



# **Estruturação de um acervo de pesquisa de culturas microbianas endofíticas para aplicação biotecnológica e busca de bioativos: análise comparativa de métodos de preservação microbiana e avaliação da atividade antimicrobiana**

**Palavras-Chave:** Coleção microbiana, Bioprospecção, Métodos de preservação

**Autores/as:**

**Vítor Oliveira Levanteza – IB, Unicamp**  
**Carlos José Alvarez Cantero – IB-Unicamp**  
**Dayanna Isabel Araque Gelves – IB -Unicamp**  
**Prof. Dr. Marcos José Salvador – IB, Unicamp**

## **INTRODUÇÃO:**

Os microrganismos endofíticos podem ser considerados como fontes promissoras de metabólitos naturais com potenciais aplicações tecnológicas e terapêuticas (Newman e Cragg (2016)). Sabe-se que a preservação de culturas microbianas é elemento essencial para garantir a viabilidade e integridade das culturas ao longo do tempo. Métodos de cultivo e preservação simples, eficientes e de baixo custo são importantes tanto para garantir a viabilidade e integridade morfológica, fisiológica e genética das culturas ao longo do tempo, quanto as possíveis aplicações biotecnológicas. As metodologias mais adequadas para a preservação de microrganismos por períodos prolongados baseiam-se na redução do metabolismo até um nível de dormência artificial. Estes fatos justificam e encorajam este trabalho onde propõem-se ações para a estruturação de um acervo de pesquisa de culturas microbianas endofíticas com vistas à bioprospecção de agentes biologicamente ativos com atividade antimicrobiana potencial a partir de microrganismos endofíticos. A proposta também envolve a capacitação de recursos humanos qualificados. Assim, este estudo objetivou contribuir para a estruturação de um acervo de pesquisa de culturas microbianas endofíticas procedendo a análise comparativa de três métodos de preservação microbiana com vistas à bioprospecção de agentes biologicamente ativos e aplicações biotecnológicas.

## **METODOLOGIA:**

A manutenção das culturas de isolados de fungos filamentosos endofíticos cultiváveis da coleção microbiana do LMBTF foi realizada com inoculação em três punções nos meios de cultura empregados em seu isolamento. Os fungos filamentosos foram cultivados nos meios de cultura, tais como: PDA (Potato Dextrose Agar), Sabouraud

Agar, PDB(Potato Dextrose Broth) e Sabouraud e incubados a  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$  por 7 dias. Decorrido o período de incubação as placas foram analisadas. E foi realizada a caracterização morfológica, analisadas assim, características macro e micromorfológicas, seguindo os trabalhos realizados por Bensch et al (2012). Frisvad & Samson (2004). Foram analisadas características macroscópicas e microscópicas tais como coloração e diâmetro das colônias, presença ou ausência de coloração de esclerídios, coloração do reverso da colônia em diferentes meios de cultura. Entre as características microscópicas, o comprimento de conidióforos está sendo analisado, junto da forma e tamanho dos



Estruturas reprodutivas de *Bipolaris* sp visualizadas em microscópio óptico.

Fonte: Acervo Pessoal

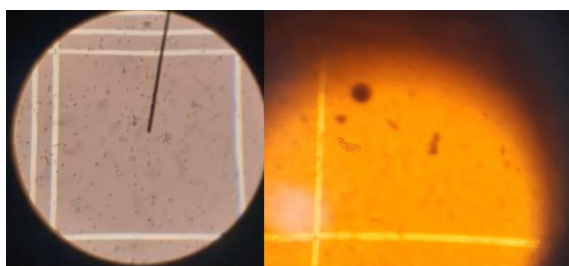
conídios, textura dos conídios e conidióforos. Os crescimentos dos fungos e bactérias foram monitorados, repicados (sendo que foram positivos para obtenção de linhagens puras) e estão sendo conservados em glicerol 20% a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os experimentos foram realizados em duplicata.

**Estudo comparativo de métodos de preservação dos fungos filamentosos:** Foi avaliada a estabilidade da viabilidade de crescimento microbiano com análise por três métodos de preservação (Castellani, glicerol 20% e método do repique contínuo) aos 30, 90 e 180 dias de conservação.

