo foi colocada sob condições assépticas em uma lâmina estéril com azul-algodão ou de metileno para visualização e mensuração das microestruturas de tais como: conidióforos (Hifa fértil), fiálides (célula conidiogênicas), conídios (esporos) e clamidósporos (células vegetativas) (Silveira 1995). Os dados de ambas as características foram comparados visando a diferenciação entre as espécies de *Aspergillus* descritas de acordo com (Klich 2002). Outras referências específicas do gênero foram utilizadas como também, o site Mycobank. Todas as linhagens viáveis foram preservadas em três réplicas nos seguintes métodos de armazenamento, baixa temperatura, sílica gel e óleo mineral em caixas específicas para os mesmos e mantidos à temperatura ambiente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 57 linhagens de *Aspergillus*, consta no acervo, sendo que somente 44 destas foram recuperadas. Apenas 13 do acervo não foi recuperado, no entanto houve um incremento de 31 novos isolados durante o estudo. Totalizando 88, isolados de *Aspergillus* que estão depositadas na coleção Microbiológica do INPA (Tabela 1). Das 88 culturas, 74 culturas estão identificadas e distribuídas em *A. niger* (46), *A. flavus* (9), *A. candidus* (1), *A. nomius* (2), *A. japonicus* (15), *A. fumigatus* (1) e *Aspergillus* spp (11), que ainda não foram identificadas em vista que apresentam características taxonômicas distintas e diferentes das demais das espécies identificadas. No que se refere à identificação sugere a aplicação de técnicas moleculares ou outras visando a confirmação dos taxa. Dentre as espécies de *Aspergillus*, destacam-se *A. niger* (46), *A. japonicus* (15) e *A. flavus* (9) com o maior número de linhagens.

Tabela 1. Relação das linhagens de *Aspergillus* reativadas e identificadas.

Taxon	Numero de linhagens
<i>A. candidus</i> Link	1
<i>A. flavus</i> Link	9
<i>A. fumigatus</i> Fresen	1
<i>A. japonicus</i> Saiato	15
<i>A. nomius</i> Kutzman	2
<i>A. niger</i> Tiegh	46
<i>Aspergillus</i> spp.	11
Total	85

As cepas de *Aspergillus* foram isoladas de diversas espécies florestais de importância econômica da região amazônica, resíduos madeireiros, produtos florestais, dentre outros substratos lignocelulolíticos que foram avaliados em estudos de durabilidade natural. Também, muitas linhagens destes fungos foram isoladas da castanha do Pará e de macrofungos (Basidiomycetes e Ascomycetes). As amostras de castanha do Brasil contribuíram com o maior número de isolados, principalmente pela colheita extrativista. A maioria destas espécies citadas acima são produtoras de micotoxinas sendo que os *Aspergillus* da seção Nigri (*Niger*), seção flavi (*flavus*) foram obtidos de um número considerável de diferentes substratos, principalmente em alimento que confirmando a sua predominância como contaminantes alimentar.

A colônia de *A. niger* é de crescimento rápido, aparência flocosa, com reverso transparente. Sua coloração é preta, também é bisseriado conforme descrito (Pitt 1988). As microcaracterísticas são distinguidas por seu

seus conidióforos que medem entre  $250 \times 15,0 \mu\text{m}$ . Suas fiálides medem  $9 \times 4,0 \mu\text{m}$ . A vesícula mede  $35 \times 40 \mu\text{m}$ . A métula mede  $17 \times 5,0 \mu\text{m}$ . Seus conídios são, hialinos, globosos medindo de  $4-6 \mu\text{m}$ . As espécies de *A. niger* podem ter a vesícula bisseriada ou unisseriada (Figura 1).

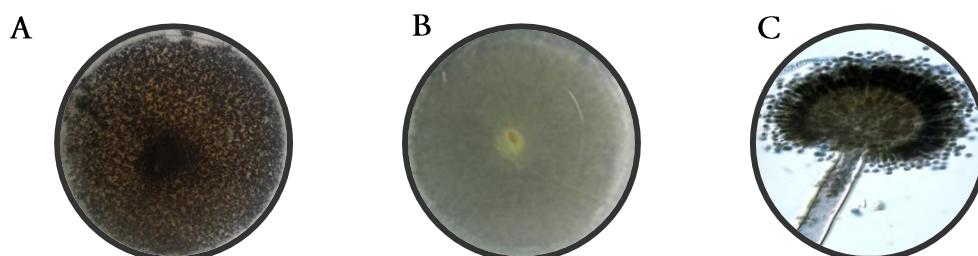


Figura 1. Aspecto da cultura de *Aspergillus niger* placa de Petri vista de frente(A), reverso(B) e estruturas de reprodução (conidióforos)(C).

