

Diversidade Microbiana da Amazônia

Editores:

Oliveira, L.A.; Fernandes, O.C.; Jesus, M.A.;
Bentes, J.L.S.; Andrade, S.L.; Souza, A.Q.L.; Santos, C



Copyright © 2016, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

PRESIDENTE DA REPÚBLICA

Michel Temer

MINISTRO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

Gilberto Kassab

DIRETOR DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Luiz Renato de França

EDITORA INPA

Editor: Mario Cohn-Haft. **Produção editorial:** Rodrigo Verçosa, Shirley Ribeiro Cavalcante, Tito Fernandes. **Bolsistas:** Brenda Costa, Lucas Souza, Natália Nakashima, Paulo Maciel e Sabrina Trindade.

FICHA CATALOGRÁFICA

D618 Diversidade microbiana da Amazônia /Editor L. A. Oliveira... [et.al.]--
Manaus: Editora INPA, 2016.
436.: il. color.

ISBN 978-85-211-0159-8

1. Microbiologia - Amazônia. 2. Diversidade. I. Oliveira, L. A..

CDD 576.9811



Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936 – Caixa Postal 2223
Cep : 69067-375 Manaus – AM, Brasil
Fax : 55 (92) 3642-3438 Tel: 55 (92) 3643-3223
www.inpa.gov.br e-mail: editora@inpa.gov.br

APRESENTAÇÃO

O CDMicro - Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia – vem se consolidando ao longo dos anos, tornando-se um referencial regional com alcance nacional e internacional na divulgação da microbiota amazônica.

Para que as informações apresentadas no Congresso tenham um maior alcance de divulgação, optou-se, a partir do 5º Congresso realizado no final de 2014, para a elaboração de um livro, dando a oportunidade aos autores dos trabalhos apresentados durante o evento, para transformarem suas apresentações em capítulos do livro. Para isso, foi solicitado aos autores interessados na conversão, para ampliarem o número de páginas e adotando-se um padrão geral de qualidade e de redação.

Esse livro é o resultado da compilação elaborada e autorizada pelos autores que se interessaram em publicar seus trabalhos apresentados no 5º CDMicro na forma de capítulos.

A Comissão Organizadora

SUMÁRIO

Alimentos

- Fazio M.L.S., Sartori N., Geromel M.R. Ação antibacteriana de ervas aromáticas..... **1 - 6**
- Fazio M.L.S., Costa A.F, Almeida V.S., Geromel M.R. Qualidade microbiológica de sucos de frutas Naturais comercializados na região de Catanduva – SP..... **7 - 13**
- Teixeira N.S., Galúcio V.A., Ferreira Neta A.P., Nunes A.S., Sales-Campos C. Análise físico-química e microbiológica de resíduos de maracujá (*Passiflora* sp.) coletados no município de Parintins - Amazonas..... **14 - 20**

Ambiental

- Bastos V.I.S., Jesus M.A., Santos Borel J.F. Some hydroid (Basidiomycetes) mushrooms of the Brazilian Amazon..... **21 - 34**
- Bezerra AFM, Vasconcelos HS, Neto JFN, Sousa HM, Araújo LS, Oliveira FM, Zanotto SP, Andrade LH, Barroso HS. Bioprospecção de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro para aplicação em reações de biorremediação enantiosseletiva de cetonas..... **35 - 40**
- Brito L.L., Menezes N.C., Minelli-Oliveira C., Oliveira L.A. Biodegradação de petróleo por isolados de rizóbios provenientes de solos amazônicos..... **41 - 46**
- Carvalho R.S., Nascimento C.C. *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff & Maubl. (Sphaeropsidales, Sphaeroidaceae) associada à espécie florestal *Scleronema micranthum* ((Ducke) Ducke, Bombacaceae) (Cardeiro) da Amazônia..... **47 - 57**
- Cortez A.C.A., Souza J.V.B, Rocha L.C., Silva T.K.S., Sanches M.A., Freire A.K.L., Zelski S.E. Fungos presentes em um ambiente lêntico do Município de Iranduba – Região Amazônica..... **58 - 62**
- Costa J. S., Atroch, E.M.A.C., Nagao, E.O. Estudos da atividade de fungicidas para o controle do crescimento de *Trichoderma* sp em meio de cultura de micropropagação de plantas..... **63 - 68**
- Costa T.P., Menezes N.C., Oliveira L.A. Crescimento de rizobactérias em meio de cultura usando o mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) como fonte de carbono para fins biotecnológicos..... **69 - 74**
- Couceiro D.M., Jesus M.A. Macrofungos Agaricomycetes (Basidiomycota) não poróides da região amazônica incorporada à Coleção de Fungos Lignocelulolíticos/INPA..... **75 - 81**
- Demosthenes L.C.R., Bentes J.L.S. Respostas enzimáticas de defesa à murcha bacteriana..... **82 - 87**
- Fernandes K.R.P., Bittencourt O.S.T., Teixeira A.F, Souza A.Q.L., Nunomura R.C.S. Isolamento e caracterização de fungos endofíticos de Myristicaceae com potencial de atividade antioxidante..... **88 - 93**
- Fonseca M.D.P., Costa C.L.S.O., Souza A.Q.L., Gibertoni T.B., Souza A.D.L., Rodrigues M.O., Pereira J.O., Azevedo J.L. Diversidade de macrofungos da família Polyporaceae (Basidiomycotina) no Estado do Amazonas..... **94 - 99**

Gama A.M., Silva M.S., Moraes A.B., Carvalho N.O., Nonato L.S., Spira B., Mota A.J., Yamane T. Isolamento de bactérias da Região Amazônica, como modelo para a recuperação de fosfato.....	100 - 105
Gasparotto L., Pereira J.C.R. Fitopatógenos habitantes do solo na Amazônia.....	106 - 113
Gonzaga A. D., Souza A.Q.L., Pereira J.O. Isolamento, purificação, identificação e conservação de microrganismos associados ao jardim de fungos simbióticos das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i>	114 - 119
Lima H.D.S., Jesus M.A., Oliveira D.A.S. Avaliação da viabilidade de culturas de <i>Paecilomyces</i> preservadas em óleo mineral na Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA.....	120 - 127
Lima J.M.S., Pereira J.O., Costa Neto P.Q., Batista I.H., Santos J.C., Araújo S.P., Pantoja M.C., Azevedo J.L. Avaliação de fungos endofíticos e epifíticos com potencial para produção de biossurfactantes, isolados de macrófitas aquáticas do rio Negro em Manaus, Amazonas.....	128 - 138
Malheiros C.H., Stieven A.C., Santos J.O., Almeida L.S., Campos D.T.S., Oliveira L.A. Indicadores microbiológicos em diferentes sistemas de manejo do solo na Amazônia Meridional.....	139 - 146
Marinho M. P. S., Souza, R.D.N.S., Santos, J.C., Lima, J.M.S., Pereira, J.O., Batista I. H., Ferreira F.S. Bactérias endofíticas com potencial de degradar hidrocarbonetos, isoladas a partir de macrófitas aquáticas, coletadas em áreas portuárias de Manaus - AM.....	147 - 155
Menezes N.C., Oliveira L.A. Tolerância de rizóbios à acidez e ao alumínio.....	156 - 161
Moraes J.C.F.B., Rolim L.N., Sales-Campos C. Avaliação produtiva de cogumelos comestíveis desenvolvidos pela técnica Jun-Cao.....	162 - 168
Nogueira J.C., Maki C.S., Martins M.K. Fungos endofíticos associados à pimenta murupi (<i>Capsicum chinense</i>): Isolamento, caracterização morfológica e atividade antimicrobiana.....	169 - 178
Oliveira D.A.S., Jesus M.A. Identificação e conservação de culturas <i>Penicillium</i> de interesse Agrossilvicultural.....	179 - 184
Oliveira F.R.; Oliveira L.A. Micro-organismos de solos amazônicos com habilidade em degradar gasolina obtida da Refinaria de Manaus (REMAN).....	185 - 191
Oliveira M.R., Gama A.M., Katak R., Matos E., Terenius O., Marinotti O., Tadei, W.P., Souza A.Q.L. Espécies de bactérias associadas a larvas de <i>Anopheles darlingi</i> Root, 1926, em seu ambiente aquático.....	192 - 198
Peixoto J.V.O., Minelli-Oliveira C., Brito L.L., Oliveira L. A. Atividades celulolíticas, proteolíticas e ureolíticas de rizóbios provenientes de solos amazônicos.....	199 - 205
Rocha E.M., Katak R.M., Oliveira M.R., Gama A.M., Souza A.Q.L., Tadei W.P. Caracterização morfológica de bactérias isoladas do habitat de larvas de <i>Anopheles darlingi</i> Root. 1926 do município de Coari, AM.....	206 - 211

Santos J.C., Lima J.M.S., Telles Y.V., Araújo S.P., Costa Neto P.Q., Mota A.J.; Peixoto J.C.C., Batista I.H., Pereira J.O. Caracterização da microbiota da rizosfera resistentes ao agrotóxico carbendazim em culturas de coentro na Comunidade Nova Esperança em Manaus/AM..... **212 - 220**

Silva S.R.S, Silva A.S., Santiago P.A.L., Souza A.D.L., Polikarpov I., Martínez J.L., Souza, A.Q.L. Avaliação das enzimas CMcase e xilanase de três fungos endofíticos da Amazônia, em três resíduos agrícolas em duas diferentes condições de cultivo..... **221 - 226**

Souza R.D.N., Batista I.H., Ferreira F. S., Santos J.C., Marinho, M.P.S., Araújo, S.P., Lima J.M.S., Pereira J.O. Atividade enzimática em fungos endofíticos isolados seletivamente de *Eichhornia crassipes* coletada em área portuária de Manaus – AM..... **227 - 233**

Básica

Castro C.S.P. Coleções de Microrganismos da Embrapa: De Requisitos Corporativos da Qualidade à Acreditação..... **234 - 240**

Couto F.A., Santos C., Dias E.S., Lima N., Batista L.R. Uso de marcadores fenotípicos e bioquímicos para caracterização de isolados de *Aspergillus* seção Flavi..... **241 - 250**

Demosthenes L.C.R., Bentes J.L.S., Costa Neto P.Q. Variabilidade genética de *Ralstonia solanacearum* utilizando marcadores AFLP..... **251 - 256**

Fonseca T.R.B., Palheta R.A., Souza B.C., Marinho N.M.V., Ebinuma V.C.S., Teixeira M.F.S. Análise de variáveis que influenciam a produção de biomassa de actinomicetos..... **257 - 263**

Lobo I.K.C., Almeida, L.B., Souza Á., Sousa N. R., Silva G.F. Identificação molecular de fungos filamentosos isolados dos sintomas de superbrotaamento em guaranazeiro..... **264 - 273**

Marinho N.M.V., Fonseca T.R.B., Palheta R.A., Souza B.C., Ebinuma V.C.S., Teixeira M.F.S. Variáveis que influenciam a produção de biomassa de actinomicetos..... **274 - 280**

Matos K.S., Hanada R.E., Silva G.F. Diagnóstico molecular por PCR-RFLP e gene *LYS2* para identificação de *Fusarium decemcellulare*..... **281 - 288**

Oliveira L.A., Cortez A.C.A., Souza J.V.B. Avaliação de metodologias de preservação para manutenção de microrganismos do Filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA..... **289 - 294**

Oliveira L.A., Cortez A.C.A., Souza J.V.B. Identificação de espécies do gênero *Candida* mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA..... **295 - 300**

Queiroz C.Á., Silva A.F., Cruz J.C., Silva G.F., Sousa N.R., Matos K.S., Hanada R.E. Caracterização de *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) por meio de ERIC-PCR..... **301 - 309**

Silva M.S., Gama A.M., Moraes A.B., Nonato L.S., Carvalho N.O., Spira B., Yamane T., Mota J. Minipreparação de múltiplas amostras para extração de DNA total bacteriano em microplacas de 96 poços..... **310 - 315**

Siqueira V.K.S., Matos K.S., Hanada R.E., Gualberto G.F., Silva G.F. Primers específicos para a determinação de MAT-1 em *Fusarium decemcellulare*..... **316 - 321**

Industrial

Araújo C.O.M., Silva L.M., Lima A.K.S., Torres D.R., Silva J.C., Fernandes O.C.C. Produção de proteases por *Aspergillus* spp estocados na Coleção de Fungos da Amazônia - CFAM do Instituto Leônidas e Maria Deane..... **322 - 329**

Lima A.K.O., Taube Júnior P.S. Bactérias lácticas e sua importância na indústria de alimentos e saúde: Uma revisão..... **330 - 335**

Lima A.K.S., Torres D.R., Fernandes O.C.C., Silva J.C., Mendes L., Araújo C.P.M. Enzimas extracelulares de *Aspergillus* e *Penicillium* conservados na Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM..... **336 - 341**

Maciel M.J.M., Farias J.A., Silva I.R., Souza F.R.F, Procópio R.E.L. Produção de etanol a partir de meio de cultura hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar..... **342 - 348**

Martim S.R., Silva T.A., Teixeira L.S., Cruz-Filho R.F, Fonseca T.R.B., Marinho N.M.V., Santos-Ebinuma V., Teixeira M.F.S. Produção e extração de proteases por fermentação extrativa..... **349 - 354**

Martim S.R., Silva L.S.C., Machado A.R.G., Teixeira R.A., Santos-Ebinuma V.C., Cruz-Filho R.F, Teixeira M.F.S. Extração líquido-líquido de proteases de *Pleurotus albidus* (DPUA 1692) empregando sistema de duas fases aquosas (peg-fosfato)..... **355 - 360**

Silva L.S.C., Machado A.R.G., Martim S., Teixeira R.A., Cruz Filho R.F, Teixeira M.F.S. Comparação entre processos de fermentação na produção de enzimas por cogumelos comestíveis..... **361 - 365**

Souza R.A.T.; Fonseca, T.R.B., Silva L.S.C., Teixeira M.F.S. Atividade proteolítica dos extratos aquosos de biocompósitos formulados com cogumelos comestíveis utilizando como matriz casca de abacaxi..... **366 - 371**

Verçosa J.V.M., Neiva M., Carmo E.J., Asfolfi Filho S. Clonagem e expressão do um inibidor de fosfolipase A..... **372 - 381**

Médica

Banhos E.F., Souza A.Q.L., Lima G.A., Souza A.F, Souza A.D.L. Avaliação da atividade anticandida de extratos de fungos do gênero *Pestalotiopsis* spp. isolados de ambientes amazônicos..... **382 - 387**

Brelaz E.C.D.O., Teixeira N.S., Galúcio V.C.A., Nunes A.S., Sales-Campos C. Pesquisa de endoparasitas em bovinos abatidos no matadouro municipal de Parintins, Amazonas..... **388 - 395**

Couto F.M.M., Andrade S.L., Buonafina M.D.S., Leal A.F.G., Magalhães O.M.C., Vasconcelos F.M.T.S., Santos F.A.G., Neves R.P. Candidemia em Unidades de Terapia Intensiva: Diagnóstico e avaliação da capacidade de aderência e formação de biofilme..... **396 - 402**

Cunha G.S., Pimenta L.A., Oliveira A.D., Pio C.H.S., Andrade S.L. Fatores de risco para o desenvolvimento de fungemia em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva em hospital terciário de Manaus..... **403 - 408**

- Jensen B.B., Comandolli-Wyrepkowski C.D., Santos P.A., Barros A.M.C., Soares F.V., Pinheiro F.G., Domingos P.R.C., Naiff M.F., Franco A.M.R. Avaliação das formulações contendo extrato metanólico de *Libidibia ferrea* contra infecção causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*..... **409 - 416**
- Matsuda J.S., Wanke B., Assumpção I.A., Balieiro A.A.S., Santos C.S.S., R.C.S., Muniz M.M., D.R., Martinez-Espinosa F.E., Souza J.V.B. Aspergilose pulmonar em pacientes de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa. Manaus, Amazonas..... **417 - 426**
- Melo E.D., Tibery Espir T., Guerreiro T.S.B., Figueira L., Naiff M., Costa A.G., Malheiro A., Franco AMR. Perfil de citocinas TH1 e TH2 em pacientes com *Leishmania (Viannia) guyanensis* no Norte do Brasil..... **427 - 436**

Ação antibacteriana de ervas aromáticas

Fazio M.L.S¹., Sartori N.¹, Geromel M.R.¹

¹Instituto Municipal de Ensino Superior - IMES Catanduva | 17 – 35312200 Avenida Daniel Dalto s/n – Caixa Postal: 86 - 15.800-970 - Catanduva-SP. Emails: faziomaria@ig.com.br, natalia_sartori04@hotmail.com, mgeromel@uol.com.br

Resumo

Diversas espécies vegetais têm sido usadas pelas características antimicrobianas, através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta, como é o caso dos compostos fenólicos. Estes apresentam ação inespecífica sobre micro-organismos, rompendo a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos para a formação da mesma. Considerando os aspectos mencionados o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de algumas ervas aromáticas empregando-se o método de difusão em gel de ágar. Os extratos que apresentaram ação antimicrobiana significativa (halos iguais ou superiores a 10 mm) foram utilizados em testes posteriores para verificar até qual diluição (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) a atividade estava presente. Verificou-se que a atividade antibacteriana dos extratos aquosos de hortelã e manjerona foram superiores; e a ação antimicrobiana foi constatada apenas para a primeira diluição. Concluiu-se que a hortelã e manjerona apresentaram maior eficácia sobre as bactérias testadas.

Palavras-chave: antibacteriana, ervas aromáticas, hortelã, manjerona

Introdução

Muitas vezes oriundos de regiões banhadas pelos oceanos Índico e Pacífico, chegando à casa de Imperadores e famílias modestas, os condimentos vegetais foram

adquirindo importância, tornando-se indispensáveis à vida destes povos, seja por ligação em rituais, por sua utilização como temperos de alimentos ou mesmo em medicina. As ervas são utilizadas desde os tempos mais antigos, fazendo parte da cultura de seu país. Cada cidade, região, país, dependem das culturas e dos costumes, tendo assim hábitos diferentes. Uma cultura pode caracterizar o alimento como forma de saciar a fome ou como fonte de prazer e oportunidade social. A família, igreja e a escola passam a prática da cultura de geração para geração, sendo assim cada pessoa consome o alimento baseado no guia cultural (Medved, 1981).

As ervas possuem níveis distintos de atividade biológica sendo, porém, efetivas contra micro-organismos em distintas concentrações. Diversas espécies vegetais têm sido usadas pelas características antimicrobianas, através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta, como é o caso dos compostos fenólicos. Estes apresentam ação inespecífica sobre micro-organismos, rompendo a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos para a formação da mesma (Nascimento *et al.*, 2000).

Existe um interesse particular na descoberta e emprego de novos agentes antimicrobianos, fato ligado ao alarmante aumento de microrganismos resistentes aos antibióticos normalmente utilizados (Souza; Lima; Narain, 2003). Considerando os aspectos mencionados o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de algumas ervas aromáticas.

Material e Métodos

Empregou-se o método de difusão em gel de ágar. Foram utilizados extratos aquosos de diferentes ervas aromáticas *in natura*. No laboratório cada amostra recebeu uma identificação, alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cebolinha (*Allium schoenoprasum* L.), coentro (*Coriandrum sativum* L.), hortelã (*Mentha spicata* L.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm.). A seguir, assepticamente 10 g da mesma foram colocados em um frasco de Erlenmeyer contendo 90 mL de água destilada estéril sendo homogeneizados posteriormente e submetidos a banho em água fervente por 30 minutos. Em seguida a amostra foi filtrada em recipientes de vidro estéreis e a solução obtida resfriada à temperatura ambiente. Os discos, de papel filtro de 6 mm de diâmetro,

próprios para antibiograma foram adicionados à solução, sendo a mesma mantida no agitador por 30 minutos.

Os microrganismos, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* (ATCC 22923), previamente semeados em Caldo Nutriente e incubados a 35°C por 24 horas, foram semeados na superfície de placas de Petri contendo Ágar Nutriente. As análises foram realizadas em duplicata. Na seqüência, discos de antibiograma saturados com a solução foram colocados no centro de cada placa; sendo as mesmas incubadas a 35°C por 24 e 48 horas. Após este período foi possível observar e medir o halo de inibição. Halos iguais ou superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antimicrobiana, conforme Hoffmann *et al.* (1999). Os extratos aquosos que apresentaram atividade antibacteriana significativa foram novamente testados com as diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , para verificar até qual diluição a ação antibacteriana era observada.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos em 48 horas (Tabela 1) demonstraram que a ação antibacteriana do extrato aquoso de hortelã (*Mentha spicata* L.) e o de manjerona (*Origanum majorana* L.) apresentaram atividade antimicrobiana significativa, sendo tal desempenho observado com relação às bactérias *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, respectivamente. Observou-se o halo de inibição de 10 mm do extrato aquoso de manjerona sobre *S. Typhimurium*; resultado superior (20 mm) foi observado por outros pesquisadores ao testarem o óleo essencial da mesma erva (Ernandes e Garcia-Cruz, 2008). De acordo com o trabalho apresentado por Busatta *et al.* (2008), o principal componente do óleo essencial de manjerona é o terpeneno_4_ol (30,41%).

O potencial antimicrobiano da hortelã sobre outros micro-organismos (*Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*) também foi observado em pesquisa realizada por Tyagi e Malik (2011). Em trabalho realizado por Chauhan *et al.* (2009), verificou-se que o principal componente do óleo essencial de hortelã é o “Carvone”, variando entre 49,62% e 76,65%, sendo tais substâncias, provavelmente, responsáveis pela ação antimicrobiana observada. A partir dos resultados apresentados na Tabela 2 verificou-se que a atividade antimicrobiana não foi significativa para diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} (halo menor que 10 mm).

Conclusão

Os estratos aquosos hortelã e manjerona apresentaram maior eficácia sobre as bactérias testadas.

Referências

Busatta C. et al (2008) Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*: 207-211.

Chauhan MK et al (2009) Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial Crops and Products*29: 654-656.

Ernandes FMPG, Garcia-Cruz CH (2008) Atividade Antimicrobiana de Extrato de algumas plantas comumente consumidas no Brasil. *Higiene Alimentar*22.

Hoffmann FL, Souza SJF, Garcia-Cruz CH, Vinturim TM, Dutra AL (1999) Determinação da atividade antimicrobiana “in vitro” de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. *Boletim CEPPA*7: 11-20.

Medved E (1981) *The world of food*. Ed. Ginn and Company, Lexington.

Nascimento GGF et al. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 31:1-15.

Souza EL, Lima EO, Narain N (2003) Especiarias: uma alternativa para o controle de qualidade sanitárias e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícias. *Revista Higiene Alimentar*17: 38-42.

Tyagi AK, Malik A (2011) Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*22: 1707-1714.

Tabela 1 - Determinação da atividade antibacteriana de extratos aquosos de alecrim, cebolinha, coentro, hortelã, manjeriço, manjerona e salsa, impregnados em discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro; incubação a 35 °C / 24 horas; expressa como halo de inibição em mm.

Ervas aromáticas/ Micro-organismos	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	Cebolinha (<i>Allium schoenoprasum</i> L.)	Coentro (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	Hortelã (<i>Mentha spicata</i> L.)	Manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.)	Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	Salsa (<i>Petroselinum Hoffm.</i>)
<i>B. cereus</i>	-	-	-	6	8	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	6	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	6	8	-	10	-	8	8
<i>S. typhimurium</i>	5	8	-	5	10	9	9

Após 48 horas os resultados não apresentaram alterações.

Tabela 2 - Determinação da atividade antibacteriana de extratos aquosos de hortelã e manjerona sobre *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella typhimurium*, respectivamente; impregnados em discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro; incubação a 35 °C / 24 horas; expressa como halo de inibição em mm.

Ervas aromáticas / Microorganismos	Hortelã (<i>Mentha spicata</i> L.)				Manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.)			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
<i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i>	10	7	6	-				
<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>					10	6		-
						6		

Após 48 horas os resultados se mantiveram.

Qualidade Microbiológica de Sucos de Frutas Naturais Comercializados na Região de Catanduva – SP

Fazio M.L.S.¹, Costa A.F.¹, Almeida V.S.¹, Geromel M.R.¹

¹Instituto Municipal de Ensino Superior - IMES Catanduva | 17 – 35312200 Avenida Daniel Dalto s/n – Caixa Postal: 86 - CEP 15.800-970 Catanduva-SP - Emails: faziomaria@ig.com.br, li.f.costa@hotmail.com, viniciusalmeida@yahoo.com.br, mgeromel@uol.com.br

Resumo

Na vida atribulada que vivemos atualmente os hábitos alimentares da sociedade têm sofrido grandes mudanças. Hoje em dia, devido ao fato de ambos os pais trabalharem, é muito comum as crianças frequentarem desde muito cedo, creches ou escolas de educação infantil em tempo integral. Neste contexto, pais e filhos são obrigados a tomarem duas ou mais refeições fora de casa. Apesar das opções não serem recomendadas como saudáveis, há sempre a possibilidade de acompanhar com sucos naturais, trocando as calorias de um refrigerante pelas propriedades nutricionais da bebida natural extraída das frutas. O objetivo do estudo foi avaliar a qualidade higiênico-sanitária e microbiológica de sucos *in natura* sabores abacaxi, acerola, goiaba, laranja, limão, maracujá, melancia, melão, morango e tamarindo comercializados na região de Catanduva-SP. As análises microbiológicas consistiram na investigação da presença de *Salmonella spp.* e Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes. Os resultados revelaram que todas as amostras estavam de acordo com o padrão federal vigente, sendo, portanto classificadas como produtos em condições sanitárias satisfatórias e, por conseguinte produtos próprios para o consumo humano.

Palavras-chave: qualidade microbiológica, suco *in natura*

Introdução

Na vida atribulada que vivemos atualmente os hábitos alimentares da sociedade têm sofrido grandes mudanças. Hoje em dia, devido ao fato de ambos os pais trabalharem, é muito comum as crianças frequentarem desde muito cedo, creches ou escolas de educação infantil em tempo integral. Neste contexto, pais e filhos são obrigados a tomarem duas ou mais refeições fora de casa. Apesar das opções não serem recomendadas como saudáveis, há sempre a possibilidade de acompanhar com sucos naturais, trocando as calorias de um refrigerante pelas propriedades nutricionais da bebida natural extraída das frutas (Canesqui e Garcia, 2005).

Os sucos de frutas são consumidos e apreciados em todo o mundo, não só pelo seu sabor, mas, também, por serem fontes naturais de carboidratos, carotenóides, vitaminas, minerais e outros componentes importantes (Pinheiro *et al.*, 2006). Porém, a manipulação inadequada dos produtos e utensílios no preparo dos sucos, acarreta na contaminação do alimento, tornando-o impróprio para consumo. De acordo com o mencionado, esta pesquisa apresentou como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de sucos naturais comercializados na região de Catanduva-SP, por meio de métodos reconhecidos mundialmente.

Material e Métodos

Foram adquiridas e analisadas dez diferentes amostras de sucos naturais prontos para o consumo, sendo estes de diferentes frutas (abacaxi, acerola, goiaba, laranja, limão, maracujá, melancia, melão, morango e tamarindo). As mesmas foram transportadas ao Laboratório Multidisciplinar do Instituto Municipal de Ensino Superior de Catanduva e estocadas sob refrigeração (Silva *et al.*, 2010). Cada amostra recebeu um número de identificação e assepticamente, 10 ml da mesma foram colocadas em um Erlenmeyer contendo 90 ml de água destilada estéril, sendo homogeneizados posteriormente (diluição 10^{-1}). A partir desta foram realizadas as demais diluições decimais seriadas até 10^{-3} utilizando-se o mesmo diluente. As três diluições obtidas foram usadas, conforme necessárias, nas análises subsequentes (Silva *et al.*, 2010). As amostras foram submetidas às seguintes análises: Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes e, pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais

Foram inoculados volumes de 1 ml das diluições 10^{-1} a 10^{-3} em três séries de tubos, contendo 9 ml de Caldo Lauril Sulfato (CLS) com tubo de Durhan invertido, e incubados a 35° C durante 24-28 horas para teste presuntivo e, considerados positivos os que apresentaram gás no interior do tubo de Durhan.

Para o teste confirmativo, com o auxílio de uma alça de platina, foi inoculada uma alçada dos tubos positivos de CLS para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB), incubados às mesmas condições anteriores, sendo a positividade verificada também para os que apresentam gás, e determinado o NMP/g de coliformes totais com o auxílio da tabela do NMP (Silva *et al.*, 2010).

Determinação do NMP de coliformes termotolerantes

A partir dos tubos de CLS positivos, inóculos foram transferidos por meio de alçadas para tubos contendo Caldo *Escherichia coli* (EC), com tubo de Durhan invertido, sendo incubados a 44, 5° C durante 24 horas. O cálculo do NMP/g de coliformes termotolerantes foi determinado utilizando-se a tabela do NMP (Silva *et al.*, 2010).

Pesquisa de E. coli

A partir dos tubos contendo caldo EC, usados na quantificação de coliformes fecais que apresentam turvação, com ou sem gás no interior do tubo de Durhan, foram semeadas placas de Petri contendo Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB) para o isolamento de *E. coli*, sendo incubadas a 35° C durante 24 horas.

Colônias típicas, pequenas, com centro negro e bordas claras, brilho verde-metálico à luz refletida, bem como as atípicas, foram confirmadas por coloração de Gram (bastonetes Gram-negativos). Posteriormente, foram repicadas em tubos contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) inclinado, sendo incubadas às mesmas condições.

Após este período, procedeu-se à identificação por meio de testes bioquímicos: Indol, Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e Citrato (IMVIC), com incubação por 35° C durante 48 horas, exceto para Citrato, incubado por 96 horas.

Para a prova de indol foram pipetados 5 ml de Caldo Triptona 1%, sendo na leitura adicionadas de duas a quatro gotas do reagente de Kovacs. No teste de vermelho

de metila foi pipetado 1 ml da cultura, adicionando-se cinco gotas de solução de vermelho de metila.

Para a prova de Voges-Proskauer foram pipetados 5 ml da cultura, sendo adicionados 0,6 ml de solução α -naftol e 0,2 ml de hidróxido de potássio a 40%. Posteriormente foi verificado o desenvolvimento característico, citrato (-); VP (-); indol (+/-) (Silva *et al.*, 2010).

Pesquisa de Salmonella spp.

Em 225 ml de Caldo Lactosado (CL) foram homogeneizados, respectivamente 25 ml de cada amostra. Após a incubação a 35° C por 24 horas, 1 ml de cada cultivo foi transferido para tubos de ensaio contendo 10 ml de Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado (RV), incubados a 35° C. Após 24 horas foram feitas sementeiras em placas de Petri contendo *Salmonella Shigella* Ágar (SSA) e Ágar Verde Brillante (BG), incubados às mesmas condições.

As colônias suspeitas em SSA, pequenas, cremes, com ou sem centro negro, e em BG, pequenas e avermelhadas, bem como as atípicas, foram transferidas com o auxílio de uma alça de platina para tubos de ensaio contendo Ágar Trílice Açúcar Ferro (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA), incubados às mesmas condições e, posteriormente, submetidas a teste sorológico a partir dos tubos com características bioquímicas compatíveis e não compatíveis. Para este, duas gotas de solução salina 0,85% estéril foram colocadas nas extremidades de uma lâmina. Uma alçada do micro-organismo típico ou atípico foi transferida para cada extremidade e homogeneizada com a solução salina, sendo acrescentada uma gota do soro somático polivalente anti-*Salmonella* sobre uma das gotas.

A leitura foi realizada após dois minutos de movimentos de inclinação e rotação da lâmina. A ausência de aglutinação das misturas classifica a reação como negativa e a positividade é constatada pela aglutinação da gota com o anti-soro (Silva *et al.*, 2010).

Resultados e Discussão

Nenhuma amostra apresentou coliformes totais e termotolerantes, o que é considerado um fator favorável, visto que, de acordo com o estudo de Correa Neto e

Faria (1999) sobre sucos as temperaturas em torno de 90°C, normalmente empregadas no tratamento térmico para a preservação do suco, podem não ser suficientes para inativar fungos termorresistentes. No entanto, temperaturas mais elevadas afetam as características físico químicas dos sucos e, portanto, o controle da deterioração por fungos termorresistentes baseia-se fundamentalmente na adoção de práticas higiênico-sanitárias adequadas, visando diminuir a possibilidade de contaminação das matérias-primas.

Tabela 1. Apresentação dos resultados obtidos após diferentes análises microbiológicas.

Amostras	Coliformes Totais (NMP/mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/mL)	<i>Escherichia coli</i> (confirmativo)	<i>Salmonella spp</i> (-/+)
Abacaxi	<3	<3	Negativo	-
Acerola	<3	<3	Negativo	-
Goiaba	<3	<3	Negativo	-
Laranja	<3	<3	Negativo	-
Limão	<3	<3	Negativo	-
Maracujá	<3	<3	Negativo	-
Melancia	<3	<3	Negativo	-
Melão	<3	<3	Negativo	-
Morango	<3	<3	Negativo	-
Tamarindo	<3	<3	Negativo	-
Padrão Federal (BRASIL, 2001)		10²		Ausência em 25 mL

Caso houvesse a presença dos mesmos seria um fator preocupante, pois os microorganismos indicadores são grupos ou espécies que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial de um alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. (Garcia *et al.*, 2012).

Com relação à *Salmonella spp*. Observou-se uma situação semelhante, obtendo-se 100% de amostras com resultado negativo. O que difere da pesquisa realizada por

Garcia *et al.* (2012) em Juazeiro do Norte-CE, também com sucos “in natura”, quando afirma que no tocante aos testes de *Salmonella*, verificou-se presença deste microrganismo em 100% das amostras analisadas, estando em desacordo com o especificado pela legislação brasileira que estabelece ausência em 25 mL.

A presença de *Salmonella* nas amostras analisadas constitui-se de riscos a saúde do consumidor. Ações para o controle de qualidade dos sucos de frutas *in natura* comercializados no mercado ambulante da cidade de Juazeiro do Norte-CE tornam-se necessárias, dentre as quais se destacam o treinamento do pessoal envolvido na produção dos sucos e monitoramento das condições dos manipuladores. (Garcia *et al.*, 2012).

Conclusão

De acordo com as avaliações realizadas e com base na legislação verificou-se que 100% das amostras encontravam-se em acordo com o padrão federal vigente para coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp., podendo ser classificadas como “produtos em condições sanitárias satisfatórias” e, portanto “produtos próprios para o consumo humano.

Referências

BRASIL, Ministério da Saúde. RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 20 dez. 2001. Seção 1.

Canesqui AM, Garcia RWD (2005) Antropologia e Nutrição: um diálogo possível. Fiocruz, Rio de Janeiro.

Correa Neto RS, Faria JA (1999) Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/veiculos_de_comunicacao/CTA/VOL19N1/CTA19N1_24.PDF

Garcia R, Santos D, Oliveira EN, Josino AS, Mori E (2012) Qualidade microbiológica de sucos *in natura* comercializados na cidade de Juazeiro do Norte-CE. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial.

Pinheiro AM, Fernandes AE, Prado G, Sousa PH, Maia GA (2006) Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. *Scielo*. <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28856.pdf>

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR (2010) Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. Varela, São Paulo.

Análise físico-química e microbiológica de resíduos de maracujá (*Passiflora sp.*) coletados no município de Parintins - Amazonas

Teixeira N.S.¹, Galúcio V.A.¹, Ferreira Neta A.P.¹, Nunes A.S.¹ e Sales-Campos C.²

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM

²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA,

Emails: nury_teixeira@outlook.com, vgalucio@gmail.com, armandapessoa@hotmail.com,
biotecs7@gmail.com ceci@inpa.gov.br

Resumo

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo e é líder na produção de frutas tropicais. No entanto, o processamento dessas frutas gera um grande volume de resíduos resultando em problemas econômicos e sérios danos ao meio ambiente. O município de Parintins é uma área produtora de frutos amazônicos, consumidos em larga escala pela população em geral e na merenda escolar com distribuição local pela agricultura familiar, gerando grande quantidade de resíduos no processamento artesanal das frutas. Com o objetivo de pesquisar a viabilidade do aproveitamento destes resíduos para a produção de alimentos que possam ser incorporados na alimentação humana e animal, realizou-se análises físico-químicas que demonstraram que muitas características das frutas *in natura* são semelhantes em resíduos e análises microbiológicas evidenciaram a necessidade de controles rígidos quanto às condições higiênico-sanitárias de resíduos que se pretende aproveitar para geração de produto de valor agregado.

Palavras-Chave: aproveitamento de resíduos; frutas amazônicas; coliformes; valor nutricional.

Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo e é líder na produção de frutas tropicais (FAO, 2013), chegando a aproximadamente 44 milhões de toneladas de frutos por ano (IBGE, 2012). O seu mercado interno de suco de frutas tem apresentado um grande crescimento, acompanhando a expansão da agroindústria para o processamento destas frutas. No entanto, o grande volume de resíduos gerados pode se tornar um problema, trazendo entre outros problemas econômicos, sérios danos ao meio ambiente. No entanto, o processamento dessas frutas gera um grande volume de resíduos resultando em problemas econômicos e sérios danos ao meio ambiente.

O município de Parintins, situado a 400 Km de Manaus – AM, é uma área produtora de frutos amazônicos, consumidos em larga escala pela população em geral e na merenda escolar com distribuição local pela agricultura familiar, principalmente na forma de suco, gerando grande quantidade de resíduos no processamento artesanal das frutas.

Os principais resíduos gerados no processamento possuem em sua composição vitaminas, minerais, fibras, compostos antioxidantes, entre outros, importantes para um bom desempenho das funções fisiológicas. Muitos desses resíduos se perdem ou não são utilizados adequadamente, em função do desconhecimento de suas potencialidades, valor nutritivo e deficiências que devem ser corrigidas para sua melhor utilização. Cascas e sementes de maracujá (*Passiflora sp.*), resíduos estes provenientes do processo de obtenção do suco, atualmente, são utilizadas por produtores rurais na alimentação animal, ainda sem muita informação técnica adequada. Como este volume representa inúmeras toneladas, agregar valor a estes subprodutos é de interesse econômico, científico e tecnológico.

A casca de maracujá tem merecido destaque por ser um produto rico em pectina, niacina, ferro, cálcio e fósforo, sendo aceita na elaboração de diversos produtos (Córdova *et al.*, 2005). Porém existem outras características importantes que influenciam no aproveitamento destes resíduos, entre elas os parâmetros físico-químicos, como pH, sólidos solúveis, umidade e matéria-seca. Além de condições sanitárias satisfatórias, facilmente observadas através de análises microbiológicas para a pesquisa de microrganismos patogênicos, principalmente a presença de coliformes fecais.

Surge, então, a necessidade de estudos visando o aproveitamento desses resíduos a produção de alimentos que possam ser incorporados na alimentação humana e animal, uma vez que as maiores quantidades de vitaminas e sais minerais de muitos alimentos se concentram nas cascas de frutas e legumes.

Diante do exposto e do potencial biotecnológico eminente, foram avaliadas as características físico-químicas e microbiológicas de resíduo de maracujá (casca) oriundo da agricultura familiar do município de Parintins – AM, para o aproveitamento na indústria alimentícia.

Material e métodos

Os resíduos foram coletados na sede da agricultura familiar de Parintins/AM, no período de 18 a 29 de agosto de 2014, totalizando 10 kg de casca de maracujá. No preparo, os resíduos foram levados ao Laboratório de Nutrição Animal do ICSEZ – Parintins/AM para

serem triturados e secos para a realização das análises descritas a seguir.

-pH: Alíquotas de 10 gramas da amostra triturada foram adicionadas em 90 mL de água destilada, em triplicata (Skrbic e Filipcev, 2008). Cada suspensão foi submetida à agitação por cinco minutos e, após sedimentação, realizou-se a leitura em potenciômetro digital portátil KASVI – K390014P, previamente calibrado.

-Sólidos solúveis: Com o uso de refratômetro portátil Instrutherm RTB-300 foram medidos os índices de refração da solução de açúcar contido nos resíduos analisados, onde 10 gramas destes foram homogeneizados em 100 mL de água destilada e os resultados expressos em °Brix (Carvalho *et al.*, 2002).

-Teor de umidade e matéria seca: Foi determinado pelo método de secagem das amostras até peso constante, em estufa a 105°C, seguindo a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). A umidade foi expressa em % e a massa seca foi calculada como sendo $MS\% = 100 - U$.

-Cinzas: Foram determinadas após completa carbonização em incineração e calcinação das amostras em forno mufla a 550°C, obtendo-se um resíduo isento de carvão, com coloração branca acinzentada (Instituto Adolfo Lutz, 1985), sendo os resultados expressos em %.

-Extrato Etéreo: A determinação de lipídios foi realizada a partir de extração contínua em Aparelho tipo Soxhlet, tendo o éter de petróleo como solvente de extração, a gordura extraída foi calculada por diferença de pesagem.

-Análise Microbiológica: Foi realizado a contagem padrão de Coliformes Totais e Termotolerantes, através da Técnica de Tubos Múltiplos e os resultados foram dados em Número Mais Provável (NMP) e pesquisa de *Salmonella* sp., sendo os resultados expressos em Unidade Formadora de Colônia (UFC), segundo o Método da American Public Health Association (APHA) descrito em A.O.A.C. (2012). As análises foram realizadas de acordo com a legislação determinada pela ANVISA sobre padrões microbiológicos – RDC nº12 (BRASIL, 2001). Inicialmente, como padrão para amostras sólidas, foram realizadas duas diluições, sendo a primeira 1:50 (10 gramas de amostra em 490 mL de água destilada) e a segunda 1:10 (25 mL da primeira diluição em 225 mL de água peptonada a 0,1%). A partir desta segunda diluição, considerada 10^{-1} , foram preparadas diluições decimais sucessivas, pela transferência de 1 mL da diluição anterior em 9 mL de diluente água peptonada a 0,1%, até 10^{-3} . Essas diluições foram utilizadas para a determinação dos microrganismos em meios de cultura vertidos em tubos de ensaio com tubos de Durhan invertidos em seu interior. Sendo utilizados os seguintes meios de cultura, Caldo Lauryl e Caldo EC para o crescimento de coliformes totais e *Escherichia coli* e Caldo SC (Selenito de Cistina) para *Salmonella* sp.

Após a inoculação, os tubos foram encubados em estufa bacteriológica a 35°C por 3 dias, a leitura foi realizada a cada 24 horas para a observação de produção de gás e turvação do meio. Após este período, alíquotas de 100 µL retiradas dos tubos contendo Caldo SC foram adicionadas em placas de Petri, em triplicata, contendo os meios TSI (Triple Sugar Iron Agar), XLT₄ e BVB (Agar Verde Brillhante modificado), incubadas a 35°C por 3 dias para a confirmação da presença de *Salmonella sp.* A identificação das colônias foi feita de acordo com as características morfológicas descritas pelo fabricante de cada meio específico, baseado na cor, aspecto e alteração do meio pelo crescimento de colônias características. Os resultados das análises foram avaliados segundo a Instrução Normativa nº 7, de 5 de abril de 1999, da Secretaria de Desenvolvimento Rural do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Brasil, 1999), que preconiza os padrões para polpa de frutas, pois não há legislação específica para análise de resíduos de frutas.

Resultados e discussão

Os resíduos *in natura* possuíam aroma característico, sendo composto apenas de casca de maracujá. Foram realizadas análises físico-químicas destes resíduos para avaliar características nutricionais fundamentais para o aproveitamento dos mesmos em produtos de valor agregado para alimentação humana ou animal. Os resultados das análises físico-químicas estão descritos na Tabela 01, sendo relevantes para avaliar características nutricionais fundamentais para o aproveitamento dos resíduos coletados, transformando-os em produtos de valor agregado para alimentação humana ou animal.

Tabela 01: Resultado das análises físico-químicas e nutricionais de amostras de resíduos agroindustriais.

Resíduo	pH	Sólidos Solúveis (° BRIX)	Umidade	Matéria Seca (MS)	Matéria Mineral (MM)	Extrato Etéreo (EE)
			(%)	(%)	(%)	(%)
Maracujá (Casca)	4,33	0,5	87,64	12,36	5,07	0,60

As análises físico-químicas realizadas demonstraram que importantes características da fruta *in natura* são mantidas em outras partes como a casca, objetivo desta pesquisa. Um exemplo, foi a acidez da fruta sendo mantida na casca que apresentou pH 4,33, sendo este um

fator de fundamental importância na limitação dos diferentes microrganismos capazes de se desenvolver no alimento (Hoffmann, 2001).

A umidade é uma característica importante que interfere na coloração e sabor das frutas (Souza *et al.*, 2008). Quanto ao resíduo da casca do maracujá, observou-se um teor de umidade bastante elevado de 87,64% e um teor de matéria seca de 12,36%. Estes resultados indicam a interferência do clima da região Amazônica na umidade das frutas como um alto valor presente também nos resíduos, fator este destacado por Abud e Naraim (2009), sendo de grande importância, uma vez que a umidade presente no material interfere na preservação do alimento. Este é um fator que precisa ser observado para a utilização dos resíduos, principalmente pelo custo elevado para desidratar e a suscetibilidade para deterioração por crescimento microbiano (Cunha *et al.*, 2009).

Esta alta umidade foi evidenciada também pelo baixo valor de cinzas 5,07%, o que pode estar associado a uma menor concentração dos minerais presentes nos resíduos analisados, visto que se tratavam de resíduos brutos, em que predominam altas concentração de água (Sousa *et al.*, 2011).

O teor de açúcar, expresso pela percentagem de sólidos solúveis totais (SST) ou °BRIX é variável entre os frutos (Sousa *et al.*, 2011). O alto suprimento de água diminui a percentagem de açúcares, encontrado em baixa concentração na casca de maracujá, apresentando apenas 0,5 °BRIX.

As análises microbiológicas foram realizadas com intuito de verificar fatores que pudessem alterar a qualidade dos resíduos inviabilizando seu aproveitamento. Sabe-se que alterações microbiológicas são indesejáveis em qualquer tipo de alimento bem como a presença de patógenos e microrganismos indicadores proveniente de más condições higiênico-sanitárias.

Os resultados das análises microbiológicas realizadas a partir de amostras moídas demonstraram características preocupantes, pois apesar de apresentarem resultados negativos nos testes presuntivos com presença de coliformes inferior a 3 NMP.g⁻¹, observou-se o crescimento microbiano em placas contendo os meios seletivos para a identificação de *Salmonella sp.* e *Escherichia coli* (Figura 01).

O resultado foi feito a partir do critério de presença e ausência de crescimento microbiano, tendo em vista que não existe uma legislação específica para análise de resíduos, mas levou-se em consideração a característica patogênica dessas bactérias. A identificação das colônias foi feita de acordo com as características morfológicas descritas pelo fabricante de cada meio específico, baseado na cor, aspecto e alteração do meio.



Figura 01: Crescimento microbiano em placa contendo meio seletivo para desenvolvimento de colônias de *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*.

Os resultados demonstraram a necessidade de maiores cuidados quanto às condições higiênico-sanitárias e manuseio dos resíduos, pois mesmo não havendo uma legislação específica, a presença de microrganismos patogênicos inviabiliza o seu aproveitamento (Cunha *et al.*, 2009).

O teste presuntivo não demonstrou resultado quanto ao crescimento microbiano observado pela turvação do meio e produção de gás, porém nos testes confirmativos em tubo e em placa com meios seletivos, observou-se a presença de colônias características, possibilitando a identificação de crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* nas amostras avaliadas.

Conclusões

Os resíduos avaliados neste estudo apresentaram características físico-químicas próprias sobre influência do clima e solo da região onde são produzidas, além de manter algumas características da fruta *in natura*.

As análises microbiológicas evidenciaram a importância de manter padrões higiênico-sanitários para viabilizar o aproveitamento dos resíduos com qualidade. Sendo este procedimento um grande potencial para minimizar problemas ambientais e gerar produtos de valor agregado.

Referências

Abud, A.K.S.; Narain, N. (2009). Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. *Braz. J. Food Technol.*, 12(4):257-265.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists (2012). Official methods of analysis of AOAC international. 19. ed. Maryland: AOAC.

Brasil. (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: www.anvisa.gov.br/e-legis.

Brasil (1999). MAPA. IN nº 12/99, de 13/09/99. Padrões de Identidade e Qualidade para Polpas de Frutas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 set. 1999, Seção I, p 72.

Carvalho H.H., Jomg E.V., Bello R.M. (2002). Alimentos: Métodos físicos e químicos de análises. 1 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS. 180p.

Córdova K.V., Winter C.M.G., Neto G.K. (2005). Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, 23(2):221-230.

Cunha M.G.G., Oliveira E.R., Alcântara, M.D.B. (2009). Conservação e utilização do resíduo de abacaxi na alimentação de ovinos no Curimataú Ocidental da Paraíba. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, João Pessoa, 3(3):55-62.

FAO, Produção brasileira de frutas 2013. Disponível em: <http://faostat.fao.org/> Acesso em 03 de abril de 2014.

Hoffmann F.L. (2001). Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. *Brasil Alimentos*, 9:23-30.

IAL. Instituto Adolfo Lutz (1985). Métodos Químicos para Análise de Alimentos. 3 ed. São Paulo.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2012). Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 15/11/2013.

Skrbic B., Filipcev B. (2008). Nutricional and sensory evaluation of wheat breads supplemented with oleic-rich sunflower seed. *Food Chemistry*, 108(1):119-129.

Sousa M.S.B.; Vieira L.M., Lima A. (2011). Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. *Ciênc. agropec.*, Lavras, 35(3):554-559.

Souza M.W.S., Ferreira T.B.O., Vieira I.F.R. (2008). Composição centesimal e propriedades funcionais tecnológicas da farinha da casca do maracujá. *Alim. Nutr.*, Araraquara, 19(1):33-36.

Some hydroid (Basidiomycetes) mushrooms of the Brazilian Amazon

Bastos VIS¹, Jesus MA^{1,2}; Santos Borel JF¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM. E-mail: vbastae@gmail.com, ²ranna@inpa.gov.br;

Abstract

The general characters of this fungal group are the presence of odontoid hymenium, hymenophore, and pileate or resupinate. Generally, the hydroid species are ectomycorrhizal, as they are important functional components of forest ecosystems. In some cultures (e.g. *Hydnum repandum*) it holds nutritional importance. The objective is to report the occurrence of hydroid mushrooms for the Amazon Rainforest. The collections were made in the following sites: Adolpho Ducke Forest Reserve, Tropical Silviculture Experimental Station, Uatumã Biological Reserve in the State of Amazonas, and Viruá National Park located in the State of Roraima. Besides the aforementioned sites few collections were made in the urban area of Manaus. All the specimens are deposited in the Herbarium of the National Institute of Amazon Research–INPA. A total of 21 specimens of Amazon hydroid mushrooms were identified: *Climacodon* sp (1), *Dentipellis* sp (1), *Hydnodon theleporum* (11), *Pseudohydnum gelatinosum* (1), *Stecchericium hydneum* (1), *S. seriatum* (2), *S. ochraceum* (1), *Trechispora gillesii* (2), *Trechispora* sp. (1). Due to the economic and ecological importance of these macrofungi, the study contributed to the expansion of knowledge about hydroid diversity in the Amazon region. Comments and illustrations are given for most of the species.

Key words: Ectomycorrhizal fungi, Northern Brazil, South America, Taxonomy

Introduction

The hydroid fungi are characterized by their pileate basidiomes, usually stipitate, centrally attached. Colors range from white to yellow, and orange to brown. The “teeth”, or “spines”, reach up to 3 mm. The hyphal system varies from monomitic to dimitic, consisting of generative and skeletal hyphae. The generative hyphae are thin-walled, branched, contain septa, and clamp connections. The skeletal hyphae are mostly thick-walled, and branched with septae. Basidiospores are hyaline, being globose or subglobose to ellipsoid, with a smooth or verrucose surface (Chevall., 1826).

Many hydroid fungi are wood-inhabiting species, but some of them are believed to be ectomycorrhizas, forming mutually beneficial relationships with the roots of living trees and other plants, (e.g., species of *Hydnellum* P. Karst.). Most of the basidiomes typically occur on the ground, or in leaf litter in woodland (Dai, 2010).

Some species (e.g. *Hydnum repandum* L.) are well known edible fungi and are commercially collected and marketed in Europe and France. It is often referred to as "pied de mouton" in France (Roberts and Evans, 2011). In North America, the related *H. umbilicatum* Peck is also known to have a sweet flavor and commercially collected, sometimes under the name "sweet tooth".

Stipitate hydroid fungi have been shown to be particularly sensitive to nitrogen deposition as an indicator of eutrophication (Vesterholt *et al.*, 2000; Arnolds, 2003). Others (e.g. *Steccherinum ochraceum*) have gone through several studies about its biotechnological potential for the pulping industry (Chernykh *et al.*, 2008).

Therefore, the main objective of this present contribution is to report the occurrence of hydroid fungi for the Amazon Rainforest and, thereby, show this fungi group's potential to develop future biotechnological studies in northern Brazil.

Materials and Methods

This study represents a few materials collected during the last 18 years by Dr^a. Maria Aparecida de Jesus and collaborators as a part of ongoing projects to search for biodiversity in the Amazon rainforest "Biodiversity Research Program– PPBio" (INPA/MCTI) and a sustainable forest management project in the Brazilian Amazon "Amazon woods" (INCT–MCTI/ FAPEAM). The collections were made in the per quadrant sampling effort methodology (RAPELD), using a grid of 30 (250 × 40 m) lots same as the ones employed by (PPBio/MCTI/INPA).

Characters of the collection sites

Adolpho Ducke Forest Reserve (2°59'38.5"S 59°55'05.8"W) with collections performed in January 2006. The forest reserve is surrounded by the urban area of Manaus, Amazonas, which is composed of a typical Amazon Rainforest. Average temperature in Manaus is 26.0°C/ 78.8°F (maximum 39.0°C/ 102.2°F and minimum 19.0°C/ 66.2°F). The vegetation has uniform canopy with an average height of 32

meters. The topography consists of plateaus crossed by streams. The soils are composed of argillaceous oxisols, and are sandier with increasing inclination and decreasing altitude, see (Oliveira *et al.*, 2008).

The Tropical Silviculture Experimental Station is located 60 km from the city of Manaus (2°35'21"S 60°06'55"W). The collections were performed during 2014. The vegetation corresponds to the dense upland forest, with floristic composition of high trees up to 12–15 meters tall, and 7–12 meter tall small trees and shrubs. The soil is composed of very oxisol acidic, clayey soil, with high aluminum content. The climate is equatorial, with abundant rainfall and well distributed all year round. There is a short dry season, where the lowest rainfall (August) gets less than 100 mm, and a rainy season with monthly precipitation exceeding 290 mm (Jardim and Hosokawa, 1986).

Uatumã Biological Reserve is located in the municipality of São Sebastião do Uatumã, in the State of Amazonas (1°27'10.03"S 59°20'28.601"W) with collections performed in 2009. The reserve holds a large variety of environments composed mostly of rainforest, with trees reaching up to 50 meters. The soil is rocky, with high concentration of nutrients. It is also very hilly and has two distinct habitats, the high and dry plateaus and the humid lowlands with many streams. The vegetation type of the open areas is composed of vines, bamboo, or grasses. Other formations are the open and closed white sand forests, very dense covered of shrubs and climbing plants (Zuquim *et al.*, 2008).

Virúá National Park is located in the municipality of Caracaráí, in the State of Roraima (1°38'57.4"N 61°08'51.7"W) with collections made between 2008/09. The vegetation is an extensive mosaic of complex, seasonally flooded, forested and not forested systems (Mendonça 2011). The climate is equatorial (hot and humid), with a short dry season, and higher rainfall in autumn. In its southern part, the area comprises a wide and nearly flat surface, with predominately sandy, poorly drained soils and lots of ponds. In its northern part, there are residual hills. Along the west extension, bounded by the Branco River, there is occurrence of alluvial flood plains, which is also observed in the southern portion (Rossetti *et al.*, 2012).

Additionally, few collections were performed in 2015 in the urban area of Manaus by collaborators during a project of fungi associated with trees and shrubs in public roads.

Macro- and microscopic examinations

The hydroid specimens were analyzed according to standard techniques as described by (Martin, 1934) used light microscopy, samples were mounted in 5% potassium hydroxide (KOH), Melzer's reagent (IKI), and 0.1% Cotton Blue (CB) in 60% lactic acid to determine cyanophily. All the specimens were deposited at the Herbarium of the National Institute of Amazon Research (INPA). Substrates were not identified properly due to their high stage of rotting. IH indicates the herbarium collection number.

Results and Discussion

A total of 21 specimens of Amazon hydroid mushrooms were identified in the Brazilian Amazon. Substrate preference and collection sites are shown below (Table 1).

Table 1. Occurrence of hydroid fungi in the Brazilian Amazon

Taxa	Family	Substrate	Collection site	Total
<i>Climacodon</i> sp 1	Phanerochaetaceae	Ft	PARNA	1
<i>Dentipellis</i> sp 1	Hericiaceae	Fb	ZFII	1
<i>Hydnodon theleporum</i> (Lév.) Banker	Hydnodontaceae	Rt, Ft	ZFII, RDS	11
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i> (Scop.) P. Karst.	Exidiaceae	Ft	INPA	1
<i>Steccherinum hydneum</i> Rick: Maas Geest.	Phanerochaetaceae	Lt	UB	1
<i>Steccherinum seriatum</i> (Lloyd) Maas Geest.	Phanerochaetaceae	Ft	ZFII	2
<i>Steccherinum ochraceum</i> (Pers. ex J.F. Gmel.) Gray	Phanerochaetaceae	Fb	ZFII	1
<i>Trechispora gillesii</i> (Maas Geest.) Liberta	Hydnodontaceae	Rt, Lt	RFAD, UB	2
<i>Trechispora</i> sp 1	Hydnodontaceae	Lt	RFAD	1
Total				21

Substrate: Fb. fallen tree branch, Ft. fallen tree trunk, Lt. live tree, Rt. root. Collection sites: PARNA. Viruá National Park, RDS. Uatumã Forest Reserve, RFAD. Adolpho Ducke forest reserve, INPA. National Institute of Amazon Research, UB. Urban area, ZFII. Tropical Silviculture Experimental Station.

Among the studied species, the largest number of specimens is *H. theleporum* most likely due to the high sampling effort performed in ZF II, which compared to the others, possibly shows that the number of species in the Amazon is low, demonstrating the need for a greater sampling effort. Likewise, most of the species studied were

described on soil corroborating with (Cifuentes *et al.*, 2005) who reported these species in the tropical and subtropical forests.

In Regards to *S. ochraceum*, its potential lignocellulolytic has been heavily studied and some different forms of laccase with unusual properties have been isolated from its culture (Chernykh, *et al.*, 2008).

Taxonomy

Hydnodon theleporum

Fig. 1–2

Description: Basidiome piliate, about 2–6 cm (wide), pale orange to orange brown, surface smooth to rimose at center, margin curved downward, imbricate. Hymenophore tuberculate with cylindrical spines, 0.5 to 1 mm (long), smaller and scattered toward margin, orange-brown to cream colored. Stipe, 2–3.5 × 3–5 cm, central portion subcylindrical to flattened, covered with short yellowish to cream colored spines, surface longitudinally rugose. Hyphal system monomitic, thin walled generative hyphae, 1.5–3 µm (wide), frequently simple clamped and scanty inflated. Cystidia absent. Basidia subclavate, 19(–25)–30 × 4.5–7.5 µm, sterigmata 2–5 µm (long), hyaline, with basal clamps. Basidiospores ellipsoid to subglobose, 4–5 × 2.5–5 µm, verrucose, in KOH 5% ornamentation cyanophilic.

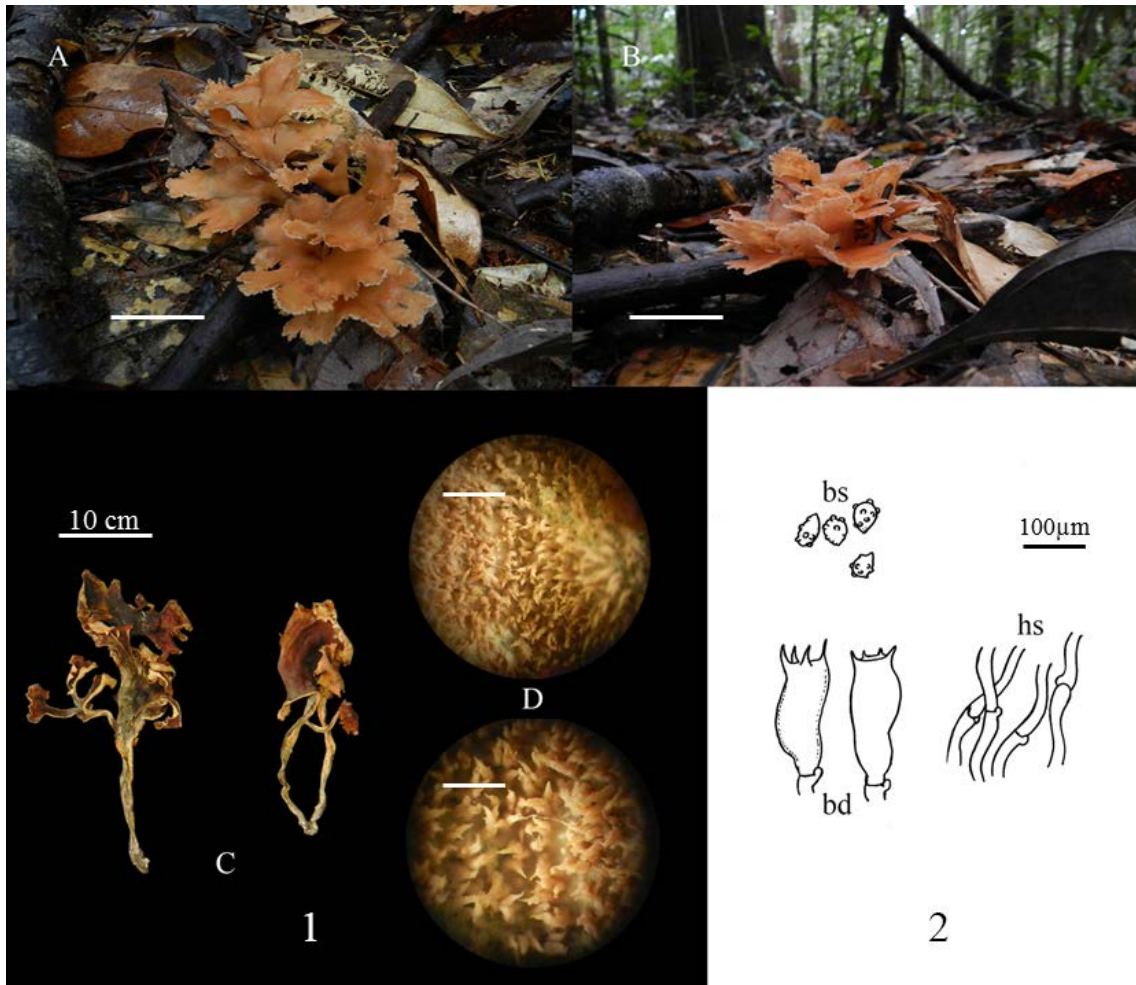


Figure 1–2. *H. thelephorum* in different perspectives. A–B. Aspect of the fresh piliate basidiome on the substrate, C. Dry hymenophore, D. Hymenophore tuberculate with cylindrical spines. bs. Basidiospores, bd. Basidia clavate with basal clamps, hs. Hyphal system (generative hyphae). Bar 100 μm (2); 1mm (D); 10 mm (A, B, C).