**a) Método com água destilada estéril ou método de Castellani:** Foi realizada a preservação fúngica em água destilada estéril seguindo metodologia descrita por Castellani (1939; 1967). Para tanto foi realizada a inoculação de frascos de vidro contendo água destilada esterilizada com pequena quantidade de meio de cultura (5mm x 10 mm) com o fungo a preservar. Os frascos empregados tem capacidade para 6 mL, sendo adicionado 4 mL de água esterilizada, selados com rolhas de borracha e 6 autoclavados a  $121^{\circ}$  sob 1 atm por 30 minutos. Após a autoclavagem foi realizada a repicagem dos fungos em duplicata para os frascos com água em condições assépticas retirando as rolhas e transferindo pedaços de meio de cultura contendo micélio dos fungos para dentro dos frascos. No período de 30, 60 e 180 dias de preservação os fragmentos microbianos estão sendo retirados e colocados em meio PDA para teste de viabilidade.

**b) Método de repique contínuo:** Foi realizada a repicagem dos fungos em duplicata colocados em placas de petri com meio PDA, seladas com parafilme. As culturas foram estocadas em geladeira à temperatura de  $4$  a  $8^{\circ}\text{C}$ , com repiques para outras placas e teste de viabilidade a 30, 60 e 180 dias de preservação.

**c) Método do glicerol 20%:** As cepas microbianas foram conservadas em duplicata em glicerol 20% a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30, 60 e 180 dias de preservação.



Estruturas reprodutivas (conídios) de *Geosmithia* sp observados na câmara de Neubauer.

Fonte: Acervo Pessoal

Além disso, foi utilizado o método de contagem com o uso da câmara de Neubauer, com objetivo de obter uma amostra de esporos/conídios com concentração conhecida, sendo assim foi feita uma mistura de tween 80 e cloreto de sódio em tubos de vidros. Essa substância foi aplicada na placa de cultura dos fungos levando a liberação dos conídios/esporos, em seguida foi

recuperada essa suspensão com a pipeta volumétrica e levada a outro tubo de vidro, logo após foi realizada uma série de diluições até a concentração de  $\frac{1}{100}$ . Essa amostra com concentração conhecida foi levada à câmara de Neubauer para observação no microscópio óptico, e quantificação dos esporos. Para tal foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\Sigma \text{ quantidade de esporos/conídios}}{\text{número de quadrantes} \times \text{número de quadros contados} \times \text{área da câmara} \times \text{superfície} \times \text{profundidade} \times \text{inverso da diluição}}$$

Foram escolhidos oito quadrantes aleatórios da câmara para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Após o cálculo da concentração utilizando a fórmula citada anteriormente, foram preparados em triplicatas dois grupos de criotubos, um contendo água e o outro glicerol 20%, sendo transferidos para cada tubo 1 ml da suspensão de esporos/conídios. Os tubos com água foram armazenados na geladeira em 4°C a 8°C, e os com glicerol no freezer em -80°C, para futuro cultivo e contagem de UFC.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Durante o tempo do projeto, a revisão bibliográfica foi realizada continuamente e trabalhei com 4 cepas de fungos filamentosos endofíticos, sendo elas: *Geosmithia* sp - cepa SSP7; *Lecanicillium* sp - cepa SS15; *Curvularia* sp - cepa SM24-2; *Bipolaris* sp - cepa SAY16

Dessa forma houve um período de adaptação e integração no ambiente, para conhecer a estrutura e organização do local de trabalho, com isso, foram realizados o acompanhamento e auxílio nos experimentos de alunos de mestrado do laboratório. Desta maneira, os objetivos principais deste estudo consistiram em:

- I. Realizar a manutenção das culturas de fungos filamentosos endofíticos da coleção microbiana do Laboratório de Metabolismo Vegetal, Bioensaios e Tecnologia Fitofarmacêutica
- II. Avaliar a estabilidade da viabilidade de crescimento por três métodos de preservação (método de Castellani, método do glicerol 20% e método do repique contínuo) aos 30, 90 e 180 dias de conservação e identificar o melhor entre eles;
- III. Estabelecer protocolos de experimentação para provas de conceito e avaliar a atividade antimicrobiana (frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e frente a espécies de *Candida*) com co-cultivo endofítico/cepas indicadoras para o microrganismo endofítico que permaneceu com cultura constante e resistiu a preservação;
- IV. Contribuir para a formação e qualificação de recursos humanos especializados.

