

# VIABILIDADE E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS MANTIDOS EM DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO.

Amaury dos Santos Bentes<sup>1</sup>; Júlia Ignez Salem<sup>2</sup>; João Vicente Braga de Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Co-orientadora CPCS/INPA; <sup>3</sup>Orientador CPCS /INPA

## 1. Introdução

Preservar fungos é utilizar-se de metodologias que tem por finalidade manter a viabilidade celular e metabólica destes organismos por longos períodos. Esta atividade é fundamental para estudos retrospectivos e prospectivos que enfoquem sua biologia, etiologia, aspectos epidemiológicos e produção de substâncias de interesse biotecnológico (Ryan *et al.*, 2000).

Os microrganismos denominados endofíticos coabitam o interior dos vegetais superiores, aparentemente sem lhes causar doença (Petrini, 1991). Estudos sobre a potencialidade dos microrganismos endofíticos, principalmente os relacionados à descoberta de novas substâncias, mostram-se relevantes tanto para uso no controle biológico de doenças e pragas, como para aplicação no setor químico/bioquímico ou indústria farmacêutica (Stierle *et al.*, 1995; Azevedo, 1998; Azevedo *et al.*, 2000; Stamford *et al.*, 2001; Stamford *et al.*, 2002; Suto *et al.*, 2002; Strobel, 2003).

O Laboratório de Micobateriologia, CPCS-INPA, vêm realizando bioprospecção de substâncias inibitórias (antimicrobianos), indutoras de crescimento e que facilitem o diagnóstico do gênero *Mycobacterium* a partir de endofíticos. Algumas linhagens de interesse industrial já foram obtidas e necessitam ser preservadas. No entanto, a literatura é muito limitada quanto à influência dos métodos de preservação sobre a morfologia e produção de metabólitos secundários deste grupo de fungos.

As principais metodologias de preservação avaliadas podem ser divididas entre "simples e baratas" como o repique constante, armazenamento sob óleo (Kobayashi 1984; Smith e Onions, 1994) sob água (Burdall e Dorworth 1994; Smith e Onions, 1994), em solo (Smith e Onions, 1994) ou sílica gel (Elliot, 1975; Smith e Onions, 1994,) ou podem ser "complexas e caras" como a liofilização (Kolkowski e Smith 1995; Tan 1997) e criopreservação em nitrogênio líquido (Smith, 1998).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade e características morfológicas de fungos endofíticos mantidos em diferentes métodos de preservação, e especificamente: a) averiguar a manutenção da viabilidade e pureza das culturas de fungos endofíticos nos métodos de conservação laboratorial de microrganismos e; b) avaliar a influência destes métodos de conservação sobre as características macromorfológicas e micromorfológicas das culturas.

## 2. Material e Métodos

**Microrganismos:** Cinco fungos endofíticos, esporulados, pertencentes à coleção de microrganismos da Coordenação de Pesquisa em Ciências da Saúde foram estudados. Destes, 4 foram isolados da planta *Caesalpinia ferrea Martius* (LU5,LU6,LU11e F45) no primeiro semestre do ano de 2005 e estão sendo conservadas sob óleo mineral, e uma linhagem que foi isolado da planta *Himatanthus sucuuba* (H42) no primeiro semestre de 2007.

**Técnicas de Preservação:** Cinco técnicas convencionais de preservação foram avaliadas: repique constante, preservação sob óleo mineral, preservação sob água destilada, preservação a -20°C e uma técnica desenvolvida no Laboratório de Micobateriologia CPCS-INPA, que utiliza miçangas e armazenamento -70 °C. A seguir são apresentadas as descrições das metodologias:

1) A técnica de preservação de repique constante foi realizada como descrito por Lacaz *et al.*, 1991. A cada 15 dias, um fragmento viável da cultura foi transferido para tubo de ensaio contendo Agar Batata Dextrose (BDA) que foi incubado a 25 °C . As sequências de repiques foram procedidas em duplicatas para se evitar o risco de perder qualquer isolado por contaminação, pois os mesmos foram inoculados puros nos tubos com meio BDA.

2) A técnica de preservação sob óleo mineral foi realizada como descrito por Braz *et al.*, 2009. Em cada um dos frascos de vidro de 20 mL (tipo frascos de penicilina) foi colocado 2 ml de meio de cultura BDA, e foram transferidos fragmentos. Após 7 dias, os meios de cultura foram cobertos com 10 ml de óleo mineral (autoclavado por dois dias consecutivos). Para se evitar possíveis perdas dos isolados por contaminação, em triplicata. Os frascos foram tampados com tampas de borracha, selo de alumínio e guardados ao abrigo de luz a temperatura ambiente (28°C).