Known distribution: This species was previously described for the Amazon region by (Bononi, 1981). Also known to be restricted to the Neotropic zone (Cifuentes *et al.*, 2005).

Material examined: Brazil, Amazonas, Manaus, Tropical Silviculture Experimental Station, on soil/root or fallen tree trunk, 23 Apr. 2014, 11 Apr. 2013, 12 Apr. 2013, 23 Apr. 2014, 12 Apr. 2013, 23 Apr. 2014, 24 Apr. 2014, 23 Apr. 2014, 24 Apr. 2014, VIS Bastos and MA Jesus (IH 8.217, 8.261, 8.412, 8.746, 10.526, 10.527, 10.528, 10.529, 10.530); Uatumã Biological Reserve, on a tree root, 26 May 2009, MA Jesus (IH 5285).

Remarks: *H. thelephorum* is distinguished among the stipitate hydroid fungi because of the pale orange to red color, gelatinous basidiome, and the basidiospores

with cyanophilic warts. (Coker and Beers, 1951). The specimens described here were mostly found on soil close to tree roots, corroborating with (Bononi, 1981; Cifuentes *et al.*, 2005; Sobestiansky, 2005).

Pseudohydnum gelatinosum

Fig. 3–4

Description: Basidiome spatulate to fan-shaped; pileus 3–4 × 2–5 cm, upper surface smooth, white to greyish-white when fresh, pale grey to somewhat dark brown when dry; odontoid hymenophore surface, provided with dense pale grey to light brown conic spines, 2–12 × 1–2 mm, with 3–6 spines per centimetre. Cystidia absent. Probasidia globose, 45–50 × 3–7.5 μm, divided into four cells by longitudinal septa, with 2–4 cylindrical sterigmata 3–5 × 1.5–2 μm. Basidiospores subglobose to ellipsoid, 6–7(–7.5)–8 × 4.2–5 μm, hyaline, smooth, inamiloides and indextrinoides.

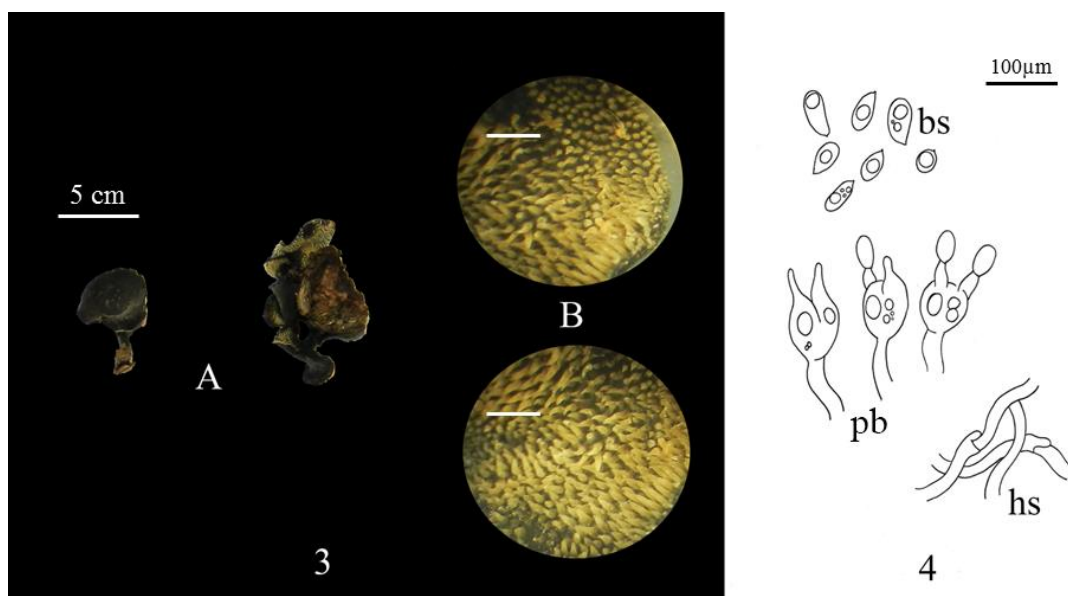


Figure 3. Macro and microstructures. A. Aspect of the dry pileate basidiome, B. Dry odontoid hymenophore. bs. Basidiospores, pb. Protobasidia, hs. Hyphal system (generative hyphae). Bar 100 μm (4); 1mm (B); 5 cm (A).

Known distribution: It is distributed worldwide (Kirk *et al.*, 2008). In Brazil, it is reported to the State of Pará (Bononi, 1981).

Material examined: Brazil, Amazonas, Manaus, National Institute of Amazon Research, on a fallen tree trunk, 05 Mar 2015, MA Jesus (IH 10.051).

Remarks: This species is characterized by its hydroid hymenophore and gelatinous consistency (Lowy, 1971).

Steccherinum hydneum

Fig. 5–6

Description: Basidiome annual, effused reflexed, usually 5–8 × 2–4 cm, when dries easily separable from substrate; odontoid hymenophore, dense spines, brownish to cream colored, subulate, flattened, straight to somewhat flexuous, 2–3 mm (long). Hyphal system dimitic; generative hyphae with clamps, thin-walled; skeletal hyphae thick-walled, 1.5–5 μm (wide), branched, somewhat interwoven. Cystidia clavate, heavily encrusted, 25–35 × 3.5–5 μm, thick-walled, no basal clamps. Basidia clavate, 15–20 × 4.5–5 μm, with basal clamps, usually with 2–4 sterigmata. Basidiospores subglobose, 5–(5.5)–6 × 3–(3.5)–4.5 μm, hyaline, thin-walled, smooth, uninucleate.

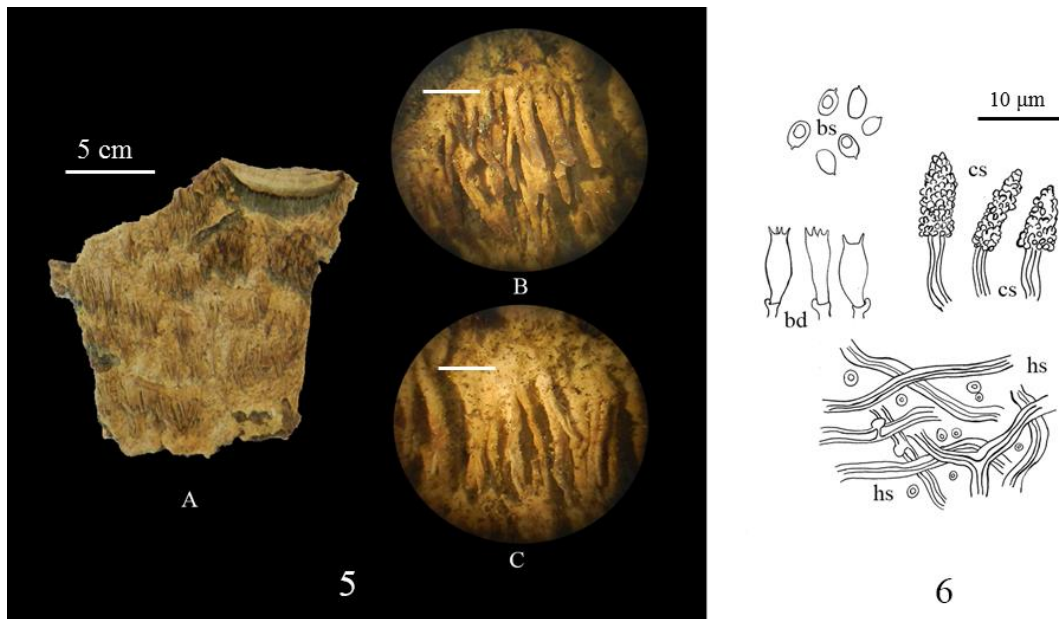


Figure 5–6. Macro and microstructures. A. Aspect of the annual basidiome, B–C. hymenophore odontoid with dense spines. bs. Basidiospores, bd. Basidia clavate, cs. Cystidia encrusted, hs. Hyphal system (generative hyphae and skeletal hyphae). Bar 10 μm (6); 1mm (B, C); 5 cm (A).

Known distribution: Brazil, in the State of São Paulo (Bononi 1976; Bononi *et al.*, 1981).

Material examined: Brazil, Amazonas, Manaus, Urban area, on a live tree, 06 Mar 2015, MA Jesus (IH 9.987).

Remarks: The species is very similar to *S. ochraceum*, reported by (Bononi, 1976) by the color of the basidiomes and shape. However, *S. hydneum* has larger basidiospores, and its context is thin and homogeneous whereas the context of *S. ochraceum* is thick and duplex.

Stecchericium seriatum

Fig. 7–8

Description: Basidiome imbricate to effused-reflexed with flabelliform pileus, flat or convex 15–50 × 10–30 mm, ranging from light yellow to reddish orange when fresh, whitish to cream-colored when dry, usually in association with algae. Hymenial surface tuberculate with cylindrical spines 3 mm (long). Hyphal system monomitic; generative hyphae bearing clamp connections; skeletal hyphae thick-walled 1.5–2 μm. Cystidia abundant, cylindrical to fusiform, 30–40 × 10 μm, thick-walled, rarely with encrustation. Basidia clavate, hyaline 8–15 × 3–5 μm, with 2–4 stigmata, up to 1.5 μm. Basidiospores ellipsoid to globose, 2–6 (wide), non-cyanophilous, amyloid.

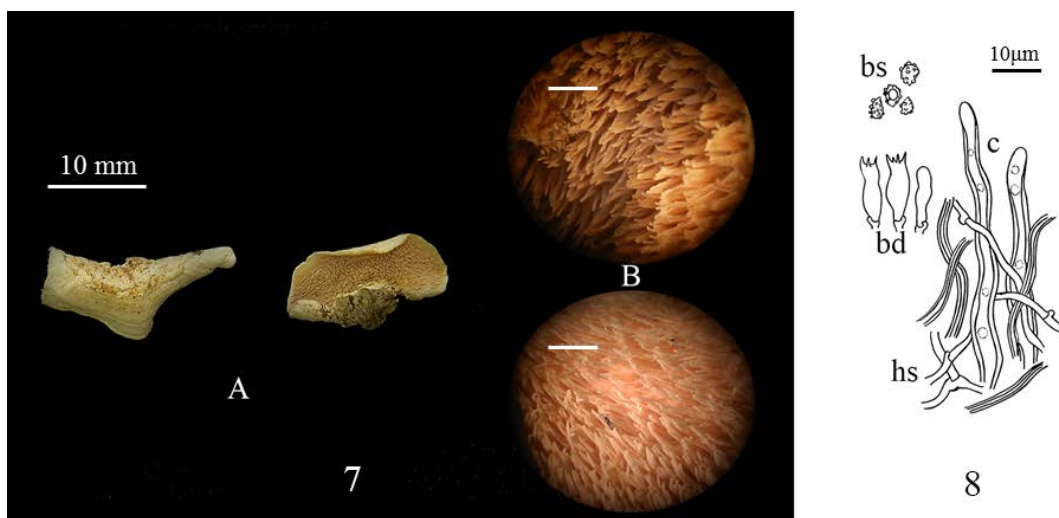


Figure 7–8. Macro and microstructures. A. Aspect of the dry effused-reflexed basidiome, B. hymenophore odontoid with dense spines. bs. Basidiospores, bd. Basidia clavate, cs. Cylindrical cystidia, hs. Hyphal system (generative hyphae and skeletal hyphae). Bar 10 μm (8); 1mm (B); 10 mm (A).

Known distribution: According to (Kirk *et al.*, 2008), the species is widespread in the tropics. It is reported in the State of Santa Catarina, Brazil by (Drechsler-Santos *et al.*, 2008) and for the Amazon region by (Bononi, 1981).

Material examined: Brazil, Amazonas, Manaus, Tropical Silviculture Experimental Station, on dead tree trunks, 23 Apr. and 23 Dec. 2014, MA Jesus (IH 8.548, 10.531).

Remarks: *S. seriatum* can be easily confused as *S. ochraceum* by macro-characters in the field. However, microscopically, *S. seriatum* is strongly amyloid, has finely verrucose basidiospores, and tubular, thick-walled gloeocystidia. In contrast, *S. ochraceum* has non-amyloid, smooth, ellipsoid basidiospores, and apically encrusted skeletocystidia.

Steccherinum ochraceum

Fig. 9–10

Description: Basidiome ressupinate, odontoid, adnate to effused-reflexed, fibrillar velutina margin, ranging from light yellow to reddish orange when fresh, whitish to cream colored when dry; odontoid surface with abundant fimbriate, bleached teeth, about 1 mm (long). Hyphal system dimitic, generative hyphae 2.5–3 μm (wide), hyaline, thin-walled, fibulate, septate, very branched; subiculum hyphae, about 3–4 μm (wide). Thick walls are observed on some simple septa. Lamprocystidia cylindrical, 35–50 \times 6–7 μm , obtuse apex, protruding from the hymenium, some without encrustation. Basidia tubular to suburniform, 18–20 \times 4.5–5 μm , hyaline, with 2–4 sterigmata, about 2 μm (long). Basidiospore ellipsoid, 4–4.5 \times 2–3 μm , hyaline, thin walled, smooth, inamiloides.

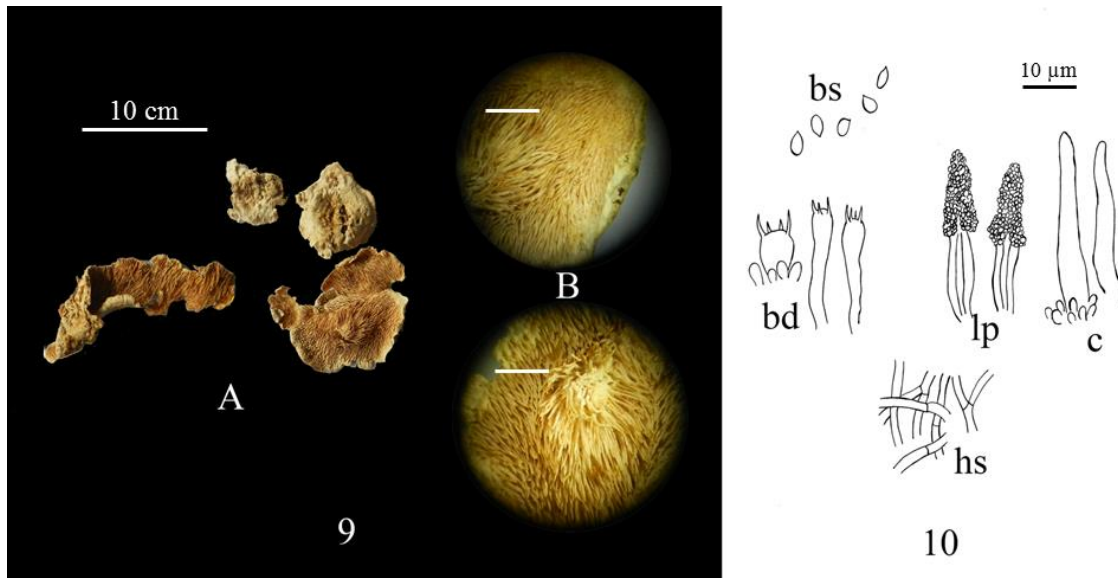


Figure 9-10. Macro and microstructures. A. Aspect of the dry effused-reflexed basidiome, B. Hymenophore odontoid with dense spines. bs. Basidiospores, bd. Basidia subuniform, c. Cystidia, hs. Hyphal system (generative hyphae and skeletal hyphae), lp. Lamprocystidia. Bar 10 μm (10); 1mm (B); 10 cm (A).

Known distribution: Distributed worldwide (Jülich and Stalpers, 1980).

Material examined: Brazil, Amazonas, Manaus, Tropical Silviculture Experimental Station, on a fallen tree branch, 12 Apr. 2013, VIS Bastos (IH 10.513)

Remarks: *S. ochraceum* seems to be morphologically similar to *S. tenuispinum* Spirin, Zmitr. & Malysheva differing from it by being shorter up to 2 mm (long) and densely arranged (5–7 per mm) pale ochraceous spines.

Trechispora gillesii

Fig. 11–12

Description: Basidiomes pileate 1.5–2 × 1 cm, whitish to cream colored, with brown edges when fresh, dark orange to brownish when dried. Stipe ochraceous, up to 1.2–1.5 cm. Hymenophore tuberculate with cylindrical spines, 0.5–1 mm (long), near stipe, smaller and scattered toward margin, cream colored. Hyphal system monomitic; hyphae fibulate and inflated close to the septa. Cystidia absent. Basidia hyaline, clavate, 15–20 × 5.5–6 μm. Basidiospore hyaline, subglobose, 5–6.6 × 4.5–6 μm, verrucose, non-amyloid.

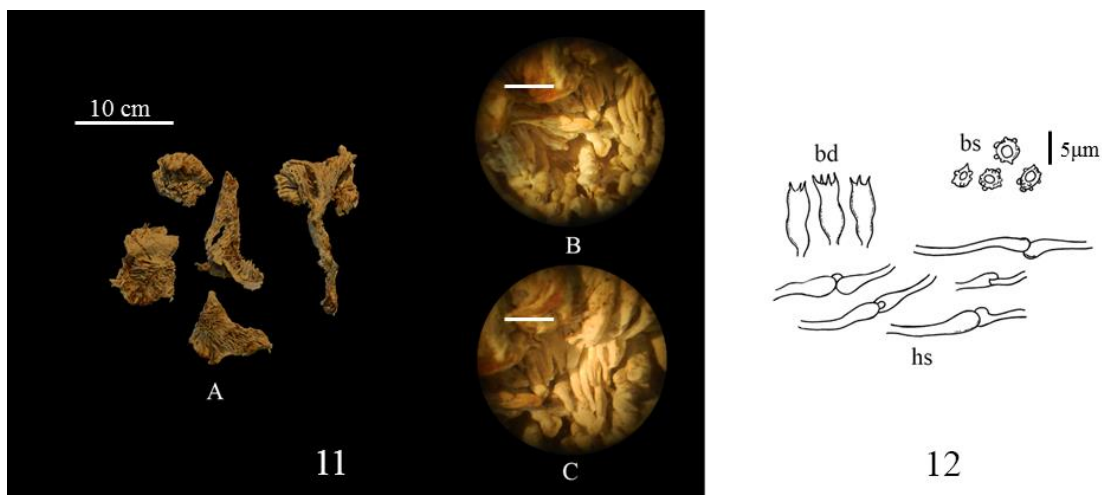


Figure 11–12. Macro and microstructures. A. Aspect of the dry pileate basidiome, B–C. hymenophore tuberculate with cylindrical spines. bs. Basidiospores, bd. Basidia clavate, hs. Hyphal system, hyphae with clamp connections. Bar 5 μm (12); 1mm (B, C); 10 cm (A).

Known distribution: Little is known about *T. gillesii*, previously reported only in Central Africa. This is the first report of *T. gillesii* in the Brazilian Amazon.

Material examined: Brazil, Amazonas, São Sebastião do Uatumã, Uatumã Biological Reserve, on soil, 27 May 2009, MA Jesus (IH 5.534); Amazonas, Manaus, Adolpho Ducke Forest Reserve, on a live tree, 27 Jan. 2006, MA Jesus (IH 3.078).

Remarks: *T. gillesii* has a particular stipitate-pileate basidiome and has large basidiospores, being one of the few species of the genera with these characters (Julich, 1976).

Conclusion

Due to the economic and ecological importance of these macrofungi, the study contributed to the expansion of knowledge about hydroid's fungal diversity in the Amazon region. However, a lot of them still remain unknown in the Amazon rain forest.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the Brazilian government for funding collections and research by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The Brazilian Program for Biodiversity Research (PPBio/INPA/MCTI). The sustainable forest management project in the Brazilian Amazon, Amazon wood (INCT-MCTI) and the National Institute for Amazonian Research (INPA) by infrastructure.

References

- Arnolds E (2003). De stekelzwammen en pruikzwammen van Nederland en België.. *Coolia* 46: 1–96.
- Bononi VLR (1976). Basidiomicetos hidnoides da micota brasileira. (Tese), doutorado em Ciências na área de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 314 p.
- Bononi VLR (1981). Alguns Basidiomicetos hidnóides da região Amazônica. *Rickia*. 9: 17–30.
- Chernykh A, Myasoedova N, Kolomytseva M, Ferraroni M, Briganti F, Scozzafava A, Golovleva L (2008). Laccase isoforms with unusual properties from the basidiomycete *Steccherinum ochraceum* strain 1833. *J. Appl. Microbiol.*, 105: 2065–2075.
- Chevallier FF (1826). Flore Générale des Environs de Paris. 1: 1–674.
- Cifuentes J, Patiño-Conde V, Villegas M, García-Sandoval R, Valenzuela R (2005). First record of *Hydnodon thelephorus* from Belize, Dominican Republic, Mexico, with new data on its morphology and distribution. *Mycotaxon* 91: 27–34.
- Coker WC, Beers AH (1951). The stipitate Hydnums of the eastern United States. University of North Carolina Press, Chapel Hill, NC. 211 p.
- Dai YC (2011). A revised checklist of corticioid and hydroid fungi in China for 2010. *Mycoscience* 52: 69–79.

- Drechsler-Santos ER, Groposo C, Loguercio-Leite C (2008). Additions to the knowledge of lignocellulolytic Basidiomycetes (Fungi) in forests from Santa Catarina State, Brazil. *Mycotaxon* 103: 197–200.
- Jardim FCS, Hosokawa RT (1986). Estrutura da floresta equatorial Úmida da Estação Experimental de Silvicultura Tropical do INPA. *Acta Amazonica*, 16/17 (Único): 411–508.
- Julich W (1976). Studies in resupinate Basidiomycetes – IV. In *Persoonia* 8: 431-442.
- Jülich W, Stalpers A (1980). The resupinate non-poroid Aphyllorphorales of the temperate northern hemisphere. *Verhandelingen der Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen* 74: 1–335.
- Kirk PM, Canhão PF, Minter DW, Stalpers JA (2008). *Dicionário da Fungi* (10th ed.). Wallingford, UK: CAB International. 340 p.
- Lowy B (1971). Tremellales. *Flora Neotropica* 6: 153 p.
- Martin GW (1934). Three new Heterobasidiomycetes. *Mycologia* 26: 261–265.
- Mendonça BAF (2011). *Campinaranas amazônicas. Pedogênese e relações solo-vegetação*. 110p. (Dissertação) Mestrado em solos e nutrição de Plantas. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa
- Oliveira ML, Baccaro FB, Braga-Neto R, Magnusson WE (2008). Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade. Manaus : Áttema Design Editorial, 168 p.
- Roberts P, Evans S (2011). *The Book of Fungi*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 471 p.
- Rossetti DF, Zani H, Cohen MLC, Cremon EH (2012). A Late Pleistocene-Holocene wetland megefan in the Brazilian Amazonia. *Journal of Sedimentary Geology* 282: 276–293.
- Sobestiansky G (2005). Contribution to a macromycete survey of the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48 (3): 437–457.

Vesterholt J, Asman WAH, Christensen M (2000). Nitrogen deposition and decline of fungi on poor and sandy soils. *Svampe* 42: 53–60.

Whittaker RH (1969). New concepts of Kingdoms of organisms. *Science* 163: 150–160.

Zuquim G, Costa FRC, Prado J, Tuomisto H (2008). Guia de identificação das samambaias e licófitas da REBIO Uatumã, Amazônia Central. Manaus: Áttema Design Editorial, 321 p.

Bioprospecção de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro para aplicação em reações de biorremediação enantiosseletiva de cetonas

Bezerra AFM¹, Vasconcelos HS²; Neto JFN¹, Sousa HML¹, Araújo LS³, Oliveira FM¹, Zanotto SP⁴, Andrade LH³, Barroso HS¹.

¹ Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-AM. ² Centro Universitário do Norte Laureate, Manaus-AM. ³ Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo-SP, Brasil. ⁴ Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

E-mails: alziramarreiros@gmail.com; joaquimfnn@gmail.com,
hiltonmarcelo18@gmail.com, fernando.mo2011@gmail.com; hileia.barroso@gmail.com,
hebe.vasconcelos@gmail.com, lidianepiaui@yahoo.com.br, leandroh@iq.usp.br,
sandrazanotto@yahoo.com.br

Resumo

A busca por novos biocatalisadores é um dos atuais interesses das indústrias biotecnológica e farmacêutica. As enzimas de origem microbiana se apresentam como excelentes catalisadores devido a capacidade de sintetizar intermediários químicos biologicamente ativos. Alguns destes são bastante difundidos na produção de fármacos, como os alcoóis enantiomericamente puros. Sua síntese pode ser realizada utilizando fungos em reações de biorredução assimétrica de cetonas. Diante da vasta diversidade microbiana presente na região amazônica e a necessidade de investigações nesta área, este trabalho teve como objetivo realizar a bioprospecção de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro, a fim de avaliar o potencial em reações de biorredução enantiosseletiva de cetonas. A atividade enzimática de 91 fungos filamentosos foi avaliada. Neste quesito, nove destacaram-se ao obter excelentes resultados, com taxas de conversão maiores que 80% e excesso enantiomérico superiores a 99% no processo de biorredução das cetonas aromáticas: 4-cloroacetofenona e 4-metilacetofenona. O fungo, cujo código de identificação é SED 41, apresentou atividade enzimática capaz de biorreduzir a 4-cloroacetofenona ao (*R*)-1-(4-clorofenil)etanol, obtendo uma conversão >99% e excesso enantiomérico >99% para o enantiômero-*R*. O isolado SED 108 converteu 60% da 4-metilacetofenona ao (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol com excesso enantiomérico de 81% (*S*). Estes resultados

demonstram o potencial dos fungos filamentosos isolados na bacia amazônica em reações de biorredução enantiosseletiva dos derivados da acetofenona e a versatilidade na produção tanto do enantiômero *S* como o *R*.

Palavras-chave: Biocatálise, micro-organismos, biorredução, alcoóis quirais.

Introdução

Os alcoóis enantiomericamente puros são amplamente utilizados como intermediários químicos em diversas áreas, principalmente, nas indústrias farmacêutica, agroquímica e biotecnológica (Patel, 2014). A produção biotecnológica de compostos químicos por biocatálise possui vantagens em relação à química sintética pois diminuem o impacto ambiental e gastos energéticos devido as condições reacionais brandas (Xu, 2013). Isto está relacionado com a utilização das enzimas produzidas pelos micro-organismos como catalisadores reacionais. Esta abordagem tem sido visada pois apresenta elevada enantiosseletividade e por ser benéfica ao meio ambiente. A biorredução assimétrica de cetonas para obtenção de alcoóis quirais pode ser realizada com células íntegras de micro-organismos ou com enzima oxirredutase isolada (Soni e Banerjee, 2006).

As reações com células íntegras de micro-organismos representam uma alternativa mais acessível, uma vez que seu sistema possui os caminhos metabólicos para regeneração de cofatores como o NAD^+ e NAD(P)H (Ni e Xu, 2012). Além disso, o cofator das oxirredutases, o NAD^+ ou NAD(P)H , confere elevada enantiosseletividade ao inserir quiralidade à molécula alvo, sendo uma boa estratégia para a produção de alcoóis opticamente ativos, possibilitando alcançar o rendimento teórico de quase 100% e enantiosseletividade de 99%. (Soni e Banerjee, 2006)

A produção de enzimas de origem fúngica é um processo bastante estudado, mas poucos são os relatos a respeito da utilização destes micro-organismos, isolados da região amazônica, em processos biotecnológicos. Diante da crescente necessidade de busca por novos biocatalisadores, a biodiversidade fúngica da região amazônica é extremamente promissora para a pesquisa do seu potencial de aplicação em processos biocatalíticos. Assim, este trabalho tem como objetivo principal verificar o potencial de fungos filamentosos isolados dos sedimentos do rio Negro/Amazônia, para produção de enzimas redutases para realizar reações de redução de dois derivados da acetofenona de forma enantiosseletiva.

Material e Métodos

A avaliação da atividade enzimática dos fungos realizou-se de acordo com o procedimento descrito por Araújo (2011). Conforme as seguintes etapas:

Reativação. Os fungos estão preservados pelo Método de Castellani e foram reativados utilizando o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose. Os cultivos foram incubados a 28 °C por 7 dias.

Pré-inóculo. O inóculo do fungo foi adicionado a um erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultura (MCFE7) e incubados a 28 °C sob agitação orbital, 160 rpm por quatro dias.

Inóculo/Reação. Neste ensaio, foram utilizadas microplacas (24 poços). Após quatro dias, foram adicionados, em cada poço da microplaca, 2 mL de pré-inóculo e 40 µL das soluções das cetonas 4-metilacetofenona e 4-cloroacetofenona (5 mmol/L). As microplacas foram mantidas em agitador orbital por 3 dias nas mesmas condições citadas anteriormente.

Extração. Após 3 dias, foi adicionado éter etílico (2 mL) a cada poço da microplaca e extraída a mistura reacional (fase aquosa) sendo transferida para um tubo Falcon e centrifugada (1 min, 6000 rpm) para separação de fases.

Análise. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa e coluna com fase estacionária quiral. O excesso enantiomérico dos compostos foram determinados por comparação cromatográfica com amostras dos (*R,S*)-alcóois sintetizados quimicamente, fornecidos pelo Laboratório de Química Fina e Biocatálise da Universidade do Estado de São Paulo - USP, e das cetonas. O excesso enantiomérico (ee) foi definido como a razão de $[S]-[R]/[S]+[R] \times 100\%$, em que [*R*] e [*S*] são as concentrações dos enantiômeros (*R*) e (*S*), respectivamente.

As soluções padrões dos alcoóis: (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol e (*R,S*)-1-(4-clorofenil)etanol; e das cetonas: 4-cloroacetofenona e 4-metilacetofenona foram preparados numa concentração de 5 mmol/L. Para isto, diluiu-se 0,25 mmol dos substratos em 1 mL de dimetilformamida (DMF) para os alcoóis; e etanol para as cetonas.

Meio de Cultura MCFE7 = (pH 5,6) = KH₂PO₄ (0,1 %; 1,0 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,04%; 0,4 g/L), NH₄Cl (0,04 %; 0,4 g/L), Dextrose (0,025 %; 0,25 g/L), Peptona (0,025 %; 0,25 g/L).

Os valores de conversão variaram entre 28% a 84% quando o substituinte R da acetofenona era o grupo metila (Me) e de 52% a >99% quando o substituinte era o cloro (Cl). Nas reações 2, 8, 10, 12, 14 e 16 com o substrato clorado as conversões foram excelentes (>80) e com elevado excesso enantiomérico (ee) (>90%) nas reações 2, 4, 8, 10, 12 e 16. Por outro lado, nas reações com o grupo substituinte Me apenas na reação 7 ocorreu conversão acima de 80% e nas reações 5, 7 e 11 obteve-se ee >90%.

Dentre os nove isolados fúngicos, sete reduziram as cetonas para produzir o enantiômero-*R* e apenas dois foram enantiosseletivos para sintetizar o enantiômero-*S*. O SED 10 converteu 63% do 4-metilacetofenona com e.e. 85% para o (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol e o 4-cloroacetofenona ao (*S*)-1-(4-clorofenil)etanol (conversão 86% e excesso enantiomérico 78%); o SED 75 reduziu 75% de 4-metilacetofenona em (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol com ee 85%.

O isolado SED 41 apresentou o melhor resultado na avaliação enzimática, pois catalisou 4-metilacetofenona e 4-cloroacetofenona com elevadas conversões (83% e >99%, respectivamente) e e.e. para o enantiômero-*R* (97% e >99%, respectivamente).

Os melhores resultados foram obtidos nas reações onde o substrato era uma cetona com o substituinte cloro (Cl) em seu anel aromático. Assim, as enzimas redutases produzidas pelos isolados fúngicos, SED 35, SED 41, SED 132, SED 05, SED 10 e SED 123 tiveram maior afinidade com a cetona clorada. Isto pode ser explicado pelo fato do cloro ser um grupo substituinte retirador de elétrons, o que facilita a reação de redução. O isolado SED 64 demonstrou-se específico para reduzir a cetona com substituinte cloro, convertendo 77% da cetona ao enantiômero (*R*) do álcool com elevado e.e. (>99%), mas não reduziu a cetona substituída pelo grupo Me. Por outro lado, o isolado SED 75 foi específico para a redução da cetona com substituinte Me, convertendo 75% da cetona a álcool com excesso enantiomérico 64% para o enantiômero (*S*).

A maioria dos isolados fúngicos apresentaram enzimas oxidorredutase com preferência pela formação do enantiômero-*R* do álcool. Já o SED 10 e o SED 75 produziram oxidorredutases diferentes dos demais, que tiveram preferência na síntese do enantiômero-*S*.

O isolado fúngico SED 41 apresentou ótimos resultados como biorredutor enantiosseletivo, reduzindo tanto a 4-cloroacetofenona como a 4-metilacetofenona com altas taxas de conversão e excesso enantiomérico para o enantiômero-*R*.

Conclusões

Este trabalho obteve resultados que demonstram o potencial biotecnológico das enzimas produzidas pelos isolados de fungos filamentosos de sedimentos de rio Negro, pois, sintetizaram com sucesso alcoóis quirais enantiomericamente puros a partir das reações de biorredução da 4-cloroacetofenona e 4-metilacetofenona, além da versatilidade na produção tanto do enantiômero-*S* como o enantiômero-*R*.

Destacou-se o isolado fúngico SED 41 como um biocatalisador promissor em reações de biorredução de cetonas para a obtenção de alcoóis quirais enantiomericamente puros.

Referências

- Araújo LS, Kagohara E, Garcia TP, Pellizari VH, Andrade LH (2011) Screening of Microorganisms Producing Cold-Active Oxidoreductases to Be Applied in Enantioselective Alcohol Oxidation. *An Antarctic Survey. Mar Drugs*9: 889-905.
- Ni Y, Xu JH. (2012) Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols. *Biotechnology Advances*30: 1279–1288.
- Patel PK, Singh S, Kumar A, Sandhyavali MS, Priyadarshini SR, Yadav IK (2014) Microbial reduction of ketones and its derivatives. *Ind J of Research in Pharm and Biotechnology*2: 1020-1029.
- Soni P, Banejjer UC (2006) Enantioselective reduction of acetophenone and its derivatives with a new yeast isolate *Candida tropicalis* PBR-2 MTCC 5158. *Biotechnology Journal*1: 80-85.
- Xu G, Yu H, Xu J (2013) Facile access to chiral alcohols with pharmaceutical relevance using a ketoreductase newly mined from *Pichia guilliermondii*. *Chin J Chem*31: 349-354.

Biodegradação de petróleo por isolados de rizóbios provenientes de solos amazônicos.

Brito L.L.¹, Menezes N.C.², Minelli-Oliveira C.¹, Oliveira L.A.³

¹ PG Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas –, ² Mestre em Agricultura no Trópico Úmido, INPA, ³ Pesquisador, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Emails: luci_brito@hotmail.com, naramenezes19@hotmail.com, cassymellini@gmail.com, luizoli@inpa.gov.br

Resumo

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos. A contaminação ambiental por estas substâncias causa grande impacto ecológico. Para a descontaminação dos locais contaminados, a biorremediação utiliza micro-organismos, o que requer mecanismos para estimular e desenvolver a atividade microbiana na degradação de compostos de petróleo. Esse trabalho teve como objetivo, testar isolados de rizóbios na degradação de compostos do petróleo. Foi utilizado o método de riscagem em placas de Petri, tendo o petróleo como fonte de carbono. Dos 120 rizóbios, 93 mostraram capacidade de usar o petróleo como fonte de carbono, apresentando bom crescimento até os 15 dias de avaliação. Desses, 36 mostraram elevada habilidade de degradar o petróleo com seis dias de crescimento. Os melhores apresentaram crescimentos elevados após 24 horas usando o petróleo (INPA R629, INPA R634, INPA R656, INPA R664, INPA R667, INPA R672 e INPA R674). Esses resultados demonstram que os rizóbios podem tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados com petróleo.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano, Ecologia microbiana, Biotecnologia, Amazônia

Introdução

A Biorremediação é um processo de simples manutenção, aplicável em grandes áreas e de baixo custo, que usa micro-organismos ou suas enzimas para destoxificar contaminantes no solo ou outros ambientes. É a transformação do contaminante em formas

que não oferecem riscos ambientais (Duarte, 2012). Os acidentes e vazamentos com produtos oleosos, principalmente derivados de petróleo, afetam vários meios ambientes, tanto aquáticos como nos solos. Para a remediação destas áreas, vários processos podem ser utilizados, mas os biológicos são os mais usados devido ao custo e à eficiência, quando comparados a processos físico-químicos (Reginatto *et al.*, 2011). A legislação brasileira exige que áreas contaminadas sejam remediadas para minimizar a interferência ambiental e restaurar os ecossistemas. Para isto, são necessários o diagnóstico, a análise e o monitoramento do impacto e medidas remediadoras (CETESB, 2010). Os micro-organismos são considerados biodegradadores eficientes por sua abundância, diversidade, versatilidade catabólica e anabólica, e capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (Moraes e Tornisielo, 2009). Para que ocorra a degradação biológica de compostos orgânicos, como os derivados do petróleo, precisam ser estabelecidas condições ambientais favoráveis (concentração de nutrientes, umidade, pH, temperatura e aeração), além do conhecimento sobre a concentração e o tipo de óleo contaminante, a densidade populacional e o potencial de degradação dos micro-organismos. Os rizóbios fazem parte da população microbiana do solo e seu estudo pode conduzir à descoberta de estirpes para uso na biorremediação de ambientes contaminados com compostos de petróleo, visto que são adaptadas ao ambiente local, e podem mostrar maior eficiência e tolerância às condições de estresse. Portanto, este trabalho testou a capacidade de isolados de rizóbios em degradar petróleo para serem utilizados no processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos da Amazônia (LEBMAM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), utilizando-se 120 isolados de rizóbios adquiridos através da coleta de nódulos de leguminosas, seguidos de isolamento e purificação, segundo método descrito por Somasegaran e Hoben (1985). As bactérias isoladas foram enumeradas como INPA R546 a INPA R677. Para avaliar a capacidade de degradação de petróleo e seus derivados e o crescimento bacteriano, foi utilizado um método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999) modificado, realizado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (yeast manitol agar), onde foram utilizados 0,1 mL de petróleo como fonte de carbono ao invés de manitol. Como controle foi usado o manitol ao invés do petróleo. Esse

teste foi realizado em quatro repetições. As avaliações foram feitas a cada três dias, por um período de 15 dias, no qual as bactérias foram mantidas em laboratório a uma temperatura de 23 – 28 °C. De acordo com o desenvolvimento das colônias nas quatro zonas da placa, foram dados valores para o crescimento para cada isolado, segundo Oliveira e Magalhães (1999). Com base no crescimento em placas de Petri, os isolados foram classificados como pouco (1,00 à 2,00), moderado (2,06 à 3,00) ou elevado crescimento (3,06 à 4,00) usando o petróleo como fonte de carbono (biodegradação). Para fins de seleção, foram escolhidos os isolados que apresentaram nota mínima de 3,06 ao sexto dia de teste.

Resultados

A figura 1 mostra o crescimento dos 120 isolados de rizóbios com as fontes de carbono manitol (M) e petróleo (P) no período de 15 dias de avaliação. Não houve diferença entre as duas fontes de carbono quando se analisa os percentuais (68% e 69%) para os isolados que apresentaram crescimentos elevados no meio com manitol e petróleo respectivamente. As diferenças dos usos dessas duas fontes de carbono apareceram entre os isolados que apresentaram pouco ou moderado crescimento. No meio com manitol, 11% mostraram crescimento moderado e 21%, baixo crescimento, enquanto que no meio com petróleo, esses percentuais foram respectivamente de 23% e 8%. Alguns microrganismos já apresentavam notas 3,06 ou acima desta após 24 horas de incubação com a fonte de carbono petróleo (INPA R629, INPA R634, INPA R656, INPA R664, INPA R667, INPA R672 e INPA R674) mostrando-se assim, superiores a todos os outros quanto à habilidade de degradar o petróleo. Outros foram adquirindo elevados crescimentos (notas acima de 3,0) após alguns dias. Com base nesses resultados, foram identificadas 36 bactérias com performances superiores, que atingiram notas elevadas (3,06 a 4,00) até o sexto dia de crescimento e foram utilizados em testes posteriores, demonstrando com isso, que são potenciais degradadores de hidrocarbonetos. Os demais isolados que apresentaram notas de crescimentos elevados e moderados após o sexto dia podem ser utilizados formando consórcios em futuros testes de biodegradação de petróleo ou de suas frações, pois até o 15^o dia apresentaram crescimentos elevados usando o petróleo para crescerem. Isso mostra que os isolados de rizóbios testados utilizaram o petróleo para seus crescimentos, tornando-se necessário novos testes para verificar o potencial de degradação de cada rizóbio utilizado.

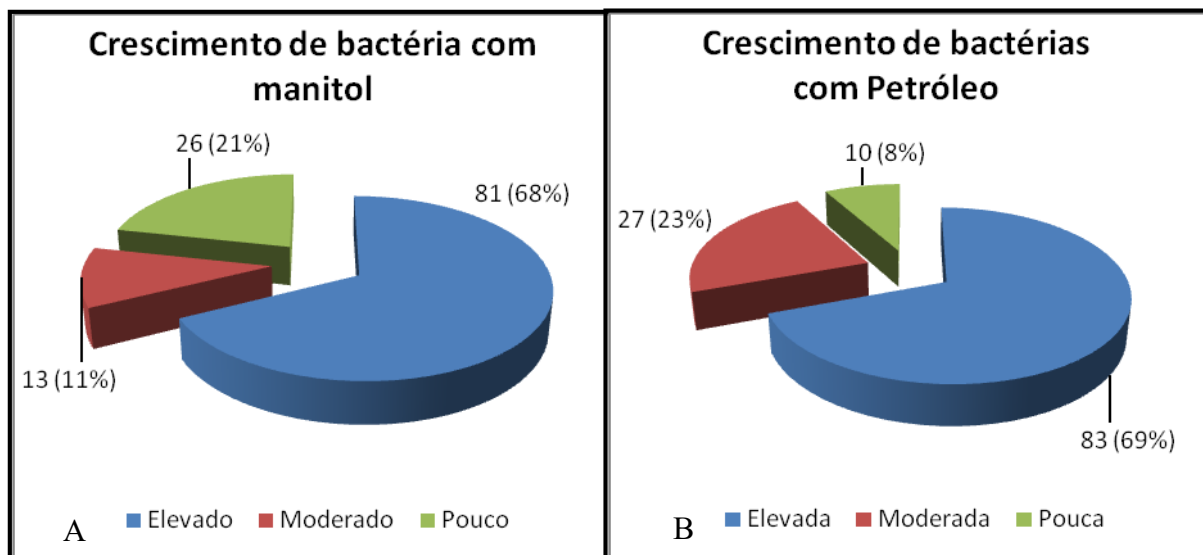


Figura 1 – Crescimento de rizóbios usando manitol ou petróleo como fontes de carbono.

Discussão

Apesar de não haver grande diferença nos testes com manitol e petróleo com relação ao crescimento elevado (68% e 69% dos isolados), observou-se que os percentuais de rizóbios com crescimentos moderados foram o dobro no meio com petróleo (23%, em comparação aos 11% com manitol), resultando em um percentual bem menor daqueles que tiveram pouco crescimento nesse meio (21% em manitol e 8% em petróleo). Esses dados demonstram que os rizóbios testados nesse trabalho usaram o petróleo com mais eficiência do que o manitol para seus crescimentos. Para demonstrar o potencial dos rizóbios na biodegradação de petróleo, vários trabalhos vêm sendo realizados. Yang e Lee (2008) testaram consórcios de rizóbios na tentativa de degradar 4-clorofenol e afirmaram que quanto maior a concentração dessa substância menor foi a biomassa das colônias de consórcios. Xiong *et al.*, (2011) realizaram testes para mensurar os efeitos da temperatura sobre a degradação de petróleo por comunidades microbianas, concluindo que a temperatura influencia na composição das comunidades microbianas do solo. Ahmad *et al.*, (1997) isolaram e caracterizaram várias linhagens de *Rhizobium meliloti* em áreas contaminadas com hidrocarbonetos aromáticos e cloroaromáticos, sendo os primeiros a registrarem isolados de *Rhizobium meliloti* com potencial para degradação de hidrocarbonetos. Isso mostra que os isolados utilizados se adaptaram à fonte de carbono petróleo, tornando-se necessário novos testes para verificar o potencial de degradação de cada rizóbio utilizado.

Conclusões

Dos 120 isolados de rizóbios, 93 apresentaram capacidade de degradar o petróleo no meio.

Trinta e seis isolados mostraram essa habilidade elevada já com seis dias de crescimento.

Os isolados INPA R629, INPA R634, INPA R656, INPA R664, INPA R667, INPA R672 e INPA R674 mostraram-se como os melhores, por apresentarem crescimentos elevados após 24 horas usando o petróleo.

Referências bibliográficas

Ahmad D, Mehmannaavaz R, Damaj M (1997) Isolation and Characterization of Symbiotic N₂-Fixing *Rhizobium meliloti* from Soils Contaminated with Aromatic and Chloroaromatic Hydrocarbons: PAHs and PCBs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39(I):33-43.

CETESB (2010). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. [on line]. Brasil, Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>> Acesso em: 13 jan. 2010.

Duarte, WM (2012) Identificação de Actinomicetos Isolados de Solo Impactado com Resíduos Petroquímicos e Seleção de Potenciais Degradadores de Misturas de Diesel e de Biodiesel. Porto Alegre, Brasil. (M.Sc Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UFRGS).

Moraes BE, Tornisielo TMS (2009). Biodegradation of Oil Refinery Residues Using Mixed- Culture of Microorganisms Isolated from a Landfarming. *Brazilian archives of Biology and technology*, 52(6):1571-1578.

Oliveira LA, Magalhães HP (1999) Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia* 30:203–208.

Reginatto C, Colla M.L., Thomé A. (2011). Biorremediação de Resíduos Oleosos em Solos *Revista CIATEC – UFP*, 3(2):19-31.

Somasegaran P, Hoben HJ (1985) Methods in legume-Rhizobium technology. NifTAL Project and MIRCEN, Hawaii, 365p.

Xiong Y, Wang H, Hao X, Sun Y (2011) Effects of temperature on oil-degrading microbial communities and the biodegradation of petroleum. 5^a Conferência Internacional sobre Bioinformática e Engenharia Biomédica (iCBBE). Wuhan, China.

Yang CF, Lee CM (2008) Enrichment, isolation, and characterization of 4-chlorophenol-degrading bacterium *Rhizobium sp.* 4-CP-20. *Biodegradation*, Taiwan, 19:329–336.

***Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff & Maubl. (Sphaeropsidales, Sphaeroidaceae) associada à espécie florestal *Scleronema micranthum* ((Ducke) Ducke, Bombacaceae) (Cardeiro) da Amazônia**

Carvalho R S¹, Nascimento CC¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Tecnologia e Inovação COTI- E-mail: rosana@inpa.gov.br.

Resumo

Realizou-se este trabalho da prevalência de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff & Maubl., manchador de madeira, associado a espécie florestal da Amazônia *Scleronema micranthum* (Ducke) Ducke durante 12 meses. Foram utilizadas cinco árvores e dos fustes foram cortados 30 discos de 30 cm. Os mesmos foram distribuídos, aleatoriamente, sobre o solo da floresta da Estação Experimental de Silvicultura Tropical-ZF-2, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA. Neste ambiente, os discos ficaram expostos a biodeterioração e a cada dois meses procedia-se a remoção de cinco discos do solo e todos foram transportados para o Laboratório de Patologia da Madeira COTI/INPA. Para o isolamento *L. theobromae* foram utilizados fragmentos retirados do alburno dos discos, foi feito a assepsia dos fragmentos, sendo que três foram colocados sobre o meio de cultura extrato de malte-agar. As placas de Petri foram e mantidos em incubadora a 27 °C. As colônias desenvolvidas durante o período de incubação foram observadas e o isolado puro foi preservado em tubo de ensaio em baixa temperatura. A identificação foi feita por meio de observações macroscópicas da colônia e microscópica das estruturas vegetativas e reprodutivas. Em todas as coletas, com exceção da segunda, a prevalência de *L. theobromae* associado a *S. micranthum* foi confirmada. A maior prevalência foi observada na primeira, quarta e sexta coleta, todas com cinco isolados.

Palavras-Chave: Madeira, *S. micranthum*, fungos manchadores, *Lasiodiplodia theobromae*

Introdução

A espécie florestal da Amazônia *Scleronema micranthum* (Ducke) Ducke, conhecida como Cardeiro, pertence à família Bombacaceae. É uma árvore de porte médio a grande é comumente encontrado no Estado do Amazonas principalmente nos arredores de Manaus e no Baixo Rio Negro (Loureiro *et al.*, 1979; Loureiro e Silva 1968). A sua madeira apresenta fácil trabalhabilidade, tendo potencial na confecção de móveis, tabuados, laminados, faqueados decorativos, compensados e na construção civil e naval (Freitas *et al.*, 1992). Em

ensaios acelerados de laboratório, o Cardeiro foi considerado resistente aos fungos apodrecedores *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus : Fr.) Murril e *Polyporus fumosus* Pers : Fr. (Paes *et al.*, 2007) e, moderadamente resistente, a *Lenzites trabea* (Pers.: Fr.) (INPA/CPPF 1991). As toras de *S. micranthum* foram cortadas e os discos foram deixados na floresta, e após 12 meses não foi encontrado ataque de fungos no cerne, e o albarno demonstrou ser pouco resistente (INPA/CPPF 1991). Sabe-se que a madeira dessa essência florestal representa o principal produto florestal, considerado um material orgânico complexo e sua composição anatômica e química que pode nutrir espécies de fungos e outros microrganismos (Dix e Webster 1995).

Os primeiros fungos que colonizam as árvores recém-abatidas são os manchadores de madeira e emboloradores, devido a grande quantidade de substâncias de reserva e a elevada umidade. Alguns fungos manchadores podem em estágio avançado de ataque provocar podridão mole (Cavalcante 1982). De acordo com Oliveira (2005) e Silva (2004), *L. theobromae* é um dos principais fungos relatados causando manchas em madeira nas regiões tropicais e subtropicais.

Na Amazônia Brasileira, há registro de *L. theobromae* ocorrendo em 12 doze espécies florestais oriundas de quatro indústrias madeireiras de Manaus-Amazonas (Hanada *et al.*, (2003). Na Amazônia Peruana, Segura (1970) relata o ataque de *L. theobromae*, causando mancha azul em amostras de 27 espécies de madeira.

Diante do exposto, o estudo teve como objetivo isolar e avaliar a prevalência do fungo manchador *L. theobromae* de amostras da madeira de *S. micranthum*, expostas ao ambiente florestal por doze meses.

Material e Métodos

Local do Experimento

O experimento de campo foi realizado na área da Estação Experimental de Silvicultura Tropical-ZF-2, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, localizado no km 60 da BR 174 (Manaus- Boa Vista). Segundo RADAM (1978) e Bastos *et*

al., (1986) a área em estudo apresenta o terreno suavemente ondulado, o clima de acordo com a classificação de Koppen, é do tipo Am. A temperatura média anual do mês mais frio é sempre acima de 18 °C. A umidade relativa é muito alta e a média anual varia de 84% a 90%. A precipitação pluviométrica é maior nos meses de dezembro a maio e a média anual é de 2097 mm. A vegetação da área é influenciada pela Bacia do rio Negro, por possuir florestas heterogêneas, a altura das árvores varia de 30 a 40 metros.

Neste trabalho foram utilizadas cinco árvores de *S. micranthum*, de cada árvore foram seccionados, aleatoriamente, seis discos (amostras) de 30 cm de comprimento, totalizando 30 discos. Os discos foram identificados com placas de alumínio e posteriormente expostos, no solo da floresta, eqüidistante a 50 cm, à biodeterioração por um período de 12 meses conforme pode ser visualizado (Figura 1).



Figura 1. Local da disposição dos discos no solo da floresta.

Isolamento e identificação dos fungos

Durante o período de exposição dos discos na floresta, a cada dois meses, seis discos foram removidos aleatoriamente, os quais foram transportados para o Laboratório de Patologia COTI/INPA. De cada disco foram retirados fragmentos de aproximadamente 10 a 20 mm², estes foram submetidos à assepsia, sendo imersos durante um minuto em hipoclorito de sódio a 5 % , álcool 70 % e lavados com água destilada estéril duas vezes. Em seguida foram colocados em papel de filtro estéril para retirar o excesso de água (Dhingra e Sinclair 1995). Posteriormente, seis fragmentos foram transferidos de forma eqüidistante em duas placas de Petri, sendo três em cada placa contendo meio de cultura extrato de malte-agar com antibiótico cloranfenicol. Em seguida, as placas foram colocadas

em incubadora a 27 °C, no escuro até a obtenção da colônia de *L. theobromae*. Às culturas puras foram armazenadas na Coleção de Culturas de Microorganismos de Interesse Agroflorestal do INPA.

Para confirmação da identificação taxonômica, foi feita observações macroscópicas da colônia como o crescimento, aspecto micelial, coloração e forma. Para tanto foram retirados discos de micélio de 5 mm de diâmetro e transferidos para o centro das placas de Petri, contendo meio de cultura. Para cada isolado foi preparadas três placas de Petri (repetições). Em seguida, as placas foram mantidas em incubadoras a 27 °C sob foto período de 12 h ou até a formação de picnídios e picnidiosporos, as placas foram observadas, diariamente sob microscópio estereoscópico (Lupa). A partir da formação das estruturas reprodutivas foram preparadas lâminas semipermanentes coradas com lactofenol ou azul de algodão e observadas sob microscópio de luz (óptico).

Os picnídios formado, foram colocados sobre a lâmina contendo corante. A estrutura foi partida com um bisturi e uma lamínula foi colocada sobre a mesma. Em seguida, os picnídios foram esmagados, cuidadosamente, fazendo uma pressão leve sobre a lamínula. com o cabo do estilete. Desta forma, tanto os picnídios e picnidiosporos foram possíveis de serem visualizados e medidos. As descrições das colônias e das estruturas reprodutivas e vegetativas do fungo foram comparadas com as descritas em literaturas especializadas: Barnett e Hunter (1998); Sutton (1980) e Dugan (2006).

Resultados e Discussão

Foram obtidos 20 isolados de *L. theobromae* de 30 discos de *S micranthum*, referente ao somatório de seis coletas por cada árvore. Este fungo foi isolado desde a primeira coleta com exceção a segunda. A prevalência foi registrada na primeira, quarta e sexta coleta com cinco isolados em cada uma destas (Figura 2).

O fato de ter encontrado maior número de isolados na primeira, quarta e sexta coleta, pode estar relacionado ao próprio ambiente onde os discos ficaram expostos na floresta, sob sol, chuva e a sombra da floresta, que ofereceram condições climáticas propícias ao desenvolvimento dos mesmos. Segundo Sales-Campos *et al.*, (2000), a temperatura e a

umidade elevada da região Amazônica, favorecem a incidência de fungos. Este fungo além de ocorrer em madeira pode ser encontrado no solo e plantas (Mohali e Encinas, 2001; Santos *et al.*, 2001; Mesquita *et al.*, 2006; Segura,1970).

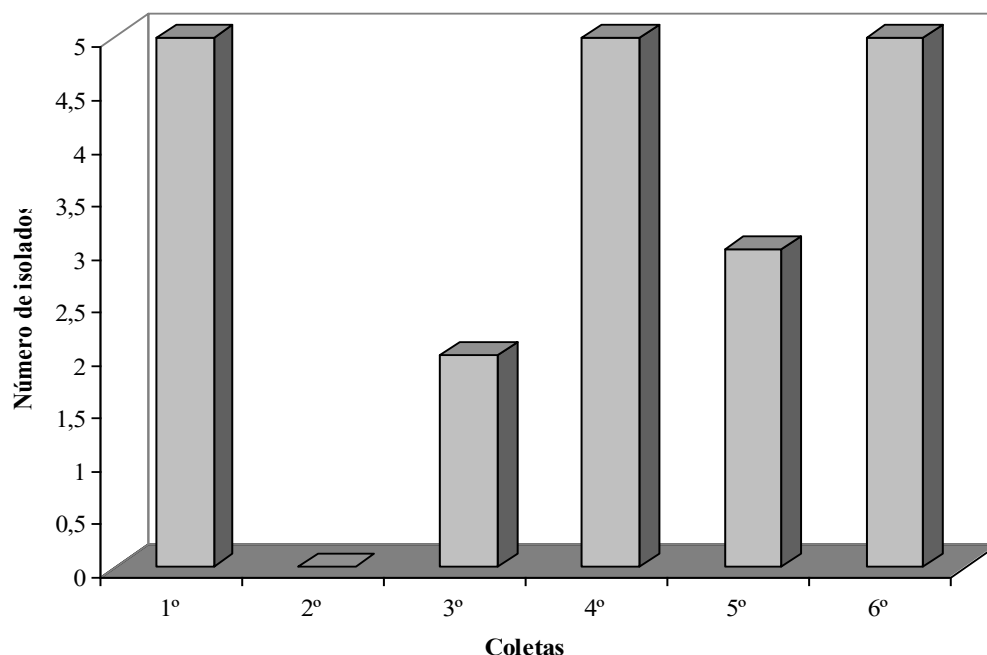


Figura 2. Número de isolados de *L. theobromae* obtidos em toras de *S. micranthum* expostas em ambiente florestal em doze meses.

Identificação da espécie L. theobromae

As colônias de *L. theobromae* apresentaram crescimento rápido, com 10 dias o micélio havia tomado toda a superfície do meio de cultura das placas, formado por micélio aéreo aveludado a cottonoso de coloração inicialmente branca e conforme o envelhecimento cinza a preto. O reverso da colônia apresentou coloração preto escura. Não foram observados quaisquer tipos de pigmentação, setores ou zonação. Houve produção de picnídios após 25 dias de incubação a 27 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Também, há gotículas de exsudatos transparentes sobre os picnídios. Os picnídios são escuros, globosos e ostiolados. Células conidiogênicas holoblásticas, cilíndricas, hialinas e lisas. Os picnidiósporos ou conídios na fase imatura foram inicialmente hialinos, globosos, crespados (granuloso), enquanto que, na fase madura apresentaram coloração marrom claro a escuro, elipsoidais a ovóides, 21-29 µm x 7-17 µm e tornaram-se bicelular, com septo

transversal. Estas características são semelhantes a descritas por Sutton (1980) e Barnett e Hunter (1998).

Conforme análise dos dados da frequência da ocorrência de *L. theobromae* nos discos foi observado logo na primeira coleta, pois o fungo ataca a árvore assim que é derrubada, podendo prolongar o ataque durante a secagem do tronco, e inclusive, penetrar nos tecidos da madeira corroborando com as observações feitas por Scheffer (1973); Oliveira *et al.*, (1986); Mesquita *et al.*, (2006). Ainda de acordo com estes autores, este fungo utiliza como fonte de nutrientes, o amido e açúcares presentes no lúmen das células de reservas das madeiras, mas pode eventualmente se nutrir de outros constituintes ao adentrar a parede celular na fase avançada de ataque. Por se utilizar materiais de reservas da madeira, em geral, este fungo restringe seu ataque ao alburno, ficando o cerne praticamente intacto. Todos os isolados de *L. theobromae* foram obtidos a partir de amostras que apresentavam coloração azul (blue stain). Segundo Scheffer (1973); Cavalcante (1982); Oliveira *et al.*, (1986), fungos que causam manchas na região do alburno da madeira, geralmente apresentam hifas pigmentadas, características de *L. theobromae*, ou secretam substâncias coloridas produzidas por eles. Os autores afirmam, ainda, que estes fungos podem causar manchas profundas na região do alburno, restringir o seu uso e conseqüentemente comprometendo com o valor comercial da madeira.