Em seguida ao período de adaptação, houve instrução para desenvolver diferentes meios de cultura em placas de petri para criação microorganismos, realizando os cálculos necessários de proporção para cada meio, sendo estes meios de cultura: PDA (Potato Dextrose Agar), Sabouraud Agar, PDB (Potato Dextrose Broth) e Sabouraud. Foi possível analisar o crescimento dos fungos em diferentes meios e concluir que o meio PDA apresentou um melhor crescimento, com os fungos mostrando cores mais aparentes e um tamanho maior.

Após esse processo, foi iniciado o cultivo das cepas de fungos filamentosos em diferentes meios de cultura, realizando os experimentos em duplicata, nesse momento, houve o aprendizado sobre o funcionamento do fluxo laminar e a necessidade da Luz UV e do uso da autoclave para esterilizar os materiais usados no cultivo.

As atividades seguintes foram focadas no processo de conservação das cepas, utilizando-se de diferentes técnicas de preservação, sendo esses métodos: Método com água destilada estéril ou método de Castellani, Método

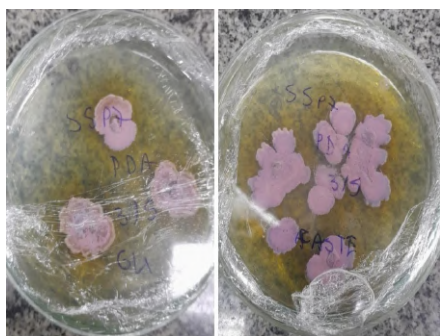
do glicerol 20% e Método de repique contínuo. Onde os tubos criogênicos com os diferentes fungos foram armazenados de acordo com os métodos de preservação e preparados para os futuros experimentos sobre viabilidade.

Foram realizados os experimentos de conservação das cepas e ativação nos períodos especificados e os resultados estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1. Resultado do monitoramento de ativação das cepas em Castellani e em Glicerol 20%**

	30 dias de conservação	90 dias de conservação	180 dias de conservação
<i>Geosmithia</i> sp - cepa SSP7	Houve crescimento normal	Houve crescimento normal	Houve crescimento normal
<i>Bipolaris</i> sp - cepa SAY16	Houve crescimento normal	Houve crescimento normal	Houve crescimento normal
<i>Lecanicillium</i> sp - cepa SS15	Houve crescimento normal	Crescimento reduzido e perda de características específicas da espécie	Não houve crescimento
<i>Curvularia</i> sp - cepa SM24-2	Houve crescimento normal	Crescimento reduzido e perda de características específicas da espécie	Não houve crescimento

Com isso, pode-se dizer que os objetivos I e II do projeto obtiveram sucesso parcial, visto que as cepas SS15 e SM24-2, não se mantiveram viáveis em quaisquer métodos de conservação utilizados durante o tempo estipulado. Em seguida, deu-se continuidade ao estudo com relação aos testes de viabilidade comparativa dos fungos, dessa forma, se obteve conhecimento sobre as fórmulas utilizadas para realização dos cálculos necessários nos testes,



Crescimento da cepa de *Geosmithia* sp (SSP7) conservada em Castellani na direita e em glicerol 20% na esquerda  
Fonte: Acervo Pessoal

métodos de preparação das substâncias utilizadas (tween 80 + solução salina) e sobre a estrutura e utilização da câmara de Neubauer, realizando experimentos de teste, utilizando da câmara de Neubauer e cepas de *Bipolaris* sp para a familiarização e entendimento dos métodos estudados. Dessa maneira, os resultados no que diz respeito a viabilidade dos fungos em diferentes métodos de conservação foram que os fungos armazenados no método Castellani mostraram um melhor crescimento em relação aos fungos armazenados no glicerol 20%, apresentando uma coloração mais característica da espécie e ocupando maior área na placa de cultura.