Diferentemente da colônia de *A. flavus* que apresenta crescimento micelial rápido, são flocosos, com reverso transparente e coloração verde claro ou preta acinzentado, também é bisseriada (Pitt 1988). Já as microcaracterísticas são distinguidas por seus conidióforos que medem entre  $200 \times 13,0 \mu\text{m}$ . Suas fiálides medem  $12 \times 7,0 \mu\text{m}$ . A vesícula mede  $30 \times 45 \mu\text{m}$ . A métula mede  $16 \times 7,0 \mu\text{m}$ . Seus conídios são hialinos, globosos e elipsoidal medindo  $6-6 \mu\text{m}$ . As espécies de *A. flavus* têm a cabeça bisseriada e colunar (Figura 2).

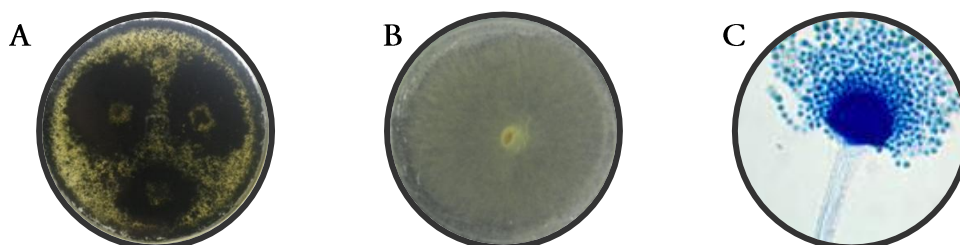


Figura 2. Aspecto da cultura de *Aspergillus flavus*. Placa de Petri vista de frente(A), reverso(B) e estruturas de reprodução (conidióforos)(C).

Por outro lado, observou que a colônia de *A. Japonicus* também é de crescimento rápido e flocoso. No entanto, as colônias parecem ser veludadas. Podem ser marrom escuro ou mais escuro. O reverso pode ser transparente ou marrom claro. Já as microcaracterísticas são distinguidas por seus conidióforos que medem entre  $300 \times 13,0 \mu\text{m}$ . Suas fiálides medem  $7 \times 5,0 \mu\text{m}$ . A vesícula mede  $14 \times 33 \mu\text{m}$ . Seus conídios são hialinos, globosos e elipsoidal medindo  $4-6 \mu\text{m}$ . As espécies *A. Japonicus* têm a vesícula unisseriada e radiada (Figura 3).

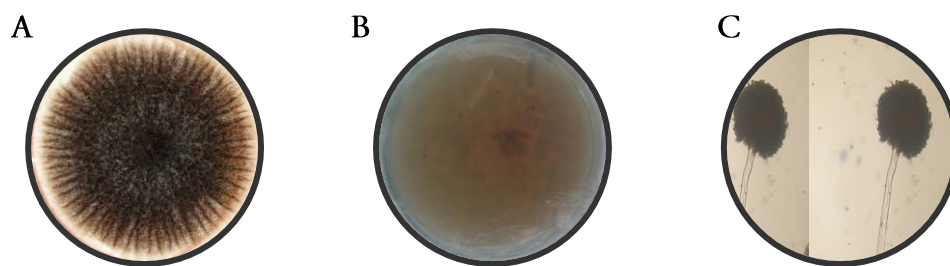


Figura 3. Aspecto da cultura de *Aspergillus japonicus* placa de Petri, vista de frente (A), reverso (B) e estruturas de reprodução (conidióforos) (C).

## CONCLUSÃO

Na coleção estão depositadas 88 culturas de *Aspergillus*, sendo que *A. niger*, *A. japonicus* e *A. flavus* estão com o maior número de linhagens no acervo. A identificação das espécies é de suma importância, pois algumas espécies possuem potencial tanto biotecnológico como alimentício. Recomendam-se futuros estudos biotecnológicos, a fim de conhecer as potencialidades das espécies de *Aspergillus* da região Amazônica

## REFERÊNCIAS

- Klich, M.A. 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 94(1): 21-27.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. *Fungi and food spoilage*. 2 end ed. London: Blackie Academic and Professional. 540p.
- Pitt, J.I.; Klich, M.A. 1988. *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs*. United states department of Agriculture. Agricultural Research Service. Southern Regional Research Center. New Orleans, Louisiana/USA. 82: 1-39.
- Silveira, V.D. 1995. Deuteromycetes. *Micologia*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Âmbito Cultura, Rio de Janeiro, RJ. 5: 263-311.