Neste contexto, as manchas de *L. theobromae* em madeiras tem sido objeto de estudos por partes de vários pesquisadores em diversas regiões. Na África, *L. theobromae* tem sido relatado como o principal causador de mancha azul de madeiras úmidas (Fougerousse 1958); no Peru, o fungo foi isolado em mais de 27 espécies florestais cujas amostras apresentavam mancha azul (Segura 1970) e na Venezuela o fungo tem causado sérios danos nas espécies *Pinus caribea* var. *hondurensis*, *Ceiba pentandra*, *Acacia mangium*, *Eucalyptus urophylla* (Mohali e Encinas 2001, Mohali *et. al.*, 2007). Na Amazônia Brasileira, *L. theobromae* ocorre em várias espécies florestais da região amazônica. No estado do Amazonas, estudos de Mendonça e Jesus (1999) relatam que dos 269 fungos da Coleção de Cultura de Micro organismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA. *L. theobromae*, foi isolado de sete espécies florestais, oriundas de quatro indústrias madeireiras *Ceiba pentandra* (L.) Gaerth, *Carapa guianensis* Aubl., *Erisma calcaratum*

(Link) Warm., *Hevea brasiliensis* Müll. Arg., *Hura creptans* L., *Schefflera morototoni* (Aubl.) Lecne & Planch, *Virola sirinamensis* (Rol.) Warb. e em Manaus o *L. theobromae* ocorreu em 12 doze espécies florestais oriundas de quatro indústrias madeireiras (Hanada *et al.*, 2003). Estes foram os primeiros estudos que abordaram a colonização *L. theobromae* associado à espécie florestal ao longo do ano em condições naturais de floresta.

Além de *L. theobromae* ser um fungo sapróbio é considerado o principal responsável por manchas e bolores em madeira das regiões tropicais e subtropicais e pode colonizar em serrapilheira, sobre plantas, associado a insetos dentre outros segundo Grandi (1998), e Mohali *et al.*, (2005), cita que é um patógeno comum, difundido de árvores lenhosas tropicais, causando ferrugem em broto e doenças em árvores e arbustos e mancha azul em madeira. Também, o fungo ocorre em culturas da gravioleira, ateira, sapotizeiro e cajueiro e outras. Pereira *et al.*, (2006); Viana *et al.*, (2003) relatam que *L. theobromae* é considerado um patógeno fraco, mas nos últimos anos, é responsável por doenças em inúmeras fruteiras tropicais, onde se incluem as famílias Anacardiaceae e Anonaceae, causando perdas significativas de produção, notadamente no nordeste brasileiro.

A ocorrência desse fungo em diversos ambientes e hospedeiros comprova a eficiente capacidade de adaptação e o grau de evolução conforme a sua exigência fisiológica. Por outro lado, o fungo apresenta características morfológicas e genéticas semelhantes entre os isolados obtidos de diferentes substratos. Medeiros-Galvão (2008), estudando diversos isolados de *L. theobromae*, de diferentes hospedeiros e substratos, inclusive obtidos de madeira, por meios de caracterização moleculares, não observou diferenças entre eles. Também neste trabalho não foram observadas diferenças morfológicas significativas entre os isolados, confirmando, desta forma, que o fungo em estudo se trata da mesma espécie, apesar das diferentes procedências de isolamentos, hospedeiros e substratos.

Conclusão

O fungo *L. theobromae* foi isolado do alburno de *S. micranthum* exposto em ambiente florestal, sendo que na primeira, quarta e sexta coleta, obteve-se maior número de isolados da madeira.

Referências

Barnett HL, Hunter BB (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. 4thed. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 218p.

Bastos TX, Rocha EJP, Rolim PAM, Diniz TDAS, Santo ECR, Nobre RAA; Cutrim RMS, Mendon'car LD. (1986). Climate of Brazilian Amazon region for a agricultural purpose a state-of-the-art.1 In.: Proceeding of the 1º Symposium of the Humid Tropics held in Belém, Pará. Vol. 1. Climate and Soil. EMBRAPA-CPATU. Documento 36: 19-36.

Cavalcante MS (1982). Deterioração Biológica e Preservação de Madeiras. IPT. Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo. Divisão de Madeiras, Pesquisas e Desenvolvimento. São Paulo. 41.

Dhingra OD Sinclair JB (1995). Basic plant pathology methods. 2. ed. Boca Raton.: CRC Press, 434.

Dix NJ, Webster J (1995). Fungal Ecology. Chapman & Hall. London. 549.

Dugan FM. (2006) The identification of fungi. An illustrated Introduction with keys, Glossary, and Guide to Literature. The American Phytopathological Society. Minnesota. U.S.A. 175.

Fourgerousse M (1958). Les alteration fungiques dès bois frais em Afrique Tropicale et plus particulièrement de l'llomba et du limba. Bois et Forest te Tropiques, 60: 41-56.

Freitas JÁ, Vasconcelos JF, Silva NB, Loureiro AA (1992). Madeiras da Amazônia que apresentam raios largos. Acta Amazônica 22 (1): 61-91.

Grandi RAP (1998). Taxonomia de Deuteromicetos. In: Bononi, V.L.R., Coord. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos “Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnologica”. Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 184.

Hanada RE, Sales-Campos C, Abreu RLS, Pfenning L (2003). Fungos emboloradores e manchadores de madeira em toras estocadas em indústrias madeireiras do município de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 33 (3): 483-488.

INPA/CPPF (1991). *Catálogo de Madeiras da Amazônia: Características Tecnológicas. Área da Hidrelétrica de Balbina*. Manaus, Amazonas. 163.

Loureiro AA, Silva MF, Alencar JC. (1979). *Essências madeireiras da Amazônia v. 2*. CNPq/INPA/ SUFRAMA. Manaus. 230p.

Loureiro AA, Silva MF (1968). *Catálogo das Madeiras da Amazônia*. SUDAM. Belém, 1: 125-131.

Medeiros-Galvão RS (2008). *Diversidade de linhagens de Botryosphaeria rhodina produtoras de jasmonatos*, Manaus, Brasil 198p. (Tese de Doutorado Universidade Federal do Amazonas – UFAM).

Mendonça ACA, Jesus MA (1999). *Ocorrência de fungos manchadores e de bolor em madeiras Amazônicas*. V Congresso e Exposição Internacional sobre Florestas-Forest'99. Centro de Convenções de Curitiba. Curitiba- Paraná- Brasil.

Mesquita JB, Lima JT, Trugilho PF (2006). *Micobiota associada à madeira serrada de Eucalyptus grandis Hill ex Maiden durante a secagem ao ar livre*. *Ciência Florestal*, Santa Maria 16 (1): 45-50.

Mohali S, Encinas O. (2001) .Association of Diplodiamuticola with blue stain of Caribbean Pine in Venezuela.*For.Path* 31: 187-189.

Mohali S, Encinas O (2001). Association of Diplodia muticola with blue stain of Caribbean Pine in Venezuela.*For.Path* 31: 187-189.

Mohali S, Burgess TI, Wingfield MJ (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35: 385–96.

Mohali SR, Slippers B, Wingfield MJ, Michael J (2007). Identification of Botryosphaeriaceae from Eucalyptus, Acacia and Pinus in Venezuela. *Fungal Diversity* 25: 103-125.

Oliveira AMF, Leis AT, Oliveira ES, Lopes GAC, Oliveira LCS, Canedo MD, Milano S (1986). Agentes destruidores da Madeira. In: Oliveira, E.S. (Ed). Manual de Preservação de Madeiras. IPT, São Paulo, 1. 99-278.

Oliveira ML, Luz, EDMN (2005). Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. Ilhéus. CEPLC/CEPEC/SEFIT. 132.

Paes JB, Melo RR, Lima CR (2007). Resistência natural de sete madeiras a fungos e cupins xilófagos em condições de Laboratório. *Cerne*, Lavras. 13(2): 160-169.

Pereira AL, Silva, GS, Ribeiro VQ (2006). Caracterização Fisiológica, Cultural e Patogênica de Diferentes Isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. São Luiz–Maranhão. *Fitopatologia Brasileira* 31(6): 572-578.

Punithalingam, E (1976). *Botryodiplodia theobromae*. C.M.I. – Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N. 519.

RADAM (1978). Programa de Integração Nacional. Levantamento de Recursos Naturais. V-18 (Manaus)–RADAM (projeto) DNPM, Ministério de Minas e Energia. 620.

Sales-Campos C, Abreu RLS, Vvianez BF (2000). Indústrias Madeireiras de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica* 30(2): 319-331.

Santos FEM, Sobrosa RC, Costa IFD, Corder MPM (2001). Detecção de Fungos Patogênicos em Sementes de Acácia-Negra (*Acácia mearnsii* De Wild). *Ciência Florestal*, Santa Maria 11(1): 13-20.

Scheffer TC (1973). Microbiological degradation and the causal organism. In: Nicholas, D.D. (Ed.) Wood deterioration and its prevention by preservative treatments. Syracuse University Press, Syracuse 11. 31-106.

Segura CB (1970). Mancha azul de algumas madeiras tropicales Peruanas. *Revista Florestal del Peru* 4(1-2): 25-30.

Silva SC, Silva MFGF; Filho ER, Souza A, Muller MW (2004). Identificação de fungos isolados de *Khayaivoresnis*(Meliaceae). XXVI Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecológica Micromoleculares. Instituto de Química. Universidade Federal Fluminense.

Sutton, BC (1980). The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 696p.

Viana FMP, Freire FCO, Cardoso JE, Vidal JC (2003). Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle. Fortaleza-CE. Embrapa Agroindústria Tropical. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico, 86) 11p.

Fungos presentes em um ambiente lântico do Município de Iranduba – Região Amazônica

Cortez A.C.A¹, Souza J.V.B², Rocha L.C², Silva T.K.S², Sanches M.A.³, Freire A.K.L⁴,
Zelski S.E.⁵

¹ Programa de pós-graduação da Bionorte –UFAM, ² Instituto Nacional de Pesquisas da
Amazônia, ³Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas- UFAM, ⁴ Programa de
Pós-graduação em Medicina tropical- FMT, ⁵ University of Illinois
E mail: accortez@inpa.gov.br

Resumo

Os fungos são importantes decompositores de madeira e detritos herbáceos presentes em ambientes aquáticos. Mesmo sabendo desta importância ecológica, não existem investigações descrevendo a diversidade de fungos presentes nos ambientes aquáticos da Amazônia. O objetivo da presente pesquisa foi investigar a biodiversidade de fungos decompositores de madeira submersa em um lago do município de Iranduba-Região Amazônica. Foram realizadas 4 coletas de fragmentos de madeira submersa presentes em um lago do município de Iranduba-AM-Brasil. Duas dessas foram realizadas na estação chuvosa e duas na estação não-chuvosa. Os fragmentos de madeira foram incubados e durante 6 meses, os fungos que se desenvolveram foram identificados/isolados. Observou-se 259 indivíduos pertenceram a 25 taxa do Filo Ascomycota, sendo 15 Ascomycetes e 10 Fungos anamorfos. Nos meses chuvosos foram observados 23 espécies e nos meses não chuvosos foram 14 espécies. Maior diversidade e menor equitabilidade foi observada no período chuvoso. Os fungos mais frequentes pertencem a classe dos Sordariomycetes.

Palavras-chave: biodiversidade, fungos de água doce, região Amazônica.

Introdução

Os fungos são importantes decompositores de madeira e detritos herbáceos presentes em ambientes aquáticos. Os ecossistemas aquáticos são classificados em marinhos, onde temos os oceanos, os estuários, os recifes de corais e os manguezais; e ecossistemas continentais que são divididos em três classes: a) lóticos constituído pelos rios, riachos, córregos e aquíferos subterrâneos; b) lânticos constituído pelos lagos e as lagoas e c) os híbridos (Jones and Pang, 2012; Nunes *et al.*, 2013). Quanto aos ecossistemas continentais, a Amazônia é uma das mais importantes coleções de

ambientes aquáticos. Localiza-se no Norte do Brasil, América do Sul, na qual encontra-se a maior floresta tropical e bacia de água doce do mundo (Avila-Cabadilla *et al.*, 2009).

Os fungos presentes nos ambiente aquáticos podem ser classificados como residentes que reproduzem-se e são apenas encontrados nos ambientes aquáticos; e transeuntes que são aqueles carreados para esse ambiente. Os fungos presentes nos ambientes aquáticos pertencem aos filos Chytridiomycota, Ascomycota e Basidiomycota (Shearer *et al.*, 2007). Os Ascomycetes presentes nos ambiente aquáticos são sapróbios, colonizam e decompõem os substratos submersos, sendo importantes na cadeia alimentar como fonte de alimento para os invertebrados (Simonis *et al.*, 2008). As classes mais encontradas nos ambientes de água doce são Leotiomycetes, Dothideomycetes e Sordariomycetes (Shearer *et al.*, 2007). Mesmo sabendo-se desta importância ecológica, não existem investigações descrevendo a diversidade de fungos presentes nos ambientes aquáticos da Amazônia. O objetivo da presente pesquisa é investigar a biodiversidade de fungos decompositores de madeira submersa em um lago do município de Iranduba-Região Amazônica.

Material e Métodos

Foram realizadas 4 coletas de fragmentos de madeira submersa (n=30/coleta) presentes em um lago conhecido como “Parque das Águas San Raphael”, localizado no Km 25 da estrada Manuel Urbano (AM 070), coordenadas de 3°16'35"S e 60°26'87"W pertencente ao município de Iranduba-AM-Brasil. Esse lago foi formado na década de 70 pelo represamento do “Igarapé da Cachoeira Grande”. Possui aproximadamente 65.000 m², forma oval e profundidade de 0,8 a 2 m. A estação chuvosa ocorre nos meses de dezembro a maio e a não chuvosa de junho a novembro (Ferreira *et al.*, 2005). Duas coletas foram realizadas na estação chuvosa (março/2013 e fevereiro/2014) e duas na estação não-chuvosa (agosto e novembro/2013). Devido à ausência de estudos prévios de caracterização da água, o presente trabalho realizou a investigação de algumas variáveis físico-químicas da água, incluindo: temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), condutividade elétrica, transparência, concentração de oxigênio e potencial de saturação.

Os fragmentos de madeira foram incubados em câmaras úmidas e as amostras foram dimensionadas quanto ao seu comprimento e diâmetro e incubadas à temperatura

ambiente e a cada 7 dias durante 6 meses. Os fungos que se desenvolveram foram transferidas para lâminas de microscopia contendo água destilada e identificados, os Ascomycetes é realizada com base na morfologia do ascomata, hematecium, ascos e ascósporos; os fungos mitospóricos estão sendo identificados investigando os tipos de conidiogêneses e conídios. Para o isolamento, tranferiu-se as estruturas fúngicas para a superfície de Ágar Água Antibiótico e as colônias desenvolvidas foram transferidas para o meio de cultura Ágar PYG (Raja *et al.*, 2009; Zelski *et al.*, 2011)

Resultados

Na caracterização da água os resultados encontrados para a temperatura foi a mínima de 27,9 °C e a máxima de 30,0 °C, com valor médio de 28,5 °C. As concentrações de pH variaram de 4,2 a 4,8 com valor médio de 4,4. A condutividade elétrica mínima foi de 7,5 µS/cm e a máxima de 8,5µS/cm, com valor médio 8,0µS/cm. As concentrações de oxigênio variaram de 5,19 mg/L a 5,71 mg/L, com valor médio de oxigênio dissolvido de 5,41mg/L. O potencial de saturação foi de 54,8 a 67,8, com valor médio 63. A transparência permaneceu inalterada em todas as coletas. O comprimento das amostras variou entre 6-22 cm (média de 12,66 cm) e o diâmetro entre 4 e 15 cm (média de 8,67 cm). Até o presente momento nas 120 amostras de madeira que foram coletadas, duas na estação chuvosa (março/2013 e fevereiro/2014) e duas na estação não-chuvosa (agosto e novembro/2013), nas quais observou-se 259 indivíduos que pertencem a 25 taxa do Filo Ascomycota, sendo 15 Ascomycetes e 10 fungos anamorfos. Nos meses chuvosos, foram observados 125 fungos contidos em 23 espécies, sendo 13 Ascomycetes e 10 fungos anamorfos. Os índices de diversidade (H') e equitabilidade (E) foram 2,6514 e 0,616255, respectivamente. Nos meses não chuvosos, ocorrem 134 espécimes distribuídas em 14 espécies, sendo 12 Ascomycetes e 2 fungos anamorfos. Os índices de diversidade (H') e equitabilidade (E) foram 2,2084 e 0,650082, respectivamente. Quanto avaliadas ambas estações, o índice de similaridade de Sorenson foi de 0,6486. Os fungos mais frequentes pertencem a classe dos Sordariomycetes seguido pelos fungos anarmorfos.

Discussão

A falta de conhecimento sobre os fungos encontrados nas águas da região Amazônica foi o que motivou este estudo, logo, este é apenas o começo desta investigação, pois, coleções futuras são necessárias para podermos descrever os fungos presentes neste ambiente, assim como a sua importância para o ecossistema da região, onde, os mesmos são considerados a base da cadeia alimentar, principalmente nas águas pretas que compõem a rede hidrográfica da bacia Amazônica. Os resultados das águas analisadas apresentaram características físico-químicas similares a de outros ambientes lênticos de águas pretas da região Amazônica e não apresentaram diferenças quanto a sazonalidade (Pinto *et al.*, 2009).

Os dados encontrados diferem dos ambientes lacustres da China, onde a temperatura mínima foi de 11°C e a máxima foi de 18 °C, assim como o pH, onde o mínimo foi de 6,9 e o máximo de 8,6 (Luo *et al.*, 2004). Os resultados de diversidade encontrados são similares com os descritos por Luo *et al.* (2004) em ambientes lacustre na China, onde os fungos mais frequentes foram os Ascomycetes (56) e os Fungos anamorfos (46), não ocorrendo diferença significativa entre as coletas. No entanto, Hu *et al.* (2010), também descreveram que em ambiente lacustre na Tailândia, o fungo mais frequente é Ascomycetes entre os 7 taxa encontrados,. Mesmo que os taxa dos fungos anamorfos (16 taxa) seja os mais predominantes, os índices foram similares ao presente estudo, diferindo apenas quanto ao índice de similaridade que é menor (0,12), comparado ao obtido neste estudo (0,64), ambos estudos demonstram que a diversidade de cada ambiente é alto, mesmo para o ambiente lêntico que é considerado pobre quando comparado com o ambiente lótico, sendo os resultados similares ao de diversidade de fungos presentes em ambientes aquáticos na região Amazônica.

Conclusões

Nas 120 amostras de madeira coletadas foram isolados 259 indivíduos pertencentes a 25 taxa do Filo Ascomycota, sendo 15 Ascomycetes e 10 fungos anamorfos.

A maior diversidade e menor equitabilidade foi observada no período chuvoso. Quanto avaliadas ambas estações, o índice de similaridade de Sorenson é 0,6486.

Os fungos mais frequentes pertencem a classe dos Sordariomycetes, seguido pelos fungos anamorfos. As águas analisadas apresentaram características físico-químicas similares a de outros ambientes lênticos da região Amazônica.

Referências

- Avila-Cabadilla LD, Stoner KE, Henry M, Añorve MYA (2009) Composition, structure and diversity of phyllostomid bat assemblages in different successional stages of a tropical dry forest. *Forest Ecology and Management* 258:986–996. doi: 10.1016/j.foreco.2008.12.011
- Ferreira SJF, Luizão FJ, Dallarosa RLG Precipitação interna e interceptação da chuva em floresta de terra firme submetida à extração seletiva de madeira na Amazônia Central . 1. 35:55–62.
- Hu D, Cai L, Chen H, et al (2010) Fungal diversity on submerged wood in a tropical stream and an artificial lake. *Biodiversity and Conservation* 19:3799–3808. doi: 10.1007/s10531-010-9927-5
- Jones EBG, Pang K-L (2012) Tropical aquatic fungi. *Biodiversity and Conservation* 21:2403–2423. doi: 10.1007/s10531-011-0198-6
- Luo J, Yin J, Cai L, et al (2004) Freshwater fungi in Lake Dianchi , a heavily polluted lake in Yunnan, China. *Fungal Diversity* 16:93–112.
- Nunes MV, Ferreira MJ, Reginato R (2013) Estudo das diferenças das variáveis abióticas de um riacho de pequena ordem e de uma represa. *Fórum Ambiental* 9:351–359.
- Pinto AGN, Silva MSR, Pascoaloto D, Santos HMC (2009) Efeitos da contribuição antrópica sobre as águas do rio negro, na cidade de Manaus, estado do Amazonas. *Caminhos de Geografia* 10:26–32.
- Raja HA, Schmit JP, Shearer CA (2009) Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. *Biodiversity and Conservation* 18:419–455. doi: 10.1007/s10531-008-9500-7
- Shearer CA, Descals E, Kohlmeyer B, et al (2007) Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation* 16:49–67. doi: 10.1007/s10531-006-9120-z
- Simonis JL, Raja HA, Shearer CA (2008) Extracellular enzymes and soft rot decay : Are ascomycetes important degraders in fresh water? *Fungal Diversity* 31:135–146.
- Zelski SE, Raja HA, Miller AN, Shearer CA (2011) *Longicollum biappendiculatum* gen. et sp. nov., a new freshwater ascomycete from the Neotropics. *Mycosphere* 5:539–545.

Estudos da atividade de fungicidas para o controle do crescimento de *Trichoderma* sp em meio de cultura de micropropagação de plantas

Costa, J. S.¹, Atroch, E.M.A.C.¹, Nagao, E.O.¹

¹Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Av. Gal. Rodrigo Otávio 3000 Coroado Manaus AM.
E-mail: jsc.ufam@gmail.com, eatroch@hotmail.com, eonagao@ufam.edu.br

Resumo

Com o objetivo de avaliar a eficiência de alguns fungicidas na inibição de *Trichoderma* sp. testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do ICB/UFAM. Os fungicidas utilizados foram: Amistar, Cuprocarb, Manzate, Priori. Os tratamentos foram compostos pela adição ao meio de MS dois fungicidas na concentração de 0,1gL⁻¹. A adição dos fungicidas foi realizada em duas condições, antes e depois da autoclavagem do meio. A eficiência dos fungicidas foi verificada através da aferição perpendicular dos diâmetros das colônias em milímetros, obtendo-se a média geral por tratamento, e pela determinação da porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando-se a fórmula: $PIC = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento} \times 100) / \text{diâmetro da testemunha}$. A maior inibição do crescimento dos inóculos de *Trichoderma* sp. ocorreu nos tratamentos com o fungicida sistêmico Amistar® autoclavado e não autoclavado onde o percentual de inibição foi de 8,69a e 6,25a. Os fungicidas Cuprocarb, Manzate, Priori apresentaram baixa eficiência no controle do patógeno, evidenciando que o isolado em estudo é tolerante a estes produtos.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano, controle de doenças, resistência a fungicidas.

Introdução

Indispensáveis na relação planta-hospedeiro, muitos microrganismos representam a possibilidade das plantas ampliarem mecanismos de defesa e utilização dos recursos do ambiente, a exemplo da importância de micorrizas e bactérias fixadoras de nitrogênio. Entretanto, na cultura *in vitro* de plantas, os microrganismos geram o primeiro gargalo no

estabelecimento de microcultivos, sendo que a contaminação poderá ocorrer em diferentes fases dos procedimentos necessários à introdução de plantas *in vitro*, desde as condições de manutenção das plantas matrizes, que serão fontes de explantes, até a manipulação para introduzi-los no meio de cultura. Assim, existem várias fontes de contaminação em todo o processo que inclui o material vegetal, os instrumentos de trabalho, o ambiente laboratorial e o trabalho dos técnicos (García, 2003). Além disso, muitos microrganismos se desenvolvem endofiticamente sem representarem risco para as plantas na natureza, mas podem vir a desenvolver-se na condição de microcultivo constituindo-se em contaminantes.

Desta forma, é fundamental associar boas práticas de manipulação ao emprego de substâncias antimicrobianas que possam garantir o sucesso da assepsia. Para tal utilizam-se agentes bactericidas e fungicidas, de amplo espectro, para o controle da contaminação. Este cenário põe em destaque a eficiência de fungicidas e/ou bactericidas empregados, e suas formas de uso nos protocolos de assepsia.

Muitos fatores influenciam o sucesso da descontaminação, como a origem do material, se cultivado em condições fitossanitárias adequadas e suas características morfológicas, como por exemplo, a presença de pelos na epiderme que dificultem os processos de limpeza e descontaminação (Hussain, 2012). Nota-se também, em boa parte dos casos, que os fungos, tais como *Penicillium* spp. *Trichoderma* spp. *Lasiodiplodia* spp. *Xylaria* spp são contaminantes importantes. Assim, os protocolos de assepsia buscam combinar técnicas e substâncias que possam funcionar tanto na planta matriz, em condição de viveiro, como nos procedimentos em laboratório para limpeza dos microrganismos epifíticos e controle dos endofíticos do explante. Quando tais métodos mostram-se ineficientes, existe a alternativa de adicionar as substâncias descontaminantes ao meio de cultura. Contudo, a adição segura desses compostos depende da estabilidade perante autoclavagem e da eficiência no controle do crescimento dos organismos em questão. Ademais tal procedimento só deverá ser aplicado quando esgotadas as possibilidades de promover a assepsia antes da inoculação do explante, uma vez que fungicidas e bactericidas podem influenciar no desenvolvimento das plantas *in vitro*, sendo escassos os estudos que tratem da segurança destas substâncias associadas à micropropagação de plantas, conforme verificado por Msogoya et al (2012) em trabalho que objetivou o controle do crescimento de bactérias e fungos no cultivo *in vitro* de banana, pela adição de antibióticos e antifúngicos no meio de cultura.

Assim buscou-se avaliar a eficiência dos fungicidas dos grupos químicos azoxistrobina (sistêmicos), ditiocarbamato e oxiclureto de cobre (ambos fungicidas de contato), adicionados antes e após autoclavagem, ao meio de cultura de MS (1962), sobre o crescimento *in vitro* de *Trichoderma* sp, com vistas a incluir substâncias fungicidas nos meios para micropropagação em ensaios futuros.

Material e Métodos

O efeito de diferentes fungicidas no controle do *Trichoderma* sp foi analisado por meio de testes *in vitro*, realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do ICB/UFAM.

Os inóculos do fungo foram obtidos a partir da contaminação de gemas *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith). Em seguida, repicados para placas de Petri com meio constituído pelos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), empregado na micropropagação de plantas, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de agar, e pH ajustado para 5,8.

Os tratamentos foram compostos pela adição ao meio de MS de dois fungicidas do grupo azoxistrobina (sistêmicos); e ditiocarbamato e oxiclureto de cobre (de contato), em concentração de 0,1g L⁻¹. A adição dos fungicidas foi realizada em duas condições, antes e depois da autoclavagem do meio. Após a homogeneização foram vertidos em placas de Petri de 15 cm. Com o meio solidificado, cada placa recebeu quatro discos de micélio de 07 mm de *Trichoderma* sp. As condições de crescimento foram as da micropropagação, em sala de crescimento com temperatura de 29±2 °C por sete dias, sendo as placas protegidas da luz. Como testemunha foram utilizadas placas de Petri contendo meio de MS sem fungicida.

A eficiência dos fungicidas foi verificada através da aferição perpendicular dos diâmetros das colônias em milímetros, obtendo-se a média geral por tratamento, e pela determinação da porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando-se a fórmula: $PIC = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento} \times 100) / \text{diâmetro da testemunha}$.

A mensuração do crescimento micelial radial foi realizada a cada 24 horas, durante seis dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e duas repetições por tratamento com quatro inóculos por placa.

Resultados

Os fungicidas apresentaram efeitos diferenciados sobre o crescimento dos inóculos, conforme detectado pela análise de variância ($p \leq 0,01$). A maior inibição do crescimento ocorreu nos tratamentos com o fungicida sistêmico Amistar®, principalmente quando não autoclavado (Tabela 1). Os tratamentos referentes a adição dos fungicidas de contato dos grupos de ditiocarbamato autoclavado e oxiclreto de cobre, nas duas condições de autoclavagem, não resultaram em nenhum controle do crescimento do fungo.

Tabela 1. Média dos efeitos dos tratamentos sobre o crescimento dos inóculos

Tratamento	Crescimento
Ditiocarbamato não autoclavado	40.0 a
Priori® autoclavado (sistêmico)	29.7 b
<i>Priori® não autoclavado</i>	27.6 bc
Amistar® autoclavado (sistêmico)	24.7 cd
Amistar® não autoclavado	22.1 d

¹Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A porcentagem da inibição do crescimento (PIC) apresentou resultados diferenciados em resposta aos tratamentos, de acordo com a análise de variância ($p \leq 0,01$). Confirmou-se a maior atividade do fungicida Amistar®, autoclavado ou não, na inibição do crescimento dos inóculos de *Trichoderma* sp. Notou-se que em alguns tratamentos, a presença do fungicida estimulou o crescimento do fungo (PIC negativo), em lugar de inibição, e que tal condição favoreceu quando o fungicida não foi autoclavado (Tabela 2).

Tabela 2. Média dos efeitos dos tratamentos sobre a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) em relação à testemunha (n=40)

Tratamento	PIC
Ditiocarbamato não autoclavado	-65,52c
Priori® autoclavado	-14,01b
Priori® não autoclavado	-24,11 ab
Amistar® autoclavado	8,69a
Amistar® não autoclavado	6,25a

¹Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Discussão

A frequência da contaminação por fungos resultou em procedimentos que inclui a aplicação de substâncias fungicidas em alguma fase da micropropagação, constituindo parte da assepsia. Os fungicidas podem ser empregados desde os cuidados com a planta matriz e/ou procedimentos de limpeza antes da inoculação (Barrueto Cid e Zimmerann, 2006), e até no próprio meio de cultura (Londe et al., 2007). De forma semelhante ao verificado neste trabalho com *Trichoderma* sp (Quadro 1), Tavares e Souza (2005) relataram alta eficiência de fungicida do grupo da Azoxistrobina, quando adicionados ao meio BDA, para o controle do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Também a adição do fungicida Benomyl ao meio de MS, resultou em maior controle da contaminação por fungos na micropropagação de *Anacardium humile* (LONDE et al., 2007). Utilizando vários tipos de fungicidas no meio de MS para o estabelecimento *in vitro* de gemas laterais de mangueira, Andrade et al. (2008) verificaram que a presença de fungicida Tebuconazole resultou em maior controle da contaminação, enquanto que o meio com Mancozebe, também do grupo ditiocarbamato, de forma semelhante ao desempenho desta substância aqui observado (Quadros 1 e 2), apresentou os maiores índices de contaminação dos explantes, embora este fungicida tenha demonstrado bom desempenho em experimentos de campo. Tal situação se explica pela condição nutritiva do meio de MS que, rico em nutrientes minerais, e adicionado de uma fonte de carbono, sem dúvida favorece o crescimento de microrganismos, os quais são mais facilmente controlados quando a planta é cultivada no campo ou viveiro.

A inclusão de substância antibiótica ao meio de cultura precisa ser otimizada para garantir a eficiência. Neste sentido, o procedimento de autoclavagem pode causar alterações na eficácia dessas substâncias, como sugere os resultados aqui verificados para os fungicidas Amistar® e Piori® quando não autoclavados (Quadros 1 e 2). Outro aspecto é que a decisão de adicionar substâncias que inibem o crescimento de microrganismos *in vitro*, juntamente com o explante, precisa também considerar a verificação de efeitos prejudiciais ao desenvolvimento das plantas durante o microcultivo e no período de aclimatização.

Conclusões

O fungicida Amistar®, autoclavado, apresenta maior eficiência para o controle de *Trichoderma* sp no meio de cultura de MS.

- A eficiência dos fungicidas foi alterada durante o processo de autoclavagem.

Referências

Andrade SEM, Oliveira WC, Reis Júnior FB, Charchar MJ, Faleiro, FG, Metha A, Texeira JB, Peixoto JR (2008) Controle do crescimento e identificação de microrganismos contaminantes visando à micropropagação de gemas laterais de mangueira. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, n. 217. Embrapa Cerrados.

Barrueto LP, Zimmermann MJA (2006) Contaminação *in vitro* de plantas. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 20 p.

García PC, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L (2003) The role of fungicides in the physiology of higher plants: implications for defense responses. *The Botanical Review*, 69:162–172.

Hussain A, Qarshi IA, Nazir H, Ullah I (2012) Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. Chapter 1: Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/40180.pdf> Acesso em: 20/8/2014.

Londe LN, Sousa CS, Vieira CU, Bonetti AM, Kerr WE (2007) Efeito do Benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). *Bioscience Journal*, Uberlândia, 23(3):94-100.

Msoyoya T, Kanyagha H, Mutigitu J, Kulebelwa M, Mamiro D (2012) Identification and management of microbial contaminants of banana *in vitro* cultures. *Journal of Applied Biosciences*, 55:3987– 3994.

Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

Tavares GM, Souza PE (2005) Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 29(1):52-59.

Crescimento de rizobactérias em meio de cultura usando o mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) como fonte de carbono para fins biotecnológicos

Costa T.P.¹, Menezes N.C.², Oliveira L.A.¹

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Agricultura no Trópico Úmido.
naramenezes19@hotmail.com, luizoli@inpa.gov.br

² Tecnóloga em Petróleo e Gás, Mestre em
Emails: tatiana.paulain@gmail.com,

Resumo

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de etanol, usando quase que exclusivamente, a cana-de-açúcar. Na sua entressafra as usinas estão procurando usar espécies que contêm amido, para que possam produzir álcool o ano inteiro. Na Amazônia, onde o babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) tem ocorrência espontânea em suas matas, essa palmeira pode ser uma alternativa econômica e socialmente viável para essa finalidade, devido ao alto teor de amido no mesocarpo de seus frutos. Micro-organismos podem ser usados para a conversão dos componentes do mesocarpo, convertendo-o em produtos de valor econômico, como o etanol. Portanto, este trabalho teve como objetivo, selecionar rizobactérias capazes de utilizar o mesocarpo do babaçu como fonte de carbono para fins biotecnológicos. Para isso foram testadas 40 rizobactérias em meio YMA, no qual se substituiu o manitol pela farinha do babaçu, verificando a capacidade desses micro-organismos em degradá-la, avaliando seu crescimento. Os resultados mostraram que 23 atingiram notas acima de 3,0 até o décimo quinto dia de crescimento, indicando que usam eficientemente, a farinha do babaçu para seus crescimentos. Dessas, 17 mostraram altas capacidades de degradar a farinha já no terceiro dia de crescimento (notas acima de 3,0), indicando serem as melhores para futuros testes visando a obtenção de produtos biotecnológicos de valores econômicos, usando a farinha do babaçu como fonte de crescimento. Elas foram identificadas como INPA R178, R234, R236, R262, R266, R268, R276, R277, R278, R279, R285, R288, R296 e R298.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano, farinha de babaçu, microbiota amazônica.

Introdução

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de etanol, com a sua produção atingindo 28,6 bilhões de litros em 2014 (Estadão, 2015). Devido a isto, há uma necessidade maior em investimentos em pesquisas a fim de encontrar outras biomassas potenciais para a produção deste bioproduto (Lima, 1975; Bermann, 2008).

Diversas são as fontes propícias para a sua produção, entre elas, encontra-se o babaçu, cuja farinha do mesocarpo apresenta cerca de 50-70% de amido (Peixoto, 1973; Zuniga *et al.*, 2013). Para que ocorra a conversão deste composto em etanol é necessário que este seja hidrolisado e desta forma convertido em açúcares, podendo ser por hidrólise ácida ou enzimática, ambas com a mesma finalidade de reduzi-lo a monossacarídeos (Collares, 2011). Para isso são necessárias enzimas de interesse econômico, como amilases, que já foram encontradas em isolados de rizobactérias, tais como as do gênero *Rhizobium* (Oliveira *et al.*, 2006, 2007).

O babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) é um tipo de palmeira que frutifica durante todo o ano e seu fruto é utilizado para diversos fins, como na fabricação de farinha e óleo comestível, produção de carvão e, etanol a partir do seu mesocarpo. É nativo da zona de transição entre o cerrado e as florestas abertas do sul da Amazônia com grandes extensões (cerca de 17 milhões de hectares) (Holanda, 2004; Clement, 2005). É uma palmeira bastante atrativa no setor energético de sustentabilidade, por apresentar várias características favoráveis em relação à produção de biocombustível. Portanto, este trabalho teve como objetivo, selecionar rizobactérias capazes de usar o mesocarpo do babaçu como fonte de carbono para fins biotecnológicos.

Material e Métodos

Foram obtidos 40 isolados de rizobactérias da coleção bacteriana do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos da Amazônia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LEBMAM/INPA). Estes isolados foram testados em meio YMA (Extrato de levedura, manitol e ágar), no qual se substituiu o manitol pela farinha do babaçu. A matéria-prima utilizada foi a farinha do mesocarpo do babaçu, proveniente do Município de Rio Preto da Eva/AM. Para a avaliação do teste de crescimento, os isolados foram estriados em placas de Petri contendo o meio anteriormente citado e avaliados por um período de 15 dias. Para cada isolado foram realizadas quatro repetições, usando as notas de 1,00 (sem crescimento visível na zona 1) a 4,00 (máximo crescimento na zona 4) (Figura 1), segundo o método de Oliveira e Magalhães (1999),

podendo ser atribuídas notas intermediárias, subdivididas em 0,25, ou seja, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00 e etc., até 4,00 (Figura 1), aumentando assim a precisão do método. As avaliações foram realizadas a cada três dias, num total de quinze dias, sendo considerados de baixo crescimento, os isolados que apresentaram valores de 1,00 a 2,00, crescimento mediano os com notas entre 2,06 a 3,00 e, crescimentos elevados, os com valores de 3,06 a 4,00.

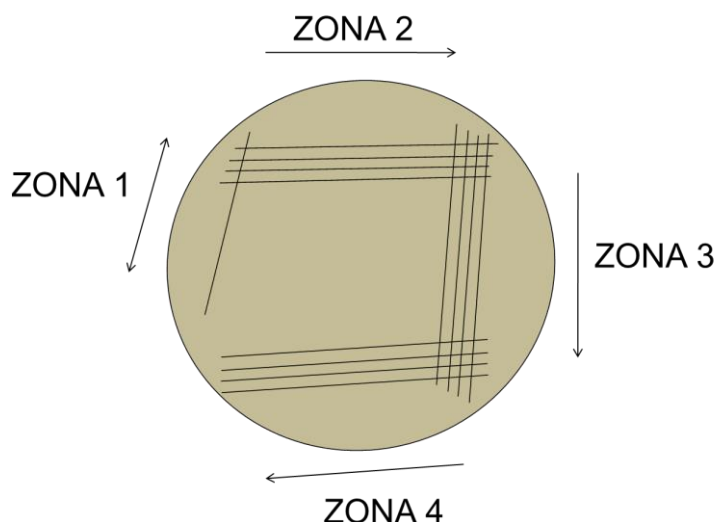


Figura 1. Ilustração do método de estriagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999).

Resultados e Discussão

Sob as condições testadas em laboratório a uma temperatura média de 27°C, a maioria dos isolados apresentou crescimento mediano ou elevado (Tabela 1). Os resultados mostraram que 23 atingiram notas acima de 3,0 até o décimo quinto dia de crescimento, indicando que usam eficientemente, a farinha do babaçu para seus crescimentos. Dessas, 17 mostraram altas capacidades de degradar a farinha já no terceiro dia de crescimento (notas acima de 3,0), indicando serem as melhores para futuros testes visando a obtenção de produtos biotecnológicos de valores econômicos, usando a farinha do babaçu como fonte de crescimento. Elas foram identificadas como INPA R178, R234, R236, R262, R266, R268, R276, R277, R278, R279, R285, R288, R296 e R298. Segundo Oliveira e Magalhães (1999), as bactérias que crescem mais rapidamente no meio de cultura, atingindo as notas máximas já nos primeiros dias de crescimento, são as mais promissoras, pois conseguem usar os componentes do meio com mais eficiência.

Tabela 1- Crescimento de rizobactérias em meio de cultura contendo farinha de babaçu.

Isolados	Média dos isolados (dias)				
	3	6	9	12	15
INPA_R001	1.00	1.25	1.25	1.25	1.25
INPA_R020	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
INPA_R028	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25
INPA_R178	3.07	3.20	3.80	4.00	4.00
INPA_R233	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
INPA_R234	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R236	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R260	1.20	1.80	4.00	4.00	4.00
INPA_R261	1.20	2.20	3.70	3.70	3.70
INPA_R262	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R263	1.20	2.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R264	1.15	1.50	1.70	1.70	1.70
INPA_R265	1.50	3.70	4.00	4.00	4.00
INPA_R266	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R267	1.15	1.50	2.00	2.00	2.00
INPA_R268	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R270	1.25	1.50	1.50	1.50	1.50
INPA_R272	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
INPA_R273	1.15	1.25	1.50	1.50	1.50
INPA_R274	1.25	1.50	2.00	2.00	2.00
INPA_R275	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15
INPA_R276	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R277	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R278	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R279	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R280	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
INPA_R282	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R284	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R285	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R287	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
INPA_R288	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R289	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
INPA_R290	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
INPA_R291	1.50	2.75	3.00	4.00	4.00
INPA_R292	3.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R294	2.25	2.75	2.75	2.75	2.75
INPA_R295	1.15	1.75	1.75	1.75	1.75
INPA_R296	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R297	2.06	4.00	4.00	4.00	4.00
INPA_R298	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00

A figura 2 mostra uma rizobactéria crescendo em uma placa de petri contendo farinha de babaçu em substituição ao manitol e usando os demais componentes do meio YMA segundo Vincent (1970). Observa-se que essa rizobactéria mostra um crescimento elevado, com a zona 4 quase totalmente preenchida com crescimento, pela qual, usando os critérios estabelecidos por Oliveira e Magalhães (1999), apresenta nota 3,75.

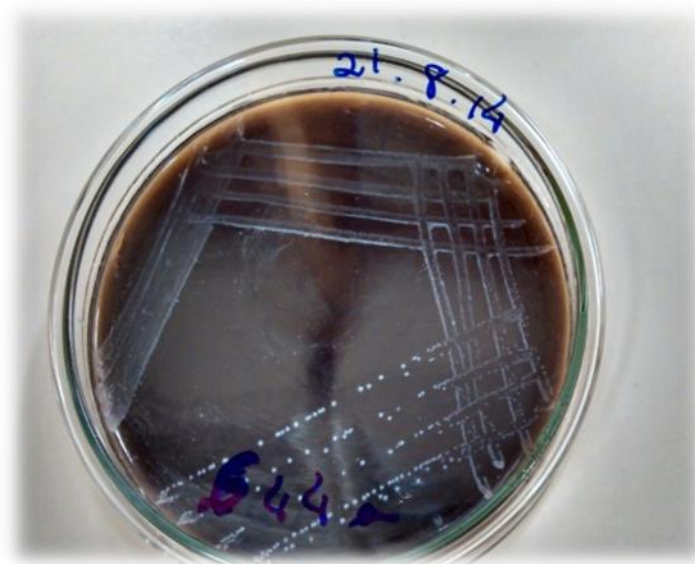


Figura 2. Rizobactéria crescendo em meio de cultura contendo farinha de babaçu e mostrando nota 3,75.

Conclusões

A maioria das 40 rizobactérias testadas em meio de cultura contendo farinha de babaçu apresentou crescimento mediano ou elevado.

As 17 rizobactérias que mostraram crescimentos elevados já no terceiro dia foram as identificadas por INPA R178, R234, R236, R262, R266, R268, R276, R277, R278, R279, R285, R288, R296 e R298.

Essas rizobactérias mostraram potencial para serem usadas em estudos futuros visando transformar a farinha do babaçu em bioprodutos de valor econômico desejável.

Referências

Bermann, C. (2008). Crise ambiental e as energias renováveis. *Cienc. Cult.* 60(3):20-29.

Clement C.R., Lheras P.E., Van Leeuwen L.J. (2005). O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: Acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociências*, 9(1-2):67-71.

Collares, M.R. (2011). *Otimização do processo de hidrólise da mandioca “In natura”, com o uso de enzimas Amilolíticas e Pectinolíticas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria- Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos, Rio Grande do Sul.

Estadão. 2015. Produção de etanol no Brasil atinge recorde de 28,6 bi de litros em 2014. <http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,producao-de-etanol-no-brasil-atinge-recorde-de-28-6-bi-de-litros-em-2014,1696115>.

Holanda A. (2004). Biodiesel e inclusão social. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – Série Cadernos de altos estudos; n.1. pg. 13-57.

Lima U.A. (1975). *Produção do Etanol. Tecnologia das Fermentações*. São Paulo, Edgard Bücher. .pg.48-68.

Oliveira L.A., Magalhães H.P. (1999). Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, 30:203-208.

Oliveira, AN; Oliveira, LA; Andrade, JS. 2006. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , Campinas, 26(4): 853-860.

Oliveira, AN, Oliveira, LA, Andrade, JS. (2007). Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 27: 61-66.

Peixoto, A.R. (1973). Plantas Oleaginosas Arbóreas. Biblioteca Rural. Ed. Nobel S.A. In: Teixeira, M.A. Biomassa de babaçu no Brasil. Departamento de Energia – FEM – São Paulo: Unicamp.

Zuniga A.D.G., Fronza P., Silveira M.R., Moura J.S., Edwin Elard Garcia Rojas E.E.G. (2013). Hidrólise ácida da farinha do mesocarpo do coco babaçu visando a obtenção de bioetanol. *Enciclopédia Biosfera*. Centro Científico Conhecer - Goiânia, 9(17):3549-3555,

Macrofungos Agaricomycetes (Basidiomycota) não poróides da região Amazônica incorporada à Coleção de Fungos Lignocelulolíticos/INPA

Couceiro, DM¹; Jesus MA¹

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

Resumo

Os macrofungos não poróides, abriga espécies de fungos raramente estudadas. O objetivo deste estudo é identificar o acervo de macrofungos não poróides depositados na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos/INPA. Os fungos são provenientes da Estação Ecológica de Maracá e Parque Nacional do Viruá, ambos localizados no Estado de Roraima e Reserva Biológica do Uatumã e, Campus do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA e da Estação Experimental de Sivilcultura Tropical- ZF2/INPA e Área Urbana de Manaus, todos localizados no Estado do Amazonas. Os espécimes dos macrofungos não poróides foram identificadas e distribuídas em 5 famílias, 7 gêneros e 9 espécies: *Aquascypha hydrophora*, *Caripia montagnei*, *Cotylidia aurantiaca*, *Cymatoderma caperatum*, *C. elegans*, *Inflatostereum glabrum*, *Stereopsis hiscens* var. *macrospora*, *Stereum hirsutum* e *S. ostrea*. *C. aurantiaca* e *I. glabrum* são de primeira ocorrência para o Estado de Roraima. O estudo possibilitou conhecimento de espécies Agaricomycetes não poróides da região Amazônica, contribuindo com a ocorrência e distribuição em áreas florestais de ambos Estados Amazonas e Roraima.

Palavras-chaves: Amazônia, Micobiota, Não poróide, Podridão branca.

Introdução

Reid em 1965 propôs uma nova família para fungos não poróides (Aphyllophorales) (Talbot, 1973). Nesta proposta, as espécies de Stereaceae descritas por Talbot (1973) foram incluídas, de modo que os representantes dos macrofungos (Podoscyphaceae) foram classificados como polifiléticos (Reid, 1965). No entanto atualmente, estes fungos estão distribuídos em Meruliaceae, Omphalotaceae, Phanerochaetaceae, Rickenellaceae e Stereaceae (GBIF, 2016; Mycobank, 2016).

Essas famílias abrigam algumas espécies de macrofungos raramente estudadas, das quais a maioria só ocorre na Amazônia. Esses macrofungos são caracterizados por

basidiomas espatulados, infundibuliformes, pseudoinfundibuliformes ou merismatóides e estipe esteroide, e as características microscópicas possui sistema hifal monomítico, dimítico ou trimítico, presença de cistídias e gleocistídios, os basidiósporos podem ser lisos, globosos, subglobosos a elípticos (Reid, 1995).

Os macrofungos não poróides desse grupo estão distribuídos com predominâncias em zonas tropicais ou subtropicais (Reid, 1965), sendo relatados para a região Amazônica com ocorrência em diversos substratos lignocelulolíticos tais como: galhos, troncos de árvores em pé ou caído (Teixeira, 1995). Portanto são fungos lignocelulolíticos, causadores de podridão branca, resultante da degradação da lignina, celulose e hemicelulose do substrato, deixando o mesmo com a coloração esbranquiçada (Gilbertson, 1980).

O estudo teve por objetivo identificar o acervo de macrofungos não poróides depositado na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos do INPA, visando obter informações importantes sobre as espécies com potencial fitopatogênico, além de contribuir com incremento do valor científico das coleções do Herbário do INPA.

Material e Métodos

As exsicatas dos macrofungos não poróides estão depositadas na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos do INPA. Os macrofungos são provenientes das seguintes áreas: Estação Ecológica de Maracá (EEM), município de Amajari e Alto Alegre, Parque Nacional do Viruá (PNV), município de Caracaraí, Estado de Roraima, Reserva Biológica do Uatumã (RBU), município de Presidente Figueiredo, Campus do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA (CI) Manaus, Estação Experimental de Silvicultura Tropical- ZF2/INPA e área urbana de Manaus, todos localizados no Estado do Amazonas. A identificação do acervo foi baseada nos caracteres macroscópicos, tais como: a forma do basidiocarpo, cor e modo de fixação do macrofungo no substrato, e na microscópica: esporos, tipos de hifa, presença ou ausência de cistídios e gleocistídios (Reid 1995). As reações de amilóide e inamilóides das hifas e dos esporos foram evidenciadas com aplicação dos reagentes de Melzer e KOH 3% e as gloecistídio com Vermelho Congo de acordo com (Ryvarden e Johansen, 1980).

Na classificação das espécies foram usados às chaves de classificação com descrições elaboradas por Lentz (1955), Reid (1965), Dennis (1970), Demoulin (1985); Ryvar den e Hjortstam (1987), Jung (1987), Gilbertoni (2004), Figueiredo (2008) e os sites que disponibilizam a descrição das espécies Mycobank, (<http://www.mycobank.org>) e Index Fungorum (www.indexfungorum.org). Todas as exsiccatas identificadas serão incorporadas ao Herbário do Instituto Nacionais de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Resultados e Discussão

Um total de 23 exsiccatas de macrofungos não poróides está incorporado na Coleção de Fungos Lignocelulolíticos do INPA, e está distribuído de acordo com a nova classificação em 5 famílias, 7 gêneros e 9 espécies (Tabela 1).

Dentre as espécies, *S. hirsutum* apresentou o maior número de espécimes (7) coletados na área de fragmento florestal do Campus do INPA em período úmido, o qual pode ser favorável para o seu desenvolvimento como saprófita ou parasítico. Seguido de *C. aurantiaca* e *I. glabrum* ambos com (3), o que provavelmente deve-se aos diferentes tratamentos silviculturais na Estação Experimental de Silvicultura Tropical - ZF2/INPA que pode ter contribuído para desenvolvimento das espécies.

Tabela 1. Relação de espécies de macrofungos não poróides coletadas em vários substratos em diferentes áreas da região Amazônica.

Táxon	Substrato	Áreas da Região Amazônica						Nº de espécimes
		EEM	PNV	RBU	ZF2	CI	MAO	
Meruliaceae								
<i>Aquascypha hydrophora</i> (Berk.) D. A. Reid	TC	-	-	1	-	-	-	1
<i>Cymatoderma caperatum</i> (Berk. & Mont.) D.A. Reid	G	-	-	-	-	-	1	1
<i>C. elegans</i> Jungh.	TC	-	-	-	1	-	-	1
	RT	-	-	-	-	1	-	1
<i>Stereopsis hiscens</i> var. <i>macrospora</i> D. A. Reid	BT	-	-	-	1	1	-	2
Omphalotaceae								
<i>Caripia montagnei</i> (Berk.) Kuntze	G	-	-	-	2	-	-	2
Phanerochaetaceae								
<i>Inflatostereum glabrum</i> (Lév.) D. A. Reid	AM	-	1	-	2	-	-	3

Rickenellaceae

Cotylidia aurantiaca (Pat.) A.L. Welden TC - 3 - - - - 3

Stereaceae

AV - - - - 1 - 1

AM - - - - 1 - 1

Stereum hirsutum (Willd.) Pers. TC - - - - 4 - 4

TS 1 - - - - 1

S. ostrea (Blume & T. Nees) Fr. BT - - - 2 - - 2

Total 1 4 1 8 8 1 23

Legenda: Local EEM = Estação Ecológica de Maracá; PVN = Parque Nacional do Viruá; RBU = Reserva Biológica do Uatumã; ZF2 = Estação Experimental de Silvicultura Tropical – ZF2; CI = Campus do INPA; MAO = Área Urbana de Manaus. **Substrato:** AM = Árvore morta; AV = Árvore viva; BT = Base de tronco; G = Galho; RT= Raiz de tronco; TC = Tronco caído; TS = Tronco suspenso.

Comparando a distribuição das espécies de macrofungos não poróides com a de outras regiões do Brasil, verifica-se que há um número maior de gênero e espécies, ambos relatados por Dennis (1970); Reid (1965); Gilbertoni (2004) e Jung (1987) para a região Amazônica.

Descrição das espécies:

Aquascypha hydrophora (Berk.) D.A. Reid – Esporóforo estipitado (1.2–2.0 cm), pseudoinfundibuliforme para infundibuliforme, hifa trimítica com septo e ansa, basidiósporo globoso para subgloboso ($3 \times 3.1\text{--}3.5 \mu\text{m}$). Distribuição: Registro na América do Norte e parte do Sul, principalmente para o rio Negro-AM (Reid, 1965).

Caripia montagnei (Berk.) Kuntze – Basidioma estipitado (0.8–10 mm), hifa monomítica com ansas, basídia clavada ($24\text{--}25 \times 6 \mu\text{m}$), gleocistídia presente e basidiósporo elipsóide ($5.4\text{--}6 \times 2.8\text{--}3.2 \mu\text{m}$). Distribuição: Registros na América do Norte e Sul em zonas tropicais (Ginns, 2011).

Cotylidia aurantiaca (Pat.) A.L. Welden – Esporóforo estipitado (0.9 mm – 1 cm) infundibuliforme para espatulado, hifa dimítica com septo e ansas, basídia clavada ($29\text{--}32 \times 5 \mu\text{m}$) e basidiósporo elíptico ($5\text{--}6 \times 3.8\text{--}4 \mu\text{m}$). Distribuição: Registros na América Tropical, Argentina: Província de Misiones, Bolívia: Província de Nor-Yugas e Brasil: Amazonas, Juruá e Rio de Janeiro (Reid, 1965).

Cymatoderma caperatum (Berk. & Mont.) D.A. Reid – Esporóforo estipe central (5 cm), flabelado, encontrado em semente, hifa dimítica com ansas, basídia clavada (48–50 × 5–6 µm) e basidiósporos elíptico para subgloboso (6.8–7.2 × 5–5.8 µm). Distribuição: Registros em todos os continentes da América (Reid, 1965).

Cymatoderma elegans Jungh. – Esporóforo estipitado para espatulado (3–4.5 cm), hifa dimítica com ansas, basídia clavada (24–25 × 5.8–6 µm) e basidiósporo elíptico (5.8–6.2 × 3.5–4 µm). Distribuição: Registros em zonas tropicais da África do Sul e Ásia (Reid, 1965).

Inflatostereum glabrum (Lév.) D.A. Reid – Esporóforo estipe central (0.5 mm – 1 cm), hifa dimítica com septo e ansas, basídia clavada (20–22 × 3 µm) e basidiósporo elipsoide (3–4 × 2.5 µm). Distribuição: Registros na América do Sul, Brasil: Trombetas, Rio Aripicuru, Pará, Rio madeira. Ásia: Borneo, Ilha de Ceylon e Malásia (Reid, 1965).

Stereopsis hiscens var. *macrospora* D.A. Reid – Esporóforo espatulado para frambelado, hifas dimítica com septo e ansas, basídias clavada (24–25 × 5 µm) e basidiósporo elíptico (6.3–8 × 6–6.2 µm). Distribuição: Registros no Brasil: Manaus (Reid, 1965).

Stereum hirsutum (Willd.) Pers. – Esporoforo piliado, hifa monomítica septo e ansas, presença de pseudocistídia e gleocistídia, basídia clavada (23–25 × 5 µm) e basidiósporo cilíndrico para elipsoide (7.2–7.5 × 2.8–3 µm). Distribuição: Registros em zonas pantropical do mundo (Jungh, 1987).

Stereum ostrea (Blume & T. Nees) Fr. – Esporóforo piliado, hifa dimítica, basídia clavada (28–30 × 5–6 µm), presença de pseudocistídia, basidiósporo cilíndrico para elipsoide (5.2–6.4 × 2.8–4 µm). Distribuição: Registros na Europa, Ásia e América (Jungh, 1987).

Conclusões

O estudo sobre fungos não poróides mostra oito espécies de Agaricomycetes não poróides na região Amazônica, distribuídos em 18 espécimes no Estado do Amazonas, sendo oito encontrados no Campus do INPA e Estação Experimental de Sivilcultura Tropical- ZF2/INPA, ambas as áreas de maior ocorrência deste grupo de macrofungos, e

um na Reserva Biológica do Uatumã, enquanto que cinco foram encontrados no Estado de Roraima, quatro no Parque Nacional do Viruá e um na Estação Ecológica de Maracá.

Todas as espécies de macrofungos não poroides são geralmente associadas a zonas tropicais, embora sejam pouco estudadas no Brasil e no mundo. Dentre as espécies, *C. aurantiaca* e *I. glabrum* são primeiro registros no Estado de Roraima.

Referências

Demoulin V (1985). *Stereum fasciatum* (Schw.) Fr. and *S. lobatum* (Kunze : Fr.) Fr. Two distinct species. *Mycotaxon* 13: 207-217.

Dennis RWG (1970) Fungus of Venezuela and Adjacent Countries. Kew Bulletin Additional Series II. Her Majesty's Stationery Office, London, 531p.

Figuêredo VR (2008). Estudos de Fungos Aphllophorales no sul da Bahia. Ilhéus-Bahia, Brasil, 122p. (Dissertação), Mestrado em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.

GBIF (2016) Global Biodiversity Information Facility: Backbone Taxonomy. Disponível em: <http://www.gbif.org/>. Acessado em 10 de janeiro de 2016.

Gilbertoni TB. (2004) Aphyllophorales (Basidiomycotina) em Áreas de Mata Atlântica do Nordeste Brasileiro. Recife-Pernambuco, Brasil, 277p. (Tese). Doutorado em Biologia de Fungos, Universidade Federal do Pernambuco - UFPE).

Gilbertson RL (1980) Wood-rooting fungi of North America. 1a ed. *Mycologia* 72: 49 p.

Ginns J (2011) *Caripia montagnei* (Basidiomycota: Tricholomataceae s. l.) in southeastern United States. *North American Fungi* 6:(5), 1-5.

Index Fungorum (2016) Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/> . Acessado em 10 de janeiro de 2016.

Jung HS (1987) Wood-rotting Aphyllophorales of the southern Appalachian spruce-fir forest. Berlin, Stuttgart. *Bibliotheca Mycologica*. 255p.

Lentz PL (1955) *Stereum* and Allied Genera of Fungi in the Upper Mississippi Valley. Washington, D. C. Agriculture Monograph 24, 79p.

Mycobank Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. 2016. Disponível em: <http://www.mycobank.org/>.

Mycobank. Fungal Databases Nomenclature and Species Banks. 2014. <http://www.mycobank.org/>.

Reid DA (1965). A monograph of the stipitate stereoid fungi. Beihefte zur. *Nova Hedwigia* 15: 388p.

Ryvarden L, Johansen I. 1980. A Preliminary Polypore Flora of East Africa. *Fungiflora*, Oslo. 636.

Ryvarden L, Hjortstam K (1987) *Stereum magellanicum* sp. nov. from tierra del fuego. *Transactions of the British Mycological Society* 89:(1), 114-116.

Talbot PHB (1973). Aphyllophorales I: General characteristics. Thelephoroid and cupuloid families. In: Ainsworth, G. C, Sparrow, F. K. & Sussman, A. The fungi. An advanced treatise. Vol. IV, Academic Press, Nova York. 327-349.

Teixeira AR (1995) Método para o estudo das hifas do carpóforo de fungos políporáceos. São Paulo, Instituto de Botânica. 20p.

Respostas enzimáticas de defesa à murcha bacteriana.

Demosthenes L.C.R.¹, Bentes J.L.S.²

¹.Universidade Federal do Amazonas, UFAM
E-mail: liacristine@ufam.edu.br, jlbentes@ufam.edu.br.

Resumo

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* é a principal doença bacteriana de Solanáceas no Amazonas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de enzimas relacionadas com respostas de defesa em acessos de *Capsicum* spp. previamente avaliados como fontes de resistência à doença. Foi avaliada a atividade de polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia liase (FAL) em 12 acessos de *Capsicum* sp. nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. A atividade enzimática variou conforme o nível de resistência dos acessos avaliados e foi maior nas primeiras horas após a inoculação decrescendo após 72 horas. A resistência dos acessos foi associada com a maior atividade da PPO e FAL, sendo o acesso LA 01 o que apresentou a maior atividade destas enzimas dentre os acessos avaliados, indicando que estas enzimas compõem o mecanismo de defesa bioquímico em plantas de *Capsicum*.

Palavras-chave: murcha bacteriana, atividade enzimática, resistência.

Introdução

A murcha bacteriana causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* é uma doença que ataca muitas espécies de plantas, dentre elas as solanáceas compreendem uma importante cultura agrícola muito suscetível, representando um problema para os produtores (Lopes e Boiteux, 2004). Na Região Norte as condições favoráveis de elevada temperatura e umidade, contribuem para a ocorrência da doença que pode se espalhar rapidamente e comprometer a produção em larga escala. A utilização de áreas contaminadas com o patógeno, práticas culturais errôneas como a rotação com espécies hospedeiras do patógeno, manejo incorreto da irrigação, ausência de uma cultivar resistente e a variabilidade do patógeno dificultam a implementação de medidas que sejam eficientes no controle da doença.

A interação entre patógeno e hospedeiro induz algumas mudanças no metabolismo das células e dependendo do patógeno, rotas de sinalização específicas das plantas são ativadas e levam à expressão de respostas de defesa como a resposta hipersensitiva (HR), produção de espécies reativas de oxigênio, acúmulo de fitoalexinas, a síntese de proteínas PR, atividades das enzimas, tais como fenilalanina amônia liase (FAL), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO), lipoxigenase (LOX) entre outras (Silva *et al.*, 2010).