3) A técnica de preservação sob água destilada foi realizada como descrito por Diogo *et al.*, 2005. Frascos de vidro de 20ml (tipo frascos de penicilina) foram acrescidos de 10 mL de água destilada (autoclavada por dois dias consecutivos) e aproximadamente 250 mg de cinco pequenos fragmentos (5 mm<sup>3</sup>) de uma cultura de 7 dias desenvolvida em placas de BDA foram transferidos para os frascos contendo água destilada, em triplicata. Os frascos foram fechados com tampa de borracha, selo de alumínio e armazenados ao abrigo de luz a temperatura ambiente (28°C).

4) A técnica de preservação a -20 °C foi realizada como descrito por Girão *et al.*, 2004. Frascos de vidro de 20ml (tipo frascos de penicilina) foram acrescidos de 8 mL de água destilada, 0,5 mL de dimetil-sulfóxido DMSO (crioprotetor), 1 mL de glicerol (crioprotetor) foram autoclavados por dois dias consecutivos, em seguida, aproximadamente, 250 mg de cinco pequenos fragmentos (5 mm<sup>3</sup>) de uma cultura de 7 dias desenvolvida em placas de BDA, foram transferidos para cada frasco. Esta técnica também foi feita em duplicata. Os frascos foram fechados com tampa de borracha, selo de alumínio e armazenados a temperatura de -20°C.

5) A técnica de preservação utilizando miçangas e armazenamento -70°C foi realizada como desenvolvido no Laboratório de Micobacteriologia, CPCS-INPA. Foram acrescidos 0,4 mL de água destilada , 0,025 mL de dimetil-sulfóxido DMSO (crioprotetor), 0,050 mL de glicerol (crioprotetor), 10 g de miçangas (com orifício) nos criotubos e autoclavados por dois dias consecutivos. Em seguida, aproximadamente, 250 mg de pequenos fragmentos (0,5 mm<sup>3</sup>) de uma cultura de 7 dias desenvolvida em placas de BDA foram transferidos para criotubos, esta técnica também foi procedida em triplicata. Os criotubos foram colocados em uma caixa, identificados com nome do projeto com número de fungos, a que laboratório pertence, em seguida, foram armazenados no Deep Freezing a temperatura de -70°C.

No interior de uma placa de Petri esterilizada, contendo uma lâmina para microscopia, foi colocado um cubo de ágar BDA de aproximadamente 1,5 cm de aresta, inoculado o micélio em cada um dos quatro lados superiores do cubo e coberto com uma lamínula esterilizada. A umidade foi mantida com o auxílio de um pedaço de algodão embebido em água destilada esterilizada, e a placa foi vedada com filme de PVC. Em 7 e 14 dias de cultivo foram retiradas as lamínulas com auxílio de uma pinça e montadas as lâminas de microscopia com o corante azul lactofenol para análise das características micromorfológicas.

Após 50 dias, os cinco isolados mantidos em repique contínuo, óleo mineral, água destilada, conservados em -20°C e miçangas (-70°C) foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA. No sétimo dia de desenvolvimento, foram obtidas informações quanto à viabilidade, pureza, macromorfologia e micromorfologia.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Avaliação da viabilidade e pureza das culturas frente às diferentes técnicas de preservação**

Neste estudo, utilizando-se como metodologia de preservação o repique contínuo, 100% dos isolados permaneceram com a viabilidade após 50 dias conservação, como descrito na Tabela 1. Na preservação sob óleo mineral, o isolado LU6 quando reativado não apresentou viabilidade. Na preservação em água destilada, 100% dos isolados permaneceram com a viabilidade após 50 dias conservação. Na

preservação a -20°C, o isolado LU11, quando reativado não apresentou viabilidade. Na preservação utilizando miçangas a -70°C, o isolado LU11, quando reativado não apresentou viabilidade.