Além disso, as cepas SS15 e SM24-2 tiveram maiores dificuldades de crescimento do que as cepas SSP7 e SAY16. Visto que, durante os processos de ativação das cepas, esse segundo grupo apresentou desenvolvimento menos acentuado ou sem crescimento algum, nos períodos de maior tempo de incubação. Dando indícios de menor tolerância aos métodos de preservação e uma maior dependência de seus hospedeiros, já que se tratam de organismos endofíticos.

## CONCLUSÕES:

Ao longo do projeto foi possível realizar a maior parte dos objetivos propostos para o estudo. A respeito do nosso primeiro objetivo que consistia em realizar a manutenção das culturas de fungos filamentosos endofíticos da

coleção. Foi possível observar que os fungos criados no meio de cultura PDA apresentaram melhor crescimento em relação aos fungos em outros meios de cultura utilizados como o Sabouraud, ocupando uma maior área na placa e com características da espécie mais visíveis, sendo este então o meio de cultura escolhido para realização dos experimentos seguintes.

Já em relação ao nosso segundo objetivo: Avaliar a estabilidade da viabilidade de crescimento por três métodos de preservação (método de Castellani, método do glicerol 20% e método do repique contínuo) aos 30, 90 e 180 dias de conservação e identificar o melhor entre eles. Conseguimos chegar a conclusão que as cepas SS15 e SM24-2 apresentaram maiores dificuldades no crescimento e conservação dando indícios que se tratam de organismos menos tolerantes a condições adversas e apresentam maior dependência de seu hospedeiro natural já que se tratam de espécies endofíticas. Além de que, as cepas conservadas no método de preservação Castellani obtiveram um melhor crescimento em relação aos outros métodos de conservação utilizados durante os experimentos.

O objetivo três que tratava sobre: “Estabelecer protocolos de experimentação para provas de conceito e avaliar a atividade antimicrobiana (frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e frente a espécies de *Candida*) com co-cultivo endofítico/cepas indicadoras para os microrganismos que permaneceu com cultura constante e resistiu a preservação. Não foi possível realizar, já que durante a execução do projeto realizamos outros tipos de experimentos, tendo foco na área de viabilidade das cepas utilizando a câmara de Neubauer para determinar a concentração de esporos/conídios e preparar amostras em diferentes meios de conservação para futuro cultivo e contagem de UFC.

O objetivo quatro visou contribuir para a formação e qualificação de recursos humanos especializados. Foi cumprido de forma efetiva tal qual foi adquirido muitos conhecimentos importantes para a formação e desenvolvimento profissional, principalmente no ramo da microbiologia e trabalho em laboratório, aprendendo sobre morfologia e ciclo de vida de fungos, preparação de meios de cultura, preservação de microrganismos, medidas de segurança e sobre a utilização de variados aparelhos presente no laboratório.

**Agradecimentos:** ao CNPQ, CAPES, FAPESP e FAEPEX-UNICAMP pelas bolsas e apoio financeiro.

---

## BIBLIOGRAFIA

1. Ruffatto, Kettlin, et al. **Avaliação da viabilidade de células fungicas em diferentes tipos de armazenamento.** Revista Estudo & Debate, vol. 28, no. 2, 12 Julho 2021, <https://doi.org/10.22410/issn.1983-036x.v28i2a2021.2638>.
2. Batista, Alan Dias. “**Atividade antimicrobiana e estudo do mecanismo de ação da triptantrina em fungos e bactérias.** Pantheon.ufrj.br, 9 Mar. 2022, [pantheon.ufrj.br/handle/11422/17105](http://pantheon.ufrj.br/handle/11422/17105).
3. FRISVAD, J. C. **Applied and Environmental Microbiology**, 41(3): 568–579, 1981.
4. CASTELLANI, J. **Tropical Medicine Hygiene**, 70: 181-184, 1967.
5. CASTELLANI, J. **Tropical Medicine Hygiene**, 42: 225-226, 1939.
6. NEWMAN, T. J. ; CRAGG, G.M. **J. Nat. Prod.**, 83 (3): 770-803, 2020.