O aumento da atividade de enzimas como a POX, PPO e FAL relacionadas com fontes de resistência já foi demonstrada em vários patossistemas. Araújo e Stadinik (2011) avaliando a atividade de enzimas em plântulas de macieira resistente e suscetível a mancha foliar causada por *Colletotrichum gloesporioides* observaram o aumento da atividade da POX associado à resposta da cultivar resistente. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade enzimática de PPO, FAL e POX como resposta dos componentes de defesa em acessos de *Capsicum* com diferentes níveis de resistência.

Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação em Manaus. Os acessos foram semeados em mistura de terriço e substrato comercial Bioplant® na proporção de 3:1. Para a inoculação foi utilizado o isolado IRAND10 considerado o mais agressivo em ensaio preliminar de agressividade. A inoculação foi realizada aos 30 dias de idade após o ferimento das raízes, através da introdução de um bisturi próximo ao colo da planta e vertendo-se 10 mL da suspensão de inóculo por planta. As avaliações foram feitas aos quatro, oito, 12, 16, 20 e 24 dias após a inoculação (DAI) em função da incidência e do desenvolvimento de sintomas da doença. A avaliação dos sintomas foi visual através de uma escala de notas variando de 0 a 5 (Winstead e Kelman, 1952), O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. O controle consistiu de dez plantas inoculadas com água destilada esterilizada. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SAEG versão 9.0.

Para a atividade enzimática relacionada à defesa foram coletadas três folhas por planta aos 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação, então embaladas em papel alumínio, identificadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e levadas ao laboratório para pesar e serem armazenadas à - 20 °C para os ensaios posteriores. Para a

determinação do teor de proteínas totais e atividade das enzimas PPO, FAL e POX, amostras de 0,1 g de tecido foliar foram maceradas na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino que foi homogeneizado em tampão acetato de sódio, coletado em microtubos e centrifugados a 20.000G durante 30 minutos a 4 °C em centrífuga. O sobrenadante foi recolhido em novos microtubos e estocado a - 20 °C para as determinações enzimáticas. O teor de proteínas foi quantificadas segundo Bradford (1976), a atividade de FAL foi determinada segundo Umesha (2006), a atividade da PPO e POX conforme Kar e Mishra (1976).

Resultados e Discussão

Considerando o progresso da murcha bacteriana de acordo com os valores área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) os acessos AC NT e BC 05 foram considerados resistentes apresentando menores valores, os acessos LA 01 e BC 01 moderadamente suscetíveis, os demais acessos foram considerados suscetíveis e os acessos BC 06 e LA 02, com maiores valores de AACPD foram considerados altamente suscetíveis.

A atividade de proteínas apresentou aumento inicial seguido pelo declínio alguns dias após a inoculação (d.a.i). Nos cinco dias de coleta de amostras, somente os acessos mais suscetíveis, como CD, BC 06 e LA 02 já apresentavam sintomas visíveis. Mesmo não sendo detectadas diferenças nos sintomas entre os acessos, um aumento gradual no teor de proteínas totais foi detectado a partir do 2º d.a.i..

Também foi verificada a mudança no padrão de atividade das enzimas FAL e PPO, atividade da PPO foi significativamente maior nas plantas inoculadas do que no tratamento controle, até o segundo d.a.i, quando atingiu seu máxima atividade. A atividade da enzima FAL apresentou comportamento semelhante aumentando sua atividade logo após a inoculação com o patógeno, alcançando o máximo no segundo d.a.i. e reduzindo nos dias seguintes. A atividade de FAL foi 47% maior no acesso LA 01 quando comparada com o acesso suscetível BC 12. Houve diferença quanto na dinâmica da POX durante o período de coleta para os acessos mais resistentes quando comparado ao acesso suscetível e ao tratamento controle. Enquanto no acesso com maior nível de resistência (LA 01) a atividade da POX apresenta um aumento mais rápido, no acesso susceptível (CD) esta mobilização é mais lenta. No tratamento

controle o aumento embora gradual apresenta-se num ritmo bem mais lento. As enzimas fenilalanina amônia liase (FAL), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase apresentaram maior atividade no acesso moderadamente resistente LA 01.

A diferença quanto à resposta de resistência apresentada por diferentes estirpes de *R.solanacearum* em *Capsicum* também já foi identificada por Lopes & Boiteux (2004) em estudo em Brasília, DF, onde avaliaram 23 acessos de *Capsicum* de vários países considerados como resistentes à murcha bacteriana, e por Demosthenes e Bentes (2011) também encontraram variados níveis de resistência entre acessos de *Capsicum* inoculados com um isolado da biovar 1 e conseguiram identificar três acessos resistentes (20, 30 e 17). Fatores ambientais como aumento na temperatura ambiente, tipo de solo, manejo da irrigação também são fatores que podem contribuir para manifestação da resistência diferenciada.

Em relação à atividade enzimática associada a respostas de defesa o resultado está de acordo com os obtidos por Araujo e Stadnik (2011) que também detectaram aumento no teor de proteínas totais em plântulas de macieira resistentes e suscetíveis inoculadas com *Colletotrichum gloesporioides* nas primeiras horas após a inoculação com o patógeno, indicando como a planta lança mão de suas reservas enzimáticas na tentativa de controlar a invasão do patógeno.

As enzimas FAL e PPO podem estar atuando na defesa das pimenteiros quando infectado por *R.solanacearum*, uma vez que dinâmica de aumento de atividade da FAL e PPO logo nos primeiro e segundo dia após a inoculação sugere que a planta esteja mobilizando suas respostas de defesa para conter a invasão e concorda com estudo de Ngadze *et al.* (2011) que ao estudarem o papel de diversas enzimas na resistência de tubérculos de batata contra *Pectobacterium atropsepticum* também identificaram o aumento dessas duas enzimas.

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os de Vanitha *et al.* (2009) que avaliaram o papel das enzimas PAL e PFO em tomateiro resistente e suscetível e conseguiram identificar que a maior atividade destas enzimas, nas cultivares resistentes, ocorreu as 12 e 15 horas após a inoculação com *R. Solanacearum* enquanto nas cultivares suscetíveis a atividade ocorreu mais tardiamente, indicando que estas duas enzimas tem papel importante na defesa do tomateiro à murcha bacteriana.

A resistência também pode ser mediada pelo peróxido de hidrogênio, que é frequentemente associada com a atividade de peroxidases (POX). Houve diferença quanto na dinâmica da POX durante o período de coleta para os acessos mais resistentes quando comparado ao acesso suscetível e ao tratamento controle. Enquanto no acesso com maior nível de resistência (LA 01) a atividade da POX apresenta um aumento mais rápido, no acesso susceptível (CD) esta mobilização é mais lenta. No tratamento controle o aumento embora gradual apresenta-se num ritmo bem mais lento. Esta dinâmica pode ser entendida como a capacidade em mobilizar mais rapidamente seus mecanismos de defesa bioquímicos na tentativa da planta barrar a colonização por *R.solanacearum*. Neste estudo a atividade de POX foi menor quando comparada a atividade da PAL, mas mesmo assim ela pode estar associada a outros mecanismos de resistência atuando em acessos de *Capsicum*. Andrade *et al.*, (2013) que também avaliou a atividade de POX, PFO, GLU e LOX em resposta ao ataque de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em cultivares de tomateiro pulverizadas com ácido jasmônico, etefon e Bion e constataram dinâmica semelhante, onde puderam correlacionar o aumento na atividade das enzimas POX, PFO e LOX com a maior resistência apresentada pelo tomateiro. Neste estudo a atividades dessas enzimas foi maior entre o sexto e nono dias após a inoculação.

Conclusão

O aumento da atividade das enzimas FAL e PPO durante a infecção por *R. solanacearum* nos acessos avaliados indica que estas duas enzimas atuam nos componentes de defesa bioquímicos em *Capsicum*.

Referências

Andrade CCL, Resende RS, Rodrigues FA, Silveira PR, Rios JA, Oliveira J R, Mariano RLR (2013) Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa, *Tropical Plant Pathology* 38: 28-34.

Araújo L, Stadinik M (2011) Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tropical Plant Pathology* 36: 241-248.

Bradford MMA (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Demosthenes LCR, Bentes JLS (2011) Fontes de resistência à murcha bacteriana em germoplasma de *Capsicum* spp. *Acta Amazonica* 41: 251-256.

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence, *Plant Physiology* 57: 315-319.

Lopes CA, Boiteux LS (2004) Biovar-specific and broad-spectrum sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Capsicum*, *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4: 350-355.

Ngadze E, Icishahayo D, Coutinho DD, Van der Waals JE (2011) The role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and total soluble phenols in the resistance of potatoes to soft rot, *Plant disease* 96: 186-189.

Silva FAC, Santos RC, Azevedo Neto A, Granja MMC, Souza CCF, Melo Filho PA (2010) Descritores bioquímicos em cultivares de algodoeiro em resposta a inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Tropical Plant Pathology* 35: 114-118.

Umesha, S. (2006) Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica* 34: 68-71.

Vanitha SC, Niranjana SR, Umesha S (2009) Role of Phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. *Journal of Phytopathology* 157: 552-557.

Winstead NN, Kelman A (1952) Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42: 628-634.

Isolamento e caracterização de fungos endofíticos de Myristicaceae com potencial de atividade antioxidante

Fernandes KRP¹, Bittencourt PST²; Teixeira AF¹, Souza AQL²; Nunomura RCS²

¹Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus, AM, ²Universidade Federal do Amazonas – UFAM. E-mail: kamila.rangelprimo@gmail.com

Resumo

A pesquisa dos fungos endofíticos, principalmente os presentes em espécies tropicais, é um campo promissor na descoberta de novos produtos fármacos. Não havendo estudos a respeito da microbiota endofítica de *Virola venosa* a pesquisa em questão contribuiu para a sociedade com novas informações a respeito desta espécie. Este trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial antioxidante de fungos endofíticos isolados de *Virola venosa* e dos extratos vegetais da hospedeira. Também foram realizados o isolamento e identificação de fungos endofíticos de várias partes de *V. venosa*. Nos ensaios de atividade antioxidante foram obtidos resultados representativos nos extratos brutos de caule e folha, utilizando o radical livre DPPH, sendo que o extrato bruto do caule apresentou IC₅₀ igual a 55,9 µg/mL, e no ensaio de fenólicos totais a amostra apresentou maior concentração de fenólicos (224,39 µg/mL) mostrando a relação existente entre esta classe de substâncias e a atividade antioxidante.

Palavra chave: fungos endofíticos, *Virola venosa*, atividade antioxidante

Introdução

A Família *Myristicaceae* é amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais. Caracterizada, principalmente, por ser árvores medianas, e árvores de dossel. Constituída por cerca de 8 gêneros e 400 espécies, as *Myristicaceas* nas Américas são representadas por cinco gêneros endêmicos, com aproximadamente 93 espécies. *Virola* é um dos gêneros mais amplamente disperso (Rodrigues, 1980).

Acredita-se que a maioria dos metabólitos secundários cumpre função de defesa da planta contra predadores e patógenos, atuando como agentes alelopáticos, sendo que os metabólitos são liberados para exercer efeitos sobre outras plantas e de atrair os polinizadores.

Os metabólitos secundários considerados importantes para o ser humano são os terpenóides, alcalóides, compostos nitrogenados derivados dos fenilpropanóides e os

compostos fenólicos, considerando que estas classes funcionam como reguladores de rotas biossintéticas específicas e outras como reguladores pleitrópicos (Teixeira, 2007).

As plantas produzem substâncias de interesse econômico, provenientes de seu metabolismo, mas contêm também, fungos que produzem substâncias importantes, principalmente os decompositores dos componentes primários da madeira.

Pertencentes ao reino Fungi, os fungos são seres eucariotos, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides; são altamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos (Minami, 2003).

Dentre os fungos, são considerados endofíticos aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar mal ao hospedeiro, não desenvolvem estruturas externas, excluindo as bactérias nodulantes e fungos micorrízicos” e que podem ser cultiváveis ou não (Azevedo e Araújo, 2006).

Material e Método

Diferentes partes do material vegetal (galhos, folhas e caule) de *V. venosa* foram coletadas na região urbana de Manaus no campus da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Foram obtidos extratos hexânicos, de acetato de etila e metanólicos através de extração a frio, e foram realizados o isolamento e caracterização de fungos endofíticos.

Após a desinfecção, o material vegetal foi inoculado em placas de petri, contendo meio de cultivo BDA. A partir da contagem das colônias purificadas foi obtida a diversidade de fungos, determinando-se, agrupamentos de acordo com suas características morfológicas.

A obtenção dos metabólitos ocorreu através da seleção de 20% dos morfotipos de cada grupo morfológico, do qual foram inoculados em meio líquido BDL, e em seguida foram incubados em shaker, com agitação 120 rpm por 15 dias em 28°C. Os sobrenadantes foram direcionados a extração em coluna SPE C₁₈, e com o micélio foi realizada a extração com metanol após 72h (Souza *et al.*, 2004)

A atividade antioxidante dos extratos foram avaliados com base na captura de radicais livres de DPPH. Inicialmente 200 µL de uma solução metanólica de DPPH 100 mM foram misturadas com 20 µL de extrato (ou padrão). Após mistura, permaneceram durante 30 minutos encubados na ausência de luz (Moein *et al.*, 2007). O ensaio foi realizado em um leitor de microplacas ELX 800 no comprimento de onda de 490 nm.

O ensaio de fenólicos totais foi realizado adicionando 0,750 mL de solução folin ciacateau 2N (10x diluída) em 100 µL da amostra de extrato (1mg/mL) ou padrão, após 5 minutos encubados, 0,750 mL de bicarbonato de sódio 60g/L é adicionado a mistura, depois de 90 minutos de encubação a leitura foi realizada em espectrofotômetro de UV/Vis à 725 nm. A curva analítica foi obtida utilizando o ácido gálico nas concentrações de 0.5, 0.25, 0.125, 0.625, 0.03125 mg/mL. Os resultados foram expressos em µg/mL equivalentes de ácido gálico (Velioglo *et al.*, 1998).

Resultados

Com a extração a frio, obteve-se o total de doze extratos vegetais brutos de galhos verdes e maduros, folhas e caule, em hexano, acetato de etila e metanol. Foram isolados 122 fungos endofíticos, porém apenas 105 foram agrupados e identificados morfológicamente, gerando 16 grupos distintos (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos dos prováveis gêneros de fungos

Grupos	Número de isolados	Características morfológicas	Provável gênero
G1	62	Característica de Ascomycetes	<i>Phomopsis</i>
G2	20	Característica de mitospóricos	<i>Colletotrichum</i>
G3	10	Coloração preta como de ascos	<i>Ascomycetes Preto</i>
G4	1	Coloração castanha, micélio rasteiro	
G5	1	Fungos mitospórico, coloração marrom	
G6	1	Característica de Ascomycetes	<i>Ascomiceto Estomático</i>
G7	1	Característica de Ascomycetes	
G8	1	Característica de Ascomycetes	<i>Xylaria</i>
G9	1	Coloração cinza, micélio cotonoso	
G10	1	Coloração esverdeada, Micélio cotonoso	
G11	1	Coloração branca	
G12	1	Característica de Ascomycetes de coloração branca	<i>Ascomycetes</i>
G13	1	Levedura de coloração bege	<i>Levedura</i>
G14	1	Levedura de coloração Rosa	<i>Levedura</i>
G15	1	Levedura de coloração cinza	<i>Levedura</i>
G16	1	Fungo colorido, Metabólito rosa	

Após a obtenção dos metabólitos e extração destes em fase reversa C₁₈ e do micélio em extração com metanol, e doze extratos vegetais brutos, totalizando sessenta e oito extratos, os quais foram submetidos ao teste de atividade antioxidante.

Através da AA%, pode-se perceber que para os sessenta e oito extratos testados, apenas três apresentaram uma relevante atividade antioxidante, sendo estes os extratos

vegetais brutos, de folhas em metanol, caule em metanol e em acetato de etila. Os valores do AA% destas amostras constam na Tabela 2. E os valores de IC₅₀ para os três selecionados e para o padrão, quercetina estão listados na Tabela 3.

A amostra do extrato bruto do caule em acetato de etila apresentou menor IC₅₀ seguido das folhas e caule em metanol sendo 55,9, 75,1 e 75,15(µg/mL) respectivamente. Quanto menor o IC₅₀ maior é o potencial antioxidante da amostra.

Tabela 2- Capacidade de captura de radicais livres (AA%) dos extratos vegetais brutos da *V.venosa*.

Atividade Antioxidante		
Amostra	Concentração	AA%
Caule MeOH	1mg/ml	84,2
	0,1mg/ml	72,1
	0,01mg/ml	32,0
Folhas MeOH	1mg/ml	87,1
	0,1mg/ml	50,4
	0,01mg/ml	30,5
Caule AcOEt	1mg/ml	88,22
	0,1mg/ml	53,1
	0,01mg/ml	30,3

Tabela 3- Valores de IC₅₀ dos extratos brutos de *V. Venosa*

IC50	
Amostra	(µg/mL)
Quercetina	14,77
Caule (AcOEt)	55,9
Folhas (MeOH)	75,1
Caule (MeOH)	75,15

Apesar do resultado promissor, as amostras dos extratos brutos apresentaram potencial antioxidante quatro vezes menores que o padrão utilizado, quercetina (IC₅₀ = 14,77 µg/mL). Os extratos com potencial antioxidante também apresentaram uma

grande quantidade de fenólicos, principalmente, no extrato bruto de caule obtido em acetato de etila (224,39 µg/mL). Já nos extratos que não apresentaram atividade antioxidante no ensaio de DPPH não foram encontrados valores significativos equivalentes de ácido gálico, o que confirma a relação entre baixos valores de fenólicos totais e o baixo potencial antioxidante.

Discussão

Os extratos de *V.venosa* é fonte de fungos endofíticos, essa espécie vegetal mostrou-se hospedeira de um número total considerável de endófitos, levando em consideração que muitas espécies de fungos não são cultiváveis e, portanto, o isolamento expressa a frequência de fungos endofíticos cultiváveis e não o total de fungos endofíticos presente na planta.

A ausência de microrganismos epifíticos ou contaminantes na contra prova de desinfecção superficial, corroboram com os resultados obtidos no isolamento. Sendo que o número significativo de endófitos encontrados em galhos, 50,82% pode estar relacionado tanto com o modo que o endofítico penetra na planta, por transmissão vertical ou horizontal, quanto com a existência de condições favoráveis à permanência ou crescimento do fungo em tecidos específicos.

É importante também lembrar que a etapa de desinfecção superficial deve ser específica para cada espécie vegetal e cada parte da planta, tendo em vista as diferenças entre os tecidos de cada planta. Vale ressaltar que a diversidade dos fungos identificados e seus prováveis gêneros, caracterizaram estes endófitos para com esta hospedeira.

Os resultados dos testes de atividade antioxidante mostraram que os extratos de micélio extração em metanol e dos sobrenadantes em extração com C₁₈, não apresentaram nenhuma atividade significativa comparadas com o padrão, o que possivelmente que estes fungos não metabolizam substâncias com potencial antioxidante.

Enquanto que nos extratos que apresentaram atividade antioxidante pode-se observar a relação entre atividade antioxidante e compostos fenólicos, a amostra do caule apresentou o maior IC₅₀ (µg/mL) e maior quantidade de fenólicos (µg/mL).

Conclusões

Mediante aos resultados apresentados foi possível compreender que a espécie *Virola venosa* é uma ótima hospedeira de fungos endofíticos, apresentando ampla diversidade.

Com relação ao teste atividade antioxidantes no qual os extratos dos isolados fúngicos foram testados, estes demonstraram uma baixa capacidade de sequestrar radicais livres, ou seja, nenhum dos extratos se destacou em relação à presença de compostos com atividade antioxidante.

Visto que os extratos promissores de atividade antioxidantes foram os extratos obtidos com solventes de alta e média polaridade que podem ter promovido a extração de compostos fenólicos, sendo assim podemos relacionar que a atividade antioxidante destes extratos está intimamente ligada aos compostos fenólicos contidos nestes extratos.

Referências

Azevedo JL, Araujo WL (2006). Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI BN DESMUCKH SK. Fungi. *Multifaceted Microbes*. New Dehli: Anamaya Publication, p.189-207.

Minami PS (2003) Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses. Barueri: Editora Manole, 199p.

Moein, S, Farzami B, Khaghani S, Moein MR (2007). Antioxidant properties and protective effect on cell cytotoxicity of *Salvia mirzayani*. *Pharm Biol*, 46:458–463,

Rodrigues WA 1980. Revisão Taxonômica das Espécies de *Virola* Aublet (*Myristicaceae*) do Brasil, *Acta Amazonica*, ano 10, n.1.

Souza AQL, Souza ADL (2004). O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aublet.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. *Acta Amazonica*, 34(2):185-195.

Teixeira AF (2007). Metabólitos secundários de frutos da *Virola molissima* (Poepp. ex. A. DC) Warb.: Neolignanas e Atividade Antifúngica. 2007. 156p. (Tese) Doutorado em química orgânica, USP. São Paulo.

Velioglo YS, Mazza G, Gao L (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food. Chem.*, 46:4113 - 4117.

Diversidade de Macrofungos da Família Polyporaceae (Basidiomycotina) no Estado do Amazonas

Fonseca MDP¹; Oliveira Costa CLS², Souza AQL², Gibertoni TB², Souza ADL²,
Rodrigues MO³, Pereira JO²; Azevedo JL⁴.

¹ Universidade do Federal do Amazonas-UFAM Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, ² Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, ³ Universidade do Estado do Amazonas-UEA, ⁴ Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, ESALQ,
E-mail:dolores_pinheiro@yahoo.com.br, antoniaqlsouza@gmail.com; souzadq@gmail.com.br, joseodairpereira@yahoo.com.br, tbgibertoni@hotmail.com

Resumo

Investigação sobre a biodiversidade são de suma importância para a utilização racional dos recursos naturais, principalmente em regiões mega-diversas, como a Amazônia. O estudo da diversidade de macrofungos da família Polyporaceae (Basidiomycotina) é importante para contribuir com o conhecimento sobre a diversidade destes no Estado do Amazonas e apresentar novos registros para a região, além de poderem ser usados como matéria prima para diferentes setores da sociedade, como alimentos, farmacêuticos, químico e outros. As áreas de coleta dos fungos se atem ao Estado do Amazonas. Foram realizadas coletas em área de floresta nos municípios de Autazes, Anamá, Careiro da várzea, Coari, Barcelos, Borba, Novo Aripuanã, Nova Olinda do Norte, Manaus, Manicoré, Parintins e Presidente Figueiredo. A coleta e preservação dos espécimes seguiram as recomendações técnicas de Fidalgo e Bononi (1989) e Souza (2004). Foram identificados 83 fungos da família Polyporaceae distribuídos em 11 gêneros e 15 espécies. Esta pesquisa ampliou o conhecimento sobre a distribuição de estes macrofungos, fornecendo dados suplementares sobre sua classificação geográfica na Amazônia brasileira.

Palavras-chave: Polyporaceae, diversidade, taxonomia, Amazonas.

Introdução

O conhecimento sobre a biodiversidade amazônica ainda é restrito devido às constantes alterações ambientais, falta de investimento financeiro e falta de recursos humanos qualificados para efetuarem as coletas, o que contribui para baixa produção científica desta área do conhecimento. Existe neste contexto a necessidade de aumentar o conhecimento da micobiota endógena do Amazonas, tornando-se assim, imprescindível para avaliar a diversidade fúngica desta região. Segundo Moore e Frazer

(2002), houve uma queda de identificações entre as décadas de 1980 e 2000, provavelmente porque a taxonomia clássica (morfologica) deixou de ser interessante, aliada a popularidade de outras áreas, a formação de profissionais em taxonomia clássica diminuiu. Muitas espécies da família Polyporaceae podem, nesse caso, ser extintas na região Amazônica mesmo antes de serem descritas.

A família Polyporaceae pertence a ordem Polyporales, classe Agaricomycetes e filo Basidiomycota são popularmente conhecidos como cogumelos, orelha de pau ou urupê (Kirk, 2008; Hibbett *et al.*, 2007, 2014). Os Agaricomycetes compreendem todos os fungos do filo Basidiomycota que formam basidiomas, com himênio definido (Hibbett *et al.*, 2007). Dentre os Basidiomycota, os Agaricomycetes representam fundamental importância na decomposição e reciclagem da matéria orgânica também podendo ainda ser fitopatógenos (Stalpers e Loerakker, 1982). Crescem em madeira morta, mas também em solo e folheto degradando restos animais e vegetais, inclusive da micota (Donk, 1964). Além da importância biológica, os Agaricomycetes têm recebido especial atenção nas duas últimas décadas, devido ao seu potencial de aplicabilidade no tratamento de contaminantes ambientais como biorremediadores do solo e pela produção de antibióticos (Schmit e Mueller, 2007).

Algumas espécies da família Polyporaceae são comestíveis como por exemplo *Lentinus* (Ishikawa, 2012). Existem mais de 200 gêneros de Agaricomycetes (Basidiomycotina) utilizados pelo homem por suas propriedades proteicas (Boa, 2004).

Material e Métodos

Foram realizadas 12 coletas dos macrofungos no período de janeiro a março de 2013 e janeiro a maio de 2014, em área de floresta nos municípios de Autazes, Anamá, Careiro da várzea, Coari, Barcelos, Borba, Manaus, Manicoré, Novo Aripuanã, Nova Olinda do Norte, Parintins e Presidente Figueiredo. As coletas e preservações dos espécimes seguiram as recomendações técnicas de Fidalgo e Bononi (1989) e Souza e col., (2004). Posteriormente, os materiais foram levados ao laboratório de genética da Universidade do Estado do Amazonas-UEA e secos em estufa, com temperatura aproximada de 60 °C por 72 a 120 horas.

As identificações taxonômicas morfológicas foram realizadas no departamento de micologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE e na Universidade do Estado do Amazonas-UEA. As análises microscópicas foram realizadas através de cortes dos exemplares à mão livre, em microscópio estereoscópico, com o auxílio de uma

lâmina de aço inoxidável para observação das micro-estruturas. Estes cortes contendo as superfícies abhimentais e contexto, foram colocados entre lâmina e lamínula com o reagente de Melzer para a observação da reação amilóide (azulada) ou dextrinóide (avermelhada) e, solução aquosa de hidróxido de potássio 3% para observação da reação xantocróica (negra) (Singer, 1951). As lâminas assim montadas permitiram a observação do sistema hifal (mono, di ou trimítico), da disposição das hifas no contexto, de elementos estéreis (cistídios, setas), de basídios e de basidiósporos.

Resultados

Neste trabalho foram encontrados representantes de outras famílias mas, esse estudo se atem a família Polyporaceae. Com as coletas realizadas em 12 municípios do Estado do Amazonas foi possível identificar 83 espécimes de macrofungos pertencentes a família Polyporaceae da ordem Polyporales distribuídos em 11 gêneros e 14 espécies (Tabela 1). Com o estudo da distribuição geográfica das espécies encontradas, baseada em literatura, mostrar-se que as espécies *Corioloopsis polyzona* (Pers.) Ryv. 1972; *Datronia brunneoleuca* (Berk.) Ryvarden 1988; *Grammothele subargentea* (Speg.) Rajchenb. 1983; *Earliella scabrosa* (Pers.) Gilb. e Ryv. 1985; *Hexagonia hirta* (P. Beauv.) Fr. 1838, representam novas ocorrências para o Estado do Amazonas.

Tabela 1 Gêneros e espécies representantes da família Polyporaceae coletados em 12 municípios do Estado do Amazonas e novas ocorrências.

Família /Espécie	Ocorrência na Amazônia	Novo registro na Amazônia	Literatura
<i>Corioloopsis floccosa</i> (Jung.) Ryv. 1972	AC, AM, MT, AP, RO, RR	Anamã; Manaus BR 174; Manicoré; Novo Aripuanã	Ryvarden e Johansen (1980)
<i>Corioloopsis polyzona</i> (Pers.) Ryvarden 1972	RO, RR	Autazes; Borba, Coari; Manaus, Manicóé, Nova Olinda do Norte, Novo Aripuanã;	
<i>Corioloopsis byrsina</i> (Lloyd) Ryvarden 2012	AM, RO, RR	Manaus, BR174	Nogueira-Melo et al. (2012)
<i>Datronia brunneoleuca</i> (Berk.) Ryvarden 1988		Manaus-RDS; Nova Olinda do Norte; Manicoré	
<i>Dichomitus cavernulosus</i> (Berk.) Masuka e Ryvarden 1999	AM, RO, RR, PA	Manaus-Tarumã	Masuka e Ryvarden (1999)
<i>Earliella scabrosa</i> (Pers.) Gilb. e Ryvarden 1985	MT, PA, RR, RO	Anamã; Autazes; Borba; Manaus BR 174; Coari; Manicoré; Nova Olinda do Norte; Novo Aripuanã; Parintins	Ryvarden e Johansen (1980)
<i>Favolus brasiliensis</i> (Fr.) Fr. 1830	AC, AM, PA, RO	Borba, Coari, Manaus;	Bononi (1992), Sotão et al. (1997, 2002b), Sotão et al.

<i>Fomes fasciatus</i> (Sw.) Cooke 1885	AC, AM, MT, PA, RO	Presidente Figueiredo	(2008), Capelari e Maziero (1988) Sotão et al. 2008); Jesus (1996)
<i>Grammothele subargentea</i> (Speg.) Rajchenb. 1983	RR	Borba	Drechsler-Santos, R.E. et al., (2008)
<i>Hexagonia hirta</i> (P. Beauv.) Fr. 1838		Manaus	Abrahão, M.C. et al., (2009)
<i>Lentinus crinitus</i> Lloyd 1920	AM, AP, PA,RO	Anamã; Autazes; Borba; Manaus BR 174; Coari; Manicoré; Novo Aripuanã; Parintins	Bononi, V.L.R. et al., (2008), Meijer, A.A., (2008)
<i>Trametes modesta</i> (Kunze ex Fr.) Ryvarden 1972	AC, AM, PA, RO, RR	Borba; Manaus; Novo Aripuanã.	Abrahão, M.C. et al., (2009)
<i>Trametes ochroflava</i> Cooke 1880	AC, AM, RO, RR, PA	Manaus; Presidente Figueiredo,	Ryvarden (1988) (Bononi 1992); Batista et al. (1966), Silva & Minter (1995), Sotão et al. (2008)
<i>Trametes polyzona</i> (Pers.) Justo 2011	AC, AM, AM, PA,	Coari.	
<i>Trichaptum byssogenum</i> (Jungh.) Ryvarden 1972	AC, AM, PA, RO, RR	Autazes; Manaus; Coari; Novo Aripuanã.	Gugliotta, A.M. et al., (2010)

*** Novas Ocorrências na Amazônia

Vários espécimes encontram-se em estudo e estão sendo revisados, os quais inclusive podem representar novas espécies e ocorrências para o estado e para o Brasil, que apresenta-se bastante diverso nas áreas deste estudo.

Discussão

A família *Polyporaceae* apresentou maior número de gêneros e espécies. O maior número de espécies observado em *Polyporaceae* já era esperado, já que essa família está entre as que apresentam maior diversidade específica entre os fungos poliporóides (Alexopoulos *et al.*, 1996). Esses resultados corroboram com estudos sobre fungos macroscópicos no Brasil e no Estado do Amazonas. Para a Amazônia e Amazonas Gomes-Silva e Gibertoni (2009a, 2009b) divulgaram uma lista dos fungos Agaricomycetes, com 216 espécies para a ordem Polyporales, divulgando o maior número de espécies 146, de famílias 07 e de gêneros 61. Para Rondônia Capelari e Maziero (1988) fazem referência a 28 espécies de fungos Agaricomycetes poróides. No Amapá, Sotão *et. al.*, (1991) divulgaram uma relação de 33 espécies de Basidiomicetos, sendo 20 táxons de Agaricomycetes poróides, a família Polyporaceae apresentou maior número de representantes.

De acordo com Soares *et. al.*, (2014), dados recentes, ainda para o Estado do Amapá, apresentaram registro com 637 espécimes de fungos polyporoides identificados, representantes de 97 espécies, 36 gêneros e oito famílias das ordens Hymenochaetales (Hymenochaetaceae e Schizoporaceae), Polyporales (Fomitopsidaceae, Ganodermataceae, Meripilacea, e a família com o maior número de representantes também foi Polyporaceae, com 19 gêneros e 52 espécies, acompanhada por Hymenochaetaceae e Ganodermataceae. *Amauroderma* Murril foi o gênero com o maior número de espécies, seguido por *Perenniporia* Murril e *Polyporus*, *P. Micheli* (oito). Já as espécies que apresentaram maior densidade foram *Ganoderma tornatum* (Pers.) Bres. (48), *Polyporus dictyopus* Mont. (45), *P. leprieurii* Mont. (37) e *Lenzites elegans* (Spreng.) Pat. (34).

Conclusão

Para ampliar o conhecimento sobre a riqueza e distribuição das espécies da Família *Polyporaceae* no bioma Amazônia, sugere-se a continuidade de coletas no Estado do Amazonas.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos. Ao departamento de Micologia da Universidade de Pernambuco -UFPE. Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que viabilizaram a realização desse trabalho.

Referências

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) *Introductory Mycology*. 4 th ed., John Wiley and Sons, Inc., Nova York, 868p.

Capelari M, Maziero, R (1988) Fungos macroscópicos do estado de Rondônia, região dos rios Jaru e Ji-Paraná. *Hoehnea*, 15:28-36.

Donk MA (1964) A conspectus of the families of Aphylophorales. *Persoonia* 3: 199-324.

Fidalgo O, Bononi VL (1989) Guia de coleta, preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânica: São Paulo, (Manual n° 4).

Gomes-Silva e Gibertoni (2009a) Revisão do Herbário URM. Novas ocorrências de Aphylophorales para a Amazônia brasileira. *Revista Brasileira de Botânica*. 32(3):587-596.

Gomes-Silva AL, Gibertoni TB (2009b) Checklist of the aphylophoraceous fungi (Agaricomycetes) of the Brazilian Amazonia. *Mycotaxon*, v. 108, p. 319–322.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten-Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny P B, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y C, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth D L, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn, RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao Y J, Zhang N (2007) A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5):509–547.

Hibbett DS, Bauer R, Binder M, Giachini A J, Hosaka K Justo A, Larsson E, Larsson KH, Lawrey JD, Miettinen O, Nagy LG, Nilsson RH, Weiss M, Thorn RG (2014) Systematics and Evolution, The Mycota VII Part A. D.J. McLaughlin and J.W. Spatafora (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2nd Edition

Ishikawa N K, Vargas-Isla R, Chaves RS, Cabral TS (2012) Macrofungos da Amazônia: Importância e Potencialidades. *Ciência & Ambiente*, v. 44, p. 129-139.

Moore D , Frazer L (2002) Essential Fungal Genetics. New York: Springer.

Schmit JP, Mueller GM (2007) An estimate of lower limit of global fungal diversity. *Biodivers. Conserv.* 16: 99-111.

Sotão HMP, Bononi VLR, Figueiredo T S (1991) Basidiomycetes de manguezais da Ilha de Maracá, Amapá, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, (série botânica), 7(1):109-114.

Souza AQ L, Souza ADL, Astolfi-Filho S, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourealongiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnoscogens* Benth. *Acta Amazônica*. 34(2):.

Stalpers JA, Loerakker WM (1982) Canadian Journal of Botany. Laetisaria and Limonomyces species (Corticaceae) causing pink diseases in turf grasses. v.60. 537p.

Isolamento de bactérias da Região Amazônica, como modelo para a recuperação de fosfato

Gama, A.M¹, Silva, M.S², Moraes, A.B², Carvalho, N.O², Nonato, L.S², Spira, B³, Mota, A.J², Yamane, T¹

¹ Universidade do Estado do Amazonas UEA, Manaus-AM, ² Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus-AM), ³ - Universidade de São Paulo - USP, São Paulo-SP.

E-mail: auri_matos@yahoo.com.br, ssmarcelo1@hotmail.com, tetsuo@usp.br,
adolfo.mot@gmail.com, adriane_abm@hotmail.com, nanicarvalhoss@gmail.com,
member@linkedin.com, beny@usp.br,

Resumo

O fósforo é um elemento essencial para a vida de todos os seres vivos, o que tornaria a vida inviável em sua eventual escassez. Seu principal uso está na forma de fertilizantes para a agricultura, devido à pobreza dos solos desse nutriente. Por ser um elemento finito e insubstituível, sua exploração constante, tem levado a depleção e escassez de suas reservas naturais. Os micro-organismos desempenham um papel fundamental no processo de reciclagem do fósforo, visto que, necessitam incorporar este elemento do meio ambiente, na forma de íon fosfato, além de, no processo de decomposição, reciclar o fosfato orgânico disponibilizando-o para as plantas na forma inorgânica, fechando assim o ciclo do fósforo. Em vista desse papel, a finalidade deste estudo é buscar bactérias capazes de realizar uma biorremediação e a reciclagem de fosfato do ambiente. Possibilitando uma melhor compreensão dos mecanismos e da genética subjacente à captação de fosfato. As colônias foram selecionadas morfológicamente pela fenotipagem e isoladas pela técnica de esgotamento de alça em estrias. Após sua purificação, foram preservadas em solução de caldo rico contendo 20% glicerol e estocadas a -20 °C. A hipótese a ser testada é que nesses isolados possam existir um sistema eficiente de captação e assimilação de fosfato.

Palavras chaves: Rio Negro, Rio Solimões, fósforo, bactérias.

Introdução

O fósforo é um elemento químico obtido a partir de um mineral “finito e insubstituível” e essencial para a vida. Menos de 1% do total de fósforo existente no planeta está na forma disponível para as plantas, sendo assim, o seu principal uso é na forma de

fertilizantes. Assim sendo, o cenário é de extração contínua das reservas naturais para atender a demanda da agricultura no mundo todo (LOBATO, 1982). As colheitas sucessivas retiram o fosfato do solo, além de outros nutrientes, e a consequência imediata é que com o crescimento populacional, a taxa de depleção de reservas de fósforo já está em ritmo acelerado. Portanto, o risco de esgotamento das reservas naturais é real, e já há algumas décadas uma possível crise do fósforo vem sendo discutida (ABELSON, 1999).

Visto que todos os seres vivos, inclusive os fagos e vírus, carregam material genético (DNA/RNA) com fósforo no esqueleto de suas moléculas, uma eventual escassez desse nutriente tornaria a vida inviável, pois não há nenhum substituto conhecido para este elemento (Saenger, 1984; Machado e Nome, 1999).

Na natureza, as plantas e animais perecem e os micro-organismos degradam moléculas complexas ao nível de estruturas químicas simples que são então reutilizadas para o crescimento de outras plantas e animais, constituindo um ciclo fechado e contínuo. Se esse ciclo se mantivesse de forma contínua, o risco de uma crise real seria mínimo, entretanto, parte do fósforo que vai para o solo, acaba sendo levado para rios e destes para o mar, se deposita no fundo oceânico de profundezas abissais o que inviabiliza sua extração e aumenta muito o tempo para a reciclagem natural (Wanner, 1996).

Dessa forma, entendemos que é importante estudar medidas viáveis para retornar o fósforo para o ciclo e concebendo que os micro-organismos exercem um papel fundamental na reciclagem de fósforo, é *conditio sine qua non* que se estude a diversidade microbiana de rios da região Amazônica, principalmente aqueles onde existe uma quantidade relativa inferior desse nutriente, quando comparada com outros ambientes. A hipótese a ser testada é que nesses possa existir um sistema eficiente de captação e assimilação de fosfato (Morohoshi *et al.* 2002; Almeida e Spira, 2014).

Material e Métodos

Como não existem precedentes para esse tipo de abordagem, na região amazônica, usamos como modelo de estudo os dois rios de nossa região, Rio Aracá e Rio Solimões. É sabido que esses dois macroambientes são bastante diferentes em várias propriedades físico-químicas e nutricionais, o que de certa forma irá colaborar para se testar a hipótese de

mecanismos de seleção agindo sobre um sistema mais eficiente para a recuperação do fosfato pelos micro-organismos.

Foram coletadas amostras de água de dois locais do estado do Amazonas, (1) Rio Solimões nas proximidades do Município de Manacapuru (três pontos de coleta); e (2) Rio Aracá, um importante afluente do Rio Negro (quatro pontos de coletas: na Serra do Aracá, na o encontro entre o rio Aracá e o Rio Pretinho, numa posição intermediária entre a nascente e o Rio Negro, e por fim, no encontro com o Rio Negro). As indicações das localidades são relativas porque não foi possível a utilização de GPS para o georeferenciamento.

As amostras do Rio Solimões foram coletadas em garrafas estéreis de 1 L e transportada em caixas térmicas com gelo, até o laboratório. Para cada amostra, diluições sucessivas com 0,9% solução salina (0.9 g NaCl para 100 mL de água destilada, esterilizada a 121 °C por 20 min) foram realizadas até se obter a diluição de 10^{-5} . 50 µL de cada diluição foram semeados nos meios de cultura, TSA-antibiótico (Agar Triptona de Soja + 50 µg.mL fluconazol), LB-antibiótico (Agar Lisine-broth + 50 µg.mLfluconazol) e CT-antibiótico (Cetrimide Ágar + 50 µg.mLfluconazol) e incubadas a 35 °C durante 24-48 h. Para as amostras do Rio Negro foram feitos diferenciações com pH (5.0, 6.0 e 7.0) e temperaturas (18, 28 e 35 °C) e incubadas durante 24-48 h. Após o crescimento das colônias, estas foram selecionadas morfológicamente pela fenotipagem e isoladas pela técnica de esgotamento de alça em estrias. Após sua purificação, foram preservadas em solução de caldo rico contendo 20% glicerol e estocadas a -20 °C.

Resultados

Foram selecionados morfológicamente 151 isolados do Rio Solimões e 100 isolados para o Rio Negro, conforme a tabela 1. O meio CT não foi semeado para as águas do Rio Negro, pois no teste anterior (Rio Solimões) esse não foi seletivo para *Pseudomonas* sp. que era a intenção inicial utilizando este meio de cultura.

Tabela 1- Bactérias isoladas

	Local
--	-------

Meios de cultura	Rio Solimões			Rio Negro	
	LB	TSA	CT	LB	TSA
Número de isolados	69	21	61	38	62

Com o intuito de favorecer espécies que pudessem estar sendo inibidas por competição ou substâncias antagônicas provindas de outras espécies presentes na amostra, variou-se a condição de cultivo quanto a temperatura e pH para a amostragem do Rio Negro. O número absoluto de isolados estão contido na tabela 2.

Tabela 2 - Isolados do Rio Negro por diferentes temperatura e pH

Meio LB			Meio TSA		
Temperatura ° C	pH	Número de Isolados	Temperatura ° C	pH	Número de Isolados
18	5,0	7	18	5,0	7
	6,0	112		6,0	61
	7,0	107		7,0	185
28	5,0	10	28	5,0	207
	6,0	120		6,0	215
	7,0	113		7,0	219
35	5,0	222	35	5,0	222
	6,0	248		6,0	228
	7,0	136		7,0	225

Devido à grande dificuldade em identificar micro-organismos, inicialmente foi feita a identificação pela metodologia molecular e a partir dos resultados, escolher alguns isolados de cada espécie e realizar os testes morfológicos e bioquímicos. Pelo aspecto macroscópico das colônias como tamanho médio, margens, elevação, consistência, brilho, coloração, entre outros, foi possível agrupar os isolados, destacando-se maior diversidade de cores entre os isolados do rio Aracá com colônias brancas, amarelas, vermelhas, roxas, rósea e bege. Ainda, 7 isolados apresentam características morfológicas semelhantes as de *Crhomobacterium violaceum*, uma proteobacteria que vive no solo e nos rios das regiões tropicais, inclusive no Rio Negro. Os isolados do Rio Solimões são de predominância com colônias brancas e beges.

Discussão

Os resultados apresentados são preliminares, provenientes de coleta única o que inviabiliza um tratamento estatístico. Entretanto, a diversidade podem indicar uma diversidade genética, e reforçar a expectativa de encontrar sistemas eficientes na captação do fosfato. O Rio Negro é o modelo de estudo, pois suas águas são levemente ácidas e de baixa condutividade elétrica, resultado da pobreza em elementos alcalinos, alcalinos terrosos e nutrientes, como o fósforo livre, nitrito e nitrato. A concentração de Pi não ultrapassa 30 μM (PROJETO BRASIL DAS ÁGUAS, 2003), logo, as bactérias adaptadas a este ambiente devem ter um sistema de incorporação de Pi muito eficiente, digno de ser investigado. A escolha de coletar também em seu tributário deve-se que outros trabalhos realizados no laboratório utilizaram este rio como modelo de estudo.

Entre os integrantes da microbiota do Rio Negro, destaca-se *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria de vida livre, encontrada em solos e rios de ecossistemas tropicais e subtropicais (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). Identificam-se no genoma de *C. violaceum*, os principais genes de um sistema conhecido de captação de fosfato, o regulon PHO (*phoB*, *phoR*, operon *pst* e *phoA*). O regulon é caracterizado por um grupo de genes e operons expressos em resposta a um mesmo fator ou estímulo e controlados por uma mesma proteína regulatória. Em relação ao fosfato, os genes são induzidos em condições de limitação de Pi (concentração de Pi externo < 4 μM), e são regulados pelo sistema de dois componentes PhoR/PhoB (SPIRA, 2010). Entretanto, a funcionalidade dos genes e a sua regulação em *C. violaceum* ainda não foram estudados. Considerando a finalidade de estudar sistemas eficientes de reciclagem do fósforo e a existência do regulon PHO no genoma de *C. violaceum*, os isolados com as características sugestivas para essa espécie seguirão para estudos subsequentes sobre o funcionamento desse regulon e a eficiência da captação e assimilação de fósforo.

Conclusões

Dentre os diversos isolados, sete podem apresentar possível potencial para estudos subsequentes sobre o sistema de captação de fósforo, tendo em vista que estes isolados

apresentam características morfológicas sugestivas para *C. violaceum* uma bactéria com o *regulon* PHO em seu genoma.

Futuros estudos devem ser realizados para visando a identificação dos isolados, e verificar a existência do *regulon* PHO em seus genomas, assim como avaliar a cinética de incorporação de fósforo, bem como o mecanismo de funcionamento do *regulon* PHO.

Referências

- Abelson PH (1999) A potential phosphate crisis. *Science*, Washington, DC 283:2015.
- Almeida LG, Ortiz JH, Schneider, RP.; Spira, B (2015) *phoU* Inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* enhances accumulation of ppGpp and polyphosphate. *Appl Environ Microbiol*, n. 9, v. 81, p. 3006-3015.
- Brazilian National Genome Project consortium (2003) The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, Washington, DC, 100:11660-11655.
- Lobato AJ (1982) Adubação fosfatada em solos da Região Centro-Oeste. In: OLIVEIRA, A J. *Adubação Fosfatada no Brasil*. Brasília: Ed. EMBRAPA-DID, p. 201-289.
- Machado VG, Nome F (1999) Energy-Rich Phosphate Compounds. *Quim. Nova* , 22, 351.
- Morohoshi T. et al (2002) Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. Strain PC6803. *Applied an environmental Microbiology*, Am. Soc. Microbiol, 68:4107.
- Projeto Petrobras Ambiental. Projeto Brasil das Águas, 2003-2004. Disponível em: www.brasildasaguas.com.br
- Saenger W (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer: New York.
- Spira B, Ferenci T (2008) Alkaline phosphatase as a reporter of s^S levels and *rpoS* polymorphisms in different *E. coli* strain. *Arch. Microbial*, Heidelberg, 189:43-47.
- Spira B. et al (2010) Alternative promoters in the *pst* operon of *E. coli*. *Mol. Genetics and Genomics*, Sweden, 284:489-498.
- Wanner BL (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon in: *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Biology*, 1:1357-1381.

Fitopatógenos habitantes do solo na Amazônia

Gasparotto L¹, Pereira J.C.R.¹

¹Embrapa Amazônia Ocidental,. Emails: luadir.gasparotto@embrapa.br; jose.rezende-pereira@embrapa.br

Introdução

Na região Amazônica predomina o clima quente e úmido, extremamente favorável aos fitopatógenos. Dentre estes, se destacam os patógenos habitantes do solo, responsáveis por perdas significativas da produção, que, ao se estabelecerem numa área, inviabilizam novos plantios da cultura afetada. São patógenos facultativos, ou seja, infectam a planta hospedeira ou crescem sobre matéria orgânica, de acordo com as circunstâncias; polívoros, atacando várias espécies de plantas, de famílias distintas e produzem estruturas de resistência que lhes assegura a sobrevivência por longos períodos quando as condições edafoclimáticas são adversas.

A maioria desses patógenos infecta o sistema radicular causando murcha vascular ou podridões; porém alguns afetam a parte aérea da planta, como o *Thanatephorus cucumeris* e o *Sclerotium coffeicola*, causadores de manchas foliares, e *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, indutores da podridão das amêndoas da castanheira-do-brasil. Uma vez estabelecidos na área, o controle químico da maioria destes é impraticável. O plantio de cultivares resistentes, a exclusão e adoção de práticas culturais que reduzam o inóculo e favoreçam a atividade microbiana são medidas recomendadas para o controle de patógenos habitantes do solo. A seguir são descritos alguns patógenos habitantes do solo, dentre dezenas, que se destacam com os mais importantes na agricultura amazônica

***Ralstonia solanacearum*, raça 2**

A bactéria, agente causal do moko da bananeira, causa até 100% de perdas na produção. Em plantas jovens causa má-formação foliar, necrose e murcha da vela, seguidos de amarelecimento das folhas baixas.

Em plantas adultas, induz o amarelecimento das folhas basais e murcha das folhas mais jovens. Na parte interna do pseudocaule, há escurecimento vascular não localizado, de coloração pardo-avermelhada intensa, atingindo inclusive a região central; no rizoma, além do escurecimento vascular na região central, ocorre também na região de conexão rizoma principal com o rizoma das brotações. No engaço pode ocorrer escurecimento vascular, na forma de pontos avermelhados; nos frutos, além do amarelecimento precoce, há escurecimento da polpa, seguido de podridão seca.

***Fusarium oxysporum* f. sp. cubense**

Fungo causador do mal-do-panamá da bananeira. Quando afeta cultivares altamente suscetíveis como Maçã, provoca 100% de perdas na produção. Na Amazônia, a doença prevalece em solos de ecossistema de terra firme. Sobrevive no solo por várias décadas e é disseminado pelo contato dos sistemas radiculares de plantas saudáveis com esporos liberados por plantas doentes e, em muitas áreas, o uso de mudas contaminadas, pela água de irrigação, de drenagem, de inundação, assim como pelo homem, por animais e equipamentos.

As plantas infectadas pelo fungo exibem externamente amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas. Posteriormente, as folhas murcham, secam e se quebram junto ao pseudocaule. Em consequência ficam pendentes, o que confere à planta a aparência de um guarda-chuva fechado. É possível notar, próximo ao solo, rachaduras das bainhas, cuja extensão varia com a área afetada no rizoma. Internamente, observa-se a formação de um anel escuro em torno do cilindro central do pseudocaule.

Thanatephorus cucumeris

Patógeno polífago que afeta centenas de espécies de plantas, causando diversas doenças, como a mela do feijoeiro, a queima da saia do repolho e alface e a mancha areolada da seringueira, mogno africano e citros.

A mela ou murcha da teia micélica do feijoeiro manifesta-se, inicialmente, como manchas encharcadas nas folhas, circundadas por uma área marrom-escura, seguida de intensa produção de um entrelaçado de micélio que atinge as folhas adjacentes, hastes, flores e vagens, causando-lhes a morte. Há produção abundante de escleródios sobre os tecidos mortos, constituindo em focos secundários de infecção ou permanecem no solo como inóculo primário.

A mancha areolada da seringueira é caracterizada por lesões foliares que acarretam o desfolhamento das plantas. As lesões, inicialmente, são aquosas e apresentam exsudação de látex na superfície abaxial do folíolo. Cerca de dois a três dias após, a lesão apresenta aspecto seco, com tonalidade castanha, e circundada por longo halo clorótico e amarelado. Quando os folíolos atingem a maturação, as manchas são grandes, constituídas por faixas largas, helicoidais, descontínuas e marrom-escuras ou marrom-claras. Em condições de elevada umidade, na superfície abaxial das folhas, sobre as manchas se desenvolve um manto micelial esbranquiçado.

Sclerotium coffeicola

Apesar de habitante do solo, o patógeno afeta a parte aérea de várias espécies, como a gravioleira, o mogno africano e o cafeeiro, causando desfolhamento.

Os sintomas apresentam-se como manchas necróticas circulares de coloração castanha e bordos escuros distribuídas no limbo foliar, medindo 0,5 cm a 1,0 cm de diâmetro. Nas manchas da face inferior das folhas, geralmente, desenvolve-se micélio branco-dendrídico e nas folhas caídas também há produção de escleródios. Outra característica de *S. coffeicola*, somente observada na mancha da face abaxial é a produção de estruturas semelhantes à agulhas brancas, como se fossem espículas, vista macroscopicamente. Essa estrutura é constituída de hifas paralelas hialinas com até 0,2 mm de diâmetro e 1 a 4 mm de comprimento.

Phytophthora drechsleri

O fungo causa podridão mole de raízes de mandioca. Inicialmente ocorre murcha da parte aérea, seguida de secamento descendente dos ramos e queda das folhas. Arrancando-se a planta, a maioria das raízes encontra-se podre. As raízes parcialmente apodrecidas exsudam um líquido de odor fétido.

Phytophthora palmivora

Agente causal da podridão-do-estipe da pupunheira, que induz perdas de até 30% das mudas enviveiradas e plantas adultas.

Os sintomas caracterizam-se pelo amarelecimento da primeira e da segunda folha aberta e da folha bandeira ou vela (folha não aberta). Em seguida, pode ocorrer o amarelecimento e a seca das demais folhas, podendo provocar a morte da planta-mãe e, às vezes, dos perfilhos e de toda a touceira. Ao se realizar cortes longitudinais e transversais no estipe da pupunheira, observa-se o escurecimento dos tecidos internos e uma podridão generalizada.

Aspergillus flavus* e *A. parasiticus

Esses fungos se desenvolvem sobre os ouriços da castanheira-do-brasil quando o período entre a queda dos frutos e a coleta é grande e, ou quando as condições de armazenamento dos ouriços ou das castanhas são inadequadas, favorecendo a proliferação desses patógenos habitantes naturais do solo, em função da umidade excessiva.

Os patógenos colonizam as castanhas e contaminam os lotes com a produção de aflatoxinas. Aflatoxinas são micotoxinas, com ação carcinogênica, produzidas principalmente pelo fungo *A. flavus*, em sementes e castanhas, tóxicas para os seres humanos e animais.

As castanhas contaminadas por fungos do gênero *Aspergillus* apresentam as superfícies externa e interna da casca recobertas parcial ou totalmente por estruturas (micélio e conídios) do patógeno, de coloração esbranquiçada, creme ou amarelada. O fungo esporula no interior da castanha e coloniza os tecidos causando o apodrecimento da amêndoa, que apresenta coloração esbranquiçada, esverdeada ou amarelada, não podendo, nesse caso, serem usadas na alimentação humana e/ou animal. A coloração escura, no interior das castanhas, também indica a presença dos patógenos.

Após a queda dos ouriços, a coleta destes deve ser feita durante a safra, com pequenos intervalos entre uma coleta e outra, procurando evitar que fiquem em contato com o solo por longos períodos; pois os patógenos são habitantes do solo e, ou decompositores de restos vegetais.

Lasiodiplodia theobromae

Patógeno polífago, oportunista que penetra no interior dos tecidos da planta através de ferimentos e rachaduras da casca causadas por agentes físicos ou biológicos.

Em seringueira, os sintomas são observados em mudas enxertadas e em plantas novas e adultas, sempre que se apresentem debilitadas ou sofram algum dano, como ferimentos causados por tratos culturais, queimaduras devidas à elevação ou ao abaixamento excessivo de temperatura e lesões produzidas por outros parasitas.

Nas mudas, observa-se um enegrecimento do caule, que começa na região do colo ou acima deste, de 4 cm a 10 cm; a lesão desenvolve-se até abranger toda a circunferência da haste. A área afetada se contrai e seca, formando uma zona bem delimitada, que se destaca do verde normal dos tecidos sadios. Posteriormente, há morte da muda.

Em mudas enxertadas, a podridão geralmente inicia-se na região do enxerto, causando o apodrecimento de enxertos e estacas.

Nas plantas adultas, os sintomas iniciam-se pelo amarelecimento dos ramos mais jovens. O secamento progride no sentido da extremidade para a base da copa, apodrecendo a casca, atingindo o tronco e causando rapidamente a morte de grande porção da copa. Quando afeta o caule, os sintomas manifestam-se, inicialmente, na região de soldaduras do enxerto e progride no sentido ascendente, formando o desenho de um V invertido. A casca apresenta um apodrecimento de cor escura, que se destaca facilmente, ocorre anelamento e, conseqüentemente, a morte das partes acima do local afetado.

Ganoderma philippii, Rigidoporus lignosus e Phellinus noxius

São patógenos causadores de podridões das raízes de plantas arbóreas, dentre estas a seringueira. Esses agentes formam carpóforos do tipo orelha-de-pau, em troncos, galhos grossos e raízes, em estágio avançado de apodrecimento de árvores da mata anterior ao seringal, especialmente nas épocas de maior umidade.

As rizomorfias de *G. philippii* são vermelhas, com os bordos brancos, que escurecem quando envelhecem, mas tornam-se vermelhas quando umedecidas. *Rigidoporus lignosus* produz rizomorfias brancas, aderidas à superfície da casca da raiz, apresentam crescimento rápido e podem propagar-se por longas distâncias no solo, na ausência de qualquer substrato lenhoso. *Phellinus noxius* não produz rizomorfias típicas, mas forma uma manta micelial envolvendo as raízes. Estas apresentam desenvolvimento lento, são de cor escura, mucilaginosas e incrustadas com terra e pequenos pedaços de casca.

Nas plantas afetadas, inicialmente, há amarelecimento parcial da copa da árvore, que se generaliza com o passar do tempo. A planta morre repentinamente, apresentando folíolos secos presos aos ramos, por algumas semanas. Em solos pouco profundos, onde as raízes pivotantes são pouco desenvolvidas, as seringueiras podem tombar em virtude do apodrecimento das raízes laterais, sem apresentar sintomas de amarelecimento da copa. Isso pode ocorrer mesmo quando o fungo afeta a raiz pivotante, causando o seu apodrecimento e, conseqüentemente, o tombamento da árvore. Examinando-se o sistema radicular, constatam-se raízes apodrecidas e rizomorfias ou camada micelial do patógeno.

Meloidogyne exigua, M. incognita e M. javanica

Fitonematoides que afetam várias espécies de plantas. *Meloidogyne exigua* associado ao sistema radicular da seringueira, causa severos danos em seringais com quatro a doze anos de idade, situados na região geoeconômica de Rondonópolis, MT.

As plantas atacadas apresentam morte progressiva, secamento do painel e alta incidência de *L. theobromae*. O nematoide induz a formação de galhas com até 8 mm de diâmetro em profusão nas radículas. Em cortes histológicos das raízes infectadas observa-se que a arquia da raiz, tipicamente tetrarca em sua estrutura primária, fica completamente alterada. No interior de uma galha, observam-se até doze adultos (fêmeas) completamente imersos no córtex radicular. Apenas a parte anterior do corpo ultrapassa periciclo, com o conjunto de células gigantes formadas no cilindro central. O xilema, em torno das células gigantes, fica completamente alterado e os elementos do vaso curtos, deformados e dispostos num aglomerado de forma irregular, provavelmente reduzindo a eficiência das raízes na absorção de água.

Plantas afetadas por *M. incognita* e *M. javanica* apresentam o sistema radicular com galhas de aspecto necrosado e amarelado, tanto nas radículas principais como nas laterais, com poucas massas de ovos externas. Pobre desenvolvimento radicular e segmentos necrosados. Morte descendente de ramos, descortçamento e ataque intenso de fungos oportunistas, como *L. theobromae*.

Radopholus similis

Bananeiras afetadas pelo nematoide *R. similis* apresentam crescimento reduzido, amarelecimento das folhas, seca prematura, má-formação de cachos, refletindo em baixa produção e reduzindo a longevidade dos plantios. Sua disseminação é altamente dependente do homem, seja por meio de mudas contaminadas, deslocamento de equipamentos de áreas contaminadas para áreas livres de nematoides, ou por meio da irrigação e/ou água das chuvas.

Os danos causados pelo fitonematoide podem ser confundidos ou agravados com outros problemas de ordem fisiológica, como estresse hídrico, deficiência nutricional, principalmente deficiência de fósforo, ou pela ocorrência de pragas e doenças de origem virótica, bacteriana ou fúngica, devido à redução da capacidade de absorver água e nutrientes, pelo sistema radicular. A sustentação da planta é também bastante comprometida.

Referências bibliográficas

Cardoso JE, Luz EDMN (1981) Avanços na pesquisa sobre a mela do feijoeiro no estado do Acre. Rio Branco: EMBRAPA.UEPAE/Rio Branco. 29p. (EMBRAPA.UEPAE/Rio Branco. Boletim de Pesquisa, 1).

Duarte MLR (1999) Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro. I Plantas industriais. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

Gasparotto L, Bentes, JLS, Pereira JCR (2014) Doenças de espécies florestais arbóreas, nativas e exóticas na Amazônia. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.

Gasparotto L, Pereira JCR (2012). Doenças da seringueira no Brasil. 2. ed. rev. e atual. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.

Gasparotto L, Pereira JCR. (2010). A cultura da bananeira na região Norte do Brasil. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.