**Tabela 1** - Avaliação da viabilidade das linhagens fúngicas após 50 dias

	Viabilidade das Linhagens %/n	Contaminação
<b>Óleo Mineral</b>	80% (4)	20%(1)
<b>Água Destilada</b>	100% (5)	0%
<b>Repique constante</b>	100% (5)	0%
<b>- 20°C</b>	80% (4)	0%
<b>- 70°C</b>	80% (4)	0%

A contaminação é um problema que foi avaliado nesse trabalho, pois podem ocasionar variação de porcentagem da viabilidade de fungos mantidos nos métodos de preservação bem como a perda de linhagens como demonstrado no trabalho de Rodrigues e Lacaz, 1992.

### **3.2 Influência dos métodos de conservação laboratorial sobre as características macromorfológicas e micromorfológicas das culturas.**

Com base na análise das características macromorfológicas, o isolado LU6, após 50 dias nas técnicas de preservação sob óleo mineral, repique constante e - 70°C mudou sua morfologia devido às condições extremas a que estes foram submetidos. Porém, manteve a produção de pigmento nas técnicas de preservação a - 20°C e água destilada, este resultado está de acordo com Rodrigues e Lacaz (1992) que obtiveram resultados satisfatórios como o não pleomorfismos de linhagens de fungos filamentosos preservados em água destilada.

Foi observado na análise das características micromorfológicas dos isolados, que os mesmos, permaneceram similares após 50 dias nas diferentes formas de preservação avaliadas. Sendo os isolados LU5, LU6 e LU11 do gênero *Fusarium* sp., F45 pertencente ao gênero *Aspergillus* sp. e o H42 do gênero *Penicillium*.

### **4. Conclusão**

Constatou-se que as cinco metodologias utilizadas neste estudo, apresentaram resultados satisfatórios, após os fungos endofíticos serem reativados. Verificou-se que as técnicas de preservação a -20°C e de água destilada, foram as que obtiveram melhores resultados, tanto quanto à viabilidade quanto à pureza das culturas, uma vez que não houve contaminação e a macromorfologia se mostrou sem alterações. Estas metodologias de preservação também foram capazes de manter as características micromorfológicas das culturas.

### **5. Referências**

- Azevedo, J. L. Microrganismos endofíticos. 1998. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de (Eds.). Ecologia Microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 117-137.
- Azevedo, J. L.; Maccheroni Jr., W.; Pereira, J. O.; Araújo, W. L. de 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology, Chile, v.3, n.1, p. 40-65.

- Braz, S. C. de M.; Motta, C. M. S.; Massa, D. M. L.; Neves, R. P.; Magalhães, O. M. C. 2009. Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas University Recife Mycology Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.42, p.63.
- Burdsall, H. H. & Dorworth, E. B. 1994 Preserving cultures of wood decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia* 86, 275-280.
- Diogo, H. C.; Sarpleri, A.; Pires, M. C. 2005 Fungi preservation in distilled water Preservação de fungos em água destilada *An Bras Dermatol*, v.8, p.591-4.
- Girão, M. D.; Prado, M. R.; Brilhante, R. S. N.; Cordeiro, R. A.; Monteiro, A. J., Sidrim, J. J. C. e Rocha, M. F. G. 2004. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.37, P.229-233.
- Kobayashi, T. 1984 Maintaining cultures of Basidiomycetes by mineral oil method. *Bulletin of Forestry and Forestry Product Research Institute* v.325, p.141-147.
- Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C. 1991. *Microbiologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8ª ed., São Paulo: Sarvier.
- Rodrigues, E. G.; Lacaz, C.S. 1992. Preservação de Fungos e Actinomicetos de Interesse Médico em Água Destilada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. V34(2), p159 -155.
- Ryan, M.J., Smith, D.; Jerries, P. 2000. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v16, p.183-186.
- Smith, D. 1998. The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi. *Cryo-Letters* v.19, p.79-90.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D.; Grothaus, P.; Bignami, G. 1995. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal of Natural Products*, v. 58, n. 9, p. 1315-1324, sep.
- Stamford, T.L. M.; Stamford, N. P.; Coelho, L. C. B. B.; Araujo, J. M. 2001. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresource Technology*, v.76, p.137-141.
- Stamford, T.L. M.; Stamford, N. P.; Coelho, L. C. B. B.; Araujo, J. M. 2002. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology*, v.83, p.105-109.
- Strobel, G. A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v.5, p.535-544.
- Suto, M.; Takebayashi, M.; Salto, K.; Tanaka, M.; Yokota, A.; Tomita, F. 2002. Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 93, n.1, p. 88-90.
- TAN, C.S. 1997 Preservation of fungi. *Cryptogamic Mycology*, v.18, p.157-163.