Poltronieri LS, Albuquerque FC, Trindade DR, Duarte MLR, Benchimol RL (2001) Podridão mole das raízes de mandioca. In: Luz EDMN, Santos AF, Matsuoka K, Bezerra JL (eds). Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Livraria e Editora Rural, Campinas, SP, 433-454.

Poltronieri LS, Trindade DR (2002) Manejo integrado das principais pragas e doenças de cultivos amazônicos. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

Isolamento, purificação, identificação e conservação de microrganismos associados ao jardim de fungos simbióticos das formigas cortadeiras *Atta sexdens*

Gonzaga A. D¹, A. Q. L. Souza¹; Pereira J O¹

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM

E:mail:adrianadantas1@gmail.com, antoniaqlsouza@yahoo.com.br; joseodairpereira@yahoo.com.br

Resumo

Algumas formigas tornaram-se dependentes do cultivo de fungos como alimento e desenvolveram uma sociedade de cooperação com tarefas divididas, que os tornam ecologicamente muito importantes. Esta dependência de fungos ocorre em formigas (Formicidae) no monofilético grupo formado por formigas da tribo Attini (Myrmicinae: Formicidae: Hymenoptera), dependentes obrigatórias dos fungos que cultivam para alimento e nas formigas *Megalomyrmex silvestrii* (Myrmicinae, tribo Solenopsidini), que são parasitas sociais de formigas da tribo Attini e que consomem os fungos cultivados por atíneos hospedeiros. Esta pesquisa teve como objetivo isolar, purificar, identificar e conservar de microrganismos associados ao jardim de fungos simbióticos das formigas cortadeiras *Atta sexdens*. Foram isolados seis microrganismos, representados por fungos filamentosos mitospóricos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.), basidiomiceto (*Leucoagaricus gongylophorus*) Leveduras e Bactérias gram negativas e positivas, que cresceram mesmo na presença de antibióticos. Os resultados do sequenciamento de DNA indicaram a presença de: *Leucoagaricus gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *Aspergillus flavus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Fusarium solani* e Leveduras como os microrganismos associados às formigas. Todos os microrganismos isolados e identificados foram preservados para estudos posteriores em ensaios de antagonismo. Recomendamos a continuação dos estudos, pois outros microrganismos podem ser associados a estas formigas cortadeiras, incluindo aqueles de importância biotecnológica.

Palavras-chave: *Leucoagaricus gongylophorus*, *Bionectria ochroleuca*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Fusarium solani*

Introdução

Poucos animais apresentam capacidade de cultivar seu próprio alimento. Algumas linhagens de insetos, entre elas, formigas, cupins e besouros, há aproximadamente 50-60 milhões de anos desenvolveram a capacidade de cultivar fungos para alimento. Alguns destes insetos tornaram-se dependentes do cultivo para alimento e desenvolvem uma sociedade de cooperação com tarefas divididas, que os tornam ecologicamente muito importantes (Mueller e Geraldo, 2002).

Esta dependência de fungos como principal fonte de alimento ocorreu duas vezes em formigas (Formicidae) no monofilético grupo formado por formigas da tribo Attini (Myrmicinae: Formicidae: Hymenoptera) que são dependentes obrigatórias dos fungos que cultivam para alimento e nas formigas *Megalomyrmex silvestrii* (Myrmicinae, tribo Solenopsidini), que são parasitas sociais de formigas da tribo Attini e que consomem os fungos cultivados por atíneos hospedeiros (Adams *et al.*, 2000).

As formigas fornecem aos fungos substratos predominantemente de origem vegetal. As formigas das espécies dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* cortam folhas frescas e têm recebido atenção especial dos pesquisadores devido aos danos causados a plantas silvestres e cultivadas (Currie *et al.*, 2003).

Fungos e formigas se beneficiam com a relação simbiótica; os fungos são utilizados na dieta das formigas que, por sua vez, fornecem aos fungos substratos para crescimento e proteção contra parasitas e competidores (Currie e Stuart, 2001). Portanto, esta pesquisa teve como objetivo verificar o isolamento, purificação, identificação e conservação de microrganismos associados ao jardim de fungos simbióticos das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

Material e Métodos

Treze colônias da espécie *Atta sexdens*, foram coletados no município de Manaus, AM e transportados para o Laboratório LABGEMMA da Universidade Federal do Amazonas, UFAM. Os ninhos foram acomodados em recipientes de plástico transparente, recebendo água, alimento e outros cuidados.

Para o isolamento, fragmentos dos jardins (esponjas) foram imersas em água destilada autoclavada por um minuto, etanol 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% por um minuto, novamente lavados em etanol 70% por 30 segundos e por último em água destilada esterilizada. Após esse processo de assepsia foram retirados fragmentos do fungo simbionte e transferidos para placas de Petri contendo diferentes meios de cultura (BDA e

Pagnocca). Também foi isolado o fungo diretamente do formigueiro, transferindo-se pequenos fragmentos das esponjas para placa de Petri. As placas de cultivo foram transferidas para estufa tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) a 26°C.

Todos os fungos isolados do formigueiro foram submetidos aos procedimentos de cultivos a fim de se obter uma nova colônia a partir de um único esporo. Para tal, utilizou-se a técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com o protocolo de Azevedo e Costa (1973).

Os isolados utilizados no presente trabalho foram conservados por meio de 3 processos: (1) método segundo Castellani (1939); (2) método do glicerol a 15%, onde a solução de esporos foi armazenada e conservada a -20°C e (3) método dos tubos de ensaio com meio inclinado coberto por óleo mineral.

A extração de DNA dos fungos foi realizada conforme o protocolo utilizado por SOUZA (2006). A PCR foi realizada a partir dos “*primers*” descritos por WHITE et al. (1990) para a região ITS-1 do rDNA. O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com gel blue green e visualizado sob luz ultravioleta.

Resultados e Discussão

A partir do jardim de fungos associados às formigas cortadeiras, foram isolados seis microrganismos, representados por fungos filamentosos mitospóricos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.), basidiomiceto (*Leucoagaricus gongylophorus*) Leveduras e Bactérias gram negativas e positivas, que cresceram mesmo na presença de antibióticos.

Posteriormente estes fungos foram identificados com auxílio de ferramentas moleculares para a confirmação da espécie. Os resultados do seqüenciamento de DNA indicaram a presença de: *Leucoagaricus gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *Aspergillus flavus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Fusarium solani* e Leveduras como os microrganismos associados às formigas. Todos os microrganismos isolados e identificados foram preservados para estudos posteriores em ensaios de antagonismo.

A associação simbiótica entre as formigas que foram objetos deste estudo, juntamente com os fungos por elas cultivados é considerada uma das razões de seu sucesso ecológico na natureza. Aparentemente o desafio continua.

Uma das razões dos poucos estudos realizados com fungos de Attini é a sua difícil identificação. Os estudos realizados até o momento indicam ser basidiomicetos os cultivares de todos os gêneros de Attini (Weber, 1969), porém há dificuldades na definição do táxon

destes fungos, devido ao fato de, na maioria dos casos, apenas desenvolvem hifas estéreis, seja no ninho ou em culturas isoladas de laboratório, dificultando a taxonomia tradicional deste grupo, que é baseada na morfologia do basidioma, estrutura de reprodução destes fungos e que é indispensável na identificação até nível de espécie.

Os resultados encontrados nesta pesquisa confirmam a presença de fungos predominantes nos ninhos de *Atta sexdens* e descreve a presença de outros microrganismos que vivem em associação simbiótica com essas formigas cortadeiras.

Wheeler (1907), Weber (1969) descreveram também estes mesmos microrganismos fazendo parte dos jardins de fungos associados às formigas cortadeiras. A literatura registra ainda a presença de *Leucoagaricus weberi*; *Escovopsis weberi* (Muchovej et al., 1991) e *Escovopsis aspergilloides* e Actinomicetos da família *Pseudonocardiaceae*), como sendo também microrganismos encontrados associados a estas formigas.

Estudos bioquímicos e micromorfológicos confirmam que os fungos simbiossiontes de Attini são basidiomicetos, os quais estão divididos em três grupos: G1- inclui os fungos cultivados pelos gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*; único grupo que possui gongilídeos; G2- cultivados pelas espécies morfológicamente derivadas do gênero primitivo *Apterostigma*, possuem abundantes grampos de conexão e hifas aéreas extremamente alongadas, que em algumas espécies servem como proteção aos ninhos; G3- cultivados pelos gêneros *Cyphomyrmex*, *Mycetosorites*, *Mycetophylax* *Mycocephalus*, *Mycetarotes* e *Myrmecocrypta*, são relativamente mais heterogêneos, com alguns exemplares mais próximos ao grupo G1, enquanto outros estão mais relacionados a espécies de basidiomicetos não domesticados pelas formigas (Currie et al. 2003).

Wheeler, em 1910, já previa este fato dizendo: “*O estudo das Attini está apenas começando, e o avanço neste fascinante tema será mais difícil para micologistas do que para entomologistas* (Mueller, 2002).

Em estudos moleculares realizados por Currie *et al.*, (2003) observaram-se diferenças até em nível taxonômico de Família entre os fungos cultivados por diferentes categorias de Attini. MUELLER (2002) faz um relato de todas as ocorrências de basidiomas em ninhos de formigas forrageadoras e, a partir deste trabalho pode-se inferir que, ao menos para as espécies dos gêneros considerados mais evoluídos (*Atta* e *Acromyrmex*) há o cultivo da mesma espécie de fungo.

Conclusões

A partir do jardim de fungos associados às formigas cortadeiras, foram isolados seis microrganismos, representados por fungos filamentosos mitospóricos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.), basidiomiceto (*Leucoagaricus gongylophorus*) Leveduras e Bactérias gram negativas e positivas, que cresceram mesmo na presença de antibióticos.

Os resultados do sequenciamento de DNA indicaram a presença de: *Leucoagaricus gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *Aspergillus flavus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Fusarium solani* e Leveduras como os microrganismos associados às formigas. Todos os microrganismos isolados e identificados foram preservados para estudos posteriores em ensaios de antagonismo.

Recomendamos a continuação dos estudos, pois outros microrganismos podem ser associados a estas formigas cortadeiras, incluindo aqueles de importância biotecnológica.

Referencias

Adams MD et al., (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287(5461):2185-2195.

Azevedo, JL, Costa SOP (1973). Exercícios práticos de genética, São Paulo: EDUSP, 288p.

Castelani A (1939). Viability of mold culture of fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.*, 42:225.

Currie CR; Stuart AE. (2001). Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings. Biological sciences The Royal Society* .

Currie, CR, Bot ANM, Boomsma J J (2003) Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus garden from specialized parasites. *Oikos*, 101: 91-102.

Mueller, UG (2002) Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *American Naturalist*, 160: S67-S98.

Mueller UG, Geraldo N (2002). Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. *PNAS*. 23:15247-15249.

Muchovej JJ, Della Lucia TM, Muchovej RM C (1991). *Leucoagaricus weberi* sp. nov. from a live nest of leaf-cutting ants. *Mycol. Res.*, 95(11):1308-1311.

Souza, AQL (2006). Potencial Genético e Químico dos endófitos de *Murray paniculata* L. (Jack). (Tese) Doutorado em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 128 p.

Weber JR, Greer, B, Voight E, White RR. (1969). Unusual strength properties of echinoderm calcite related to structure. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 355-366.

Wheeler WM (1907). The polymorphism of ants, with an account of some singular abnormalities due to parasitism. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 23:1-93.

White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplificação e sequenciamento de genes de fungos ribossomal RNA para filogenética. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, p.315-322.

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 avaliado 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*.

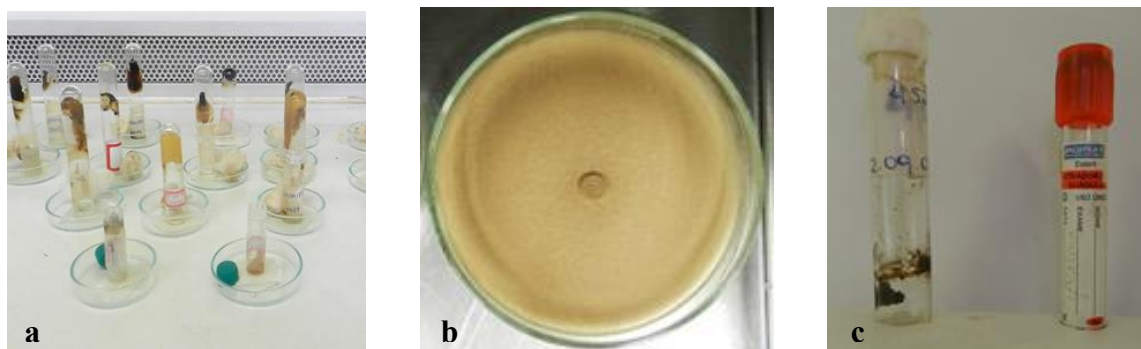


Fig. 1 - Metodologia utilizada para verificação da viabilidade dos espécimes de *Paecilomyces* armazenados em método de preservação Óleo Mineral. a) Tubo de ensaio invertido para retirada do óleo mineral. b) Cultura de *Paecilomyces* purificadas. c) Tubo de ensaio com tampão de algodão e tubos criogênicos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

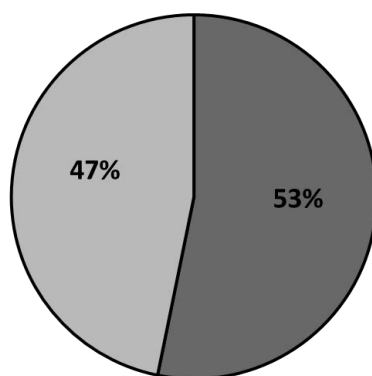


Fig. 3 - Porcentagem das culturas de *Paecilomyces* reativadas de óleo mineral e recuperadas ● e as recuperadas de ○ outros métodos.

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/unil1.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.

Avaliação de fungos endofíticos e epifíticos com potencial para produção de biossurfactantes, isolados de macrófitas aquáticas do rio Negro em Manaus, Amazonas

Lima, JMS¹, Pereira, JO², Costa Neto PQ², Batista IH³, Santos JC¹, Araújo SP⁴, Pantoja, MC², Azevedo JL⁵

¹Rede Bionorte de Biodiversidade e Biotecnologia, ² Universidade Federal do Amazonas-UFAM

³Universidade do Estado do Amazonas - UEA. ⁴ Pós-Graduação em Biotecnologia/UFAM, Manaus – AM – Brasil. ⁵Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP
Emails: jlazevedo@usp.br, mozanilzootec@hotmail.com, joseodairpereira@yahoo.com.br, jlima873@gmail.com, iedahbatista@gmail.com, spiresdearaujo@gmail.com

Resumo

Foram investigados fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas aquáticas *Eichhorniacrassipes* (Mart.) Solms e *Cyperus ligularis* L., coletadas em águas contaminadas com resíduos de petróleo para avaliação do potencial quanto à produção de biossurfactantes; os mais promissores foram identificados por meio do sequenciamento da região rDNA. Na seleção quanto à atividade biodegradadora de hidrocarbonetos o indicador utilizado foi 2,6 indofenol (DCPIP) em meio Bushnell-Haas(BH) acrescido de petróleo. Para a atividade biossurfactante, foram realizados os seguintes testes: Medida de emulsificação, colapso da gota, tensão superficial. Do total de vinte isolados, doze cresceram em meio BH e petróleo; dos quais, oito promoveram a descoloração do DCPIP. O isolado S31 apresentou moderada emulsão do diesel (1,5cm ou 52%) com redução da tensão superficial da água em 51,03 mN/m sendo identificado como *Phoma* sp. Os outros fungos identificados foram: *Rhizopus oryzae*, *Gibberella moniliformis*, *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. fujikuroie*, *Penicillium citreonigrum*, e apresentaram potencial para biodegradação de hidrocarbonetos. Novos estudos com o fungo *Phoma* sp. tornam necessários como o cultivo em diferentes fontes de carbono com o intuito de melhorar a produção de compostos secundários envolvidos na emulsificação e diminuição da tensão superficial da água.

Palavras chave: Biorremediação, bioemulsificantes, *Eichhornia*, *Cyperus*, petróleo, diesel

Introdução

Os biossurfactantes podem ser de origem microbiana e apresentam potencial para aplicações comerciais em diversos setores. Esses produtos são eficazes na recuperação avançada de petróleo e em processos de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Também possuem aplicações potenciais na agricultura, como insumos na área de cosméticos, produtos farmacêuticos, detergentes, produtos de higiene pessoal, processamento de alimentos, dentre outros (Cola e Costa 2003; Sourav *et al.*, 2015). Apresentam vantagens sobre os surfactantes de origem sintética considerando sua biodegradabilidade e por apresentar baixa toxicidade.

Considerando-se que os biossurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, os fungos endofíticos e epifíticos também podem possuir essa característica. Micro-organismos endofíticos segundo Azevedo (2008) são aqueles que habitam pelo menos um período do seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, em oposição aos epifíticos que vivem na superfície das plantas.

As espécies *Curvularia clavata*, *Fusarium proliferatum* e *Phoma* sp. isolados de diferentes ambientes contaminados por hidrocarbonetos são as principais espécies citadas como produtores de biossurfactantes. Quanto à biodegradação de hidrocarbonetos, *Cladophialophora* e *Exophiala* assimilam tolueno; enquanto que *Aspergillus* sp. e *Penicillium* spp. degradam os hidrocarbonetos alifáticos, clorofenóis, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), pesticidas, corantes sintéticos e 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (Azevedo 2008; Oliveira *et al.*, 2008; Harms *et al.*, 2011; Bhardwaj *et al.*, 2015; Neoh *et al.*, 2015). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de fungos endofíticos e epifíticos, quanto à biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes.

Material e Métodos

Os micro-organismos foram isolados das macrófitas aquáticas *Cyperus ligularis* L. e *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms coletadas próximo à saída dos efluentes da refinaria da Petrobrás/Manaus-AM (REMAN). O cultivo foi em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (Himedia) a 28°C por nove dias e repicados para meio Bushnell-Haas (BH) Broth (Sigma-Aldrich), acrescido de 2mL de petróleo. Após o crescimento micelial em BH por nove dias, discos de 5mm de diâmetro foram utilizados como pré-inóculo nos testes

subsequentes em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100mL de meio BH líquido, acrescido de 5 mL de petróleo, o pH foi ajustado para 5 e incubados por 14 dias a 30°C.

A identificação molecular foi realizada somente para as amostras com resultado positivo no teste indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) e aqueles com resultado acima de 1 cm para o índice de emulsificação. Para a extração do DNA foi utilizado o Plant/Fungy DNA isolation kit (NorgenBiotekCorp) conforme as recomendações do fabricante. Foram utilizados os *primers* ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3') e ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') para amplificação da região conservada em posições específicas do 18S e 28S do gene rDNA. Os amplicons foram purificados com polietileno glicol 8000 e sequenciados em analisador genético ABI 3500xL (AppliedBiosystems®). As sequências foram alinhadas e editadas no programa MEGA com agrupamento pelo método *Neighbor-Joining* e utilizadas para identificação dos isolados comparando-se com as sequências tipo com base nos resultados observados no BLASTn

O petróleo cru foi proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil e o diesel foi adquirido em posto de gasolinade bandeira BR, previamente filtrado. As dosagens de petróleo ou diesel foram utilizadas conforme Jaquiche-Matsuura *et al.*, (2014).

Teste de Biodegradabilidade Utilizando o Indicador Redox 2,6-Diclorofenol Indofenol (DCPIP)

O teste de biodegradabilidade foi realizado pela técnica do DCPIP (Hanson *et al.*, 1997). O experimento foi realizado em placa de poliestireno com 96 poços, a concentração de DCPIP foi ajustada para 0,010 g/mL. Em cada poço foram adicionados 200 µL da solução de DCPIP, 10 µL do petróleo de Urucu, e inóculo do fungo correspondendo a 2±3 mm de diâmetro. As placas foram mantidas em temperatura ambiente (27±2 °C). As medidas do tempo para descolorir o meio foram realizadas após 24 e 48 horas. Como controle positivo foi utilizado DCPIP com petróleo, e controle negativo somente o indofenol.

Meio Específico para Produção de Biossurfactantes

A produção de biossurfactante foi realizada em 50 mL de meio de cultura constituído de MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, NaNO₃ 3 g/L, extrato de levedura 1 g/L e peptona 0,3 g/L, com pH ajustado em 5 para fungos filamentosos, modificado de Rapp e Backhaus (1992). Como fonte de carbono foi utilizado óleo diesel ou petróleo a 1,0% v/v.

O cultivo microbiano foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL a 30°C em incubadora orbital (New BrunswickScientific) com agitação constante de 150 rpm, por 20 dias. FrascosErlenmeyer com 50 mL de meio de cultura e 1% de óleo diesel(v/v), sem o inóculo, foi utilizado como controle. Cada micro-organismo foi cultivado em triplicata. Após o período de incubação, os meios de cultura foram filtrados em membrana filtrante (TPP, Europe/Switzerland) com porosidade de 0,45 mm acoplada à seringa esterilizada de 20 mL.

Teste Qualitativo do Colapso da Gota de Óleo

O teste foi realizado em placas de Petri(60 x 12 mm) com 3,5 mL do extrato filtrado livre de células. Para realizar o teste, uma gota de petróleofoi adicionada ao extrato livre de células, em triplicata, e observados nos tempos 0, 1, 5, 30 min, 1e72 horas. O resultado foi considerado positivo quando houve dispersão da gota de petróleo. Como controle negativofoi utilizado 3,5 mL do extrato, porém sem o fungo; e 3,5 mLda solução do surfactante Sódio Dodecil Sulfato (SDS)a1M, como controle positivo.

Avaliação da Atividade de Emulsificação

O meio específico para a produção de biossurfactantes foifiltrado e avaliado quanto à atividade de emulsificação do tipo água em óleo (A/O). O teste foi realizado em triplicata. Adicionou-se em tubos de ensaio 3MI dos extratos das culturas livres de células e 2 mLde diesel.Foram agitados por dois minutos em vortexa 70 rpme 24 horas em repouso. Após esse período, a altura do petróleo emulsificado (cm) foi comparada à altura total (Cooper e Goldenberg 1987). O índice de emulsificação foi medido segundo as convenções adotadas por Paraszkiwiczet al.,(2001) e calculado conforme a equação (1): $E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$ Índice de emulsificação após 24 h (%), $H_{emulsão}$ = Altura da emulsão, H_t = Altura total.

$$\text{Equação (1): } E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

Avaliação da Tensão Superficial

A medida da tensão superficial é uma ferramenta comum e um método indireto para monitorar a produção de biossurfactantes. À medida que o micro-organismo cresce, ele sintetiza o biossurfactante e este metabólito é lançado ao caldo metabólico, reduzindo a tensão

superficial. A tensão superficial foi medida no tensiômetro modelo Kruss (K-6, Alemanha), pelo método do anel (Du Noüy). As análises foram realizadas com o sobrenadante obtido após a centrifugação da amostra bruta a 25°C.

Resultados

Oito fungos selecionados pelo crescimento no meio BH acrescido de petróleo foram identificados por meio do sequenciamento de parte do gene rDNA. Os fragmentos do gene rDNA contendo a região ITS1-5,8S-ITS2 apresentaram entre 531 a 562 pb. Os fungos epifíticos S31 e S36 isolados de *C. ligularis* foram identificados como *Phomasp.*; S24 *Rhizopus oryzae*; S32 *F. oxysporum*; S33 *Gibberella moniliformis* e S42 *F. proliferatum*. Entre os fungos endofíticos, S42 foi identificado como *F. fujikuroi* e S51 *Penicillium citreonigrum*, ambos provenientes de *E. crassipes*. O resultado das sequências mais relacionadas com as do *National Center for Biotechnology Information* estão na (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas do rio Negro-Amazonas/Brasil, utilizando como referência os dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

Iso*	Micro-organismos	Cod. NCBI	Hospedeiros	Endo.*	Epi.*	Id.*(%)
S24	<i>Rhizopus oryzae</i>	KJ460029.1	<i>Cyperusligularis</i>		X	99
S31	<i>Phomasp.</i>	KM979945.1	<i>C. ligularis</i>		X	100
S32	<i>Fusariumoxysporum</i>	JX406507.1	<i>Eichhornia crassipes</i>		X	99
S33	<i>Gibberella moniliformis</i>	EU151472.1	<i>C. ligularis</i>		X	98
S36	<i>Phomasp.</i>	KM246267.1	<i>C. ligularis</i>		X	100
S42	<i>F. proliferatum</i>	KJ020897.1	<i>C. ligularis</i>		X	99
S46	<i>F. fujikuroi</i>	KM369868.1	<i>C. ligularis</i>	X		99
S51	<i>Penicillium citreonigrum</i>	KF031329.1	<i>E. crassipes</i>	X		97

*Iso= Isolado; Endo= Endofítico; Epi= Epifítico; Id= Identidade

Entre os oito fungos analisados apenas *Phomasp.* (S31), mostrou-se eficiente nos diferentes testes realizados afim de selecionar os produtores de biossurfactantes. Os demais isolados, embora tenham dispersado a gota de petróleo em diferentes tempos, não formaram emulsão acima de 1 cm, conforme convenção adotada (Tabela 2).

Somente o *Phomasp.* (S31) foi selecionado para o teste de tensão superficial, pois foi positivo no teste do colapso da gota em menor tempo e emulsificação acima de 1 cm. A diferença entre a tensão superficial do extrato fúngico e a tensão superficial do controle foi de 2mN/m, porém em relação à água foi de 18,23 mN/m indicando possuir capacidade em romper a tensão superficial da água.

Tabela 2. Fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas do rio Negro – Amazonas/Brasil para produção de biossurfactantes

Isolado	Colapso da gota						Índice de emulsificação H _u /E ₂₄	Tensão superficial
	0	1 min	5 min	30 min	1h	72h		
<i>Phomasp.</i> (S31)	+	+	+	+	+	+	1,5 cm/52 %	51,03 mN/m
<i>Penicilliumcitreonigrum</i>	-	-	-	+	+	+	0,7 cm/38 %	-
<i>Phomasp.</i>	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Fusarium fujikuroi</i>	-	-	-	-	-	-	0	-
<i>F. proliferatum</i>	-	+	+	+	+	+	0	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Gibberella moniliformis</i>	-	±	±	±	±	±	0	-
Controle								
SDS	+	+	+	+	+	+	100 %	
BH+PS	-	-	-	-	-	-	0	53,03 mN/m
Água								71,26 mN/m

*SDS = Sódio Dodecil Sulfato foi usado como controle positivo e o meio BH+PS=Petróleo sem o fungo, foi usado como controle negativo. H_u=altura emulsificada, E₂₄= índice de emulsificação em 24h

Discussão

O comportamento dos isolados que cresceram em meio BH com petróleo pode ser analisado segundo Jaques (2007); Maciel *et al.*, (2013) e Cruz *et al.*, (2014) onde, tanto fungos como bactérias podem ser biodegradadores de hidrocarbonetos. Os micro-organismos que apresentam sucesso no processo de degradação desses compostos devem produzir enzimas capazes de utilizar as complexas moléculas do petróleo em produtos intermediários de suas rotas metabólicas. Neste caso os fungos teriam duas rotas metabólicas uma não-lignolítica e a lignolítica; à exemplo dos fungos *Cunninghamella elegans*, e o fungo *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus fumigatus* e *C. Lunata* já estudados como degradadores de petróleo e seus derivados (Paraszkiwicz, *et al.*, 2001; Jaques *et al.*, 2007; Bhatt *et al.*, 2012).

Junior *et al.*, (2012) destacaram que fungos do gênero *Phoma* são bons produtores de lacase, enzima do grupo das fenoloxidas capazes de biodegradar compostos fenólicos e hidrocarbonetos; Carneiro (2010) corrobora com essa visão em um importante trabalho sobre biorremediação, utilizando micro-organismos na metabolização de vários compostos tóxicos, dentre eles o petróleo.

Harms (2011) relatou que culturas do gênero *Rhizopus* são potenciais degradadores de HPAs, o que de certa forma pode explicar o aparecimento de espécies deste gênero nos testes de seleção usando meio BH mais petróleo (Tabela 1). Balaji *et al.*, (2015), em trabalho realizado na Índia, citaram *Aspergillus*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*, isolados de solo contaminado por petróleo. Percebe-se que a maioria dos gêneros citados, também foram encontrados no presente trabalho (Tabela 1), indicando o potencial na produção de enzimas, que podem ser aplicado para degradação de hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados.

O fungo filamentosos *C. Clavata* citado por Neoh *et al.*, (2014) e Neoh *et al.*, (2015) como biorremediador de efluentes da indústria de palma e produtora de enzimas lignolíticas, além de alta redução de compostos polifenólicos. A desintoxicação do efluente indica a adequação de *C. clavata* na biorremediação de efluentes orgânicos, esse fato é importante, pois pode direcionar futuros trabalhos utilizando fungos isolados nesta pesquisa, em processos semelhantes.

Os fungos isolados da Amazônia assemelham-se em relação ao tempo de oxidação do DCPIP, com o trabalho de Maciel *et al.*, (2013), que observaram os tempos de 14 e 25 horas para os fungos que promoveram a descoloração do indofenol. Os isolados de macrófitas promoveram descoloração em 24 horas. No trabalho de Luz *et al.*, (2011), o tempo de reação de oxidação ao indofenol foi de 96 horas. Maciel *et al.*, (2013) destacaram que os isolados responsáveis pela degradação: *P. aurantiogriseum*, *P. corylophilum* e *P. griseofulvum*. Outras espécies deste gênero isolados de macrófitas constam (Tabela 2).

Para Silva e Esposito (2004) a degradação de poluentes é realizada pelo sistema enzimático intracelular citocromo P450 monooxigenase que transforma produtos solúveis em água em menos tóxicos, levando ao processo de destoxificação. Provavelmente essas enzimas estão envolvidas nesse processo. Esses autores relataram que *Trichoderma* e *Fusarium* em solos contaminados por petróleo; *F. fujikuroi* e *F. oxysporum* foram isolados de macrófitas em ambiente contaminado por petróleo.

Quanto à produção de biossurfactantes embora os fungos filamentosos tenham crescido em meio BH com petróleo, como única fonte de carbono, a maioria não foi capaz de produzi-lo por meio dos testes seletivos como colapso da gota, índice de emulsificação e no teste de tensão superficial.

Phomasp. (S31) foi o único capaz de produzir colapso da gota de petróleo em menos de 1 min, assim como mostrou índice de emulsificação de 1,5 cm ou 52%, frente a petróleo e ao diesel, este índice é considerado moderado, segundo Jaquiche-Matssura *et al.*, (2014); além disso produziu tensão superficial de 51,03 mN/m.

Esse fungo possui propriedade emulsificante, porém baixa capacidade de redução da tensão superficial em relação ao controle (53,03 mN/m) e maior capacidade de redução de tensão superficial em relação a água (72,01 mN/m) (Tabela 3). Talvez a baixa tensão superficial seja devido à dificuldade de utilização do hidrocarboneto presente no óleo diesel para a síntese de biossurfactantes (Decesaro *et al.*, 2013). Por outro lado, é provável que pelos testes realizados o biossurfactante presente no substrato do fungo, seja de alto peso molecular o que explicaria de fato a baixa tensão superficial e a presença de propriedade estabilizante do óleo diesel (Bento *et al.*, 2008).

A emulsão formada foi do tipo A/O, sugerindo que os compostos orgânicos presentes nesse emulsificante, possuem características hidrofílicas devido à formação da emulsão se dar sempre entre a água e o óleo diesel ou petróleo. Esta característica é importante na biorremediação de poluentes, pois pode auxiliar no processo de bioaugmentação ou bioestimulação, facilitando o crescimento fisiológico de outros micro-organismos no meio contaminado com hidrocarbonetos do petróleo (Nitschke e Pastore, 2002; Deon *et al.*, 2012; Jackisch-Matsuura *et al.*, 2014). Esses autores também citaram a dificuldade de se encontrar fungos filamentosos como bons produtores de biossurfactantes com capacidade de reduzir a tensão superficial, fato este observado nesta pesquisa. Por outro lado, a produção de bioemulsificante por fungos e bactérias podem ser utilizados em diversas aplicações tais como: indústria de alimentos, indústria de fabricação de tintas, entre outras (Bezerra *et al.*, 2012).

Herath *et al.* (2009) identificaram um composto lipopeptídico de estrutura cíclica a isolado de *Phoma* sp, classificado como *Phoma fungy*, que se mostrou eficiente como antifúngico em diversos testes realizados. Com exceção do trabalho de Herath *et al.*, (2009), não há citação de *Phoma* sp. como produtor de biossurfactante ou bioemulsificante, o que indica a realização de estudos futuros como *Phoma* sp. (S31) associado a produção de biossurfactantes

envolvendo espécies de *Phoma*, principalmente no que diz respeito ao cultivo em diferentes fontes de carbono, para que possa expressar a produção de compostos secundários envolvidos, tanto na emulsificação como na diminuição da tensão superficial.

Conclusões

Todos os fungos identificados mostraram-se promissores na degradação do petróleo e de diesel.

É necessário um aprofundamento em relação a produção enzimática por esses fungos visando prospectar enzimas de interesse comercial que estejam relacionadas à biodegradação de petróleo e seus derivados, principalmente com relação a produção de biossurfactantes pelo *Phoma* sp.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pelo auxílio dado à execução do projeto.

Referências

- Azevedo JL. (2008) Genética de microrganismos. Goiânia, G.O.
- Balaji V, Arulazhagan P, Ebenezer P (2014) Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *J Environ Biol* 35: 3-9.
- Bento MF, Camargo FA, Gaylarde CC (2008) Biossurfactantes. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.). *Microbiologia Ambiental*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, Brasil, 152-184.
- Bezerra MS, Holanda VCD, Amorim JA, Macedo GR, Santos ES (2012) Produção de biotensioativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. *Holos* 28: 14-27.
- Bhardwaj G, Cameotra SS, Chopra HK (2015) Isolation and purification of a new enamidebiosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. *RSC Adv* 5:54783–54792.
- Bhatt R, Patel K, Trivedi U (2010) Purification and properties of extracellular poly (3-hydroxybutyrate) de polymerase produced by *Aspergillus fumigatus*. *J Polym Environ* 18: 141-147.
- Carneiro DA, Lucas PG (2010) A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. *Tecer* 3:82-95.
- Colla LM, Costa JV (2003) Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor* 13:85-103.

Cooper DG, Goldenberg BG (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 53:224-229.

Cruz JM (2014) Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. *Water Air Soil Pollut* 1:225-1962.

Decesaro A, Rigon MR, Thomé A, Colla LM. (2013). Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Quim. Nova* 36:947-954.

Deon MC, Rossi A, De Magro CD, Reinehr CO, Colla LM (2012) Bioremediation of contaminated soil with oils residuals through bioaugmentation and natural attenuation. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*33:73-82.

Hanson KG, Desai DJ, Desai AJA (1993) Rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques* 10: 745-748.

Harms H, Schlosser DW (2011) Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*9:177-192.

Herath K, Harris G, Jayasuriya H, Zink D, Smith S, Vicente F (2009) Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipodepsipeptide from a Widespread Tropical *Phoma* sp. *Bioorg Med Chem* 17:1361-1369.

Jackisch-Matsuura AB, Santos LS, Eberlin MN, Faria AF, Grossman MJ, Durrant LR (2014) Production and characterization of surface-active compounds from *Gordonia amicalis*. *Braz Arch Biol Technol* 57:138-144.

Jacques RJS, Bento FM, Antonioli ZI, Camargo FO (2007) Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural* 37:1192-1201.

Junior NL, Gern RMM, Furlan SA, Schlosser D (2012) Laccase production by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting chemicals. *Appl Biochem Biotechnol* 167:1144-1156.

Luz CC, Santos EA, Santos MOS, Mussu MY, Yamashita M, Bastos WR (2011) Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – RO, Amazônia. *Quim Nova*34:775-779.

Maciel CCS, Souza CS, Silva PA, Sousa MFVQ, Gusmão NB (2013) Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. *R Brás Biocil* 1:39-42.

Moldes AB, Paradelo R, Vecino X, Cruz JM, Gudiña E, Rodrigues L, Barral MT (2013) Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecylsulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *Bio Med Research International*3:1-6.

Mollea C, Bosco F, Ruggeri B (2005) Fungal biodegradation of naphthalene: Microcosms studies. *Chemosphere* 60:636-643.

Neoh CH, Lam CY, Lim CK, Yahya A, Ibrahim Z (2015) Utilization of agro-industrial residues from palm oil industry for production of lignocellulolytic enzymes by *Curvularia clavata*. *Waste Biomass Valor* 6:385–390.

Neoh CH, Lam CY, Ware AYI, Ibrahim Z (2014) Decolorization of palm oil mill effluent using growing cultures of *Curvularia clavata*. *Environ Sci Pollut Res Int* 21:4397–4408.

Nitschke M, Pastore GM (2002) Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. *Quim Nova* 25:772-776.

Oliveira SD, Lemos JLS, Barros CA, Leite SGF (2008) O Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: Estado da Arte. *Série Tecnologia Ambiental* 45. CETEM/MCT. Rio de Janeiro. RJ.

Paraszkiewicz K, Kanwal A, Długon'ski J (2002) Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularialunata*. Growth and product characterization. *J Biotechnol* 92: 287–294.

Paraszkiewicz K, Kanwal A, Długonski J (2002) Emulsifier production by steroidtrans forming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J. Biotechnol* 92:287–294.

Rapp, P, Backhaus S (1992) Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast, and bacteria. *Enzymeand Microbial Technology* 14:938-943.

Silva M, Espósito E (2004) O papel dos fungos na recuperação ambiental. *In: Espósito E, Azevedo JL. (eds.) Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.* EDUCS, Caxias do Sul, BR, 337-375.

Sourav De, Susanta M, Ghosh A, Saha R, Saha B (2015) A reviewon natural surfactants. *RSC Adv* 5:65757-65767.

Indicadores microbiológicos em diferentes sistemas de manejo do solo na Amazônia Meridional

Malheiros CH¹, Stieven A.C², Santos J.O³, Almeida L.S², Campos DT S⁴, Oliveira LA⁵

¹ Universidade do Estado do Amazonas, UEA- PPG-Bionorte, ² Universitário de Várzea Grande, UNIVAG, Várzea Grande, MT, ³ Empresa Mato-Grossense de Pesquisa Assistência e Extensão Rural, ⁴ Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, ⁵ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. INPA. Email. chmalheiros@gmail.com

Resumo

As iLPFs são manejos que integram as atividades de agricultura, pecuária e floresta visando diminuir a degradação ambiental e aumentar os lucros. O objetivo do presente estudo foi avaliar os indicadores de qualidade do solo de uma área com sistemas de integração Lavoura-Pecuária-Floresta (iLPF), em Nova Canaã do Norte-MT. A coleta das amostras de solo foi feita em maio de 2013, onde as mesmas foram coletadas no sentido transversal às linhas das espécies florestais (eucalipto e paricá) em sete diferentes distâncias: 0, 3, 6 e 10 m à esquerda e direita do pé da planta. Na avaliação da qualidade do solo utilizou-se os indicadores: Carbono da Biomassa Microbiana (CBM), Respiração Basal (RB) e o Quociente Metabólico (qCO₂). O método utilizado para a determinação do CBM foi o da fumigação e os demais indicadores obtiveram-se a partir dos dados de CBM. Os resultados destacam os sistemas de iLPF com uso de eucalipto frente aos sistemas com uso de paricá como planta perene, nos indicadores CBM e qCO₂. Porém, os sistemas, em geral, não apresentam diferenças estatísticas na maioria das comparações, o que sugere a estabilidade dos mesmos. Os resultados preliminares não sugerem benefícios ao solo com o uso de sistemas de integração após 5 anos de instalação.

Palavras-chaves: carbono da biomassa microbiana, sustentabilidade, iLPF

Introdução

Os sistemas iLPF incorporam conceitos e práticas de uso sustentável dos recursos naturais, máxima biodiversidade, uso conservacionista do solo e da água, além de agregar valor aos produtos agropecuários. O emprego de sustentabilidade desses sistemas está relacionado, entre outros fatores, aos benefícios para o solo, destacando: a melhoria da

qualidade química, física e biológica, estrutura, cobertura e maior armazenamento de água no solo (Kluthcouski et al., 2003).

A biomassa microbiana do solo (BMS) compreende a parte viva da matéria orgânica, e é considerado um indicador de qualidade do solo, uma vez que infere medidas qualitativas e quantitativas nos processos ecológicos e nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, imediatamente após qualquer mudança do ambiente. Dessa forma, pelo fato de muitos microrganismos utilizarem a fração disponível da matéria orgânica do solo (MOS), estes são mais sensíveis às mudanças em sua qualidade e mudanças significativas na BMS que podem ser detectadas muito antes que alterações na MOS possam ser percebidas, possibilitando a adoção de medidas de correção antes que a perda da qualidade do solo seja mais severa (Santos *et al.*, 2005).

O reservatório de carbono microbiano é fortemente influenciado pelos sistemas de manejo do solo, tipo e intensidade da rotação de culturas e pela incorporação de adubos orgânicos e resíduos culturais, e os indicadores microbiológicos usados para fazer essa avaliação são: o Carbono da Biomassa Microbiana (CBM), que afere o fluxo de energia e transformação do C; a Respiração Basal (RB), que reflete a atividade da BMS responsável pela degradação de compostos orgânicos; e o Quociente Metabólico (qCO_2), que indica estresse, perturbação ou estabilidade do ecossistema (Ferreira, 2006).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o CBM, RB e qCO_2 como indicadores microbiológicos presentes em diferentes sistemas de manejo do solo na Amazônia Meridional.

Material e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido com solo da Fazenda localizada na Amazônia Meridional, município de Nova Canaã do Norte, Mato Grosso, entre a latitude S10°33'29" e longitude W55°57'11", sendo uma área de transição dos Biomas Cerrado e Amazônia. O solo da propriedade é classificado como um Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico (LVAd) de textura argilosa. O clima da região é classificado segundo Koppen como Aw, com temperaturas médias anuais entre 4 e 40 °C e precipitação média anual de 2.500 mm.

As amostras de solo foram coletadas em um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico, na profundidade de 0-20 cm, com oito tratamentos em uma área de 5 ha para cada um deles, sendo: T1: iLPF linha simples de; T2: iLPF linha dupla de eucalipto; T3: iLPF linha tripla de; T4: iLPF linha simples de; T5: iLPF linha dupla de paricá; T6: iLPF linha tripla de paricá; T7:

área de rotação entre lavoura na safra e pasto na entre safra e T8: área de mesmo tamanho, com mata nativa. Os sistemas de iLPF foram implantados em Dezembro de 2008 e a partir da safra de 2011/2012 os sistemas permaneceram nas entrelinhas plantio de soja na safra, milho na safrinha e *Brachiaria ruziziensis* na entressafra.

Para avaliar o Carbono da Biomassa Microbiana (CBM), Respiração Basal (RB) e o Quociente Metabólico (qCO_2) como indicadores microbiológicos utilizou-se o método de fumigação-incubação de Jenkinson e Powlson (1976) modificado. A RB foi obtida pela diferença da medição de carbono emanado das amostras fumigadas e não-fumigadas durante o período de incubação. E o qCO_2 foi determinado pela razão entre a RB e o CBM. Todas as determinações foram feitas em triplicatas e os resultados expressos com base no peso de solo seco. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software ASSISTAT, versão 7.5, beta (Silva e Azevedo, 2002), com comparações das médias pelo Teste de Tukey a 5 %.

Resultados e Discussão

As concentrações do carbono da biomassa microbiana (CBM) não apresentaram variação entre os sistemas avaliados e as distâncias do pé da planta perene (Tabela 1).

Tabela 1 - Carbono da biomassa microbiana (CBM) de um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico, coletas de 0-20 cm de profundidade, para oito sistemas diferenciados de uso e manejo do solo na Amazônia Meridional.

Tratamento	Distância (m)			
	0	3	6	10
	----- $\mu\text{g C g solo}^{-1}$ -----			
iLPF linha simples de eucalipto	15,39 aA	18,15 aA	21,83 aA	22,31 aA
iLPF linha dupla de eucalipto	14,43 aB	24,97 aA	15,11 aB	13,12 aB
iLPF linha tripla de eucalipto	18,33 aA	24,55 aA	18,85 aA	21,31 aA
iLPF linha simples de paricá	18,76 aA	20,80 aA	16,87 aA	18,69 aA
iLPF linha dupla de paricá	19,25 aA	14,24 aA	15,41 aA	19,01 aA
iLPF linha tripla de paricá	16,84 aA	20,87 aA	21,57 aA	16,57 aA
Rotação Soja/Pasto	15,70 aA	15,70 aA	15,70 aA	15,70 aA
Mata nativa	21,82 aA	21,82 aA	21,82 aA	21,82 aA
CV% = 39,67				

*As médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Apesar da similaridade dos sistemas, é possível observar no sistema de iLPF linha simples de eucalipto, um incremento nas concentrações de CBM com relação a maior distância do pé da planta perene, com valor de 15,39 $\mu\text{g C g solo}^{-1}$ em 0 m, 18,15 $\mu\text{g C g solo}^{-1}$ a 3 m, 21,83 $\mu\text{g C g solo}^{-1}$ a 6 m e 22,31 $\mu\text{g C g solo}^{-1}$ a 10 m, entretanto, esse fato não se observa nos demais tratamentos. Nos sistemas de rotação soja/pasto e mata nativa, observa-se valor muito superior em áreas de mata, com 21,82 $\mu\text{g C g solo}^{-1}$, enquanto para rotação obteve-se 15,70 $\mu\text{g C g solo}^{-1}$ de CBM.

Na literatura é relatado que os teores de CBM podem ser alterados durante os anos, e diversos estudos realizados no Brasil constataram diferenças no teor de CBM entre épocas de amostragem, principalmente em função do ciclo das plantas, da adição de resíduos vegetais, da pluviosidade e da temperatura (Anderson e Domsch, 1993; Brandão Junior et al., 2008), dessa forma pode-se justificar a não diferenciação dos sistemas, o que sugere a necessidade de coletas e amostragem em diferentes períodos.

Um estudo sobre diversidade metabólica e atividade microbiana de solos sob integração Lavoura-Pecuária, discute que a diversidade de espécies vegetais proporcionam maiores quantidades de diferentes substratos (exsudatos liberados pelas plantas) que são utilizados pela microbiota do solo como fonte de carbono (Chavéz et al., 2011), entretanto, os dados do presente estudo não corroboram com os encontrados pelo autor, uma vez que áreas de iLPF possuem maior diversidade de resíduos vegetais comparadas as áreas de rotação soja/pasto, mas não apresentam diferenças estatísticas significativas.

As quantificações da respiração basal (RB) apresentam diferenças entre as distâncias e entre os tratamentos avaliados (Tabela 2). Para a distância de 0 m do pé da planta perene destaca-se a RB sob iLPF linha tripla de eucalipto, com 29,33 $\mu\text{g CO}_2 \text{ g solo}^{-1}$, entretanto para 3 e 6 o sistema de iLPF composto por paricá apresenta maior RB, sendo 32,46 $\mu\text{g CO}_2 \text{ g solo}^{-1}$ em iLPF linha tripla de paricá a 3 m e 36,77 $\mu\text{g CO}_2 \text{ g solo}^{-1}$ em iLPF linha simples de paricá a 6 m. Aos 10 m não foram encontradas diferenças significativas entre os sistemas. Os valores de RB em solo sob paricá são os maiores encontrados nesta avaliação, o que destaca esse sistema em relação aos demais.

A taxa de respiração basal do solo está relacionada com a maior atividade biológica, a qual é diretamente proporcional à fração de carbono lábil no solo (Tótola e Chaer, 2002), com base neste conceito, pode se inferir que as plantas de paricá forneçam mais carbono lábil ao solo, comparado ao eucalipto, sendo uma informação importante para tomada de decisão quanto à espécie vegetal perene a ser incorporada no sistema de integração.

Uma vez que, ao comparar diferentes biomassas microbianas, quanto a sua eficiência, Insam e Domsch (1988) consideram que a biomassa mais eficiente seria aquela que perde menos carbono na respiração e incorpora mais à suas células. Dessa forma, a utilização de paricá nos sistemas não é deve ser recomendada para este sistema.

De acordo com a literatura, há uma relação inversa entre CBM e qCO_2 , ou seja, maiores teores de carbono causam diminuição na atividade metabólica e aumento da biomassa microbiana (Balota et al., 1998; Moreira e Malavolta, 2004), essa relação pode ser confirmada quando comparamos os sistemas de rotação soja/pasto e mata nativa. Por outro lado, essa mesma inversão não é visível em todos os sistemas de iLPF.

Ao contrário do observado para a RB, os índices de qCO_2 destacam sistemas de iLPF com eucalipto (Tabela 3). Observa-se maior qCO_2 em iLPF linha simples e dupla de eucalipto para 0 m e 10 m, respectivamente, apresentando valores de 2,20 e 2,41 $\mu g CO_2 \mu g Cmic dia^{-1}$. Para os sistemas convencionais, observa-se maior taxa de qCO_2 em rotação soja/pasto comparado a mata nativa, com 1,48 e 1,02 $\mu g CO_2 \mu g Cmic dia^{-1}$, respectivamente.

Tabela 2 - Respiração Basal (RB) de um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico, coletas de 0-20 cm de profundidade, para oito sistemas diferenciados de uso e manejo do solo na Amazônia Meridional.

Tratamento	Distância (m)			
	0	3	6	10
	----- $\mu g CO_2 g solo^{-1}$ -----			
iLPF linha simples de eucalipto	25,21 abA	24,02 bA	27,63 bA	27,76 aA
iLPF linha dupla de eucalipto	20,88 bB	29,30 abA	24,85 bAB	27,15 aAB
iLPF linha tripla de eucalipto	29,33 aA	28,45 abA	27,93 bA	27,46 aA
iLPF linha simples de paricá	24,35 abB	28,48 abB	36,77 aA	25,59 aB
iLPF linha dupla de paricá	22,96 abA	22,39 bA	24,46 bA	23,31 aA
iLPF linha tripla de paricá	25,73 abAB	32,46 aA	27,33 bAB	24,75 aB
Rotação Soja/Pasto	23,19 abA	23,19 bA	23,19 bA	23,19 aA
Mata nativa	22,16 abA	22,16 bA	22,16 bA	22,16 aA
	CV% = 21,31			

*As médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

A relação $Cmic:COT$, responsáveis pelos valores obtidos de qCO_2 , indicam a presença de MO muito ativa e sujeita a transformações, pois é um indicador de disponibilidade da MO

para os microrganismos (Sampaio et al., 2008), o que confirma que os sistemas iLPF disponibilizam mais MO aos microrganismos, uma vez que as taxas de qCO_2 são maiores.

Tabela 3 - Quociente metabólico (qCO_2) de um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico, coletas de 0-20 cm de profundidade, para oito sistemas diferenciados de uso e manejo do solo na Amazônia Meridional.

Tratamento	Distância (m)			
	0	3	6	10
	----- $\mu g CO_2 \mu g Cmic dia^{-1}$ -----			
iLPF linha simples de eucalipto	2,20 aA	1,47 aA	1,45 abA	1,50 abA
iLPF linha dupla de eucalipto	1,90 abAB	1,35 aB	1,95 abAB	2,41 aA
iLPF linha tripla de eucalipto	2,03 abA	1,33 aA	1,94 abA	1,34 abA
iLPF linha simples de paricá	1,61 abA	1,81 aA	2,36 aA	1,57 abA
iLPF linha dupla de paricá	1,46 abA	1,75 aA	1,78 abA	1,51 abA
iLPF linha tripla de paricá	1,63 abA	1,57 aA	1,43 abA	1,96 abA
Rotação Soja/Pasto	1,48 abA	1,48 aA	1,48 abA	1,48 abA
Mata nativa	1,02 bA	1,02 aA	1,02 bA	1,02 bA
	CV% = 46,32			

* As médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Conclusões

Os sistemas de eucalipto destacam-se, em dois indicadores, CBM e qCO_2 frente aos sistemas com o uso de paricá.

Os resultados preliminares não sugerem benefícios ao solo com o uso de sistemas de integração após 5 anos de manutenção do sistema.

Sugere-se maior investigação do sistema, com coletas temporais e outros indicadores de qualidades microbiológicas do solo.

Referências

Anderson TH, Domsch KH (1993) The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soil. *Soil Biol & Bioch* 25:393-95.

Balota EL, Colozzi-filho A, Andrade DS, Hungria M (1998) Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 22:641-649.

Brandão Junior O, Hungria M, Franchini JC, Espindola CR (2008) Comparação entre métodos de fumigação extração e fumigação incubação para determinação do carbono da biomassa microbiana em um latossolo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 32:1911-1919.

Chavéz LF, Escobar LF, Anghinoni I, Carvalho PCF, Meurer EJ (2011) Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de iLPF sob intensidades de pastejo. *Pes Agrop Brasileira* 46:1254-61.

Ferreira AP, Cunha CLN, Wermelinger ED, Souza MB, Lenzi MF, Mesquita CM, Jorge LC (2006) Impactos de pesticidas na atividade microbiana do solo sobre a saúde dos agricultores. *Rev Baiana de Saúde Pública* 30:309-21.

Insam H, Domsch KH. (1988) Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microbial Ecology* 15:177-88.

Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia - IMAZON. 2015. Disponível em: <http://imazon.org.br/categorias-mapas/amazonia-legal/>. Acessado 20 julho 2015.

Jenkinson DS, Powlson DS (1976) The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform. *Soil Biol Bioch* 8:167-77.

Kaschuck G, Adalberton O, Hungria M (2010) Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability *Soil Biology and Biochemistry*. 42:1-13.

Kluthcouski J, Stone LF, Aidar H (2003) Integração Lavoura-Pecuária. Embrapa, Santo Antônio de Goiás, GO. Moreira A, Malavolta E (2004) Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solo submetido a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental. *Pesq. Agropecuária Brasileira* 39:1103-10.

Sampaio DB, Araujo ASF, Santos VB (2008) Avaliação de indicadores biológicos de qualidade do solo sob sistemas de cultivo convencional e orgânico de frutas. *Ciência e Agrotecnologia* 32:353-59.

Santos JB, Jakelaitis A, Silva AA, Vivian R, Costa MD, Silva AF (2005) Atividade microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto. *Planta Daninha* 23:683-91.

Silva FASE, Azevedo CAV (2002) Versão do programa computacional Assistant para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 4:71-78.

Tótola MRE, Chaer GM (2002) Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. Tópicos em ciência do solo. *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*: Viçosa, MG.

Bactérias endofíticas com potencial de degradar hidrocarbonetos, isoladas a partir de macrófitas aquáticas, coletadas em áreas portuárias de Manaus - AM.

Marinho, M. P. S. ¹, Souza, R. D. N. S. ¹, Santos, J.C. ², Lima, J. M. S. ², Pereira, J. O. ²,
Batista, I. H. ¹, Ferreira, F. S. ¹

¹Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. ² Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Manaus. E-mail: priscila_marinho18@hotmail.com

Resumo

O problema da poluição ambiental tem caráter mundial. As áreas portuárias são locais acometidos diariamente com diversos tipos de contaminantes. Nessas áreas encontram-se uma variedade de Macrófitas Aquáticas. Os endofíticos são microrganismos que habitam os tecidos internos de plantas auxiliando em seus processos metabólicos. O presente trabalho consistiu no isolamento de bactérias endofíticas com potencial para degradação de hidrocarbonetos de petróleo a partir de macrófitas aquáticas coletadas em duas áreas portuárias de Manaus- AM. Foram isoladas 142 bactérias, que após purificação foram testadas em ensaio de biodegradabilidade com indicador Redox 2,6 – Diclorofenol Indofenol (DCPIP). As bactérias M111, M136, M113, M91, M87 e M18 apresentaram resultado positivo para o teste de biodegradabilidade, descolorindo o meio em até 48 horas. Pelos resultados positivos obtidos estes micro-organismos merecem mais investigações acerca de seu potencial degradador.

Palavras Chave: Macrófitas aquáticas. Bactérias Endofíticas. Biodegradação.

Introdução

Na Amazônia há uma ampla diversidade de micro-organismos, destacando-se a microbiota endofítica, que habitam tecidos internos das plantas (Ryan et al, 2008). Os micro-organismos desempenham importante papel ambiental, uma vez que podem utilizar contaminantes como fonte de energia, podendo, desempenhar a função de restauração dos padrões ambientais (Melo e Azevedo, 1997). A partir de técnicas de degradação denominada de biorremediação.

Metodologias utilizando bactérias têm revelado o grande potencial desses micro-organismos no processo de descontaminação de áreas poluídas, apresentando um custo relativamente baixo e resultados significativos. (Fu e Viraraghavan, 2001).

De acordo com Souza (2015), ambientes classificados como altamente e moderadamente contaminados estão situados na costa da cidade Manaus. Dessa forma mostra a relação da alta atividade de navegação como fonte direta de contaminação com derivados de petróleo. Nessas áreas portuárias encontram-se uma variedade de macrófitas aquáticas, que são vegetais que habitam desde brejos até ambientes totalmente submersos. Essas plantas constituem-se em uma importante comunidade em ecossistemas aquáticos (Esteves, 1998).

A escolha destes vegetais neste trabalho deve-se a presença destas plantas em ambientes contaminados e poluídos. Este aspecto trouxe o interesse em investigar a relação de micro-organismos endofíticos dessas macrófitas com a capacidade de resistir a esses ambientes.

Nesse sentido, consideram-se as associações entre macrófitas aquáticas e micro-organismos que possam estar contribuindo para a transformação de compostos poluentes em moléculas com menor impacto ao ambiente. Dentro desse contexto, o presente estudo compreende o isolamento de bactérias endofíticas com potencial para degradação de hidrocarbonetos de petróleo, contribuindo para o conhecimento do potencial de degradação por micro-organismos oriundos da biodiversidade amazônica.

Material e Métodos

As amostras foram coletadas em áreas portuárias, cercadas pelo Rio Negro, na cidade de Manaus-AM, onde há um fluxo recorrente de embarcações e conseqüente derrame de derivados do petróleo como óleo diesel. As áreas portuárias de realização das coletas foram: Porto Hidroviário da Manaus Moderna localizado no Bairro Centro e Porto Marina do Davi localizada no Bairro da Ponta Negra.

Foram coletadas folhas, caules e raízes das plantas com aparência sadia, sem sintomas visuais de doenças ou lesões. As espécies coletadas foram a *Eichornea crassipes* (No Porto Hidroviário da Manaus Moderna – Centro) e, *Sauvinia auriculata* e uma macrófita não identificada cujo nome vulgar é Gramínea aquática (Coletada no Porto Marina do Davi – Tarumã).

Após a coleta, as amostras foram colocadas em sacos plásticos e levadas até o laboratório de Biodegradação na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde ocorreu o isolamento dos micro-organismos. O isolamento das bactérias endofíticas foi realizado de

acordo com a metodologia adaptada de Pereira (1993). Inicialmente, foram cortadas com auxílio de uma tesoura, as folhas e as raízes que foram higienizadas com água corrente com auxílio de uma esponja nova e macia e detergente neutro; enxaguadas com água destilada e colocadas para secar em uma bandeja forrada com papel toalha autoclavado.

Em câmara de fluxo laminar as amostras foram submetidas à desinfecção superficial em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% por 4 minutos, lavado em solução de álcool 70% por 30 segundos para retirar o excesso de cloro da superfície e para retirar todo o restante das soluções, os materiais foram lavados três vezes com água destilada ou bidestilada esterilizada. Como controle da assepsia do material isolado, a água de lavagem foi inoculada em placas de Petri contendo os meios de cultura, com auxílio de uma alça de drigalski.

Após a desinfestação superficial, as folhas foram cortadas em fragmentos de cerca de 0,7 cm, com o auxílio de um furador, e as raízes foram cortadas em fragmentos medindo cerca de 0,1 cm a 0,3 cm, com o auxílio de um bisturi, que foram inoculados em placas de Petri contendo meio BH- Bushell Hass (g/L: sulfato de magnésio: 0,20, cloreto de cálcio: 0,02, fosfato monopotássico: 1,0, fosfato dipotássico: 1,0, nitrato de amônio: 1,0, cloreto férrico: 0,05, ágar: 20,0) com fungicida e petróleo (5mL/L). Foram preparadas duas placas, com o mesmo meio, para cada macrófita, com semeadura de 1 mL da água destilada usada para a desinfecção como controle do isolamento. As placas foram incubadas a 28 °C sendo visualizadas diariamente no período de 24 às 96h. Após o período de crescimento das bactérias, as placas foram então levadas à câmara asséptica para repicagem dos isolados para tubos de ensaio contendo o mesmo meio do isolamento. Esses tubos foram datados e identificados em seguida guardados em recipientes plásticos à temperatura ambiente.

Após o isolamento realizou-se a purificação das bactérias por meio da técnica de esgotamento por estrias. As bactérias foram retiradas dos tubos onde estavam armazenadas, e dispostas em placas contendo meio NA (Nutriente Ágar), em estrias. Após 24 horas foi retirada uma colônia de um ponto isolado da placa, sendo estriada novamente em outro tubo de ensaio contendo NA sólido e em seguida foram acondicionadas na geladeira a 16 °C.

Para a preservação das bactérias purificadas, foi retirada uma alçada da colônia bacteriana, sendo inseridas em tubos tipo *ependorf* específicos para cada bactéria contendo meio NA líquido. Os tubos foram mantidos a 170 rpm a 28°C durante 24 horas. Após esse período, foi retirado 1 mililitro da colônia para ser introduzido em tubos criogênicos contendo água destilada e glicerol a 20%. Após esse processo, os tubos foram acondicionados no congelador a - 5 °C.

Foi verificado se os isolados eram capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo. O teste de biodegradabilidade foi realizado usando a técnica baseada no uso do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (Hanson et al, 1993). O meio para o teste de biodegradabilidade foi preparado com meio BH- Büshnell-Haas. Os pocinhos, das microplacas, contendo o meio BH, foram preenchidos com uma pipeta de precisão, com 200 µL de indofenol e 10 µL de petróleo.

Cada bactéria foi introduzida, com auxílio da alça de platina, em dois pocinhos. A primeira coluna foi utilizada como controle 1 (meio BH + indofenol + petróleo/ sem bactéria) e a segunda como controle 2 (meio BH + indofenol + bactéria/ sem petróleo). As microplacas foram mantidas a (28±2 ° C). A mudança de tonalidade na coloração do meio em cada inóculo foi avaliada após 24 e 48 h, para detecção de atividade biodegradadora. As bactérias que apresentaram resultados positivos foram submetidas à coloração de GRAM e suas características macroscópicas, cor e consistência, foram registradas.

Resultados e Discussão

Foram coletadas para isolamento de endofíticos três macrófitas aquáticas. Dentre essas somente duas foram identificadas a *Eichornea crassipes* e a *Sauvinia auriculata*. A macrófita que não foi identificada foi a Gramínea aquática.

Foram obtidas 142 bactérias endofíticas sendo 82 isolados de *Eichornnia crassipes*, 14 isoaldos de *Salvinia auriculata* e 69isolados da gramínea aquática (Tabela 1).

Tabela 1: Bactérias endofíticas isoladas a partir de *Eichornnia crassipes*, *Sauvinia auriculata* e Gramínea aquática.

Origem	Número de fragmentos infectados	Índice de colonização %
<i>Eichornea crassipes</i>		
Folha	18	50,00%
Raiz	14	38,80%
Gramínea aquática		
Folha	9	25,00%
Raiz	8	22,20%
<i>Salvinia auriculata</i>		
Folha	2	5,50%
Raiz	5	13,80%

Os índices de colonização foram, respectivamente para folha e raiz, 50% e 38,8% (*Eichornea sp.*), 5,5% e 13,8% (*Salvinia auriculata*) e 25% e 22,2% (gramínea aquática). A maior quantidade de bactérias endofíticas isoladas foi a partir da espécie *Eichornea crassipes*, sendo que, a parte da planta que mais se obteve isolado foram as folhas apresentando um maior índice de colonização (Tabela 2).

Tabela 2: Número de isolamento de bactérias endofíticas isoladas de *Eichornia crassipes*, *Sauvinia auriculata* e *Gramínea aquática*.

Origem	Parte da planta		Total
	Folha	Raíz	
<i>Eichornea crassipes</i>	41	41	76
Gramínea aquática	30	16	46
<i>Salvinia auriculata</i>	3	11	14
Total	74	68	142

A colonização das bactérias ocorreu nas folhas e nas raízes das plantas resultados esses que corroboram aqueles obtidos por Rosenblueth e Romero (2006) que encontraram bactérias endofíticas em diversos tecidos de plantas. As folhas das macrófitas apresentaram o maior índice de colonização. Estes resultados divergem daqueles encontrados por Martins (2011), pois, na maioria das plantas estudadas, nos tecidos das raízes encontram-se valores mais elevados de endofíticos comparativamente aos tecidos das partes aéreas.

Araújo (2014) isolou 155 bactérias da macrófitas aquática *Eichornia crassipes* sendo que 58 eram de origem endofítica oriunda das folhas, das raízes e das flores da planta em local portuário com resíduo de petróleo e óleo diesel. Batista (2009) isolou 71 bactérias, sendo 29 de origem endofítica, oriundas de folhas, caules, bulbos e raízes da macrófita aquática *Eichornia crassipes* coletadas em local com resíduos de petróleo.

Todos os isolados foram testados para a verificação do potencial de biodegradabilidade de hidrocarbonetos de petróleo. A biodegradabilidade foi observada a partir da mudança da tonalidade do meio azul a incolor (Figura 1).

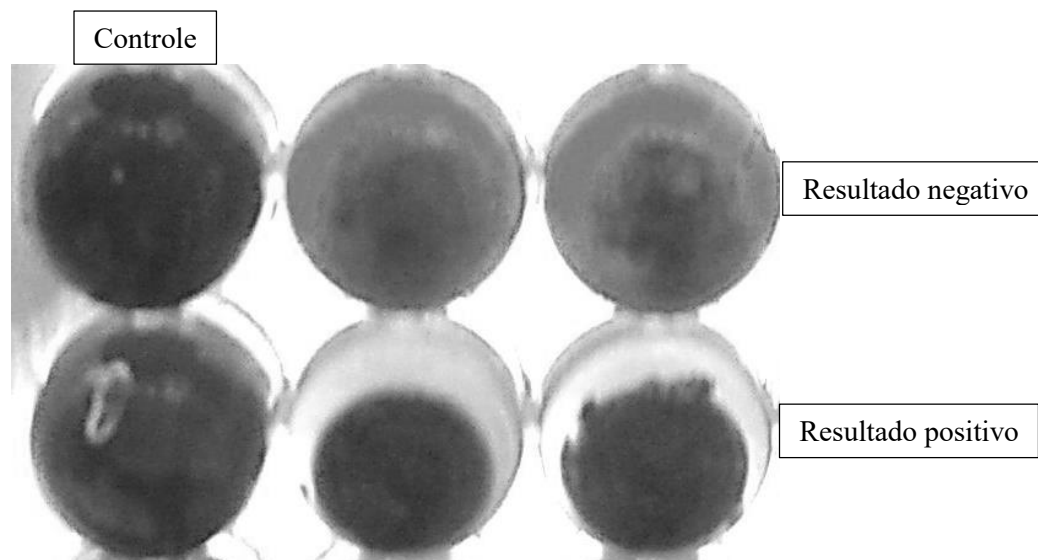


Figura 1: Teste de biodegradabilidade. Bactérias testadas com o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), mostrando o resultado positivo e negativo para o teste, nos tempos de 24 a 48 horas de incubação para confirmação de potenciais degradadores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com a mudança da coloração do azul para o incolor.

Dos 142 isolados, 6 bactérias apresentaram atividade de biodegradabilidade no intervalo de 24 e 48 horas, sendo que no período de 24 horas, três bactérias (M111, M136 e M87) promoveram a descoloração do meio e em 48 horas outras três modificaram a coloração (M113, M91 e M18) (Tabela 3). Dentre as demais bactérias, algumas modificaram a cor do meio em tempos maiores que 48 horas e outras não alteram essa coloração.

Tabela 3: Relação entre a biodegradação realizada pelas bactérias e o tempo.

Isolados (Cepas) / Código *M	Biodegradação / Tempo (horas) *X	
	24h	48h
M 111	X	
M 136	X	
M 113		X
M 91		X
M 18		X
M 87	X	

*X: Indica o resultado em horas da biodegradação.

Esses resultados corroboram com os descritos por Araújo (2014), que em seu estudo, utilizando o método do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), demonstrou que

bactérias provenientes de macrófitas aquáticas de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados possuem a capacidade de utilizar o petróleo como fonte de carbono. As bactérias isoladas em seu estudo apresentaram tempo menor de descoloração demonstrando com isso a possibilidade de selecionar micro-organismos com habilidades para degradar os hidrocarbonetos de petróleo e derivados, a partir desse teste.

Os trabalhos de Peixoto e Vieira (2005) indicam que os testes são eficientes e rápidos para a detecção da capacidade de biodegradação de compostos, especificamente de hidrocarbonetos de petróleo, utilizando o redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) para reações de óxido-redução.

Quanto às características macroscópicas e microscópicas das cepas testadas foi observadas que M111 é um bacilo pequeno Gram-negativo, a cor da cultura é creme claro com consistência cremosa; M 136 é um bacilo Gram-positivo, a cor da cultura é creme médio com consistência cremosa; M 87 apresenta forma de coco Gram-positiva, a cor da cultura é amarela com consistência cremosa; M113 bacilo Gram-positivo, a cor da cultura é creme escuro tendendo ao marrom e consistência cremosa e M91 bacilo pequeno Gram-negativo, a cor da cultura é creme médio com consistência cremosa; M18 é um bacilo Gram-negativo, a cor da cultura é creme claro também com consistência cremosa. Estas cepas foram isoladas de folhas e raízes de *Eichornea crassipes* e de Gramínea Aquática (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização morfológica das linhagens de endofíticos que apresentaram potencial biodegradador e enzimático.

Cepas *Código M	Planta Hospedeira	Orgão da planta	Forma das células	Característica da cultura		Gram
				Cor	Consistência	
M 111	<i>Eichornea crassipes</i>	Raíz	Bacilo	Creme claro	Cremosa	-
M 136	<i>Eichornea crassipes</i>	Raíz	Bacilo	Creme médio	Cremosa	+
M 113	Gramínea aquática	Folha	Bacilo	Creme escuro (Tendendo ao marrom)	Cremosa	+
M 91	Gramínea aquática	Folha	Bacilo pequeno	Creme médio	Cremosa	-
M 18	<i>Eichornea crassipes</i>	Raiz	Bacilo pequeno	Creme claro	Cremosa	-
M 87	<i>Eichornea crassipes</i>	Raiz	Coco	Amarelo	Cremosa	+

*Código M = Mayra, 2014.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, o isolamento de endofíticos a partir das macrófitas coletadas pode ser considerado positivo, visto que, foi possível isolar 142 bactérias endofíticas em meio seletivo para degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Destacou-se neste estudo a macrófita *Eichornea crassipes*, de onde foi obtido o maior número de isolados.

O teste de biodegradabilidade utilizando o Indicador Redox 2,6 – indofenol diclorofenol DCPIP realizado, mostrou-se eficaz para a observação da capacidade de biodegradabilidade de bactérias endofíticas. Através dele selecionou-se 6 linhagens de bactérias isoladas com capacidade de biodegradar hidrocarbonetos em 24 e 48 horas. Estes microrganismos merecem investigações mais detalhadas para confirmar seu poder biodegradador.

Os resultados obtidos podem proporcionar conhecimentos e informações para aperfeiçoar técnicas e desenvolver processos biotecnológicos utilizando os microrganismos oriundos de áreas portuárias de Manaus/AM.

Os estudos demonstram, portanto, a capacidade de micro-organismos da biodiversidade Amazônica em realizar processos de biodegradação, contribuindo para o conhecimento da microbiota Amazônica.

Referências Bibliográficas

Araújo SP (2014). Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na Amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Tese de doutorado (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. 158p.

Batista IH (2009). Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: Um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia Crassipes* na Amazônia. Tese de doutorado (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. 184p.

Fu Y, Viraraghavan T (2001). Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology*: v.79, p. 251 – 262.

Hanson KG, Desai DJ, Anjana J (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology techniques*. v. 7 n°10: 745-748.

Esteves FA (1998). Fundamentos de Limnologia. Ed. Interciências/FINEP. Rio de Janeiro, R. J. Cap. 20: p. 316-373.

Martins VCM (2011). Comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Halimione portulacoides*. Departamento de Biologia Universidade de Aveiro

Melo IS, Azevedo JL (1997). Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 440 p.

Peixoto RM, Vieira JDG (2005). Determination of the degrading potential of bacteria isolated from an environment impacted by petroleum and derivatives using 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP). *In: First Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology*, Natal – RN, Brasil.

Pereira JO (1993). Fungos endófitos de hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendishii*. Piracicaba-tese de Doutorado.

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan D e Dowling DN (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*. 278: 1-9.

Rosenblueth M and Martinez-Romero E (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact*. 19: 827-837.

Souza HML et al (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Superficial Sediments of the Negro River in the Amazon Region of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 26, No. 7, 1438-1449, 2015. Printed in Brazil.

Wetler-Tonini RMC et al (2011). Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados. *Rev. Virtual Quim.*, 2011, 3 (2), 78-87. Data de publicação na Web: 30 de junho de 2011.

Tolerância de rizóbios à acidez e ao alumínio

Menezes N.C.¹; Oliveira L.A.²

¹ Tecnóloga em Petróleo e Gás, Mestre em Agricultura no Trópico Úmido. ² Pesquisador - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. naramenezes19@hotmail.com
luizoli@inpa.gov.br

Resumo

A maioria dos solos amazônicos apresenta boas propriedades físicas, mas possuem alta saturação de Al e acidez, prejudiciais ao desenvolvimento de plantas. Uma alternativa para reduzir estes efeitos negativos é o uso de micro-organismos em simbiose com a planta. O objetivo deste trabalho foi avaliar rizóbios capazes de tolerar a acidez e alumínio tóxico. A metodologia consistiu em avaliar 31 isolados em meios de cultura YMA com pH 4,5+Al (2 cmolc L⁻¹) e pH 6,5, atribuindo notas de crescimento que variam de 1,00 a 4,00, durante 15 dias. Os resultados mostraram que das 31 bactérias testadas, 29 apresentaram crescimento acima de 3,06 no meio controle, com pH 6,5. Quanto à tolerância ao pH 4,5+Al, somente 9 isolados mostraram crescimento superior a 3,06, sendo assim, tolerantes à acidez e alumínio. Esses isolados tolerantes às condições de acidez e toxidez de Al apresentam potencial para sobreviverem nos latossolos e argissolos da Amazônia, podendo ser usados futuramente em inoculantes para leguminosas, caso apresentem outras características agronômicas desejáveis.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano, Ecologia microbiana, Amazônia

Introdução

O solo é um componente ambiental complexo e suas variações, no que se refere às propriedades físicas, químicas e biológicas, são definidoras de padrões ecológicos e do próprio uso da terra. Na Amazônia, cerca de 70% da região é composta por duas classes de solos, os latossolos e os argissolos (Rodrigues, 1996). Esses solos são

profundos, bem drenados e apresentam boas propriedades físicas, mas quimicamente são ácidos, com baixa fertilidade natural e alta saturação com alumínio. Os níveis tóxicos de alumínio aliados à baixa fertilidade nesses solos agem diretamente no desenvolvimento das plantas, afetando desde a raiz, nodulação, relações hídricas, redução da produção/produtividade e, portanto, a sustentabilidade. Apesar disso, estes efeitos podem ser diminuídos ou neutralizados pela calagem e adubação, atuando diretamente no solo e conseqüentemente aliviando os efeitos provocados pela baixa fertilidade e toxidez de alumínio. No entanto, a obtenção destes insumos agrícolas para o uso nos solos da Amazônia é dificultado por problemas financeiros e tecnológicos. Assim, uma alternativa para reduzir os efeitos negativos destes solos no crescimento de plantas é selecionar espécies ou cultivares mais tolerantes, aliado ao uso de micro-organismos do solo, formando associações benéficas plantas-micro-organismos. Os micro-organismos podem estabelecer relações simbióticas, como a fixação biológica de nitrogênio, podendo atuar como “facilitadores”, tornando as plantas menos dependentes de adubos químicos, permitindo, assim, uma economia desses insumos e ao mesmo tempo, uma maior produtividade dos solos. Dentre esses micro-organismos estão as bactérias nodulíferas da família Rhizobiaceae, conhecidos popularmente como rizóbios. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de tolerância à acidez e alumínio de rizóbios isolados de nódulos de leguminosas em solos da Amazônia.

Material e Métodos

Foram testados 31 isolados de rizóbios da coleção do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos da Amazônia (LEBMAM), do INPA. Eles foram isolados de nódulos de diversas leguminosas que cresciam em latossolos e argissolos da região de Manaus. A metodologia consistiu em avaliar as bactérias em placas de Petri, contendo meios YMA (Somasegaran e Hoben, 1985), sendo um com $\text{pH}=4,5 + 2 \text{ cmol}_e \text{ Al/L} + 20\text{mL}$ de solução indicadora (bromocresol verde) para a avaliação de tolerância, permitindo assim, uma concentração de Al no meio similar à encontrada nos solos da Amazônia (Chagas Júnior *et al.*, 2009) e, um meio com $\text{pH}=6,5 + 5\text{mL}$ de indicador (solução alcoólica, contendo 0,5% de azul de bromotimol), como controle. O procedimento de repicagem e avaliação para verificar a tolerância dos isolados de rizóbios em meio com Al foi feito segundo o método de Oliveira e Magalhães (1999), que avalia o nível de crescimento bacteriano, atribuindo-se notas de 1,0 (sem crescimento visível) a 4,0 (máximo crescimento), subdivididas em 0,25, ou seja, 1,00,

1,25, 1,50, 1,75, 2,00 e etc., até 4,00, aumentando assim a precisão do método. Foram usadas para cada cultura bacteriana, quatro repetições nos dois meios. As avaliações foram realizadas a cada três dias, num total de quinze dias, sendo considerados sensíveis os isolados que apresentaram valores de 1,0 a 2,0, com tolerância média 2,06 a 3,0 e, tolerantes os que mostraram crescimentos superiores a 3,06. Os indicadores de pHs foram usados para observar se as bactérias diminuía ou aumentavam a acidez dos meios depois de crescerem.

Resultados e discussão

Ao se analisar os crescimentos dos 31 isolados no meio com pH 6,5 (controle), observou-se que oito dos isolados de rizóbios mostraram crescimento elevado aos três dias (nota acima de 3,00) após a repicagem. Aos seis dias, 26 isolados mostraram crescimento acima de 3,06. Ao término do experimento (15 dias), 29 isolados mostraram crescimento superior a 3,06, indicando crescimento elevado nesse meio de cultura, permitindo assim, avaliar suas tolerâncias ou sensibilidades à acidez e presença de Al quando essas condições foram adicionadas ao meio padrão. Os únicos isolados que apresentaram algum problema de crescimento no meio padrão, pH 6,5 foram INPA R578 e INPA R583.

No meio com pH 4,5 e Al, todos os isolados mostraram-se bem sensíveis aos três dias de crescimento, apresentando valores entre 1,00 e 1,75. A partir do sexto dia de crescimento, quatro isolados (INPA R560, INPA R582, INPA R583, INPA R588) mostraram tolerância média (2,06-3,00) e, INPA R578 e INPA R674a cresceram acima de 3,06, mostrando um crescimento diferenciado quando comparado com os outros isolados testados, demonstrando maiores níveis de tolerância ao pH 4,5+Al. Aos 15 dias foi possível selecionar 9 rizóbios: INPA R553, INPA R560, INPA R575, INPA R578, INPA R580, INPA R583, INPA R588, INPA R615, INPA R634, INPA R674a, os quais mostraram crescimento elevado no meio com pH 4,5+Al.

Verificou-se ainda, mudança de coloração do meio com pH 6,5, onde dos 31 rizóbios avaliados, 11 acidificaram levemente e 8 acidificaram totalmente o meio, enquanto que, em pH 4,5+Al não houve modificação visual do pH do meio. A visualização dessa alteração foi possível devido a utilização dos indicadores de pH.

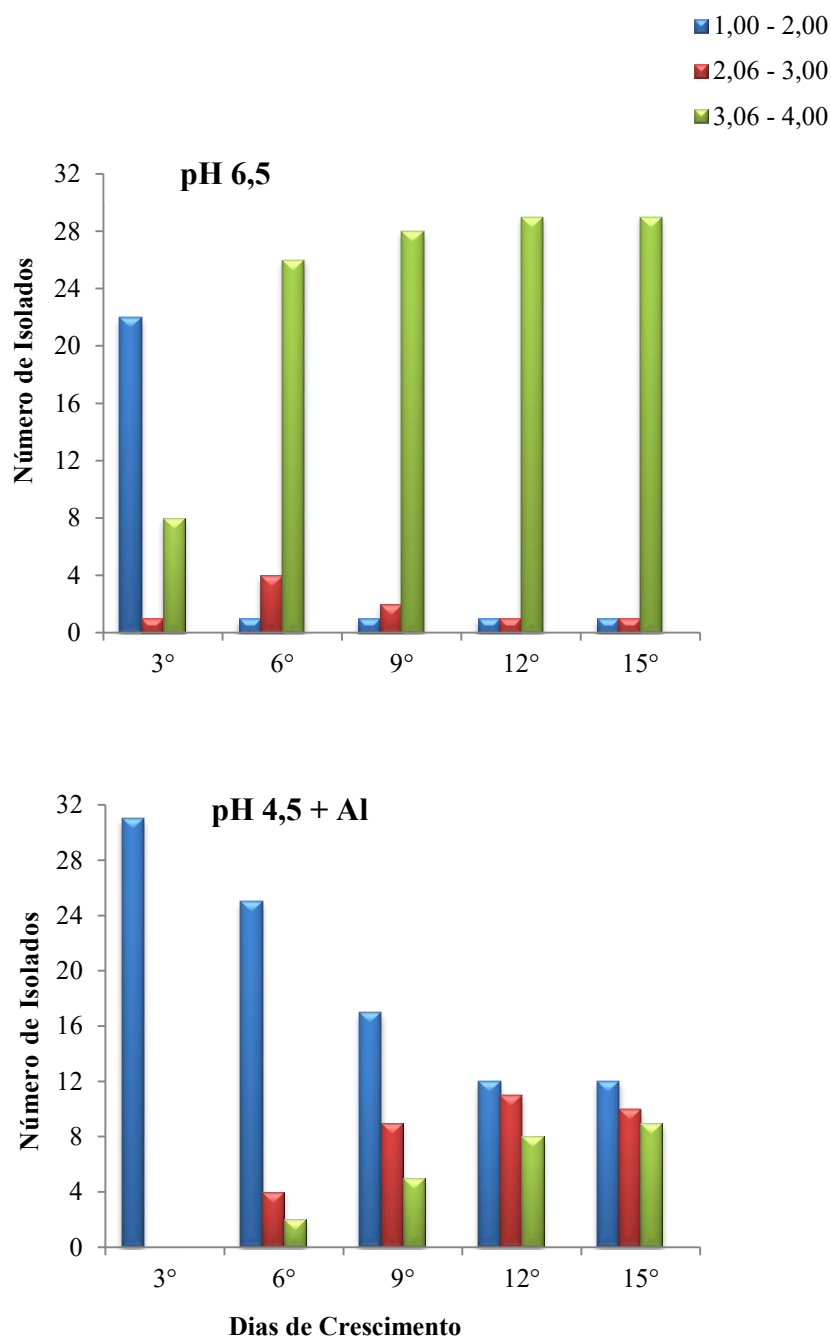


Figura 1. Crescimento dos isolados de rizóbios em placas de Petri contendo meios YMA.

Os resultados obtidos neste experimento foram diferentes dos reportados por Hara e Oliveira (2005) e Chagas Júnior *et al.* (2009), onde observou-se que parte dos isolados testados apresentaram dificuldade para crescerem em meio com pH 6,5, a partir do terceiro e sexto dia de avaliação. Segundo Campos *et al.* (2010), a capacidade desses

isolados de sobreviverem e crescerem em pH 6,5 é de grande importância, especialmente para estudos como associação com plantas em ambientes próximos à alcalinidade, tendo como referencial agrônomo, que solos com esse pH são os que apresentam maiores disponibilidades de macro e micronutrientes (Malavolta, 1976). A tolerância à acidez e alumínio, foi observado por Hara e Oliveira (2005) e Chagas Júnior *et al.* (2009) analisando-se isolados de rizóbios procedentes de solos da Amazônia, um dos motivos para estes isolados não tenham obtido um bom crescimento é que alguns processos citoplasmáticos da bactéria sejam sensíveis a tais fatores. E o crescimento dos isolados no meio aumentou com o tempo de exposição às condições de estresse. Essa capacidade de tolerar o meio com pH 4,5+Al, de acordo com Graham *et al.* (1994), está relacionada à habilidade de manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,5 quando o pH externo é ácido. O tempo de crescimento dos rizóbios pode ser usado para seleção, sendo considerados mais tolerantes em pH 4,5+Al, os isolados que apresentarem notas acima de 3,06, em menor período de tempo. Quanto à capacidade de acidificar o meio com pH 6,5, Chagas Júnior *et al.* (2009) também observaram isso estudando outros rizóbios isolados de diferentes solos da Amazônia. Este processo de alteração do pH ocorre devido à produção de ácidos orgânicos liberados pelas bactérias ao crescerem no meio de cultura. Os isolados tolerantes a pH 4,5+Al apresentam-se promissores, porém, necessitam ser testados em solos com essas características e, ainda, em simbiose com a planta na presença desses fatores limitantes.

Conclusão

Dos 31 isolados de rizóbios testados, 29% mostraram-se tolerantes ao pH 4,5 e presença de 2,0 cmol_c de Al⁺³ L⁻¹ em placas de Petri com meio YMA, indicando potencial para serem testados em latossolos e argissolos amazônicos com essas características químicas.

Referências

Campos LL, Martins ME, Elias Neto N, Loureiro MF (2010) Caracterização fisiológica de rizóbios isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium spp.* *Scientia Agraria Paranaensis*, 9(3):75-84.

Chagas Júnior AF, Oliveira LA, Oliveira NA (2009) Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 39(2):467 – 470.

Graham PH, Draeger KJ, Ferrey ML, Conray MJ, Hammer BE, Martinez E, Aarons SR, Quintino C (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 198-207.

Hara FAS, Oliveira LA (2005) Características fisiológicas e ecológicas de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 667-672.

Malavolta E (1976) Manual de química agrícola: nutrição de plantas e fertilidade do solo. São Paulo: Agronômica Ceres.

Oliveira LA, Magalhães HP (1999) Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, 30:203-208.

Rodrigues TE (1996) Solos da Amazônia, p.19-60. In: Alvarez VH, Fontes LEF, Fontes MPF (Eds.). O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado. UFV/DPS/SBCS, Viçosa, MG.

Somasegaran P, Hoben JH (1985) Methods in legume-Rhizobium technology. NifTAL Project and MIRCEN, Paia, Hawaii. 367 p.

Avaliação produtiva de cogumelos comestíveis desenvolvidos pela técnica Jun-Cao

Moraes JCFB¹; Rolim LN²; Sales-Campos C.²

¹Graduanda Nilton Lins /Bolsista PIBIC PAIC CNPq/INPA,²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

E:mail jamile_moraes17@hotmail.com; ceci@inpa.gov.br.

Resumo

Os cogumelos sempre foram apreciados pela humanidade por suas propriedades nutritivas, embora em sua maioria eles possuam considerável toxicidade. Cultivo de cogumelos comestíveis tornou-se, então, a melhor maneira de suprir o mercado sem que haja riscos de consumir cogumelos tóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta fisiológica de diferentes variedades de cogumelos desenvolvidas em substratos cuja formulação baseia-se na técnica Jun-Cao. A técnica consiste na formulação, com enriquecimento para verificar o desenvolvimento de linhagens de fungos de interesse comercial e científico como: *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes*, *Volvariella volvacea*, *Lentinus strigosus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus ostreatoroseus*. O substrato Jun-Cao foi feito com umidade 70% e utilizou Capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) 60%, serragem de cajuí (*Anacardium giganteum*) 18%, farelo de trigo (*Triticum* spp.) 10%, farelo de arroz (*Oryza* spp.) 10%, açúcar mascavo 1% e carbonato de cálcio 1%. A segunda formulação foi elaborada sem o açúcar mascavo e aumentando o carbonato de cálcio para 2%. Dentre estes substratos testados, o enriquecimento da segunda formulação apresentou melhor resposta fisiológica para somente duas espécies (*P. ostreatus* e *P. ostreatoroseus*). O açúcar mascavo provavelmente contribuiu para a colonização por bactérias e outros fungos competidores. *P. ostreatus* mostrou melhor Eficiência Biológica, produtividade de cultivo e Perda de Matéria Orgânica do que *P. ostreatoroseus*. Já as demais linhagens tais como: (*Lentinus strigosus*, *Ganoderma lucidm* e *Pleurotus ostreatus*) se colonizaram, mas não produziram corpos de frutificação. As outras três linhagens (*Flammulina velutipes*, *Volvariella volvacea* e *Grifola frondosa*) contaminaram com *trichoderma*.

Palavras Chaves: Cogumelos, Jun Cao, gênero *Pleurotus*

Introdução

Cogumelos são fungos da classe Basidiomycetes conhecidos pela civilização desde os primórdios da sua história, devido às suas características tóxicas (gerando acidentes por vezes fatais) ou por suas características nutritivas e medicinais, que os tornaram importante fonte de estudos por parte de pesquisadores no mundo inteiro. Existem cerca de 2000 espécies de cogumelos potencialmente comestíveis na natureza, mas apenas aproximadamente 22 são intensivamente cultivadas. Principalmente em solo ou em troncos de madeira ou em substrato de serragem (Manzi *et al.*, 2004).

A tecnologia de cultivo de cogumelos comestíveis na região Amazônica, ainda é pouco desenvolvida, utilizada. No entanto a região apresenta um grande potencial para esta prática, e para tal tornam-se necessárias pesquisas, a fim de difundir o conhecimento gerado tornando o produto cada vez mais conhecido e acessível à população (Carvalho 2010).

“Jun-Cao” (Jun = cogumelo; Cao = gramíneas) é uma técnica de cultivo chinesa que se tornou revolucionária para a fungicultura daquele país. Por utilizar-se de gramíneas como substrato-base, o método possui ricas fontes para o desenvolvimento selvagem ou para áreas plantadas. Dessa forma, é possível conciliar o cultivo de cogumelos com a proteção do ecossistema, uma vez que não são utilizadas madeira ou serragem (como se faz no método convencional). Além disso, o curto período de cultivo, praticidade e facilidade de manuseio são qualidades que dão à técnica excelentes possibilidades para análise de fungos pouco conhecidos, facilitando, por exemplo, estudos Bioquímicos a cerca dos basidiomicetos testados (Urben *et al.*, 2004).

Conforme mencionado na literatura diferentes composições no substrato utilizados pelos fungos resultam em ganhos metabólicos variados, com alterações na sua fisiologia e composição química (Ragunathan e Swamihathan 2003; Shashirekha *et al.*, 2005) Entretanto, Sturion e Razani (2000) relatam que os cogumelos possuem capacidade de absorver moléculas do substrato, inclusive metais pesados o que resulta na necessidade de cuidados quanto aos substratos utilizados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta fisiológica de diferentes variedades de cogumelos desenvolvidas em substratos cuja formulação baseia-se na técnica Jun-Cao para determinar qual formulação gera melhor produtividade tanto em nível de quantidade como qualidade nutricional.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. As linhagens escolhidas para o estudo foram obtidas, a partir de placas miceliadas onde todas se encontram depositadas no banco de espécies micológicas do INPA (Manaus, Amazonas, Brasil). Ao todo, foram utilizadas 8 linhagens: *Ganoderma lucidum* (CC-351), *Grifola frondosa* (CC-373), *Flammulina velutipes* (CC-85), *Volvariella volvacea* (CC-94), *Lentinus strigosus* (INPA-1466), *Pleurotus ostreatus* (INPA-1467), *Pleurotus ostreatoroseus* (coletado no Estado da Amazônia) e *Pleurotus ostreatoroseus* (coletado na Mata Atlântica, Estado de São Paulo).

As linhagens foram inoculadas sacos contendo 250g de sementes de trigo previamente hidratadas e esterilizadas em autoclave (30 minutos a 121 °C). Os sacos inoculados foram mantidos em câmara climática a 24 °C, UR 80% e em ausência de luz até completa colonização. Segundo Urben *et al.* (2004), essa etapa é propícia para intensificar o vigor micelial dos cogumelos. Uma vez plenamente colonizados, os sacos foram usados como inóculo para o substrato Jun-Cao, que foi elaborado na seguinte proporção: Capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) 60%, serragem de cajú (*Anacardium giganteum*) 18%, farelo de trigo (*Triticum spp.*) 10%, farelo de arroz (*Oryza spp.*) 10%, carbonato de cálcio 2%.

Uma vez inoculado, o material foi levado à câmara climática (25 °C, UR 80% em ausência de luz). Após a colonização, os sacos foram transferidos para outra câmara climática em condições abióticas diferentes (22°C, UR 90% com fotoperíodo de 8h) com objetivo de estimular a formação dos corpos de frutificação.

Foram avaliados tempo de colonização, formação de primórdios, quantidade de cogumelos produzidos, eficiência biológica (EB) e perda de matéria orgânica (PMO)

que é a quantidade de matéria extraída do substrato ao longo do processo de cultivo fúngico. Os dados foram analisados usando o programa Sisvar com ANOVA um fator em teste Turkey.

Resultados e discussão

O experimento foi conduzido por 90 dias. De maneira geral, a linhagem que mais rapidamente colonizou os substratos foi *P. ostreatus*, com média de 21 dias. A linhagem *P. ostreatoroseus* AM (variedade coletada no Amazonas) levou mais tempo para colonizar, com média de 24 dias. Em se tratando de produção de primórdios, *P. ostreatoroseus* AM mostrou-se mais eficiente, desenvolvendo-os em média cinco dias após a completa colonização. O desenvolvimento das frutificações levou em média quatro dias. As demais linhagens colonizaram o substrato, mas não produziram primórdios (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo de cultivo das linhagens pela técnica Jun-Cao.

Linhagem	Período (dias)		
	Colonização	Formação dos primórdios	Frutificação
<i>P. ostreatus</i> Nativo B	21	4	3-4
<i>P.ostreatoroseus</i> AM	24	5	3-4

Na avaliação da produção, considerando o somatório em todos os substratos, *P. ostreatus* foi a linhagem que mais se destacou no cultivo, totalizando 777,5g (peso fresco), com média de aproximadamente 129g por quilo de substrato. Em segundo lugar ficou *P. ostreatoroseus* AM, produzindo cerca de 542g de cogumelos frescos (média= 90g/Kg de substrato) (Tabela 2).

Tabela 2. Peso de cogumelos colhidos pela técnica Jun-Cao.

Linhagem	Mat. fresca (g)	Mat. seca (g)
<i>P. ostreatus</i> Nativo B	777.5	114
<i>P. ostreatoroseus</i> AM	542	49

Em relação à EB, na média obtida do substrato testado, a linhagem que mais se destacou foi *P. ostreatus* (EB= 86,2%) diferindo estatisticamente, segundo o teste Tukey, de *P. ostreatoroseus* AM (EB= 22,3%). No estudo da PMO, considerando a média de todas as repetições, *P. ostreatus* mostrou melhor consumo dos substratos (PMO= 62,5%), sendo diferente estatisticamente de *P. ostreatoroseus* AM (PMO= 53%). Em relação à concentração de proteínas, *P. ostreatus* e *P. ostreatoroseus* AM demonstraram similaridade estatística, tendo suas concentrações com valores muito próximos. Na avaliação das cinzas também houve similaridade (Tabela 3).

Tabela 3. Médias da Eficiência Biológica (EB) e Perda de Matéria Orgânica (PMO) em diferentes linhagens de cogumelos desenvolvidos pela técnica Jun-Cao.

Linhagem	EB (%)	PMO (%)
<i>P. ostreatus</i> Nativo B	86,4	56,7
<i>P. ostreatoroseus</i> AM	46,9	66,1

Podemos observar que nesta tabela NATIVO B consumiu menos substrato, do que o *P.ostreatoroseus* AM, porém sua eficiência biológica foi melhor.

Em relação à concentração de proteínas, *P. ostreatus* e *P. ostreatoroseus* AM demonstraram similaridade, tendo suas concentrações com valores muito próximos, com diferenças estatísticas, já fenóis houve também diferenças estatísticas. As cinzas não houve diferença significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração de umidade e cinzas obtidas de duas linhagens de cogumelos do gênero *Pleurotus*

Linhagem	Proteínas (%)	Fenóis (%)	Cinzas (%)
<i>P. ostreatus</i> Nativo B	14,73	11,78	10,97
<i>P. ostreatoroseus</i> AM	14,20	14,14	11,24

Os resultados apresentados indicam uma produtividade relativamente elevada em *Pleurotus*, quando comparados com os resultados obtidos por Ahmed *et al.*, (2013). No caso de *P. ostreatoroseus* AM, a eficiência de miceliação pode ser alterada à medida que o fungo se aprofunda no substrato. Fatores como suplementação e dificuldade nas trocas gasosas podem comprometer o desenvolvimento do fungo (Rossi *et al.*, 2001). Talvez algum destes fatores possa interferindo na ausência de crescimento das demais

linhagens no substrato suplementado. Ainda segundo Rossi *et al.*, (2001), a formulação com nutrientes, de preferência solúveis é uma alternativa promissora na estimulação do crescimento. Neste aspecto, torna-se necessário verificar outras combinações de materiais e insumos para determinar resultados melhores. Para Urben *et al.*, (2004) a umidade do substrato precisa ser observada com atenção, uma vez que as necessidades fisiológicas variam conforme a espécie de cogumelo. Neste estudo a umidade do substrato Jun-Cao utilizado ficou em torno de 75%.

Segundo Minotto *et al.* (2010) o farelo de arroz favoreceu o crescimento micelial de diversas espécies de cogumelos, promovendo, assim, a rápida colonização do substrato e conseqüentemente redução na probabilidade de contaminação. Provavelmente o uso do farelo de arroz sem trigo poderá fornecer resultados mais satisfatórios. Para Urben *et al.*, (2004), o trigo confere importante fonte de nutrientes. Faz-se, assim, necessário testá-los separadamente, comparando os resultados com substratos onde estes insumos sejam utilizados de forma combinada.

A produção de cogumelos comestíveis por meio da técnica Jun-caos se trata de uma tecnologia inovadora que causa menores impactos ambientais quando comparada aos outros métodos de produção. O estudo referente de cultivo de fungos comestíveis é um campo ainda não muito explorado com profundidade. Ainda há dúvidas quanto aos benefícios ou prejuízos à saúde e é notório que eles tendem a ser mais estudados quanto a melhor forma de cultivo e em quais substratos e linhagens eles evidenciam melhor produtividade e qualidade. Através dos resultados obtidos pode-se ter base para futuros trabalhos abordando mais profundamente a vantagem de se otimizar substratos desta região Amazônica para cultivar fungos comestíveis.

Conclusão

Pleurotus ostreatus Nativo B e *P. ostreatoroseus* AM foram as linhagens que melhor responderam. São necessários novos testes para verificar qual formulação Jun-Cao desenvolverá melhor resposta nas linhagens de estudo citadas acima.

Referências

- Ahmed M, Abdullah N, Ahmed KU, Bhuyan MHM (2013) Yield and nutritional composition of oyster mushroom strains newly introduced in Bangladesh. *Pesq Agropec Bras* 48: 197-202.
- Carvalho SMC (2010) Cultivo e análise química e bromatológica de *Pleurotus ostreatus* em resíduos de diferentes cultivares de bananeira. Manaus, Brasil, 95p. (Dissertação) mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas
- Manzi P, Marconi S, Aguzzi A, Pizzoferrato L (2004) Commercial mushrooms: nutritional quality and cooking. *Food Chem* 84: 201-206.
- Minotto E, Wille CN, Bernardi E, Manzoni CG, Nascimento JS (2009) Desenvolvimento do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) em substrato a base de serragem suplementada com farelo de arroz. XIII CIC/XI ENPOS. 1-5.
- Ragunathan R, Swaminathan K (2003) Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. *Food Chem* 80: 371-375.
- Rossi IH, Monteiro AC, Machado JO (2001) Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. *Pesq Agropec Bras* 36 (6): 887-891.
- Shashirekha MN, Rajarathnam S, Bano Z (2005) Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). *Food Chem* 92: 255-259.
- Sturion GL, Razani MRTC (2000) Composição em minerais de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil - *Pleurotus* spp e outras espécies desidratadas. *ALAN*. 50: 102-108.
- Urban AF, Oliveira HCB, Vieira W, Correia MJ, Uriartt AH (2004) Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Desenvolvimento. 110p.

Fungos endofíticos associados à pimenta murupi (*Capsicum chinense*): Isolamento, caracterização morfológica e atividade antimicrobiana

Nogueira J.C.¹, Maki C.S.², Martins, M.K.¹.

¹ Universidade do Estado do Amazonas-UEA, PPG em Biotecnologia e Recursos Naturais, ²
Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, AM.
E-mail cris.maki@gmail.com, jana-nogueira@hotmail.com

Resumo

Fungos endofíticos habitam tecidos vegetais de forma assintomática e estabelecem uma relação considerada mutualística com seus hospedeiros. Este grupo microbiano é reconhecido como uma valiosa fonte de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas que podem ter aplicações na medicina, agricultura, biotecnologia e indústria. Conhecendo o potencial desses micro-organismos, sugeriu-se neste trabalho, a caracterização da comunidade de fungos endofíticos associados ao fruto da pimenta murupi (*Capsicum chinense*) e a avaliação de sua capacidade em produzir metabólitos com atividade antimicrobiana. O número total de endófitos obtidos do endocarpo foi de 133 isolados fúngicos, com frequência total de 33,25%, sendo esses predominantes no isolamento a partir do endocarpo. Cerca de 70% dos isolados fúngicos não produziram estruturas reprodutivas nas condições testadas neste trabalho e, portanto, não puderam ser caracterizados em relação às suas estruturas reprodutivas, totalizando 74 grupos morfológicos. Para outros três grupos, foi possível analisar as características macro e micromorfológicas das colônias e sugerir a sua identificação ao nível de gênero. Pôde-se perceber a predominância de *Fusarium* entre os fungos isolados da pimenta murupi, o qual apresenta micélio cotonoso, de coloração branca a rósea e características micromorfológicas peculiares, tais como a presença de macro e microconídios. Foram selecionados 77 isolados fúngicos para testes de antibiose contra micro-organismos teste: *Staphylococcus aureus* MRSA, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. albicans* (ATCC10231), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*. Apenas um endófito apresentou halo de inibição contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). A partir do DNA genômico, extraído do fungo endofítico com potencial antimicrobiano, foi possível amplificar a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, a qual apresentou

aproximadamente 600 pb. De acordo com o banco genômico, o isolado promissor apresenta 92% de identidade com *Nemania* sp. Por se tratar de um índice considerado baixo, não foi possível inferir sobre sua identificação.

Palavras-chave: *Capsicum chinense*, micro-organismos endofíticos, composto antimicrobiano.

Introdução

Os micro-organismos estão presentes nos mais variados ambientes, interagindo com diversas formas de vida. São organismos extremamente versáteis e habitam ambientes diversificados, incluindo aqueles considerados inóspitos. Micro-organismos associados a plantas são estudados há tempos e em diferentes níveis, formando assim um micro ecossistema complexo, onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de micro-organismos. Dentre esses, podemos destacar os endófitos, que são organismos conhecidos por passar parte ou todo o ciclo de vida colonizando os tecidos vivos de uma planta hospedeira sem, entretanto, causar sintomas aparentes de doenças (Schulz et al., 2005).

É estimado que cerca de 80% das plantas são hospedeiras de micro-organismos (Zhang et al., 1997). A natureza dessa interação tem despertado o interesse de bioquímicos, químicos e biólogos na tentativa de entender essas associações, que é um fascinante e amplo campo de pesquisa, devido ao potencial que esses micro-organismos endofíticos têm em proporcionar benefícios aos seus hospedeiros e também, devido às suas aplicações biotecnológicas (Araújo et al., 2002). Até então, acreditava-se que os endófitos não mantinham qualquer relação com as propriedades de interesse apresentadas pelas plantas que os hospedavam (Radwan et al., 2004). Atualmente, mantém-se a hipótese de que genes responsáveis pela expressão de proteínas de interesse nos micro-organismos podem ser transferidos (via transferência horizontal) desses para seu hospedeiro, sendo que esse último expressa as mesmas moléculas de interesse originalmente expressas pelos seus micro-organismos associados (Araújo et al., 2010). Micro-organismos endofíticos já foram isolados a partir de uma grande variedade de plantas (Arnold *et al.*, 2000; Martins 2005; Rubini *et al.*, 2005, Wang e Dai, 2010; Siqueira *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2015). Estima-se a ocorrência de cerca de 1,5 milhões de espécies endofíticas, sendo que deste total, 10% foram descobertas e apenas 1% examinada quanto ao seu espectro de produção de

metabólitos secundários (Guo *et al.*, 2008). Assim, o estudo de bioprospecção de micro-organismos endofíticos que produzam compostos de interesse abre perspectivas para várias frentes de investigação, incluindo a descoberta de novos compostos antimicrobianos. Assim como os hospedeiros estudados até hoje, as pimentas do gênero *Capsicum* apresentam sua diversidade de micro-organismos endofíticos associados. Amaresan *et al.* (2012) isolaram de *C. annuum* cerca de 87 bactérias endofíticas e dentre os isolados, foi possível identificar gêneros como *Bacillus* sp., *Antrobacter* sp. e ainda *B. subtilis*. Devari *et al.* (2013) isolaram da mesma espécie, um fungo endofítico identificado como *Alternaria alternata*, produtor da substância capsaicina, substância responsável pela ardência das pimentas.

O gênero *Capsicum* compreende mais de 200 variedades, dentre as quais as espécies mais conhecidas são *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. chinense* e *C. frutescens* (Menichini *et al.*, 2009; Zimmer *et al.*, 2012). A região norte do Brasil apresenta-se como a área de maior diversidade da pimenta murupi (*Capsicum chinense*), variedade largamente utilizada como complemento a pratos típicos da região, porém além do uso culinário, esse gênero tem reconhecidas propriedades farmacológicas, devido à presença de capsaicinóides (Reyes-Escogido *et al.*, 2011), um grupo de alcalóides exclusivo do gênero *Capsicum*. Existem vários relatos na literatura científica que tratam da atividade antimicrobiana das pimentas, como os trabalhos de Carvalho *et al.* (2010), Oliveira (2011), Kapell (2007), entre outros. Apesar da diversidade de trabalhos com pimentas *Capsicum*, os estudos envolvendo a comunidade endofítica dessas pimentas são escassos, aliado ao pouco conhecimento existente sobre a microbiota endofítica associada à pimenta murupi, uma variedade exclusivamente brasileira, e às características benéficas que esses micro-organismos podem apresentar. Diante dos relatos apresentados e considerando o histórico de *Capsicum* associado a atividades antimicrobianas, a proposta do presente trabalho foi estudar a microbiota endofítica associada à pimenta murupi, no que se refere ao seu potencial na produção de compostos antimicrobianos e à sua diversidade biológica.

Material e Métodos

Foram coletadas 20 pimentas (10 maduras e 10 imaturas) no período de novembro de 2012 a abril de 2013, em cada um dos dois pontos da cidade de Manaus (AM): Tarumã (3°01'15,5"S - 60°04'36,4"W) e Zona Leste (3°04'50"S - 59°56'00,2"W). Somente os frutos e as sementes de pimentas murupi foram utilizados no isolamento de fungos endofíticos. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Genética de Micro-organismos da Universidade Federal do

Amazonas, onde foram realizados os procedimentos de assepsia superficial, segundo Araújo et al. (2010): as amostras vegetais foram lavadas em água corrente com detergente neutro e, em seguida imersas em álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio (2,5-3% de cloro ativo) (1 min), álcool 70% (1 min) e duas vezes em água destilada esterilizada. Após a desinfestação superficial, foram transferidos 5 fragmentos de aproximadamente 3 mm² para placas de Petri, contendo ágar batata dextrose (BDA) suplementado com antibiótico tetraciclina na concentração de 50µg/mL. As placas foram incubadas à temperatura de 28°C por 10 dias. Para avaliar a eficácia da desinfestação, alíquotas de 50µL da última água de lavagem foram semeadas em placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura e incubadas sob as mesmas condições. A purificação dos isolados foi realizada por meio da obtenção de culturas monospóricas a partir das colônias obtidas no isolamento. Após a obtenção dos isolados purificados, a macromorfologia foi analisada para condições de desenvolvimento micelial específicas: incubação em meio BDA, a 24 °C e no escuro. Análises micromorfológicas foram realizadas após a incubação dos isolados fúngicos em ágar água e nessas, priorizou-se a observação de estruturas vegetativas e reprodutivas em microscópio óptico, em aumento de 400X.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos filtrados dos micro-organismos endofíticos, foi empregado o método de difusão em ágar descrito por Huang et al. (2001). Foram utilizados *Candida albicans* (ATCC 10231), *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (MRSA) nos ensaios antimicrobianos.

O DNA do isolado com potencial antimicrobiano foi extraído e submetido à amplificação das regiões ITS do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2), utilizando-se os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), descritos por White et al. (1990). As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de culturas depositadas no *GenBank*, utilizando o programa *BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no portal do *National Center for Biotechnological Information* – NCBI.

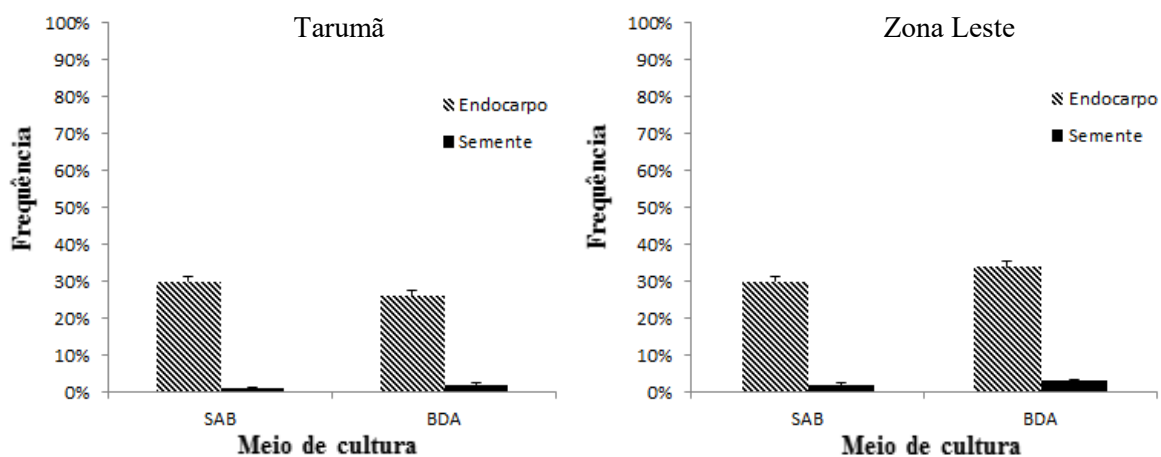
Resultados e Discussão

Um total de 133 isolados de fungos filamentosos foi isolado e todos associados ao endocarpo da pimenta murupi, com predominância em meio Sabouraud. Considerando especificamente os hospedeiros *Capsicum*, ressalta-se ainda a retenção da capsaicina à

placenta do fruto, visto que nenhum fungos endofíticos foi isolado das sementes, o que leva à hipótese de que a própria placenta do fruto pode constituir em uma barreira física e química eficiente para inibir o desenvolvimento dos fungos endofíticos, os quais foram isolados apenas do endocarpo.

A frequência geral de isolamento foi de 33,25% para o total de fragmentos vegetais, sendo as plantas da zona Leste de Manaus as maiores detentoras de fungos endofíticos passíveis de isolamento, quando comparadas às plantas do Bairro Tarumã (Figura 1). Também foi observado que no segundo isolamento, realizado em época chuvosa, houve maior isolamento de endófitos dos tecidos vegetais analisados, especialmente os coletados na zona Leste.

1º Isolamento (Período de seca)



2º Isolamento (Período de chuva)

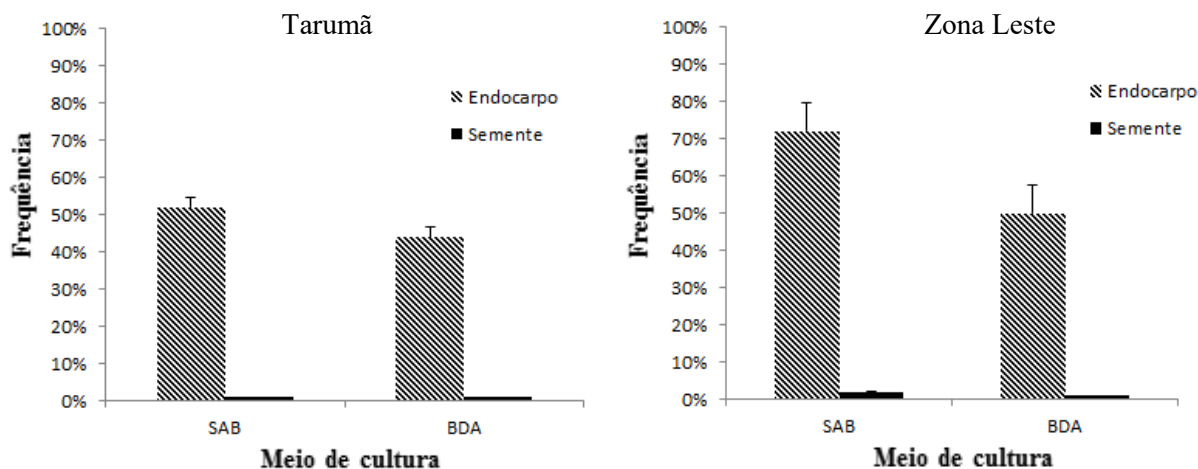


Figura 1. Frequência de isolamento de fungos endofíticos em função da sua localização na planta, do local de coleta e do meio de cultura empregados no isolamento.

Os dados obtidos corroboram com aqueles descritos por Rodrigues (1994) e Suryanarayanan *et al.*, (1998), que obtiveram maior quantidade de micro-organismos endofíticos no período chuvoso, quando comparado ao período de seca. Uma hipótese a ser considerada é a de que os micro-organismos, especialmente aqueles associados à rizosfera e ao rizoplane, encontram mais facilidade de fixação, penetração e colonização da planta através de suas raízes em épocas de solo umedecido, característica predominante do solo à época da realização da segunda coleta.

Cerca de 70% dos isolados fúngicos não produziram estruturas reprodutivas o que dificultou a caracterização, mesmo assim 74 grupos morfológicos foram classificados conforme a macromorfologia apresentada em condições específicas e padronizadas. Para aqueles fungos passíveis de identificação por meio da correlação de dados de macro e micromorfologia, houve a predominância de *Fusarium*, o qual apresenta micélio cotonoso, de coloração branca a rósea e características micromorfológicas peculiares, como a produção de micro e macroconídios, apresentando esses últimos, a forma típica de foice septada.

Dos isolados testados para detecção de atividade antimicrobiana, apenas um apresentou halo de inibição contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Figura 2).

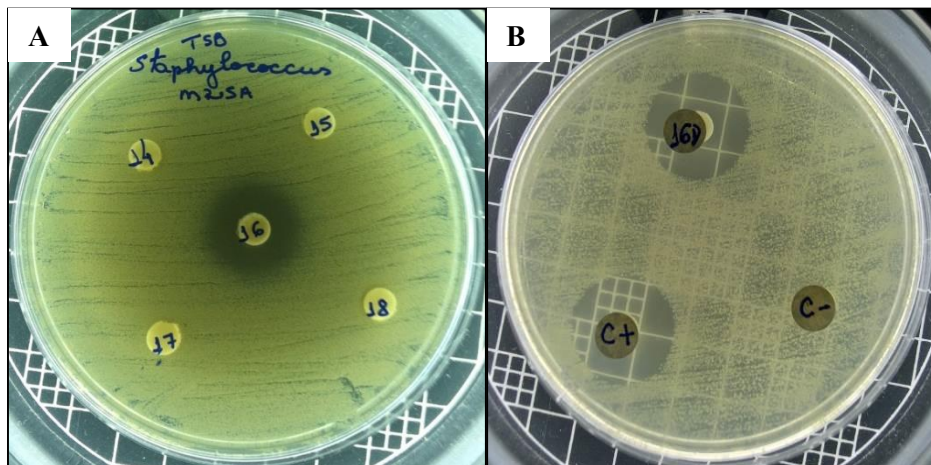


Figura 2. Teste de detecção de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em disco. Legenda: (16 e 16D) disco de papel filtro embebido no filtrado do caldo de fermentação do isolado 16, um fungo endofítico de pimenta murupi; (14, 15, 17 e 18) isolados endofíticos que não apresentaram atividade (A) (C+) controle positivo, representado pelo antibiótico ampicilina e (C-) controle negativo, representando apenas o meio de cultura líquido (B).

Análises moleculares desse isolado permitiram sua comparação com nível de identidade de 92% a um isolado de *Nemania* sp. (JQ846087 1 e DQ641634 1) (Figura 3). Baseado nos resultados moleculares, Sánchez-Ballesteros *et al.* (2000) especularam que o gênero *Nemania* pode representar um complexo de espécies com variantes genéticas e fenotípicas indistinguíveis por meio de ferramentas moleculares, ou seja, mesmo isolados de espécies diferentes dentro do gênero *Nemania* podem apresentar homologies completas de regiões conservadas, o que dificulta sua identificação, mesmo com a utilização de métodos moleculares.

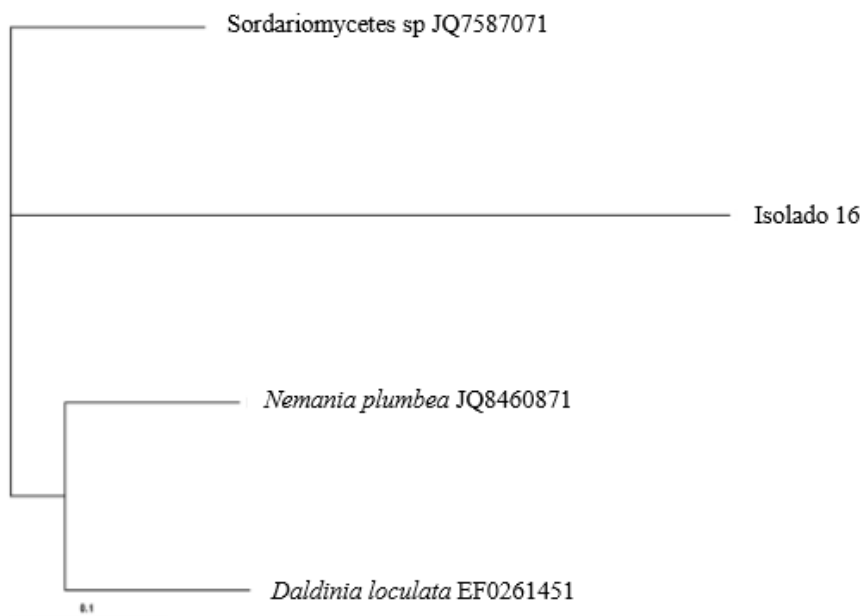


Figura 3. Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA do isolado 16 com acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI

Conclusão

Fungos endofíticos associados à variedade murupi de *C. chinense* apresentam potencial para o controle biológico de agentes microbianos, sugerindo futuros estudos, especialmente por se tratar de um hospedeiro adaptado ao clima amazônico e provavelmente, constituir uma rica e promissora fonte de micro-organismos associados.

Referências

- Amaresan N, Jayakumar V, Kumar K, Thajuddin N (2012) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. *Annual Microbiology* 62:805–810.
- Araújo WL, Lima, AOS, Azevedo JL, Marcon J, Sobral JK, Lacava PT, Pizzirani-Kleiner AA (2010) Guia Prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Editora CALQ, 167p.
- Araujo WL, Marcon J, Macheroni W, Van Elsas JD, Van Vuurde JWL, Azevedo JL (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4906-4916.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA (2000) Are Tropical Endophytes Fungi Hyperdiverse? *Ecology Letters* 3: 267-274.
- Bezerra JDP, Nascimento CCF, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Silva Nogueira EB, Gomes BS, Paiva LM, Souza-Motta, CM (2015) Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(1): 49-57.
- Carvalho HH, Wiest JM, Cruz FT (2010) Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxigenas alimentares. *Revista Brasileira Plantas Medicinai*s 12(1): 8-12.
- Devari S, Jaglan S, Kumar M, Deshidi R, Guru S, Bhushan S, Kushwaha M, Gupta AP, Gandhi SG, Sharma JP, Taneja SC, Vishwakarma RA, Ali Shah B (2013) Capsaicin production by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus from *Capsicum annum*; LC–ESI–MS/MS analysis. *Phytochemistry*.
- Freire KTLS, Araújo GR, Bezerra JDP, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Paiva LM, Souza-Motta C M (2015) Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) mill. (Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae). *Gaia Scientia Edição Especial Cactaceae* 9(2): 104-110.
- Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K (2008) Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 136-142.
- Huang Y, Wang J, Li G, Zheng Z, Su W (2001) Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 31:163-167.
- Kappel VD (2007) Avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana de extrato de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*. Porto Alegre, Brasil, 74p. (Dissertação), Mestrado em Ciências em Tecnologia de Alimento. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS).

Martins MK (2005) Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. Piracicaba, Brasil, 124p. (Tese), Doutorado em Fitopatologia. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' Universidade de São Paulo – USP)

Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, Cindio B, Houghton PJ, Menichini F (2009) The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry* 114: 553–560.

Oliveira AMC (2011) Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum* spp. Teresina, Brasil, 82p. (Dissertação) Mestrado em alimento e nutrição. Universidade Federal do Piauí – UFPI.

Radwan T, Mohamed Z, Reis VM (2004) Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 39(10): 987-994.

Reyes-Escogido ML, Gonzalez-Mondragon EG, Vazquez-Tzompantzi E (2011) Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin: *Review Molecules* 16:1253–1270.

Rodrigues KF (1994) The foliar fungal endophytes of the amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia* 3:376-385.

Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWV, Maki CS, Araújo WL, Santos DR, Azevedo JL (2005) Diversity of endophytic community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Brom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1:24-33.

Sánchez-Ballesteros J, González V, Salazar O, Acero J, Portal MA, Julián M, Rubio V, Bills GF, Polishook J, Platas G, Mochales S, Peláez F (2000) Phylogenetic study of *Hypoxylon* and related genera based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia*. 92:964–977.

Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research* 109(06): 661-686.

Siqueira VM, Conti R, Araújo JM, Souza-Motta CM (2011) Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 53: 89-95.

Suryanarayanan TS, Kumaresan V, Johnson JA (1998) Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Canadian Journal of Microbiology* 44:1003-1006.

Wang Y, Dai CC (2011) Endophytes: a potencial resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology*, 61: 207215.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

Zhang W, Wendel JF, Clark LG (1997) *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:205-217.

Zimmer AR, Leonardi B, Miron D, Schapoval E, Oliveira JR, Gosmann G (2012) Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 228– 233.

Identificação e Conservação de culturas *Penicillium* de interesse Agrossilvicultural

Oliveira¹ D.A.S, Jesus¹ M.A

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM. E-mail: ranna@inpa.gov.br; danielasoliveir@gmail.com

Resumo

Penicillium (Trichocomaceae) são fungos que possuem importante papel ecológico como decompositor e reciclador de matéria orgânica. Algumas espécies são conhecidas pelo seu potencial biotecnológico. Pretendeu-se identificar as linhagens de *Penicillium* depositadas na Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA. Um total de (111) linhagens de *Penicillium* está depositados na coleção e distribuídas em *P. aculeatum* Raper & Fennell, *P. commune* Thom, *P. corylophilum* Dierckx, *P. chrysogenum* Thom, *P. expansum* Link, *P. fellutanum* Biourge, *P. frequentans* Westling, *P. glabrum* (Wehmer), *P. griseofulvum* Dierckx, *P. melinii* Thom, *P. paxilli* Bainer, *P. raistricki* Smith, *P. roquefortii* Thom, *P. sclerotirum*, *P. verruculosum* Peyronel e com destaque *P. citrinum*, *P. lividum* e *P. implicatum* pelo número de linhagens e os possíveis potenciais biotecnológicos. A identificação das espécies contribui para o conhecimento da diversidade de *Penicillium* na região Amazônica.

Palavras-chave: Taxonomia de fungos, Fungos amazônicos

Introdução

Penicillium pertence à família Moniliaceae, apresenta fase assexual através da produção de frutificações telemórficas. Caracterizam-se pela formação de uma estrutura ramificada de conídios que terminam em células conidióginas, chamadas fiálides, com ramificações monoverticilado, biverticilado e triverticilado. As ramificações estão divididas

em várias microestruturas (ramos, râmulas, métula e fiálides), nas quais são produzidos os conídios que são esféricos ou elipsoidais, unicelulares e geralmente hialino ou verde, azul- petróleo, verde oliva ou cinza (Frisvad e Samson, 2004). O aspecto macroscópico das colônias é circular, geralmente verdes, em algumas espécies a cor pode ser amarela, laranja, roxo ou marrom, e a superfície da colônia, também podem apresentar uma textura arenosa, aveludada ou mucilaginosa (Pitt, 1985).

Segundo Terrasan (2007) *Penicillium* apresenta grande papel ecológico como decompositor e reciclador de matéria orgânica. Este fungo tem sido isolado como endofítico em tecidos de várias plantas. Algumas espécies são conhecidas como produtores diversas classes de metabólitos secundários bioativos, incluindo atividade antiparasitária Elias (2005). Atualmente, diversas pesquisas têm mostrado seu enorme potencial biotecnológico, podendo ser fonte de novos fármacos, de enzimas de interesse industrial, entre outros (Pallu, 2010).

As cepas de *Penicillium* depositadas na Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural foram isoladas de diversas espécies florestais de importância econômica da região amazônica, resíduos madeireiros, produtos florestais, dentre outros substratos, lignocelulíticos que foram materiais de estudos de durabilidade natural de madeira, tecnologia da madeira e biotecnologia, no entanto muitas linhagens ainda não se encontravam identificadas. De modo que o estudo de taxonomia das espécies contribuiu para o conhecimento da diversidade de *Penicillium* na região Amazônica.

Material e Metodos

Primeiramente, foi realizado um levantamento das linhagens de *Penicillium* do acervo com o intuito de selecionar as melhores técnicas de cultivo e preservação, identificar e conhecer a diversidade e as aplicabilidades desses fungos. As linhagens reativadas foram mantidas a 25°C por um período de 7 à 14 dias, período em que o micélio cresce em toda a superfície da placa de Petri. Apartir da obtenção da colônia pura, inóculos foram produzidos para a preservação da linhagem em óleo, sílica gel e baixa temperatura. Posteriormente, outra colônia foi obtida para estudo de taxonomia, tendo como parâmetros: a velocidade de crescimento (lento, relativamente lento, rápido), sendo que para fungos de crescimento mais lento a colônia foi avaliada, assim que atingiu a metade do diâmetro da placa de Petri. Enquanto que o crescimento rápido da colônia foi avaliado diariamente. Também, a descrição do aspecto da superfície da

cultura foi realizada, tendo como parâmetro o aspecto do micélio aéreo: plumoso, ceroso, camurçado, aveludado, flocoso, lanoso e úmido (presença de exsudatos). Assim como a coloração da colônia: verde, verde-oliva, cinzentada, amarela e outras, e presença de anéis concêntricos, e o reverso da mesma, seguindo os parâmetros estabelecidos por (Pitt, 1985).

A análise microscópica da colônia foi feita a partir de lâminas semipermanentes, preparadas com lactofenol e azul de algodão, sendo que as microestruturas foram obtidas em micro-cultivo (CYA) que consiste em repicar dois inóculos, equidistante na placa de Petri e sobre cada inóculo coloca-se uma lâminula estéril pelo período de sete dias, até que o fungo micelial cresce sobre as lâminulas de acordo com Daumal (1995). Também foi avaliado a presença ou ausência de microestruturas tais como micélio vegetativo e reprodutivo e suas respectivas mensurações. As características das culturas foram comparadas com as das espécies de *Penicillium* descritas em sites e.

Resultados

Um total de 111 linhagens de *Penicillium* está depositado na coleção, deste 95 linhagens estão identificados morfologicamente em *P. aculeatum* Raper & Fennell, *P. commune* Thom, *P. corylophilum* Dierckx, *P. citrinum* Thom, *P. chrysogenum* Thom, *P. expansum* Link, *P. fellutanum* Biourge, *P. frequentans* Westling, *P. glabrum* (Wehmer), *P. griseofulvum* Dierckx, *P. implicatum* Biourge, *P. lividum* Westlin, *P. melinii* Thom, *P. paxilli* Bainer, *P. raistricki* Smith, *P. roquefortii* Thom, *P. sclerotirum* e *P. verruculosum* Peyronel, e com o maior número de linhagens. Em vista que esses fungos são representantes de maior número de linhagens de importância biotecnológica se justifica a preservação e conservação de suas cepas em condições específicas no sentido de manter a viabilidade cultural.

A reativação das culturas contribuiu para a obtenção de culturas puras de 111 linhagens de *Penicillium*, as quais estão mantidas em pelo menos 3 métodos de conservação na Coleção. (Tabela 1.)

Os dados de reativação e identificação dos isolados indicam a necessidade de preservação e conservação dos mesmos em todos os métodos, com o intuito e de se evitar contaminação e perda das culturas de *Penicillium*, inclusive das que possuem grande potencial bioeconômico, e assim dar continuidade na identificação das espécies através de técnicas clássica ou moleculares, e principalmente a preservação das mesmas,

considerando as linhagens que podem apresentar aplicabilidades biotecnológicas, como .Também, o estudo de taxonomia e otimização dos processos de conservação e preservação de *Penicillium* viabilizou o melhor aproveitamento do na coleção, e o conhecimento da diversidade de *Penicillium* fornecendo assim subsídios para futuro estudos em bioprospeção dos metabólitos destes fungos, visando a obtenção de bioprodutos (Canhos e Vazoller, 2004).

Tabela 1. Relação de *Penicillium* identificados na coleção.

Táxon	Linhagem
<i>Penicillium aculeatum</i> Raper & Fennell	1
<i>P. corylophilum</i> Dierckx	1
<i>P. chrysogenum</i> Thom	3
<i>P. citrinum</i> Thom	15
<i>P. commune</i> Thom	3
<i>P. expansum</i> Link	2
<i>P. fellutanum</i> Biourge	2
<i>P. frequentans</i> Westling	1
<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	1
<i>P. griseofulvum</i> Dierckx	2
<i>P. implicatum</i> Biourge	7
<i>P. lividum</i> Westling	14
<i>P. melinii</i> Thom	1
<i>P. raistricki</i> Smith	1
<i>P. roquefortii</i> Thom	2
<i>P. paxilli</i> Bainier	2
<i>P. sclerotirum</i> Beyma	2
<i>P. verruculosum</i> Peyronel	4
<i>Penicillium spp.</i>	47
Total	111

Discussão

Muitas das espécies de *Penicillium* depositadas na coleção são conhecidas pelo seu amplo potencial biotecnológico por produzirem diversos metabólitos secundários bioativos utilizados para produção de enzimas hidrolíticas (amilases, celulasas e proteases), ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido glucônico) que podem possuir aplicabilidade em diversas áreas bioeconômicas (Pallu, 2010).

Também, outras espécies de *Penicillium* da coleção são utilizadas no controle de patógenos em cultivares e sementes na agricultura (Costa e Jesus 2012). *P. citrinum* é antagonico a *Aspergillus niger* Tiegh, inclusive é usado no controle da população desse patógeno causal de podridão vermelha no sisal (Damasceno, 2012). Na área médica, as espécies *P. lividum* e *P. implicatum* são produtores de proteases, enzimas industriais, aplicadas a indústria farmacêutica na produção de fármacos antibióticos da classe Beta lactâmicos penicilina, amoxilina, bezetacil e outros antibióticos. (Silva e Lins, 2008). Além destas de valor econômico, *Penicillium roquefortii* e *Penicillium camembert* tem aplicabilidades na indústria alimentícias, principalmente na produção de fermento para pão e de diversos queijos, (Rousseau, 1984) sendo que os seus respectivos nomes *roquefortii* e *camembert* são dados para queijos que são bastante diferentes um do outro.

A importância da preservação de culturas de *Penicillium*, principalmente das linhagens conhecidos pelos seus potenciais e até mesmo aquelas desconhecidas podem servir de fonte para futuras pesquisas em biotecnologia na região amazônica. Uma vez que é de grande valia a manutenção de culturas de microrganismos, não somente para fins científicos como também didáticos (Romeiro, 1996).

Conclusão

O presente estudo contribui para o conhecimento da diversidade de *Penicillium* na região Amazônica, com destaque para *P. citrinum*, *P. lividum* e *P. implicatum* com o maior número de linhagens com possíveis potenciais biotecnológicos.

Referências

- Abreu MM, Tutunji LV(2003). Implantação e Manutenção das coleções de culturas de microrganismos da UniCEUB. *Universitas Ciência da Saúde*. 2:236-251.
- Canhos VP, Vazoller MP (2004). Coleções de culturas de microrganismos. 82-101. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/pdf/v72cap03.pdf>> Acesso em: 11 de dezembro de 2013.
- Dalmau LM (1929). Remarques surla technique mycologique. *Parasitologie et Humaine Comparée, Annales* 7:536-545.
- Damasceno LC. (2012). Potencial de *Penicillium citrinum* para controle *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal, Monografia, Universidade Federal do Rêconcavo da Bahia. 69 pp.
- Elias BC(2005). Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos de culturas de *Penicillium verrucosum* Dierck23p., (Dissertação) Mestrado em Produtos Naturais e Sinteticos, FCF-USP. Ribeirão Preto.
- Pallu APS (2010). Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana de açúcar, (Tese) Doutorado em Genetica e melhoramento de plantas, Piracicaba. 130pp.
- Pitt JI (1985). A laboratory guide to common *Penicillium* species. Common wealth scientific and industrial research organization division of food research. Australia. 6pp.
- Rousseau M (1984). Study of the surface flora of traditional Camembert cheese by scanning electron microscopy *Milch Wissens Chaft*, 39:129–134.
- Romeiro RM (2005). Bactérias patogênicas. Imprensa Universitária/ UFMG. Viçosa. 417pp.
- Silva RR,Lins GD (2008). Fungos e Aplicabilidades biotecnológicas, programa de pós-graduação em Biodiversidade Vegetal do IBT, São Paulo. 20pp.
- Terrasan CRF (2007). Produção e caracterização do complexo Xilanolítico de *Penicillium janczewskii*, 83pp. (Dissertação) Mestrado em Microbiologia Aplicada,, UNESP, Rio Claro.

Micro-organismos de solos amazônicos com habilidade em degradar gasolina obtida da Refinaria de Manaus (REMAN)

Oliveira F.R.¹; Oliveira L.A.¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA
E-mails: fabirochaoliveira@gmail.com, luizoli@inpa.gov.br

Resumo

A contaminação ambiental por derivados do petróleo, como a gasolina, diesel, entre outros, causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. O presente trabalho teve como objetivo testar isolados de rizobactérias com habilidade em degradar gasolina. Foi utilizado o método de estriagem em placa, contendo meio de cultura YMA modificado com 0,1 mL de gasolina como fonte de carbono. Em seguida foi verificada a capacidade dos microrganismos em degradar e tolerar esse composto, avaliando seu crescimento nas placas de Petri. Os resultados mostraram que os isolados testados são tolerantes à presença de gasolina. Do total de 90 isolados bacterianos avaliados, 12 mostraram crescimento máximo usando a gasolina como fonte de carbono (INPA_R561, R586, R589, R610, R614, R620, R621, R626, R630, R633, R652 e R732). Os demais mostraram ser moderados ou sensíveis ao cultivo contendo gasolina. Trata-se ainda de um trabalho inicial na busca de isolados de Rizobactérias capazes de degradar a gasolina, visando utilizá-las no processo de biorremediação de solos amazônicos contaminados.

Palavras-chave: Biorremediação, rizobactérias, tolerância à gasolina.

Introdução

O petróleo é um composto orgânico, formado por processos biogeoquímicos, constituído em sua maior parte por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. A contaminação ambiental por esta substância e por seus derivados (gasolina, álcool, diesel, etc.) causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. A maior

parte dos compostos de petróleo é passível de biodegradação; no entanto, trata-se de um processo lento, podendo levar décadas até a total descontaminação do ambiente.

A comercialização da gasolina tem como consequências negativas, a possibilidade de derramamento nos solos e águas regionais. Não há ainda no Estado do Amazonas, estudos sobre o impacto negativo da contaminação dos solos e rios por esse composto químico, bem como as características da população microbiana tolerante e possivelmente responsável pelo processo de biorremediação natural.

Os processos biológicos de descontaminação, enquadrados na categoria de biorremediação, utilizam, geralmente, micro-organismos autóctones ou introduzidos com capacidade de biodegradar parcial ou totalmente as substâncias contaminantes. A biorremediação é uma tecnologia que utiliza micro-organismos para minimizar ou remover poluentes, assim como os hidrocarbonetos dos compostos derivados do petróleo no ambiente sem afetar o equilíbrio ecológico (Autry e Ellis, 1992; Desai e Banat, 1997).

Foi avaliada a capacidade de 90 isolados de rizobactérias em degradarem a gasolina comercializada na região amazônica. Os resultados obtidos visam, portanto, indicar os micro-organismos com maiores potenciais de degradação desse produto para serem utilizados no processo de biorremediação de solos e/ou rios contaminados.

Material e Métodos

Os isolados de rizobactérias foram obtidos do banco de micro-organismos do LEBMAM (Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos da Amazônia) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /INPA. Cada isolado foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (Vincent, 1970) e incubados a 26,5°- 28° C até o crescimento das colônias (por cerca de 3 dias) para posteriores estudos e análises com gasolina. O meio de cultivo YMA é historicamente utilizado para o isolamento, purificação e crescimento de bactérias indutoras de nódulos em leguminosas, genericamente denominadas de rizóbios. As bactérias utilizadas foram isoladas dos nódulos de leguminosas coletados em diferentes localidades de Manaus/AM e municípios circunvizinhos.

Para avaliar a capacidade de degradação da gasolina, foram testados 90 isolados de rizobactérias por meio do método proposto por Oliveira e Magalhães (1999), realizado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA modificado, onde foi utilizado 0,1 mL de gasolina como

fonte de carbono ao invés de manitol. Como controle usou-se o meio com manitol e sem gasolina, com todos os tratamentos realizados em quadruplicata. As avaliações foram feitas após 10 dias de crescimento à temperatura ambiente (± 26 °C). O processo de avaliação consistiu na atribuição de notas 1,00 (sem crescimento visível) a 4,00 (máximo crescimento). Foram também atribuídas notas intermediárias, subdivididas em 0,25, ou seja, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00 até 4,00. Consideraram-se como os de melhores crescimentos, os que apresentaram notas médias acima de 3,06.

Resultados e Discussão

Conforme o método proposto por Oliveira e Magalhães (1999), foi observado que todos os isolados avaliados apresentaram crescimento no meio de cultura YMA modificado, adicionado com 0,1 mL de gasolina (Figura 1 e Tabela 1).

Na figura 1 observa-se a nota 4 de crescimento bacteriano, identificada como bactéria altamente tolerante ao cultivo adicionado de gasolina como fonte de carbono.

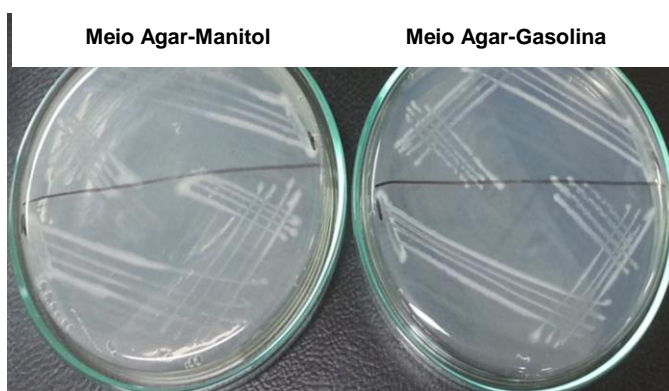


Figura 1. Crescimento máximo mostrado pela bactéria INPA_R586 cultivada em meio Agar-Manitol e Agar-Gasolina por um período de 10 dias em temperatura ambiente.

Do total de 90 isolados bacterianos avaliados, 12 (~13%) foram bastante tolerantes e usaram a gasolina como fonte de carbono, tendo em vista que apresentaram um crescimento alto na presença de gasolina no meio sólido (nota acima de 3,06), sendo eles INPA_R561, R586, R589, R610, R614, R620, R621, R626, R630, R633, R652 e R732. Dos demais isolados (cerca de 90% do total), 41 mostraram crescimentos moderados (notas 2,06 - 3,00) e outros 37 foram sensíveis (notas 1,00 - 2,00) ao cultivo contendo gasolina como fonte de carbono (Tabela 1).

Tabela 1 - Crescimento de rizobactérias em meio Agar-manitol (M) e Agar-gasolina (G) após 10 dias de incubação à temperatura ambiente. (Notas segundo Oliveira e Magalhães, 1999).

Isolados	M	G	Isolados	M	G	Isolados	M	G
INPA R007	1,3	1,3	INPA R571	2,0	2,0	INPA R621	3,8	3,4
INPA R020	2,6	2,4	INPA R572	1,3	1,3	INPA R624	2,0	1,7
INPA R028	2,3	2,8	INPA R573	2,0	2,0	INPA R625	2,0	2,0
INPA R076	2,3	2,4	INPA R575	2,7	2,3	INPA R626	3,9	3,9
INPA R178	2,3	2,3	INPA R576	2,1	2,1	INPA R628	2,9	2,4
INPA R183	3,0	2,7	INPA R577	2,9	2,9	INPA R630	3,8	3,7
INPA R529	2,1	2,5	INPA R578	1,7	1,3	INPA R631	3,0	2,5
INPA R537	2,5	2,4	INPA R580	3,0	2,5	INPA R633	3,9	3,1
INPA R545	2,6	2,4	INPA R581	2,0	2,0	INPA R634	3,0	2,6
INPA R546	2,4	2,1	INPA R582	2,8	2,9	INPA R640	3,0	2,5
INPA R547	3,0	2,8	INPA R583	1,7	1,3	INPA R642	2,0	2,0
INPA R548	2,0	2,0	INPA R586	4,0	4,0	INPA R644	3,0	2,5
INPA R549	3,0	2,5	INPA R587	2,0	1,8	INPA R645	3,0	2,8
INPA R550	3,0	2,5	INPA R588	2,4	2,3	INPA R646	1,8	1,6
INPA R551	2,0	1,5	INPA R589	3,1	3,1	INPA R649	1,3	1,3
INPA R552	2,6	2,9	INPA R590	2,5	3,0	INPA R650	2,6	2,1
INPA R553	3,0	2,5	INPA R592	1,9	1,9	INPA R650	2,0	2,0
INPA R554	3,0	3,0	INPA R593	2,0	1,8	INPA R651	3,0	2,5
INPA R555	2,6	2,1	INPA R595	3,0	2,9	INPA R652	4,0	3,5
INPA R556	3,0	2,5	INPA R597	1,9	1,4	INPA R654	1,4	1,5
INPA R557	2,0	2,0	INPA R599	2,0	2,0	INPA R655	2,0	1,5
INPA R558	2,5	2,1	INPA R607	1,3	1,3	INPA R656	1,8	1,6
INPA R559	1,7	2,0	INPA R610	3,8	3,2	INPA R662	2,2	2,3
INPA R560	3,0	2,5	INPA R612	3,0	2,5	INPA R666	3,0	2,5
INPA R561	3,9	3,1	INPA R613	2,0	1,5	INPA R667	1,6	1,6
INPA R562	1,4	1,4	INPA R614	3,1	3,3	INPA R668	2,0	1,6
INPA R563	1,9	1,9	INPA R615	2,0	1,6	INPA R674	1,3	1,3
INPA R566	2,5	3,0	INPA R618	2,0	1,5	INPA R675	1,4	1,6
INPA R568	2,5	2,1	INPA R619	2,0	1,6	INPA R676	1,4	1,3
INPA R569	3,0	2,7	INPA R620	3,2	3,8	INPA R732	4,0	3,7

De acordo com os dados da tabela 1, observa-se que para muitos isolados, não houve diferença de crescimento nos dois meios utilizados (Agar-Manitol e Agar-Gasolina), sugerindo que essas bactérias apresentam uma boa adaptação, ou seja, um crescimento satisfatório quando utilizada a gasolina como fonte de carbono, sob as condições testadas, sendo que os melhores isolados foram INPA_R586, R626, R652 e R732.

A gasolina é um dos principais produtos resultantes da destilação do petróleo, podendo apresentar de 6-12 átomos de carbono em sua cadeia (Farias, 2008); trata-se de um composto altamente complexo e que pode servir como fonte utilizável no metabolismo de determinados micro-organismos. Esses podem ser utilizados como fontes de biorremediação, por meio do uso de suas enzimas capazes de degradar essa substância presente em solos ou outros ambientes contaminados.

Ecologicamente, micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos são amplamente distribuídos e as dificuldades encontradas para caracterizar comunidades microbianas de ambientes impactados por esses compostos são agravadas pela grande quantidade de substratos específicos e interações metabólicas possíveis (Wetler-Tonini *et al.*, 2011). Tais micro-organismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes e são capazes de degradar a maioria desses compostos para suprir as suas necessidades energéticas e de crescimento, iniciando assim o processo de biodegradação (Bernoth *et al.*, 2000). Alguns trabalhos foram realizados utilizando isolados de rizóbios na degradação de compostos derivados do petróleo (Lindström *et al.*, 2003; Poonthigpun *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2011).

A grande motivação de pesquisas e estudos de biodegradação é, sem dúvida, a busca de micro-organismos versáteis capazes de degradar, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a baixo custo operacional, utilizando aqueles que não prejudiquem a vida existente nas áreas contaminadas. Entre as rizobactérias de interesse, o gênero *Rhizobium* ou similares apresenta características adequadas para ser utilizado num processo de biorremediação, pois além de apresentar todas as características citadas, não são patogênicas, não prejudicando assim o homem, a fauna e a flora existentes no meio ambiente.

Trata-se ainda de um trabalho inicial na busca de isolados de rizobactérias capazes de degradar os derivados do petróleo, assim como a gasolina. Há, entretanto, necessidade de uma busca de um maior número de isolados e testes mais aprofundados para avaliar a eficiência

enzimática dessas bactérias, como forma de indicar as mais aptas para serem utilizadas no processo de biorremediação de solos amazônicos contaminados.

Conclusões

Do total de 90 isolados de rizobactérias, apenas doze mostraram-se altamente tolerantes quando presentes no meio de cultivo Agar-Gasolina, dos demais isolados, 41 mostraram crescimentos moderados (nota 2,06 - 3,00) e outros 37 sensíveis (1,00 - 2,00);

Doze isolados de rizobactérias (INPA_ R561, R586, R589, R610, R614, R620, R621, R626, R630, R633, R652 e R732) mostraram crescimentos elevados usando a gasolina como fonte de carbono e apresentam potencial para serem usadas futuramente em inoculantes visando descontaminar solos contaminados com gasolina.

Alguns isolados mostraram pouco crescimento nos dois meios, indicando dificuldades de usarem o manitol e a gasolina como fontes de carbono nas condições experimentais.

Referências

- Autry A.R., Ellis G.M. (1992). Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environmental Progress*, 11(4):318-323.
- Bernoth L., Firth I., Mcallister P., Rhodes S. (2000). Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. *Miner. Metall. Proc.*, 17:105-111.
- Coelho F.J.R.C., Sousa S., Santos L., Santos A.L., Almeida A., Gomes N.C.M., Cunha A. (2010). PAH degrading bacteria in an estuarine system., Eds., N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe, *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants*. p. 77–87.
- Desai J.D., Banat I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1):47-64.
- Farias R.F. (2008). Introdução à química do Petróleo. *Ciência Moderna*, Rio de Janeiro, 1º Ed., 106 p.
- Lindström K., Jussila M.M., Hintsala H., Kaksonen A., Mokolke L., Mäkeläinen K., Pitkäljärvi J., Suominen L. (2003). Potential of the *Galega – Rhizobium galegae* System for Bioremediation of Oil-Contaminated Soil. *Food Technol. Biotechnol.* 41(1):11–16.
- Oliveira L.A., Magalhães H.P. (1999). Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, 30:203-208.

Poonthrigpun S., Pattaragulwanit K., Thanyanuch S., Juntongjin K.K., Thaniyavarn S., Petsom A., Pinphanicharkarn P. (2006). Novel Intermediates of Acenaphthylene Degradation by *Rhizobium* sp. Strain CU-A1: Evidence for Naphthalene-1,8-Dicarboxylic Acid Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9):6034–6039.

Vincent J.M. (1970). *A manual for practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook N. 15. Blackwell Scient. Publ. 140p.

Wen Y., Zhang J., Yan Q., Li S., Hong Q. (2011). *Rhizobium phenanthrenilyticum* sp. nov., a novel phenanthrene-degrading bacterium isolated from a petroleum residue treatment system. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 57:319–329.

Wetler-Tonini R.M.C., Rezende C.E., Gravitol A.D. (2011). Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus derivados. *Revista Virtual Química*. 3(2):78-87.

Espécies de bactérias associadas a larvas de *Anopheles darlingi* Root, 1926, em seu ambiente aquático.

Oliveira M.R.¹, Gama A.M.², Katak R.¹, Matos E.², Terenius O.³, Marinotti O.⁴, Tadei, W.P.⁵, Souza A.Q.L.²

¹ Universidade Estadual do Amazonas (UEA), ² Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
³ Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), ⁴ University of California, Irvine (UCI),
omarinotti@gmail.com, ⁵ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA),
E-mail: martabiotec@yahoo.com.br ; auri_matos@yahoo.com.br

Resumo

A malária é uma doença parasitária responsável por milhares de mortes no mundo. No Brasil o principal vetor da malária é o *Anopheles darlingi*. Este vetor encontra-se associados a uma diversidade de micro-organismos, dentre os quais se destacam as bactérias, que têm se tornado parte integrante dos programas de controle de vetores. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar isolados bacterianos associados a larvas de *A. darlingi* em seu ambiente aquático, no estado do Amazonas. Foram coletadas amostras de água dos criadouros naturais de *A. darlingi* no estado de Amazonas. As bactérias foram isoladas a partir dessas amostras, em seguida foram realizadas as extrações de DNA e identificação por meio da amplificação e sequenciamento do rDNA. Foram identificadas nove espécies bacterianas, pertencentes a três filos, sete famílias e nove gêneros diferentes. Sequências de seis isolados não foram encontradas no NCBI. Desta forma demonstrou-se que o habitat aquático das larvas de *A. darlingi* abrigam uma rica diversidade bacteriana.

Palavras chaves: *Anopheles darlingi*, Malária, Microbiota Bacteriana.

Introdução

A malária é uma doença infecciosa, considerada como um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, sendo estimados cerca de 250 milhões de casos anualmente em mais de 109 países (WHO, 2009), sobretudo nos países em

desenvolvimento e sub-desenvolvidos. Sua transmissão é dada pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818. Sendo o *A. darlingi* Root, 1926, o seu principal vetor na região Amazônica, onde ocorrem a maioria dos casos no Brasil (Tadei *et al.*, 1998).

Considerando-se o desafio de longo prazo da erradicação da malária, é essencial aumentar o conhecimento sobre a ecologia, biologia e o comportamento de seus vetores (Hiwat e Bretas, 2011) em especial na sua fase imatura. Sabe-se que várias espécies de larvas de mosquitos se alimentam de partículas orgânicas suspensas na água e de micro-organismos, principalmente bactérias (Forattini, 1996), sendo essas muitas vezes sua única fonte de alimento (Merritt *et al.*, 1992). Várias espécies bacterianas têm sido identificadas no intestino de mosquitos adultos através de diferentes técnicas mediadas por cultura convencional (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011) e estas foram adquiridas a partir do seu ambiente aquático, durante o desenvolvimento larval. Entretanto, vale ressaltar que estudos sobre a biodiversidade microbiana associada ao ambiente aquático desses insetos vetores permanecem escassos.

Portanto, pesquisas que buscam conhecer a microbiota associada a insetos vetores, são de grande relevância para implementação de políticas com estratégias mais eficazes de controle da malária no mundo. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar isolados bacterianos associados ao ambiente aquático de larvas de *A. darlingi* no estado do Amazonas.

Material e Método

A coleta do material foi realizada no lago do Puraquequara (S 03° 03. 230' W 059° 53. 533') no município de Manaus-AM, de onde foram coletadas amostras de água de quatro pontos equidistantes (cinco metros cada um). As amostras foram recolhidas de criadouros específicos de *A. darlingi*, previamente identificados pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde. Em tubos Falcon de 50 mL estéreis foram recolhidas amostras de água da superfície e mantidas a 4 °C até a chegada ao laboratório de Genética, da Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas- ESA/UEA.

Para cada amostra adquirida foram espalhados 100 µL em placas de Petri com meio de cultura Luria-Bertani (LB) e Agar Nutriente (NA) contendo de 100 µg/mL de fluconazol. As placas foram incubadas a 18, 26 e 40° C por oito dias, a partir de 24 h

iniciou-se o isolamento das colônias pela técnica do esgotamento por estrias cruzadas em seguida a realização da técnica de coloração de Gram.

Posteriormente foi realizada a identificação molecular com as seguintes etapas: lise celular por choque térmico, descrito por Stemmer (1994) com modificações para obtenção do DNA molde, em seguida realizou-se a amplificação do gene *16S* do *rDNA* com os iniciadores: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3') (White et al., 1990), utilizando o protocolo de PCR descrito por Boichenko et al, (2000), a verificação da PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1 % coradas com GelRed®, após a corrida o gel foi fotodocumentado em transluminador de luz UV.

Os fragmentos de *rDNA* amplificados na reação de PCR, foram purificados utilizando a enzima ExoSAP®(Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota do DNA purificado foi usado para as reações de sequenciamento, com o kit de sequenciamento BidDye Terminator V 3.1. (Life Technologies) e 0,5 µM do mesmo oligonucleotídeo foi utilizado para a reação de sequenciamento no sequenciador 3.500 da Applied Biosystems. A identificação das bactérias foi feita através da comparação das sequências de nucleotídeos obtidas com as depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>) a fim de comparar as sequências das amostras deste trabalho com as depositadas no GenBank. A partir de todas as 19 sequências *16S rRNA* obtidas neste estudo, realizou-se a construção do dendograma utilizando o programa MEGA, versão 4 (Tamura et al., 2007). O alinhamento das sequências foi feita pelo programa Clustral W e o dendograma foi gerado pelo método Neighbor-Joining, com Bootstrap de 1000.

Resultados

A partir das quatro amostras de água coletadas do criadouro do *A. darlingi*, foram isolados 180 bactérias, destas foram selecionadas 19 diferentes tipos com características morfológicas bem distintas (representando a diversidade encontrada), para a realização do sequenciamento do gene 16S rRNA. Por meio das análises de bioinformática das sequências obtidas foram identificadas nove espécies bacterianas (*Aeromonas jandaei*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*, *Pseudomonas* sp e *Serratia marcescens* e de seis amostras não foram possíveis realizar

a identificação taxonômica, uma vez que as sequências obtidas não foram encontradas nos bancos de dados do NCBI sendo consideradas como organismos incultos.

Foram identificados um total de três filos (*Actinobactérias*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*), sete famílias (*Aeromonadaceae*, *Bacillaceae*, *Brevibacteriaceae* *epidermidis*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Neisseriaceae* e *Pseudomonadaceae*) e nove gêneros (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* e *Serratia*).

O Dendograma com todas as 19 sequências *16S rRNA* obtidas, mostra a grande diversidade das diferentes espécies bacterianas encontradas nesta pesquisa (Figura 1).

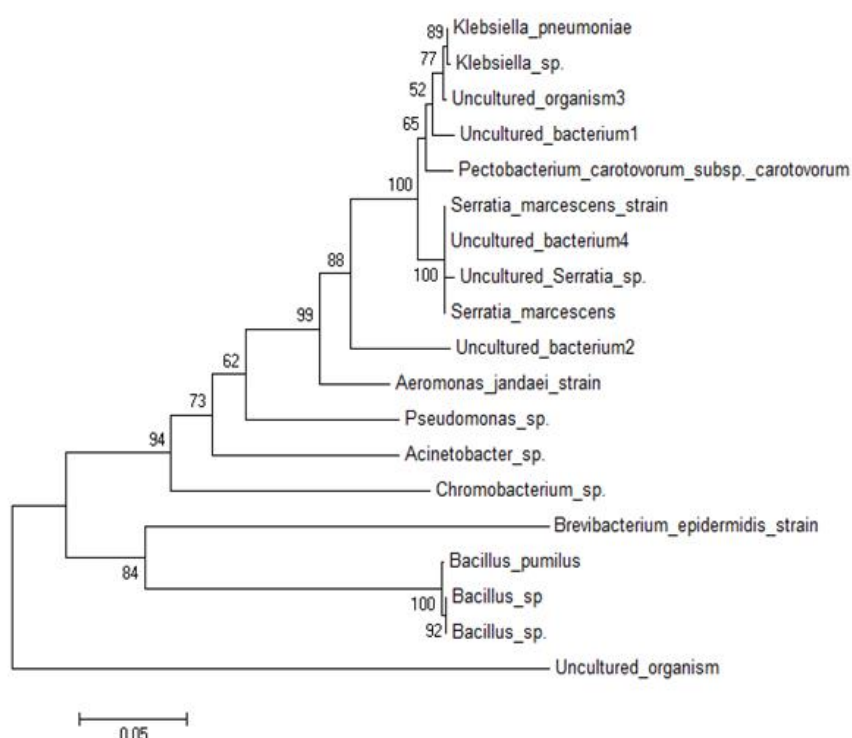


Figura 1 - Dendrograma resultante da análise Bayesiana com sequências do marcador 16S do rDNA sequenciadas neste estudo.

Discussão

As análises dos dados demonstraram que as diferentes espécies bacterianas encontradas no habitat natural das larvas dos mosquitos estão intimamente ligadas a diferentes estágios de vida do gênero *Anopheles*, como descritos por diversos autores. Os gêneros *Bacillus*, *Serratia* e *Pseudomonas* foram encontrados no intestino médio de diferentes vetores da malária no mundo, tais como *A. arabiensis* em estudo realizado na

Zâmbia (Cirimotich *et al.*, 2011), *A. stephensi* na Índia (Rani *et al.*, 2009) além do *A. gambiae* (Lindh *et al.*, 2005). A família com maior predominância neste trabalho foi a *Enterobacteriaceae* que segundo Cirimotich *et al.* (2011) e Pumpuni *et al.* (1993) são capazes de inibir o desenvolvimento de espécies *Plasmodium* no intestino médio do *A. albimanus* e *A. stephensi*.

Dos três filos encontrados destaca-se o filo *Firmicutes* que apresentam espécies de *Bacillus* que tem alto potencial como agentes de controle biológico de diferentes populações de mosquitos (Minard *et al.*, 2013; Geetha *et al.*, 2010).

As sequências 16S do rRNA de cinco bactérias não identificadas nos bancos de dados do NCBI potencialmente são novas espécies ainda não descritas, uma vez que as mesmas foram isoladas de amostras amazônicas, que apresenta uma das maiores biodiversidade do planeta e poucos são os estudos com essa ênfase na região. Ressaltando que ainda permanecem escassos os dados sobre a microbiota bacteriana e seus potenciais genéticos relacionados ao habitat naturais dos Anofelinos em seus diferentes estágios de vida.

Conclusão

Foram identificadas nove espécies bacterianas, pertencentes a três filos, sete famílias e nove gêneros diferentes. As sequências de seis isolados não foram encontradas no NCBI. Desta forma, conclui-se que os isolados bacterianos presente no ambiente aquático das larvas de *A. darlingi* apresentam uma rica diversidade.

Referências

- Boichenko LV, Boichenko DMV, Vinokurrova NG (2000) Use of Polymerase Chain Reaction for Searching for Products of Ergot Alkaloids From Among Fungi. *Microbiology* 70(12):360-368.
- Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford AL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos, G (2011) Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science* 322: 855-858.
- Forattini OP (2002) Culicidologia Médica, v. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
- Forattini OP (1996) Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia. Ed. EDUSP.

Geetha I, Manonmani AM, Paily KP (2010) Identification and characterization of a mosquito pupicidal metabolite of a *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain. *Appl Microbiol Biotechnology* 86:1737-1744.

Hiwat H, Bretas G (2011) Ecologia de *Anopheles darlingi* Root em Relação ao Vetor Importância: uma revisão. *Parasitas e Vetores* 4:145-154.

Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O' Neill SL (2011) Wolbachia and the Biological Control of Mosquito-Borne Disease. *EMBO Reports* 12(6):508–518.

Lindh JM, Terenius O, Faye I (2005) 16S rRNA Gene-Based Identification of Midgut Bacteria from Field-Caught *Anopheles gambiae* Sensu Lato and *A. funestus* Mosquitoes Reveals New Species Related to Known Insect Symbionts. *Appl Environ Microbiol* 71:7217-7223.

Mcmeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SC (2009) Stable Introduction of a Life-Shortening Wolbachia Infection Into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323(5920):141-144.

Merritt RW, Dadd RH, Walker ED (1992) Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes. *Annu Rev Entomol.*37:349-76.

Minard G, Mavingui P, Moro CV (2013) Diversidade e Função da Microbiota Bacteriana no Holobiont Mosquito. *Parasitas e Vetores* 6:146-158.

Pumpuni CB, Beier MS, Nataro JP, Guers LD, Davis JR (1993) *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gramnegative bacteria. *Exp Parasitol* 77(2):195-199.

Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK (2009) Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*- an Asian malarial vector. *BMC Microbiol* 9:96-118.

Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Stemmer WPC (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370(6488):389-391.

Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS (1998) Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brasilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 59(2):325-35

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol* 24(8):1596–1599.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-322.

World Health Organization (WHO) (2009) *World malaria report 2009*. In, World Health Organization. 78p.

Atividades celulolíticas, proteolíticas e ureolíticas de rizóbios provenientes de solos amazônicos.

Peixoto J VO³, Minelli- Oliveira C², Brito L L², Oliveira L A¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia -INPA, Manaus -AM, ² PPG Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas UFAM, Manaus, AM ³ Universidade Estadual do Amazonas UEA, Manaus, AM.

E-mail jpeixotovarsovia3@gmail.com, (luci_brito@hotmail.com, luizoli@inpa.gov.br cassymminelli@hotmail.com).

Resumo

A associação rizóbios com leguminosa contribui para enriquecer o solo com nitrogênio por meio da fixação biológica. Entretanto, pouco se conhece a respeito do perfil enzimático desses microrganismos. Nesse contexto, a presente investigação propôs avaliar a produção de enzimas por isolados de rizóbios nativos da Amazônia. Essa triagem constitui o primeiro passo na seleção de micro-organismos nativos que são potencialmente exploráveis como produtores de enzimas. Foram testados 20 isolados nativos de rizóbios para as atividades celulolítica, proteolítica e ureolítica em meio YMA modificado. Dos 20 isolados de rizóbios da coleção do INPA testados, 15 se mostraram promissores nas atividades enzimáticas em meio contendo caseína como fonte de carbono, 10 em meio contendo celulose e 10 em meio contendo ureia. Foram observados isolados que atingiram crescimentos elevados nos meios com caseína e celulose até o 9º dia, mas foi observado que os rizóbios inoculados no meio de ureia necessitaram de 15 dias para que seu crescimento fosse completo.

Palavras-chave: Carboximetilcelulase, protease, urease

Introdução

Os micróbios são organismos muito pequenos que em geral podem ser visualizados com o uso de microscópio (Tortora *et al.*, 2012). Estes são de extrema importância ecológica na manutenção do equilíbrio do ambiente pela reciclagem dos elementos químicos entre o solo, os organismos e a atmosfera e são utilizados em aplicações comerciais e industriais para produzir alimentos, químicos, tratamento de detritos, controle de pestes e limpeza de poluentes.

Os micro-organismos têm um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas, o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (Jayani *et al.*, 2005). As enzimas de origem microbiana possuem

menor custo de produção do que as de origem animal e vegetal, podem ser produzidas em larga escala em fermentadores industriais e oferecem um amplo espectro de características físico-químicas.

A identificação de novas fontes microbianas é de grande interesse estratégico, pois garantem o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais. Os resíduos lignocelulósicos vêm sendo utilizados em processos biotecnológicos devido a aspectos econômicos, ambientais e à farta disponibilidade. Uma de suas aplicações é a produção de enzimas celulolíticas para a obtenção de açúcares fermentescíveis, utilizados na geração do bioetanol de segunda geração e servindo como fonte de energia renovável (Dashtban *et al.*, 2010).

Oliveira *et al.* (2006), ao estudarem a capacidade de rizóbios nativos da Amazônia em produzir enzimas hidrolíticas, reportaram a atividade amilolítica como a mais frequente. Porém, não se pode negligenciar as potencialidades de uso dessas bactérias como fontes de outras enzimas de reconhecido valor industrial, caso das lipases, pectinases e proteases (Van Beilen, 2002; Kirk *et al.*, 2013). O presente estudo objetivou avaliar em meios de cultura solidificados, as atividades celulolíticas, proteolíticas e ureolíticas de rizóbios nativos da Amazônia.

Material e Métodos

Obtenções das amostras

Foram testados 20 isolados de rizóbios obtidos da Coleção de Micro-organismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos do INPA.

Avaliações dos isolados capazes de usar caseína, celulose e ureia como fontes de carbono.

Para esta avaliação, foi usado o meio de cultura YMA (Vincent, 1970) modificado, onde se substituiu o manitol por carboximetilcelulose, caseína ou ureia como fontes de carbono. Foram feitas três repetições de cada meio para cada isolado.

A avaliação de crescimento foi feita pelo método de Oliveira e Magalhães (1999). Tal método leva a um processo de diluição do micro-organismo, onde a zona 1 é a de maior concentração e a zona 4, a mais diluída (Figura 1). De acordo com o crescimento de cada rizóbio, foram atribuídos valores variando de 1,00 (sem

crescimento visível na zona 1) a 4,00 (máximo crescimento na zona 4), podendo ter valores intermediários entre esses extremos (Figura 2 e Tabela 1). As placas foram mantidas em condições de laboratório com 28 ± 2 °C de temperatura. As avaliações foram realizadas a cada três dias, até os 15 dias.

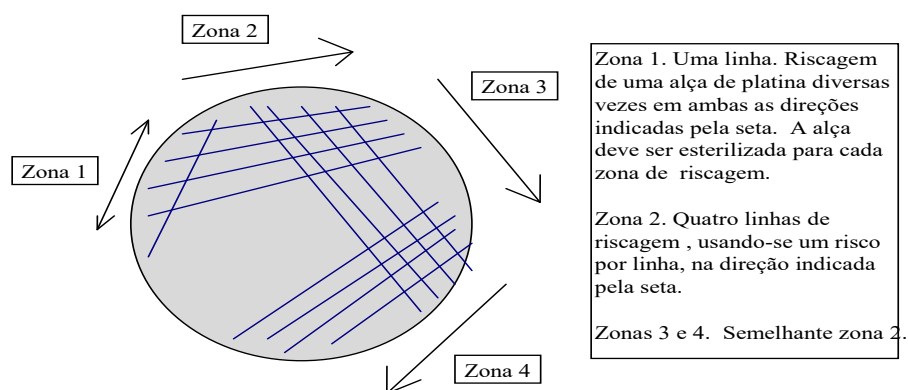


Figura 1. Método de avaliação do crescimento bacteriano segundo Oliveira e Magalhães (1999).

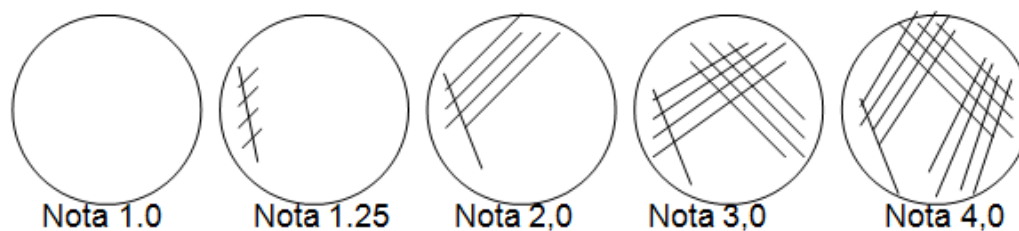


Figura 2. Pontuações (notas) aplicadas para o crescimento das bactérias segundo Oliveira e Magalhães (1999).

Tabela 1- Faixas de pontuação para avaliação do crescimento das bactérias.

GRAU DE CRESCIMENTO	FAIXA DE PONTUAÇÃO
Baixo	1,00 – 2,00
Médio	2,06* - 3,00
Alto	3,06** - 4,00

* Três repetições com nota 2,0 e uma com 2,25. ** Três repetições com nota 3,0 e uma com 3,25 (Oliveira e Magalhães, 1999).

Avaliações do potencial de degradação de caseína, celulose e ureia.

Atividade proteolítica

A habilidade das bactérias em hidrolisar proteínas foi testada em meio YMA modificado contendo 10 g de caseína como substituto do manitol como fonte de carbono em pH 5,5.

Atividade celulolítica

A produção de celulase foi detectada, adicionando-se ao meio YMA modificado, 10g de carboximetilcelulose em substituição ao manitol, com pH 5,5. Avaliou-se a atividade por sete dias a 28° C.

Atividade ureolítica

A atividade ureolítica foi avaliada pela metodologia proposta por Christensen (1946), modificada com substituição da solução de ureia a 40% por 20g/L de ureia. Além da ureia, a composição do meio em g/L foi: 1,0g de glicose, 1,0 de peptona, 15gde agar em pH 6,8. A atividade dos micro-organismos produtores de urease foi constatada após quinze dias de incubação.

Resultados de Discussão

Avaliações dos isolados de rizóbios

Os rizóbios apresentam alta diversidade genética e conseguem se adaptar a diferentes condições de solos, podendo se desenvolver nas rizosferas de leguminosas, onde induzem a formação de nódulos, como também, nos de não leguminosas ou leguminosas não compatíveis, onde, apesar de não induzirem nodulação, conseguem se multiplicar em grandes números. Na ausência de plantas na área de solo, podem apresentar habilidade saprofítica elevada, usando matéria orgânica como fonte de carbono (Zilli *et al.*, 2013).

A Tabela 2 mostra os melhores isolados quanto ao crescimento em meio de cultura contendo carboximetilcelulose em decorrência da atividade celulolítica, que apresentaram pontuações superiores a 3,0 até o nono dia de crescimento. Desses, os que

apresentaram melhores crescimentos foram os identificados como INPA R577, R549, R547, R562, R561, R955 e R618, por já apresentarem máximo crescimento (pontuação de 4,0) já na primeira avaliação, aos 3 dias. Segundo Oliveira e Magalhães (1999), os que crescem mais rápidos são os que adaptam ao meio de cultura testado.

Tabela 2. Crescimento dos isolados de rizóbios em meio contendo carboximetilcelulose como fonte de carbono.

Isolados de rizóbios (INPA)	Dia de incubação				
	3	6	9	12	15
R577	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R549	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R547	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R562	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R561	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R615	1,50	3,06	4,00	4,00	4,00
R556	1,50	1,00	2,50	3,00	4,00
R955	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
R618	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

Com relação aos rizóbios produtores de proteases (Tabela 3), também observou-se que dos 20 testados, 15 mostraram crescimentos elevados como indicativo da produção dessa enzima. Todos, exceto o isolado INPA R577, cresceram aos 3 dias de incubação, mostrando que nesse meio de cultura é ótimo para esses rizobios.

Tabela 3. Crescimento dos isolados de rizóbios em meio contendo caseína como fonte de carbono.

Isolados de rizóbios (INPA)	Dias de incubação				
	3	6	9	12	15
R577	1,0	2,5	3,0	4,0	4,0
R955	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R942	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R957	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R954	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R620	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R605	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R598	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R612	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R586	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R558	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R618	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Quanto á atividade ureolítica, 10 dos 20 isolados mostraram-se superiores aos demais (Tabela 4). Desses, o melhor foi o isolado INPA R553 que apresentou crescimento máximo já aos 3 dias de incubação.

Tabela 4. Crescimento dos isolados de rizóbios em meio contendo ureia como fonte de carbono.

Isolados de rizóbios (CMINPA)	Dias de incubação				
	3	6	9	12	15
R610	1,0	2,0	3,0	4,0	4,0
R592	1,5	2,5	3,0	4,0	4,0
R581	1,0	2,0	3,0	4,0	4,0
R942	0,5	1,0	2,5	3,0	4,0
R958	0,0	0,5	1,0	2,5	3,0
R548	0,0	0,5	1,5	3,0	4,0
R593	1,0	2,0	3,0	4,0	4,0
R553	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
R606	0,0	0,5	1,0	2,5	3,0

Conclusões

Dos 20 isolados de rizóbios da coleção do INPA testados, 10 mostraram-se promissores como produtores de celulasas, 15 como produtores de proteases e 10 como produtores de ureases.

Os rizóbios inoculados no meio com ureia necessitaram de 15 dias para completar o crescimento.

Este estudo revelou alguns isolados de rizóbios nativos da Amazônia como fontes promissoras de enzimas de importância industrial para uso biotecnológico.

Agradecimentos

Agências de Fomento: CNPq e FAPEAM pelo apoio financeiro e bolsas.

Referências

Christensen WB (1946) Urea decomposition as means of differentiating Proteus and Paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. *J. Bact.*, 52:461-466.

Dashtban M, Maki M, Leung KT, Mao C, Qin W (2010) Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Review in Biotechnology*, 30(4):302-309.

Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytical enzymes: a review. *Process Biochem.*, 40:2931– 2944.

Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4):345-351.

Oliveira LA, Magalhães HP (1999) Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, 30:203-208.

Oliveira NA, Oliveira LA, Andrade JS, Chagas Júnior AF (2006) Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26:853-860.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2012) *Microbiologia*. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva et al. Revisão: Flávio Guimarães da Fonseca. 10 ed. Porto Alegre; Atmed.

Van Beilen JB (2002) Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4):338-344.

Vincent JM (1970) *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications (International Biology Program Handbook, 15. London), 164 p.

Zilli JÉ, Pereira GMD, França JI, Silva K, Hungria M, Rouws JRC (2013). Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. *Acta Amazonica*, 43:153-160. DOI: 10.1590/ S0044-59672013000200004

Caracterização morfológica de bactérias isoladas do habitat de larvas de *Anopheles darlingi* Root, 1926 do município de Coari, AM

Rocha EM¹, Katak RM², Oliveira MR¹, Gama AM¹, Souza AQL², Tadei WP³

¹ Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus, AM, ²Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, ³Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM. Email: elerson.matos@hotmail.com

Resumo

A diversidade microbiana associada com larvas de insetos vetores de doenças é fundamental para um bom funcionamento do habitat, pois estão relacionados com alimentação, desenvolvimento e reprodução desses insetos. Conhecer a microbiota associadas às larvas de mosquitos é importante, considerando que dependendo de suas funções, esses seres microscópicos podem até serem utilizados para o controle de insetos vetores de doenças, como a malária que na região amazônica é transmitida, principalmente, pelo mosquito *Anopheles darlingi* Root, 1926. Este inseto se procria em lagos situados, principalmente perto de áreas Peri-urbanas. Este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar morfológicamente bactérias associadas ao habitat larval de *A. darlingi* do Município de Coari no Estado do Amazonas. Foram obtidas 84 colônias isoladas de amostras de água, as quais foram caracterizadas de acordo com as formas, cor, textura, Gram positivas e negativas. A diversidade encontrada corresponde a 32 possíveis gêneros, entre bacilos Gram- com sete representantes, bacilos Gram+ com quatro, cocos Gram- com dezesseis e cocos Gram+ com 5 representantes.

Palavras-chave: Bioprospecção, malária, microbiota aquática.

Introdução

A malária é uma doença infecciosa, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* Machiafava e Celli, 1983, transmitida ao homem pela picada da fêmea contaminada do mosquito *Anopheles* Meigen, 1818, considerado vetor nessas

condições. A espécie de vetor mais prevalente na região Amazônica é *A. darlingi* Root, 1926 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A malária é uma doença que causa grandes impactos negativos à saúde pública e à economia, em suas áreas de ocorrência. De acordo com o relatório mundial da malária da Organização Mundial da Saúde, em 2013 cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, situadas em regiões tropicais do planeta. Estima-se que 198 milhões de casos de malária ocorreram no mundo com um número de 584.000 óbitos e que essa enfermidade prevalece em 104 países, dos quais 35 estão no Continente Africano, que apresenta o maior número de casos correspondendo 90% de todas as mortes por malária no mundo, sendo que as crianças com idade menores de 5 anos representam 78% de desse total (WHO, 2014).

Na Amazônia, as condições tropicais e o ciclo hidrológico da região favorecem a formação de inúmeros criadouros propiciando a proliferação de mosquitos. Em decorrência das alterações ocasionadas por estes fatores ambientais, o aumento na densidade populacional dos vetores provoca a disseminação da malária, por toda a região (TADEI et al., 2010). Além disso, outros fatores que contribuem sobre maneira para os altos índices de malária na região tais como o limitado número de estratégias de controle disponíveis, as condições ambientais que favorecem a proliferação do vetor, suporte técnico limitado na implementação das ações de controle, a presença e a densidade de vetores, áreas que apresentam vetores com resistência aos inseticidas, dentre outros, Neste sentido, novos métodos de combate à doença são urgentemente necessários (RIEHLE et al., 2007).

Nos últimos anos, vários experimentos realizados validaram a ideia de que microrganismos presentes em mosquitos vetores da malária podem ser geneticamente modificados, para inibirem o desenvolvimento do plasmódio e tornarem os vetores refratários à transmissão da malária (SMITH et al., 2013). Porém, a microbiota bacteriana do habitat larval dos vetores da malária é pouco conhecida, como também não existem estudos sobre a diversidade bacteriana para o nicho destes vetores (LINDH et al., 2005).

O isolamento de bactérias presentes no habitat aquático de larvas de *A. darlingi* possibilitará identificar espécies simbiotes do inseto disseminador da malária na região amazônica. O primeiro passo é isolar e caracterizar bioquimicamente estas espécies,

neste contexto, este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar morfológicamente bactérias associadas ao habitat larval de *A. darlingi* do Município de Coari-AM.

Metodologia

As amostras de água foram coletadas no município de Coari no Estado do Amazonas, tendo em vista que é uma área de registros de casos de malária pelo SIVEP malária do Ministério da Saúde nos últimos anos. Foi selecionado um lago que apresenta alto índice de procriação larval de *A. darlingi*, sendo estabelecidos quatro pontos de coletas no lago. Foi utilizado um tubo falcon esterilizado para coletar 50 mL de água em cada ponto. Após a coleta, as amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo para o laboratório de controle biológico e biotecnologia da dengue e malária do INPA em Manaus-AM, onde foram feitos os devidos procedimentos.

Para este trabalho apenas o ponto 1 do lago de Coari foi analisado. Os meios de cultivo utilizados para o isolamento bacteriano foram: Nutriente Agar (NA), Lúria Bertani (LB) e Agar Tripitona de Soja (TSA). Para cada meio de cultivo foram preparadas 3 placas de Petri acrescido de 20 mg/mL de fluconazol e adicionado 50 µL da amostra e mais 3 placas controle. Em seguida, as placas de Petri foram etiquetadas com informações sobre a origem e armazenadas em uma estufa incubadora B.O.D a 26,4°C. Após 24 horas de crescimento foi feita a seleção das colônias presentes nas placas para o isolamento das bactérias. Para o isolamento da bactéria utilizou-se a técnica do esgotamento por estrias cruzadas a partir de uma única colônia. Após o isolamento, as bactérias foram purificadas pela mesma técnica de esgotamento com auxílio de uma alça de platina embebida em álcool 70% e flambada em chama no bico de Bunsen. Foram utilizados meios de cultivo apropriado para cada tipo de isolamento. Em seguida, as placas de Petri foram colocadas na B.O.D por 24 horas, para o crescimento bacteriano. Após o isolamento foi feita a caracterização morfológica, determinação da coloração de Gram e a contagem do número total de cada isolado obtido. As bactérias foram preservadas nos seus respectivos meios de cultivo na forma líquida com a adição de glicerol a 20% e estocadas em freezer a -20 °C. Os isolados encontram-se preservados no Laboratório de controle biológico e biotecnologia da dengue e malária do INPA em Manaus-AM e onde foi feitas as análises moleculares.

Resultados

Um total de 26 colônias foi isolado em meio de cultivo, sendo que estas foram agrupadas de acordo com a semelhança morfológica e coloração de Gram em 10 possíveis gêneros bacterianos codificados de G1 a G10. O grupo de G1, G10 e G4 apresenta o maior número de isolados com sete, quatro e três respectivamente, enquanto aos outros grupos G2, G5, G7, G8 e G9 apresentaram dois isolados e G3 e G6 com apenas um isolado para cada um.

Um total de 29 isolado foi obtido em meio de cultivo LB sendo que os isolados foram agrupados de acordo com suas semelhanças morfológicas e coloração de Gram em 9 possíveis gêneros bacterianos (G1 a G9). Os grupos G2, G5, G6 apresentaram quatro isolados para cada grupo. Enquanto que G4 é composto de cinco isolados, e os grupos G1 e G3 com três isolados cada um, e os demais G7, G8 e G9 com dois isolados para cada grupo.

Em meio de cultivo TSA, houve crescimento de 29 isolados, que foram agrupados em 13 possíveis gêneros bacterianos (G1 a G13). Destes, G3 e G9 representados com o maior número de isolados cada um com cinco. Enquanto que G1, G2 e G6, estão representados com três isolados cada. Os grupos G5, G7 e G11 também com dois isolados cada e os demais grupos G4, G8, G10 e G12 representados cada um com um único isolado.

A diversidade encontrada corresponde 84 isoladas bacterianos obtido de amostras de água, que foi caracterizado morfolologicamente em 32 possíveis gêneros, entre bacilos Gram - com sete representantes, bacilos Gram + com quatro isolados, cocos Gram - com dezesseis isolados e cocos Gram + com 5 isolados. Estes isolados serão identificados por métodos moleculares, além de ser feita análises estatísticas para determinação das espécies simbiotes de *A. darlingi*.

Discussão

Recentes estudos têm sido realizados para investigar as espécies bacterianas associadas a mosquitos do gênero *Anopheles*, a fim de entender as relações entre ambos e utilizar estas bactérias como alternativas de controle, por meio de novas técnicas desenvolvidas com aplicação de engenharia genética e biologia molecular, visando elucidar como as comunidades bacterianas podem estar associadas ao inseto no

processo imunológicos à infecções ocasionadas por protozoários do gênero *Plasmodium* que são os agentes etiológicos da malária (BOISSIÈRE, 2012; CHAVSHIN, et al., 2012; NGO, et al 2015; RANI, et al 2009).

No trabalho de Ngo, et al (2015) amostras de mosquitos adultos do gênero *Anopheles* capturados no Vietnam mostra um número expressivo de bactérias associadas. Apesar das bactérias serem de amostras diferentes, tanto as obtidas por estes autores como as isoladas nesta pesquisa, indica que não se pode descartar a hipótese de que a maior parte de bactérias, encontradas no intestino médio de adultos, é oriunda dos habitats aquáticos em que se desenvolvem as larvas do inseto (BOISSIÈRE, 2012).

Em outro estudo realizado por Costa (2012) com bactérias associadas a esponjas isoladas da água no município de Manaus, as características morfológicas das bactérias são semelhantes as das isoladas no presente trabalho. Embora a microbiota bacteriana tenha sido isolada de organismos diferentes, no entanto o ecossistema aquático é da região Amazônica. No entanto, estudos da microbiota aquática associadas a larvas de insetos vetores de doenças na região Amazônica ainda são escassos na literatura.

Conclusão

Um total de 84 isolados bacterianos foi obtido de amostras de água no município de Coari, AM. A diversidade encontrada corresponde a 32 possíveis gêneros, entre bacilos Gram- com sete representantes, bacilos Gram+ com quatro, cocos Gram- com dezesseis e cocos Gram+ com 5 representantes.

Referências Bibliográficas

BOISSIÈRE A, TCHIOFFO M. T, BACHAR D, ABATE L, MARIE A. Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. *PLoS Pathog* 8(5): e 1002742. doi:10.1371/journal.ppat.1002742, 2012.

CHAVSHIN, A.R; OSHAGHI MA, V.H; POURMAND, M.R; RAEISI A, E.A.A; MARDANI N, G.S. Identification of Bacterial Microflora in the Midgut of the Larvae and Adult of Wild Caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Tropical*, v. 121, n.23, p.129–134. 2012.

COSTA, G.C.M. Microbiota Bacteriana associada às esponjas de água doce da Amazônia. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Manaus: UEA, 2012.

LINDH, J.M; TERENIUS, O; FAYE, I. **16S** rRNA Gene-Based Identification of Midgut Bacteria from Field-Caught *Anopheles gambiae* Sensu Lato and *A. funestus* Mosquitoes Reveals New Species Related to Known Insect Symbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n.2, p.7217–7223. 2005.

NGO, C. T., AUJOULAT, F., VEAS, F., JUMAS-BILAK, E., & MANGUIN, S. (2015). Bacterial Diversity Associated with Wild Caught *Anopheles* Mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam Using Culture and DNA Fingerprint. *PLoS ONE*,10(3), e0118634. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0118634>

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. **Malaria in Brazil: An overview**. *Malaria Journal*, v. 9: p. 115, 2010.

RANI, A; SHARMA, A; RAJAGOPAL, R; ADAK, T; BHATNAGAR, R.K. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 96. doi: 10,1186 / 1471-2180-9-96. PMID: 19450290.

RIEHLE M. A., MOREIRA C. K., LAMPE D., LAUZON C., AND JACOBS-LORENA M. Using bacteria to express and display anti-Plasmodium molecules in the mosquito midgut. *International Journal of Parasitology*. 37(6). 595-603. (2007).

SMITH, RYAN C; CHRISTOPHER KIZITO; JASON L. RASGON; MARCELO JACOBS-LORENA. Transgenic Mosquitoes Expressing a Phospholipase A2 Gene Have a Fitness Advantage When Fed Plasmodium falciparum-Infected **Blood**. *Published*: October 01, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0076097.

TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. 2010. **Malária e Dengue na Amazônia: vetores e estratégias de controle**. Pesquisa Científica e Tecnologia em Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília. Cap. MCT-INPA. p.112-125.

WHO – World Health Organization. 2014. **World Malaria Report**, Geneva. 242 pp.

Caracterização da microbiota da rizosfera resistentes ao agrotóxico carbendazim em culturas de coentro na Comunidade Nova Esperança em Manaus/AM

Santos J.C.¹, Lima J.M.S.¹, Telles Y.V.¹, Araújo S.P.¹, Costa Neto P.Q.¹, Mota A.J.¹;
Peixoto J.C.C.¹, Batista I.H.², Pereira J.O.¹

¹Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus-AM, Brasil.; ²Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Manaus-AM, Brasil. Emails: jucileuzasantos@hotmail.com, jlima873@gmail.com; ydrielly@hotmail.com; spiresdearaujo@gmail.com; senaneto16@yahoo.com.br; adolfo.mot@gmail.com; jean.metagenoma@gmail.com; joseodairpereira@yahoo.com.br, iedahbatista@gmail.com

Resumo

Os agrotóxicos são comumente utilizados na produção agrícola. No entanto, devido à sua toxicidade e persistência, têm afetado severamente o ambiente, trazendo graves riscos à saúde e à manutenção da qualidade de vida. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi isolar microrganismos envolvidos na degradação de carbendazim, a partir da rizosfera de culturas de Coentro em Manaus, realizando ensaios de sensibilidade a este agrotóxico pelos isolados, em diferentes concentrações. Foi feita análise de solos coletados em diferentes áreas, buscando-se detectar resíduos do fungicida a ser utilizado neste estudo. Realizou-se ainda a caracterização físico-química do solo rizosférico coletado para o isolamento. Três áreas agrícolas com histórico de uso intensivo de agrotóxicos, localizadas no Município de Manaus, Careiro da Várzea e Manacapuru foram escolhidas para o presente trabalho. Após análises de amostras de solo desses municípios, os resultados mostraram que embora tenha uso intensivo de agrotóxico nessas áreas, em Manacapuru e Careiro da Várzea o limite de quantificação não foi detectado. Somente em Manaus foi possível detectar a presença do analito carbendazim. Foram isolados dessa área 97 microrganismos resistentes a este fungicida, sendo 80 bactérias e 17 fungos. Dentre estes microrganismos 53 bactérias e os 17 fungos foram tolerantes nas cinco concentrações testadas. Há possibilidade destes microrganismos estarem envolvidos em processos de biodegradação, o que reflete a necessidade de estudos posteriores para avaliar este potencial.

Palavras-chave: microrganismos; agrotóxico; carbendazim; biodegradação.

Introdução

Os agrotóxicos são, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, de culturas florestais e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

No estado do Amazonas a proporção de agricultores dos diferentes municípios do Estado que cultivam frutas e legumes com uso de agrotóxico varia entre 64% e 96,7% (IBGE, 1998).

A biorremediação envolve o uso de microrganismos ou plantas para tratamento de ambientes contaminados e surge como alternativa para amenizar os efeitos deletérios do largo uso dos pesticidas (Chowdhury, 2008). Os microrganismos degradadores de agrotóxicos são encontrados no mundo microbiano e estes compostos podem ser mineralizados por um conjunto de microrganismos. A biodegradação de um complexo de moléculas normalmente envolve o efeito interativo das comunidades mistas de microrganismos e conta com a versatilidade metabólica das bactérias e fungos (Alexander, 1999).

O solo rizosférico contém uma grande biomassa e alta atividade microbiana, quando comparada com solo não-rizosférico. O número de microrganismos na rizosfera pode ser até 30 vezes maior que em solo livre de raízes (Bodelier et al., 1997). O estudo da comunidade microbiana de solo rizosférico é de grande importância, não só por entender o papel ecológico destes microrganismos na interação com as plantas, mas também para possíveis aplicações biotecnológicas.

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi isolar microrganismos envolvidos na degradação de carbendazim, a partir da rizosfera de culturas de Coentro em Manaus, realizando ensaios de sensibilidade a este agrotóxico pelos isolados, em diferentes concentrações. Foi feita análise de solos coletados em diferentes áreas, buscando-se detectar resíduos do fungicida a ser utilizado neste estudo. Realizou-se ainda a caracterização físico-química do solo rizosférico coletado para o isolamento.

Materiais e Métodos

O estudo foi realizado nos Municípios de Manaus (Comunidade Nova Esperança), Careiro da Várzea (Comunidade São Francisco, Costa da Terra Nova) e em Manacapuru (comunidade de São Francisco, no ramal do Arapapá), que constituem regiões agrícolas onde agrotóxicos são intensamente utilizados. Destas áreas foram coletadas amostras de solo de culturas de Coentro (*Coriandrum sativum L.*), Chicória (*Cichorium endívia*) e berinjela (*Solanum melongena*) em Manaus, Careiro da Várzea e Manacapuru, respectivamente.

Para cada ponto de coleta foi usado como padrão 0-10 cm de profundidade. No Município de Manaus, foram coletadas 9 amostras de solo de culturas Coentro (*Coriandrum sativum L.*). Já no Careiro da Varzea foram coletadas 6 amostras de solo de culturas de Chicória (*Cichorium endívia*), por fim em Manacapuru foram coletadas 6 amostras de solo de culturas berinjela (*Solanum melongena*). Cada amostra continha aproximadamente 250 g, armazenada em frascos estéreis. A refrigeração foi feita através de gelo seco artificial e enviado para análise no laboratório Agrosafety através do método LC/MS para os analitos acefato, aldicarbe, carbendazim, etoprofós, imazalil, metamidofós, tiofanato-metílico, triclorfom e GC/MS para os analitos alacloro, aldrin, aletrina, ametrina, atrazina, azinfos etílico, azinfos metílico, azoxistrobina, bifentrina, bioaletrina, bromopropilato, captana, carbaril, carbofenotiona, carbofurano, carbosulfano, ciflutrininas totais, cipermetrininas totais, ciproconazol, clorfenvinfos, Clorotalonil, clorpirifós, clorpirifós metílico, deltametrina, diazinona, dicofol, dieldrin, difenoconazol, dimetoato, dissulfotom, dodecacloro, endossulfam, endrin, esfenvalerato, Etion, fenamifós, fenitrotiona, fenpropratrina, fentiona, fentoato, fenvalerato, fipronil, folpete, Forato, fosfamidom, fosmete, gama-BHC, hexaclorobenzeno, iprodiona, lambda-cialotrina, Malationa, metidationa, metoxicloro, mevinfós, monocrotofós, ometoato, parationa, parationa metílica, permetrina, pirazofos, pirimifos metílico, pirimifós etílico, procimidona, procloraz, profenofós, propanil, propargite, tebuconazol, terbufós, tetradifona, triazofós, trifluralina, vinclozolina.

O solo utilizado nesta pesquisa para o isolamento dos microrganismos foi obtido do Município de Manaus na Comunidade Nova Esperança. Foram coletadas amostras da região rizosférica de cultura de coentro, 5 amostras a 0-10 cm e 5 amostras e 10-20cm de profundidade e acondicionadas em sacos plásticos estéreis. As amostras de solo foram secas em local ventilado e peneiradas em peneira de 2 milímetros. Foram realizadas as análises de extração de Cálcio, magnésio, alumínio trocável, enxofre, Boro, fósforo e fósforo remanescente, potássio, pH em água, e pH cloreto de potássio (KCl), acidez potencial,

granulometria de acordo com o manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes (Silva 2009).

O isolamento seletivo foi realizado em meio de cultura mínimo, solução de vitaminas, tendo como única fonte de carbono o fungicida carbendazim a 250µg/mL. A incubação foi a 28°C por 7 dias. Após esse período, 100mL do meio fermentado foi retirado e inoculado novamente em 500mL do mesmo meio e incubado por mais 7 dias. Após 2 repetições, se procedeu à diluição em série da última fermentação e semeadura no mesmo meio de cultivo, porém sólido e contendo carbendazim. Os métodos utilizados para preservação dos microrganismos foram: repiques contínuos, preservação em óleo mineral, água destilada ou método de Castellani somente para fungos e em glicerol a 50% somente para bactérias. Para a caracterização morfológica, foi realizada coloração utilizando-se a técnica de Gram e posterior visualização por microscopia óptica. Os testes de sensibilidade foram realizados através da técnica de difusão em poços (Pinto et al., 2003). A suspensão continha a espécie bacteriana crescida em caldo LB a 30°C, 125rpm por 24h na escala de McFarland a 0,5. Cada placa de Petri com meio Lurian Bertani (LB) foi semeada com a suspensão bacteriana. Em seguida foram perfurados 05 poços de 05 mm de diâmetro, preenchido com 40µl de carbendazim em 05 concentrações decrescentes: 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL e 62,5µg/mL. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas.

As amostras de solos foram coletadas em três áreas agrícolas para análise de resíduos de agrotóxicos, nas coordenadas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 Lista dos locais de coleta das amostras de solo

Local de Coleta	Sequência das amostras	Latitude (W)	Longitude (S)
<i>Manaus</i>	1	3°00'56".5	59°55'14.0"
	2	3°00'56.9"	59°55'13.7"
	3	3°00'57.7"	59°55'13.5"
	4	3°00'57.7"	59°55'14.2"
	5	3°00'57.3"	59°55'14.1"
	6	3°00'56.7"	59°55'14.1"
	7	3°00'56.7"	59°55'14.3"
	8	3°00'57.2"	59°55'14.3"
	9	3°00'57.5"	59°55'14.5"
<i>Careiro da Várzea</i>	10	3°06'41.6"	59°50'37.2"
	11	3°06'41.5"	59°50'36.7"

	12	3°06'41.7"	59°50'36.7"
	13	3°06'41.6"	59°50'37.0"
	14	3°06'59.8"	59°51'29.8"
	15	3°06'59.8"	59°51'30.1"
	16	3°17'07.6"	60°23'259"
	17	3°17'08.0"	60°23'260"
	18	3°17'07".0	60°23'26.2"
<i>Manacapuru</i>	19	3°17'08.7"	60°23'25.2"
	20	3°17'10.5"	60°23'26.0"
	21	3°17'10.1"	60°23'25.2"

Resultados e Discussão

Embora tenha uso intensivo de agrotóxico nas três áreas, em Manacapuru e Careiro da Várzea o limite de quantificação não foi detectado. Somente em Manaus foi possível detectar a presença do analito carbendazim (0,189µg/Kg). A ausência de resíduos nas amostras pode estar associada, segundo Chaim (2004), ao fato de 32% dos agrotóxicos pulverizados retidos ficarem nas plantas, 19% irem pelo ar para outras áreas circunvizinhas da aplicação e 49%, apesar de irem para o solo, após algum tempo, parte se evaporar, parte lixiviar para o lençol freático e outra parte se degradar. Considera-se ainda o fato de ambientes de clima tropical apresentarem taxas de degradação de herbicidas mais rápidas, devido ao aumento de populações de microrganismos e as modificações nas condições ambientais, como resultado do aumento das temperaturas do solo (Laabs *et al.*, 2002). Regiões tropicais apresentam temperaturas mais elevadas nas camadas superficiais do solo, o que resulta em maior decomposição da matéria orgânica e uma maior atividade microbiana (Silva *et al.*, 1998), razões pelas quais podem não ter sido detectado os resíduos de agrotóxico, já que segundo o produtor de Manacapuru, a aplicação de deltametrina foi realizada três dias antes.

Somente no solo que apresentou resíduo de agrotóxico foi realizada análise físico química. As amostras foram coletadas no período da manhã, no dia 23 de maio de 2013, foram obtidas conforme metodologia descritas no item 4.2.2, nas seguintes coordenadas geográficas (amostra 1: S03°00'57.0" W059°55'14.4", amostra 2: S03°00'56.6" W059°55'14.5", amostra 3 S03°00'57".0 W059°55'14.8"; amostra 4 S03°00'57.0" W059°55'14.8"; amostras 5: S03°00'56.6" W059°55'14.9").

A análise do solo é o instrumento que o técnico utiliza para recomendar as necessidades de calagem e fertilizantes, melhorando as condições de fertilidade de um solo, para que as plantas encontrem os nutrientes que elas precisam para responder com altas produtividades. No entanto as análises foram realizadas para se verificar em quais condições de solo, os microrganismos se encontravam quando foram isolados.

Tabela 2 Resultados da análise física do solo da Comunidade Nova Esperança, Manaus-AM

PERFIL Prof. (cm)	Areia	Silte	Argila	V%	(CTC _{EFETIVA})	m%	M.O	P-rem	V%
	-----dag kg ⁻¹ -----				-----cmol dm ⁻³ -----		dag kg ⁻¹	mg L ⁻¹	
0-10	92,2	7,3	0,4	38.9	2.8	0	0.5	54,3	
10-20	93,5	5,9	0,5	97.5	3.2	0	1.1	54,3	

saturação por bases; CTC_{EFETIVA} capacidade de troca catiônica; m% Saturação por Alumínio; P-rem fosforo remanescente.

O solo analisado apresentou classe textural arenosa (Tabela 2). A matéria orgânica (M.O) na profundidade de 0-10 foi determinada como muito baixa (0,5dagKg⁻¹), na profundidade 10-20 foi determinada como baixa. A saturação por bases (V%), na profundidade de 0-10, caracterizou o solo como de baixa fertilidade, já na profundidade de 10-20, com saturação bem maior que 50%, a caracterização é de solo fértil. A capacidade de troca catiônica efetiva foi determinada como média, o nível de fósforo remanescente foi muito bom, apresentando os valores de 54,28 mgL⁻¹ e 54,36mgL⁻¹ nas profundidades de 0-10 e 10-20, respectivamente. A Saturação por Alumínio (m) foi classificado como muito baixa.

Tabela 3 Resultados da análise química do solo da Comunidade Nova Esperança, Manaus-AM

PERFIL Prof. (cm)	pH	P	K	Ca	Mg	B	Al	H+Al	SB	SO ₄ ²⁻	CTC
		mg dm ⁻³	-----				cmol dm ⁻³ -----				
f 0-10	7.5	824.7	14	2.6	0.2	0.4	0	4.53	2.9	0.15	7.4
ó 10-20	7.6	745.5	25	2.5	0.6	0.5	0	0.08	3.2	0.21	3.3

s
foro; K potássio M.O matéria orgânica; Mg magnésio; B boro, Al Alumínio; H+Al acidez potencial; SB soma de bases; (CTC capacidade de troca de cátions.

Segundo Furtini Neto et al (2001), geralmente a acidez aumenta com a profundidade. Os resultados mostraram que em ambas profundidades (0-10 e 10-20cm) o pH do solo não apresentou diferença significativa (Tabela 3). De acordo com a classificação de Ribeiro A.

(1999) para o pH em água, relação 1:2,5 TFSA, o solo apresentou alcalinidade fraca, apresentando valores na faixa entre 7.5 e 7.6 respectivamente. Segundo a classe de valores utilizadas na agronomia quando o pH se encontra maior que 6,0, é classificado como muito alto (Sobral, et al, 2007). O solo foi classificado como arenoso e o nível de fósforo para este tipo de solo foi muito alto para ambas profundidades. O nível de potássio trocável quando o valor é menor que 30 é considerado baixo (14 - 25). O nível do Cálcio é classificado como médio (2.6 - 2.5), o magnésio e o boro em profundidade de 0-10 cm apresentaram níveis baixos e em 10-20 cm, níveis médios. O alumínio foi detectado em níveis muito baixos e a acidez potencial (H+Al) na profundidade de 0-10 cm apresentou nível médio e em 10-20 cm foi detectado em nível baixo. A soma de bases (SB) foi classificada com níveis médio, e a capacidade de troca de cátions (CTC) pH 7 na profundidade de 0-10 cm foi considerada baixa e em 10-20, foi média.

Em geral, os solos arenosos retêm pouca umidade e são pouco férteis, no entanto por se tratar de uma área utilizada para cultivo de hortaliças, os agricultores realizam adubação periodicamente, ocasionando níveis de nutrientes considerados suficientes para suprir as necessidades das plantas. Segundo Oliveira (2010) em solo arenoso, plantas e microrganismos vivem com mais dificuldade, devido à pouca umidade. Mesmo esta área sendo arenosa e apresentando resíduos de agrotóxico, foi possível isolar 80 bactérias e 17 fungos degradadores de carbendazim.

Na coleta de solo foram isolados 97 microrganismos, dos quais 80 são bactérias e 17 são fungos. Dessas 80 bactérias 52 (65%) são gram-negativas e 28 (35%) são gram-positivas. A maioria são bacilos 65 (81%), 12 (15%) são cocos, 2 (3%) são diplococos e 1 estafilococos (1%). Dos 17 fungos, 13 são filamentosos e 4 são leveduriformes.

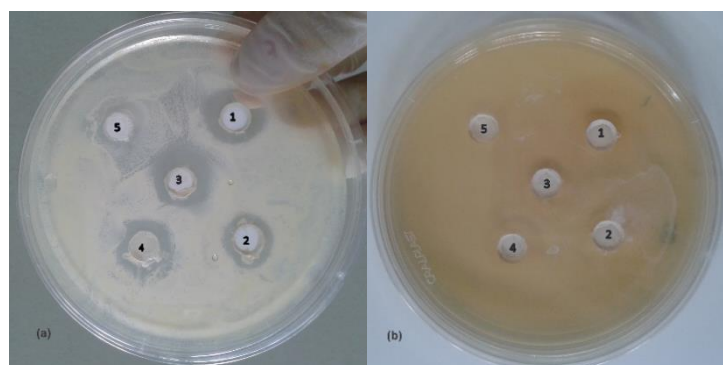


Figura 1 Teste de Sensibilidade (a) Halo de inibição
(b) Crescimento ao redor do poço

No teste de sensibilidade dos 97 microrganismos na presença do fungicida carbendazim, observou-se que 53 bactérias e 17 fungos apresentaram crescimento ao redor do poço (Figura 1) em todas as concentrações testadas (1(1000µg/ml), 2 (500µg/ml), 3 (250µg/ml), 4 (125µg/ml) e 5(62,5µg/ml)).

De acordo com Yarden *et al.* (1990) as bactérias exercem maior influência na biodegradação do fungicida carbendazim, quando comparado ao fungo *A. alternata*. Em solos sem prévio tratamento, somente a inoculação bacteriana resultou em biodegradação acelerada do fungicida. Tal fato sugere que enquanto o fungo contribui para a dissipação de carbendazim no solo, as bactérias exercem maior influência na biodegradação desse fungicida. Observaram ainda degradação mais rápida por culturas bacterianas originadas de solos previamente tratados com carbendazim do que daquelas provenientes de solos sem prévio tratamento. Dessa forma, nossos resultados foram bastante satisfatórios, pois dos 97 microrganismos isolados de solos tratados com carbendazim, 70 apresentaram-se resistentes na presença do fungicida, o que sugere a possibilidade desses microrganismos possuírem potencial na degradação do referido fungicida.

Conclusões

Os solos agrícolas da região pesquisada apesar do uso intensivo de agrotóxicos têm retido pouco agrotóxico. Foi possível, no entanto isolar bactérias tolerantes ao Carbendazim em variadas concentrações. Espera-se ainda que estes isolados apresentem potencial de biodegradabilidade de carbendazim podendo ser utilizados como uma alternativa eficaz no tratamento de áreas contaminadas por este composto. Acredita-se que seja possível obter bioprodutos para remediação de áreas impactadas com agrotóxico. Desta forma, espera-se que a proteção dos ecossistemas, possa ter um elemento a mais na sua efetivação.

Referências

ANVISA. (2003). AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Distribuição de resíduos de agrotóxicos em frutas e verduras entre julho de 2001 e dezembro 2002. Brasília. p. 72.

Alvarez VVH, Novais RF, Barros NF, Cantarutti RB, Lopes, AS (1999). Interpretação dos resultados das análises de solos. In: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez VVH. (Ed.). Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5. Aproximação. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais. p.25-32.

Alexander, M (1999). *Biodegradation and bioremediation*. 2. ed. New York: Academic, p. 453.

Bodelier, PLE, Wijlhuizen, AG, Blom CWPM, Laanbroek, HJ (1997). Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima*, studied in a gnotobiotic microcosm. *Plant Soil*, 190:91–103.

Chowdhury A, Pradhan S, Saha M, Sanyal N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*; 48(1):114-127. doi:10.1007/s12088-008-0011-8.

Chaim A (2004). Tecnologia de aplicação de agrotóxicos: fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental. In: Silva CMMS e Fay EF. Agrotóxicos e ambiente. Brasília: Embrapa; p. 289-317.

Furtini Neto, A. E.; Vale, F. R.; Resende, A. V.; Guilherme, L. R. G.; Guedes, G.A.A (2001). Fertilidade do solo. 252f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Solos e Meio Ambiente) – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) 1998. Censo Agropecuário, 1995-1996. Rio de Janeiro.

Oliveira, DL (2010). Solos uma Questão de Sustentabilidade. Gestão & Tecnologia - Faculdade Delta - ISSN 2176-2449. Edição III janeiro/fevereiro.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT (2003). Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 325.

Laabs, V.; Amelung, W.; Pinto, A.; Zech, W (2002). Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. *Journal of Environmental Quality*, Madison-WI, 31(1): 256-268.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT (2003). Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p.

Silva F (2009). Manual de análise química de solos, plantas e fertilizantes 2 ed. rev. Ampl. 627 p. Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica.

Silva, A. A., Oliveira Jr, R. S., Castro Filho, J. E (1998). Avaliação da atividade residual no solo de imazaquin e trifluralin através de bioensaios com milho. *Acta Scientiarum*, Maringá-PR, v. 20, n. 3, p. 291–295.

Sobral, L; Viegas, P.R.A., Siqueira, O.J.W. De; Anjos, J.L. Dos; Barreto, M.C De V.; Gomes, J.B.V (2007). Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes no Estado de Sergipe. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 251

Yarden O, Salomon, R, Katan J, Aharonson N (1990). Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole in soil. *Can. J. Microbiol.*, v. 36, p. 15-36,.

Avaliação das emzimas CMCase e xilanase de três fungos endofíticos da Amazônia, em três resíduos agrícolas em duas diferentes condições de cultivo

Silva, S.R.S¹; Silva, A.S.²; Santiago, P.A.L.¹; Souza, A.D.L.²; Polikarpov I.³, Martinez J.L.⁴, Souza, A.Q.L.²

¹Universidade do Estado do Amazonas (UEA) – PPGMBT, ²Universidade Federal do Amazonas (UFAM) – PPGQ, ³Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – LCPBE, ⁴Facultad de Farmacia de La Universidad de Granada (UGR)

E-mail: jmtnez@ugr.es, srhrael@hotmail.com, ipolikarpov@ifsc.usp.br, santiago_fro@hotmail.com, couceiro@ufam.edu.br

Resumo

Diversos resíduos são gerados a partir de atividades humanas e esses resíduos, ao longo dos anos, tem sido alvo para utilizá-los na produção de moléculas de interesse de diversos setores industriais como por exemplo, as enzimas. Para a produção enzimática de CMCase e Xilanase, três fungos (*Aspergillus niger*, *Penicillium adametzii* e *Basidiomiceto*) foram submetidos a cultivo submerso em duas soluções de cultivo diferentes (Manachini e GLBN 40) com três resíduos Amazônicos como indutores (casca de maracujá, cupuaçu e macaxeira) durante 5 e 10 dias. Todos tiveram produção enzimática, no entanto, *A.niger* mostrou-se o melhor produtor de CMCase e xilanase em 5 dias com 7,2 UI/mL e 13,5 UI/mL, respectivamente, em solução de Manachini com casca de maracujá como indutor. Os valores obtidos com *P. adametzii*. e o *Basidiomiceto* variaram de acordo com as soluções de cultivo e com os indutores. As condições de cultivo podem ser otimizadas para melhoramento da produção enzimática.

Palavras-chave: Enzimas, Resíduos Agrícolas, Fungos Amazônicos, CMCase, xilanase.

Introdução

As variadas atividades humanas geram inúmeros tipos de resíduos que, por sua vez, são acumulados no meio ambiente. Diante do acúmulo de resíduos agroindustriais, ao longo dos anos, têm-se buscado sua reutilização para redução da sua quantidade no meio ambiente.

Na região Norte do Brasil, o estado do Pará destaca-se como o maior produtor de macaxeira do país com produção acima de 4 milhões de toneladas, é responsável pela maior safra de cupuaçu do Brasil com mais de 74 mil toneladas em 13 mil hectares de área e também, é o maior produtor de maracujá da região com mais de 26 mil toneladas (IBGE

2014; CEPLAC,2013). Toda esta produção gera resíduos e vários bioprocessos têm sido utilizados para a conversão de resíduos em moléculas de interesse como aminoácidos, etanol, enzimas e outras.

A biomassa vegetal é composta por celulose, hemicelulose e lignina. Diversos microrganismos produzem enzimas que atuam em sinergia (complexo enzimático) e assim, conseguem degradar a biomassa vegetal. Fungos de ocorrência disseminada na natureza como Basidiomicetos e fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*, possuem capacidade de produzir essas enzimas (Bom *et al.*, 2008). Dentre outras enzimas desse complexo enzimático, destacam-se as endoglucanases e as xilanases. Estas enzimas são utilizadas em diversas indústrias como, por exemplo, indústrias de papel, roupa, têxtil, farmacêutica, entre outras, que têm o interesse no melhoramento da produção dos seus produtos.

O mercado brasileiro de enzimas, apesar de pequeno, quando comparado ao mercado mundial, mostra-se promissor devido a grande disponibilidade de resíduos agroindustriais e do dinamismo dos setores industriais (Mussatto *et al.*, 2007).

O objetivo deste trabalho foi comparar a produção enzimática de três fungos (Basidiomiceto, *Penicillium adametzii* e *Aspergillus niger*), três substratos e duas soluções de cultivo.

Material e métodos

Para induzir a produção de CMCase (Carboximetilcelulase) e xilanase, utilizou-se casca de cupuaçu, maracujá e macaxeira in natura, em duas soluções de sais minerais: Manachini (Manachini *et al.*, 1987) e GLBN 40.

Os fungos utilizados foram um Basidiomicetos (Mas 3M 1.1.1), um *Aspergillus niger* (EjFLOR 3cont BDA) e um *Penicillium adametzii*(Stsp C2-3/1-2C) reativados da coleção do Laboratório GEMMA (Grupo de Espectrometria de Massas e Microrganismos da Amazônia), na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em meio BDA durante 8 dias a 28 °C.

Após a esterilização dos resíduos juntamente com as soluções, foram feitos os inóculos adicionando-se dois fragmentos de aproximadamente 1cm² de Basidiomiceto e 20 µL de solução de suspensão de esporos de *A. niger* e *P. adametzii* Os experimentos foram

cultivados em incubadora Shaker, em quintuplicata, durante 5 e 10 dias, a temperatura de 28 °C a 120 rpm. Para a extração das enzimas, todas as réplicas foram filtradas em sistema de filtração a vácuo estéril contendo filtro Millipore 0,22 µm. Para os testes quantitativos, foi separada uma alíquota de 1,5 mL.

Utilizou-se o método DNS (Miller, 1959), que quantifica açúcares redutores, para quantificar as enzimas CMCase e Xilanase a partir da metodologia descrita por Ghose, (1987). Os ensaios ocorreram em tubos de ensaio de 6 ml, em triplicata, adicionando-se 450 µL do substrato CMC (quando quantificada CMCCase) e Xilano (quando quantificado Xilanase) a 1% em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 50 µL de extrato enzimático. Essa mistura foi aquecida por 10 minutos a 50°C em banho-maria. Após o tempo reacional, adicionou-se 500 µL do reagente ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), levando as amostras ao banho fervente por 5 minutos e sequencialmente, as amostras sofreram resfriamento em banho gelado por mais 5 minutos. Por fim, adicionou-se 4 mL de água destilada. Para o controle das amostras, adicionou-se 450 µL de CMC, 500 µL de DNS e 50 µL do extrato enzimático. Para o Branco adicionou-se 500 µL de água destilada, 500 µL de DNS e 4 ml de água destilada. As amostras foram lidas a 540 nm em espectrofotômetro de UV.

Resultados e discussão

Com relação à CMCásica, as dosagens enzimáticas revelaram que dentre as soluções de sais minerais utilizadas no cultivo submerso, a solução de Manachini mostrou-se a melhor solução de cultivo para atividade e xilanásica, conforme mostra as figuras 1 e 2.

Em relação ao tempo de cultivo, o melhor tempo de produção mostrou-se em 5 dias havendo declínio desta produção com 10 dias para ambas as enzimas. Dentre os substratos agrícolas utilizados, a casca de maracujá mostrou-se melhor indutor na solução de Manachini tanto para CMCCase quanto para Xilanase. A casca de cupuaçu mostrou-se o segundo melhor indutor e a casca de macaxeira foi o indutor menos eficiente. Dentre os fungos utilizados nesta pesquisa, o *A.niger* mostrou-se o melhor produtor de CMCCase com 7,2 UI/mL em 5 dias, seguido do *P. adametzii* com 3,1 UI/mL em 10 dias e o pior desempenho foi o do Basidiomiceto com 3,0 UI/mL em 5 dias, todos em solução de Manachini. Muitas espécies de *Aspergillus* produzem várias enzimas extracelulares sendo elas 19 diferentes enzimas de importância biotecnológica (Pandey et al. 1999). Dentre estas

estão celulase, xilanase, poligalacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glucoamilase, β -glucosidade e protease ácida.

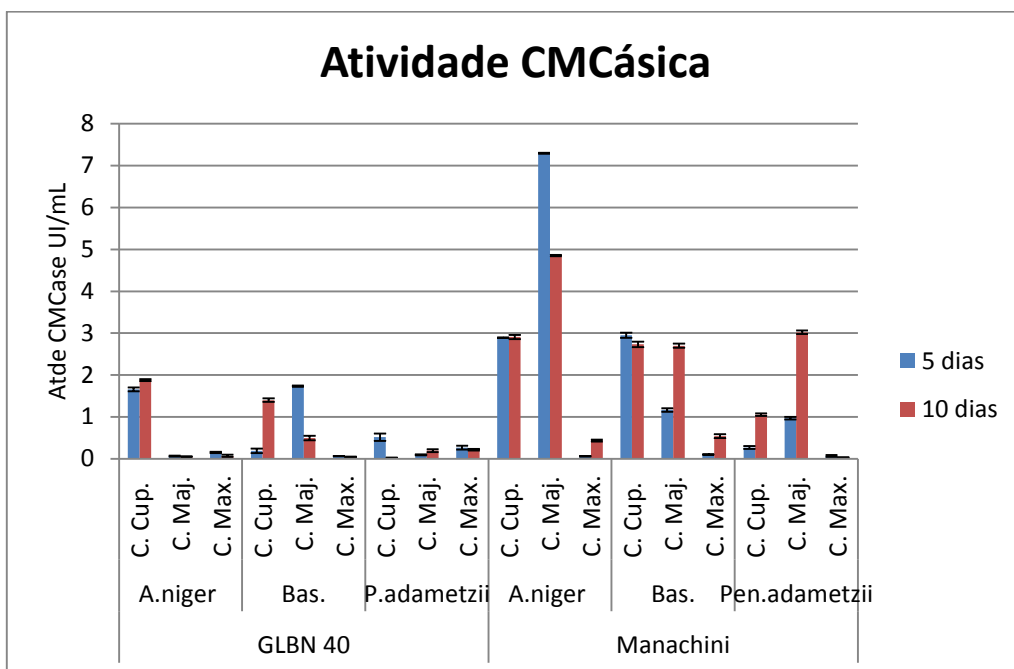


Figura 1. Comparação de atividade CMCásica entre solução de Manachini e solução GLBN 40 onde C.Cup.= casca de cupuaçu, C. Maj.=Casca de maracujá e C. Max.=casca de macaxeira.

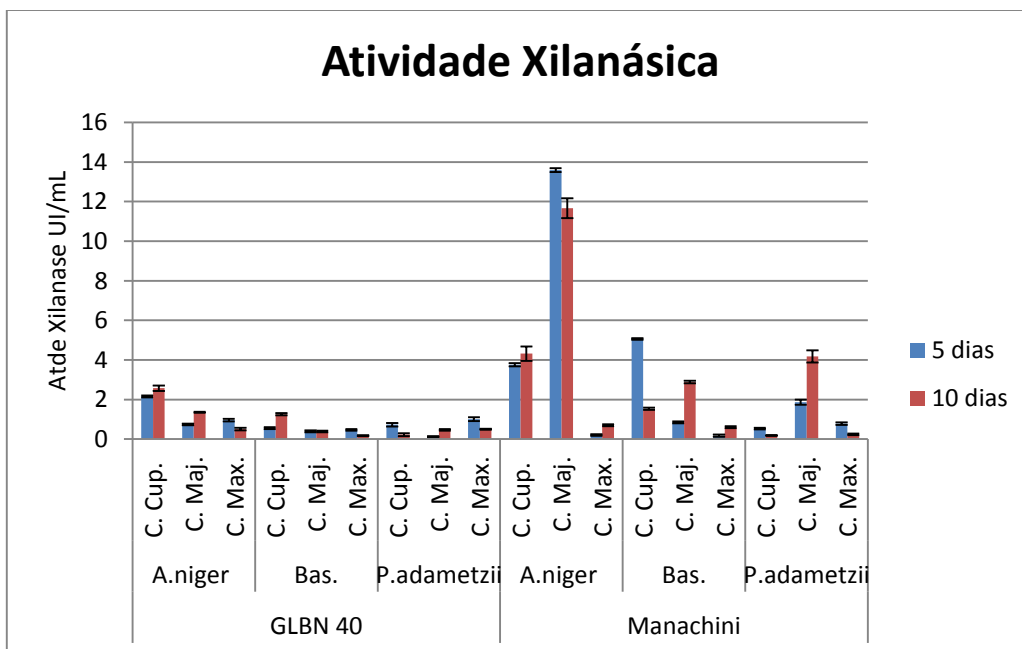


Figura 2. Comparação de atividade Xilanásica entre solução de Manachini e solução GLBN 40 onde C.Cup.= casca de cupuaçu, C. Maj.=Casca de maracujá e C. Max.=casca de macaxeira.

Em atividade xilanásica, o melhor desempenho foi do *A. niger* com 13,5 UI/mL, seguido do Basidiomiceto com 5,1 UI/mL, ambos em 5 dias, e o pior desempenho foi do *P. adametzii* com 4,7 UI/mL em 10 dias, todos em solução de Manachini. Stroparo *et al.* (2012) avaliaram a produção de hidrolases e dentre estas, observaram que o *A. niger* apresentou maior nível de Xilanase com 8,73 UI/mL, sendo os valores deste trabalho superiores utilizando a casca de maracujá como indutor, em 5 dias de cultivo.

Silva (2013) avaliou a produção de CMCase e Xilanase também utilizando casca de maracujá como substrato e uma espécie de *Penicillium*, reativado do Laboratório GEMMA e, obteve um valor de 13,444 UI/mL e 0,510 UI/mL no 10º dia de cultivo, utilizando 20 µL de solução de suspensão de esporos. Neste trabalho, encontrou-se os valores de 3.116 UI/mL e 4,793 UI/mL, de CMCase e Xilanase respectivamente, ambos em 10 dias, inoculados 10 µL de solução de suspensão de esporos. Silva (2013) também avaliou a produção de CMCase e Xilanase de Basidiomicetos e obteve 1,004 UI/mL e 0.371 UI/mL, respectivamente. Neste trabalho, as atividades CMCásica e xilanásica foram 3.012 UI/mL e 5.166 UI/mL, respectivamente. De acordo com Pandey *et al.* (1999), a enzima que será produzida depende do tipo de substrato utilizado no processo de cultivo. Isso justifica as diferenças de produção de xilanase e CMCase observadas dentre os substratos e soluções utilizadas, visto que cada solução (Manachini e GLBN 40) possui componentes diferenciados que podem interferir no crescimento fúngico e conseqüentemente, na produção enzimática.

Conclusões

A melhor solução de cultivo para a produção de CMCase e Xilanase foi a de Manachini tendo 5 dias de cultivo como melhor tempo de produção enzimática.

Entre os três fungos utilizados, a cepa de *A. niger* (EjFlor 3 cont BDA) foi o melhor produtor de ambas as enzimas e o melhor substrato, foi a casca de maracujá.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro da FAPEAM, do CNPq e da CAPES que viabilizaram a realização desse trabalho e pela concessão de bolsa da CAPES.

Referências

Bom, EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB, Coelho, R R R (2008) Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. *Interciência*. Rio de Janeiro.

Fraife Filho, G.A. (2013) Cultivo do cupuaçuzeiro para o estado da Bahia. CEPLAC/Centro de pesquisas do cacau – Cepec. <http://www.ceplac.gov.br/radar/cupua%C3%A7uzeiro.htm>

Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59:257-268.

IBGE (2014). Lavoura Permanente. Acessado em: http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=df&te_ma=lavourapermanente2012. Acessado em 16 de fevereiro de 2014.

Manachini PL, Fortina MG, Parini C (1987) Purification and properties of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters* 9:21-224.

Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31:426-428.

Mussato SI, Fernandes M, Milagres AMF (2007) Enzimas – Poderosa Ferramenta na Indústria. *Ciência Hoje* 41:28-33.

Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 29:119–13,

Silva AS (2013) Avaliação da produção de celulasas e xilanase pela degradação de resíduos agrícolas regionais por fungos da Amazônia. Manaus, Brasil, 104p. (Dissertação) de Mestrado em biotecnologia. UFAM

Stroparo EC, Beite, SM, Resende JTV, Knob A (2012) Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Semina: Ciências Agrárias* 33:2267-2278.

Atividade enzimática em fungos endofíticos isolados seletivamente de *Eichhornia crassipes* coletada em área portuária de Manaus – AM

Souza R.D.N², Batista I.H¹, Ferreira F. S.¹, Santos J.C.², Marinho, M.P.S.¹, Araújo, S.P.², Lima, J.M.S.²⁷, Pereira, J.O.²

¹Universidade do Estado do Amazonas- UEA, Manaus, AM, ² Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, AM. E-mail: rayane_a14@hotmail.com, iedahbatista@hotmail.com, fransferreirauaea@gmail.com, jucileuzasantos@hotmail.com, priscila_marinho18@hotmail.com, soldearaujo@hotmail.com, jlima873@gmail.com, joseodairpereira@yahoo.com.br

Resumo

Microrganismos endofíticos vivem no interior das plantas sem causar danos aparentes, estabelecendo com seus hospedeiros uma relação simbiótica potencialmente vantajosa. A espécie *Eichhornia crassipes* é uma das macrófitas mais abundantes na Amazônia, tendo importante função ecológica nos ecossistemas. Este estudo teve o objetivo de isolar fungos endofíticos a partir da referida macrófita coletada no porto da cidade de Manaus e realizar ensaios de atividade enzimática com os isolados. O isolamento foi realizado em meio mineral acrescido de petróleo, utilizando-se fragmentos de folha e raiz da planta. Realizaram-se ensaios de atividade enzimática para amilase e lipase. Os fungos que apresentaram resultados positivos foram caracterizados morfológicamente para identificação preliminar. Foram isolados 28 fungos e selecionados 11 para os ensaios enzimáticos. Para o ensaio de amilase quatro fungos revelaram atividade e para lipase apenas um. Os fungos que apresentaram produção enzimática foram identificados como possivelmente pertencentes aos gêneros: *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp. e *Verticillium* sp. Os fungos isolados que apresentaram atividade enzimática são de gêneros que potencialmente podem ser promissores para uso em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Microrganismos endofíticos, atividade enzimática, Amazônia

Introdução

A Amazônia é mundialmente conhecida pela sua diversidade biológica, seja de espécies vegetais, animais ou microrganismos. Do ponto de vista biotecnológico, essa biodiversidade apresenta uma importante ferramenta para o desenvolvimento de tecnologias e alternativas que venham a servir para os mais variados setores da vida humana.

A região amazônica, em grande parte de sua área, sofre constantemente com ações antrópicas. Como exemplo, pode ser citada a contaminação dos corpos d'água por derivados de petróleo causando assim um impacto considerável na fauna e flora aquática. Porém, mesmo em locais extremamente poluídos, é comum notar-se a prevalência de plantas aquáticas. Isso acontece devido à capacidade do vegetal de resistir e se adaptar à poluição química da água. Muitas vezes essa capacidade de resistência da planta em ambientes contaminados está associada à existência de microrganismos em seus tecidos vegetais.

As macrófitas são plantas com ampla dispersão, podendo habitar desde brejos até locais totalmente submersos. Elas são definidas como formas de vegetação aquáticas visíveis a olho nu (Rejmánková, 2011). São encontradas em áreas com diferentes níveis de poluição, o que evidencia a sua capacidade de sobreviver em locais extremamente degradados.

Os microrganismos são agentes principais na ciclagem de nutrientes na região amazônica, desempenhando papel fundamental na manutenção de ecossistemas por meio dos ciclos biogeoquímicos por exemplo. A prospecção desses organismos tem fundamental importância para se manter o conhecimento da diversidade da microbiota existente nesta região.

Fungos filamentosos destacam-se pelo seu potencial biotecnológico na síntese de diversos compostos bioativos de interesse para o homem e para o ambiente. Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior dos tecidos vegetais, inclusive de macrófitas, e que não causam nenhum dano aparente ao seu hospedeiro (Azevedo, 1999). Os fungos endofíticos diferem dos epifíticos (que vivem na superfície da planta, exteriormente), e dos fitopatógenos, (que lhes causam doenças). As interações entre endófitos e plantas ainda não são claramente conhecidas, mas estudos revelam a produção de metabólitos secundários por parte dos microrganismos que auxiliam a planta em diversos setores (diminuição de herbivoria, de ataques de insetos e aumento da resistência da planta) (Souza *et al*, 2004). Dentre os metabólitos produzidos, as enzimas são amplamente estudadas atualmente. Enzimas são catalisadores orgânicos que participam de reações químicas nos processos vitais (Cuzzi *et al.*, 2011). As enzimas são estritamente específicas, e para cada substrato existe uma enzima. No caso do amido, a enzima responsável por sua quebra é a amilase. As amilases são enzimas facilmente encontradas na natureza e de grande importância biotecnológica tais como indústria têxtil, produção de bebidas, indústrias químicas e farmacêuticas. A utilização de enzimas produzidas por microrganismos vem sendo ampliada devido as maiores facilidades quando comparados a animais e vegetais. A produção em larga escala e a aplicação quase completa da hidrólise do amido são características das enzimas sintetizadas por

microrganismos (Soares *et al.*, 2009). As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na aceleração dos processos de clivagem das ligações ésteres de trigliceraldeídos liberando ácidos graxos e glicerol (Garcia, 2011). As lipases são encontradas na natureza em animais, vegetais e microrganismos. Por serem compostos específicos e de fácil regulação, estão sendo bastante utilizadas em indústrias de modo geral. As enzimas naturais são interessantes pela ampla diversidade bioquímica, facilidade quanto à manipulação genética e possibilidade de produção das mesmas em larga escala. O estudo de endófitos em macrófitas aquáticas de ecossistemas amazônicos representa significativo conhecimento dos mecanismos de adaptação destes vegetais aos peculiares ambientes desta região, desvendando suas vias biossintéticas que podem ser exploradas com fins biotecnológicos.

Material e Métodos

Foram coletadas folhas e raízes de *Eichhornia crassipes* do porto do centro da cidade de Manaus-AM. As amostras foram submetidas à higienização e em câmara de fluxo laminar, o material foi lavado em água destilada e mergulhado em álcool 70% por 1 minuto, introduzido em solução de hipoclorito a 2,5% por 1 minuto, submerso em álcool 70% por 30 segundos e por último lavado em água destilada (figura 1). O material foi inoculado em 18 placas de Petri com meio BH (L/g: sulfato de magnésio: 0,20, cloreto de cálcio: 0,02, fosfato monopotássico: 1,0, fosfato dipotássico: 1,0, nitrato de amônio: 1,0, cloreto férrico: 0,05, ágar: 20,0) acrescido de antibiótico e petróleo. Todas as placas foram identificadas e incubadas em BOD à temperatura de 18° C, onde permaneceram de três a dez dias.

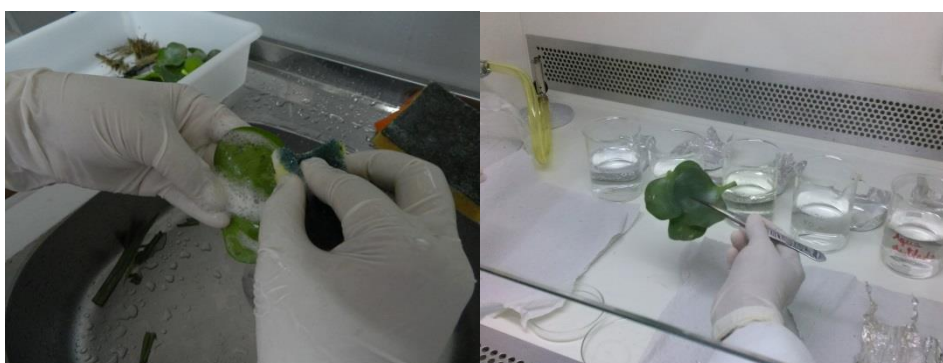


Figura 1: Assepsia da folha e desinfecção superficial

Conforme o crescimento, os fungos foram repicados para tubos de ensaio onde foram datados, identificados e guardados. O índice de colonização dos fungos isolados foi calculado dividindo o número total de fragmentos infectados pelo número total de fragmentos inoculados. A purificação foi feita por repique sucessivo. A análise qualitativa das enzimas lipase e amilase produzidas por fungos foi avaliada em placas de Petri contendo meio de

cultura específico para cada enzima. Os fungos endofíticos selecionados foram cultivados em meio BDA por oito dias a 28° C e transferidos para placas com meio específico. Para o teste de amilase, o meio de cultura foi acrescido de 10 g de amido de milho. Após o crescimento da cultura, as placas de Petri foram coradas com 5 ml de solução de lugol para verificação do halo de degradação, evidenciando a atividade amilolítica. Para testar a produção de lipase, o meio foi acrescido de 10 ml de azeite de oliva e as placas, após crescimento dos fungos, foram coradas com 2 ml de vermelho de fenol e submetidas a luz ultravioleta. A determinação da atividade enzimática decorreu da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia acrescido da zona de precipitação. (Hankin & Anagnostakis, 1975). Os resultados foram classificados em negativos (IE= 1), positivos ($1 > IE > 0,64$) e fortemente positivos ($IE < 0,64$). Após os testes enzimáticos, os fungos que apresentaram resultados positivos foram caracterizados quanto à morfologia das colônias, por meio de visualizações macroscópicas e também microscópicas com o uso da técnica de micro cultivo.

Resultados e Discussão

Foram isolados 28 fungos endofíticos a partir dos fragmentos da folha e da raiz. O índice de colonização foi de 47% para a folha e 30% para a raiz. A princípio um número maior de fungos foi isolado, porém alguns não se tornaram viáveis após repiques sucessivos em meio BDA. Os fungos foram codificados quanto à origem de isolamento. Após a purificação, os fungos que demonstraram similaridade quanto às características macroscópicas foram agrupados, sendo selecionados 11 fungos para os ensaios enzimáticos. O teste para produção de amilase evidenciou atividade enzimática em quatro fungos e o de produção de lipase detectou atividade em um fungo. Os isolados que apresentaram atividade enzimática foram caracterizados morfologicamente após análise macro e microscópica, sendo possível a identificação preliminar dos gêneros: *Aspergillus* sp, *Chaetomium* sp. e *Verticillium* sp. havendo, no entanto, a necessidade de ser feita a caracterização molecular para confirmação desses resultados (tabela 1).

Tabela 1. Relação dos fungos endofíticos isolados.

Cód	Cor	Textura	Taxa
FEC 8	Anverso: Marrom Verso: Laranja claro	Arenosa	<i>Aspergillus</i> sp.
FEC 15	Anverso: Branco/cinza Verso: Bege	Algodonosa	<i>Chaetomium</i> sp.
REC	Anverso: Branco	Veludosa	<i>Verticillium</i> sp.

Cód	Cor	Textura	Taxa
14	Verso: Mista (marrom e verde)		
FEC 2	Anverso: Branco/cinza Verso: negro	Algodonosa	Não identificado

Estes gêneros apresentaram índice enzimático para amilase de 0,77, 0,67 e 0,53 respectivamente. Não foi possível identificar o isolado codificado como FEC 2 pois não foram visualizadas estruturas reprodutivas e/ou esporos nas lâminas. Este fungo apresentou para a amilase o índice enzimático de 0,54 (Figuras 2 e 3). Foi detectada atividade enzimática para lipase apenas no gênero *Chaetomium* sp. com o valor de 0,76 (tabela 2).



Figura 2. Testes enzimáticos para amilase em três fungos (A) *Aspergillus* sp.; (B) FEC 2; (C) *Verticillium* sp.



Figura 3. Teste enzimático para lipase. Fungo *Chaetomium* sp.

Tabela 2. Resultados dos testes enzimáticos

Fungo	Valor do IE		Caracterização do IE	
	Amilase	Lipase	Amilase	Lipase
<i>Aspergillus</i> sp.	0,77	-	Positivo	-
<i>Chaetomium</i> sp.	0,67	0,76	Positivo	Positivo

<i>Verticillium</i> sp.	0,53	-	Fortemente positivo	-
FEC 2	0,54	-	Fortemente positivo	-

A metodologia para isolamento de endófitos utilizada neste trabalho é descrita também em outros estudos (Souza et al., 2004). Em meio seletivo, Batista (2009) obteve um índice de colonização de 48,1%, para folha, e se comparado a este trabalho evidencia uma semelhança. Já em meios não seletivos, a porcentagem de colonização é muito maior, podendo chegar até em 100% (Silva, 2006). Cuzzi et al (2011) realizaram ensaios para determinação enzimática usando fungos do gênero *Aspergillus* sp., que apresentaram um índice enzimático de 0,66 para amilase e do gênero *Chaetomium* sp., que para amilase teve um índice de 0,92 e para lipase de 0,93, resultados que corroboram com este trabalho. Neste estudo o fungo do gênero *Verticillium* sp. apresentou o maior índice de atividade enzimática que foi de 0,53 e o do gênero *Chaetomium* sp. apresentou resultados tanto para produção de amilase quanto para lipase, sendo 0,67 e 0,76, respectivamente. O gênero *Aspergillus* sp. é comumente encontrado em trabalhos de isolamento e identificação de fungos (Souza et al., 2004). Cuzzi et al (2011) evidenciam a versatilidade e o potencial enzimático dos gêneros *Chaetomium* sp. e *Aspergillus* sp., apresentando atividade enzimática para amilase, lipase e protease com resultados positivo para todas as enzimas ensaiadas. Um estudo sobre fungos endofíticos como fontes de metabólitos secundários relatou o isolamento de um fungo do gênero *Chaetomium* sp. e sua grande potencialidade de apresentar atividade biológica (Borges, 2008).

Conclusões

A atividade enzimática detectada em quatro dos isolados apresentou índices positivos quando comparados a trabalhos semelhantes.

Os gêneros preliminarmente identificados podem ser promissores podendo ser avaliados em outras condições de cultivo e com o uso de outras metodologias.

Faz-se necessária a identificação molecular dos fungos isolados.

Referências

Azevedo JL (1999) Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revista Brasileira de Botânica*. 22 n.2: 225-229.

Batista IH (2009) Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes* na Amazônia. Manaus, Brasil, 185p (Tese). Doutorado em Biotecnologia-UFAM

Borges WS (2008) Estudo de fungos endofíticos associados a planta da família Asteraceae como fonte de metabólitos secundários em processos de biotransformação. USP. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-27082008-092456/pt-br.php>

Cuzzi C, Link S, Vilani A, Onofre SB (2011) Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (asteraceae). *Global Science and Technology* 4(2):47-57.

Garcia, AK (2010). Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira. /Alexandre Kopte Garcia, São Paulo.

Hankin L, Anagnostakis SG (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*. 67:597-607.

Rejmánková E (2011) The role of macrophytes in wetland ecosystems. *Journal of Ecology and Field Biology*. 34(4):333-345.

Silva RLO, et al (2006) Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botânica Brasileira*. 20: 649-655.

Soares IA, Flores AC, Zanettin L, Pin HK, Mendonça MM, Barcelos RP, Trevisol LR, Carvalho RD, Schauern D, Rocha CLMSC, Baroni S, (2010). Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nudulans*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [ONLINE] 30(3):700-705.

Souza AQL, Souza ADL, Filho AS, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira, JO (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazonica*. 34:185-195.

Oliveira, L.A.; Fernandes, O.C.; Jesus, M.A.; Bentes, J.L.S.;
Andrade, S.L.; Souza, A.Q.L.; Santos, C.
Diversidade Microbiana da Amazônia 2015. Editora INPA.

Coleções de Microrganismos da Embrapa: De Requisitos Corporativos da Qualidade à Acreditação

Castro C.S.P.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, clarissa.castro@embrapa.br

Resumo

As coleções estruturadas e organizadas por meio de um modelo de gestão único e integrado são essenciais para a sociedade brasileira, pois geram produtos, tecnologias e serviços que podem causar impactos diretos na melhoria da qualidade de vida da população. São exemplos desses benefícios os bioinseticidas, capazes de controlar insetos-praga e mosquitos transmissores de doenças sem causar danos à saúde humana, aos animais e ao meio ambiente, o uso de microrganismos no processo de elaboração de bebidas, alimentos, combustíveis, fixação de nitrogênio, proteção da saúde animal e controle biológico. A acreditação de ensaios na Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 trouxe os seguintes benefícios para o LBE e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Rastreabilidade aos ensaios (Registros); Confiabilidade dos resultados (Programa de Equipamentos, Obras e Reformas, Programa de treinamento, Padronização de procedimentos, Sistema de Auditoria Interna); Gestão do conhecimento (Procedimentos, Instruções, Registros); Competência técnica atestada (nacional/internacional); Minimização/Eliminação do retrabalho e desperdício; Melhoria do ambiente de trabalho; Satisfação do cliente, ganho de mercado (aumento da competitividade).

Palavras-chave: Preservação de micro-organismos, bioinseticidas.

Introdução

As coleções de microrganismos têm sido estabelecidas ao longo dos anos para preservar exemplares da biodiversidade e garantir a conservação do patrimônio genético.

Na Embrapa, as coleções de microrganismos nasceram com a própria empresa, na década de 70, e estão distribuídas por todo o território nacional. Hoje são 16 coleções, classificadas em três categorias (Centros de Recursos Biológicos-CRBs, Coleções Institucionais-CIs e Coleções de Trabalho-CTs), que preservam microrganismos restritos aos níveis de risco de biossegurança 1 e 2 (fungos filamentosos, bactérias, vírus, micoplasmas, leveduras, cogumelos e algas microscópicas) e que possuem funcionalidades diversas, como por exemplo o controle biológico de pragas, a fixação biológica de nitrogênio e fertilidade do solo, a agroindústria e os agentes patogênicos de animais e de plantas. As informações associadas a estes microrganismos estão inseridas no Sistema de Informação AleloMicro (<http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/AleloMicro>).

Os CRBs, as CIs e as CTs da Embrapa têm como missão contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do País, por meio da realização de atividades especializadas, de serviço e suporte científico em microbiologia básica e aplicada à agricultura, pecuária e agroindústria e da disseminação de informações científicas e tecnológicas. O CRB da Embrapa é composto por coleções de microrganismos de quatro Unidades da Embrapa (CENARGEN, CNPAB, CNPMA, CNPSO), que estão buscando reconhecimento formal junto à Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE)/Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), por meio da acreditação de suas atividades de ensaio e de produção de materiais de referência. O CRB da Embrapa atende a Requisitos Corporativos da Qualidade que contemplam todos os requisitos das Normas NIT-DICLA 061, ABNT NBR ISO/IEC 17025, Versão Brasileira do Documento Diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos e/ou ABNT ISO GUIA 34. No Brasil, está sendo estruturada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação uma Rede de CRBs (Portaria N° 409 de 15/04/14) de modo a abranger os quatro principais segmentos estratégicos para o desenvolvimento da biotecnologia: Saúde, Agronegócios, Ambiente e Indústria, sendo a Embrapa a instituição âncora responsável pelo CRB Agronegócio. As CIs da Embrapa são compostas por coleções de microrganismos de cinco Unidades da Embrapa (CNPAF, CNPGL, CNPMS, CNPSA, CNPUV) e atendem a várias pesquisas e/ou Instituições e a Requisitos Corporativos da Qualidade estabelecidos a partir das Normas ABNT NBR ISO/IEC 17025 e Versão Brasileira do Documento Diretrizes da OCDE de Boas

Práticas para Centros de Recursos Biológicos. As CTs da Embrapa são compostas por coleções de microrganismos de sete Unidades da Embrapa (CNPAE, CNPAT, CNPC, CPAC, CFACT, CPAO, CTAA) e estão vinculadas aos CRBs ou às CIs. As CTs da Embrapa atendem a um único ou a vários projetos de pesquisa e a Requisitos Corporativos da Qualidade estabelecidos a partir das Normas ABNT NBR ISO/IEC 17025 e Versão Brasileira do Documento Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos.

Material e Métodos

As coleções de microrganismos da Embrapa têm sido organizadas corporativamente desde 2001, por meio de projetos de pesquisa e de desenvolvimento institucional estruturados em rede e financiados pela Embrapa e por Instituições Externas. Em 2009, a gestão da qualidade passou a integrar esses projetos como o principal pilar do processo de organização das coleções. Em 2014, como resultado dessa iniciativa foi desenvolvido um modelo corporativo de gestão para as coleções de microrganismos da Embrapa, tomando como base o diagnóstico das coleções, o benchmarking de coleções nacionais e internacionais e o mapeamento dos processos de gestão das coleções (Castro et al., 2015). O Modelo está estruturado em 13 capítulos (1. Legislações aplicáveis a Recursos Genéticos Microbianos; 2. Estrutura Organizacional; 3. Sustentabilidade; 4. Processos de Gestão; 5. Critérios para armazenamento de material biológico; 6. Documentos; 7. Registros; 8. Pessoal; 9. Infraestrutura; 10. Requisitos Corporativos da Qualidade; 11. Biorrisco; 12. Serviços e Parcerias; 13. Divulgação) e 23 anexos. A implantação desse modelo tem como objetivos: alcançar níveis de excelência; satisfazer normas nacionais e internacionais e as regulações de biorrisco e acessibilidade e garantir a harmonização dos procedimentos e processos das três categorias de coleções de microrganismos da Embrapa (CRBs, CIs e CTs).

O capítulo 10 desse modelo estabelece Requisitos Corporativos da Qualidade que devem ser implementados por cada categoria de coleção (Pontes et al., 2015). Esses requisitos foram selecionados a partir de três normas de qualidade (ABNT NBR ISO/IEC 17025, Versão Brasileira do Documento Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos e ABNT ISO GUIA 34) e sua complexidade e número variam de acordo com a categoria da coleção, sendo os CRBs os que possuem o

maior nível de exigência por estarem buscando a acreditação segundo às Normas ABNT NBR ISO/IEC 17025, ABNT ISO GUIA 34 e NIT-DICLA 061 junto à CGCRE/INMETRO. Os requisitos corporativos de qualidade aplicáveis às CIs e CTs incluem documentos (internos e externos), registros (impressos e eletrônicos), infraestrutura (instalações, condições ambientais e equipamentos) e pessoal (treinamento e capacitação).

Uma das coleções que constitui o CRB da Embrapa, a Coleção de Bactérias de Invertebrados, a qual integra o CRB da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e está localizada no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE), já deu os primeiros passos desse processo de acreditação. O LBE obteve em fevereiro de 2014 a acreditação na Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 junto à CGCRE/INMETRO de dois ensaios biológicos (Determinação da toxicidade de Bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* (*Lysinibacillus sphaericus*) a larvas de mosquitos e Determinação da toxicidade de Bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* a larvas de lepidópteros) e em 2016 pretende obter a acreditação de mais três ensaios (Identificação de *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* (*Bacillus sphaericus*); Teste de viabilidade de amostras de *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* (*Bacillus sphaericus*) e Teste de pureza de amostras de *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* (*Bacillus sphaericus*)) da Coleção de Bactérias de Invertebrados na Norma NIT-DICLA 061 junto à CGCRE/INMETRO. A metodologia utilizada pelo LBE para a obtenção da acreditação foi a desenvolvida pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e envolve 20 passos (Diagnóstico, Sensibilização, Estrutura do Sistema da Qualidade, Estrutura Física da Gerência da Qualidade, Plano de Ação da Gerência da Qualidade, Aprendizado das Normas de Qualidade, Política e Objetivos da Qualidade, Manual da Qualidade, Procedimento Operacional Padrão Zero, Planos da Qualidade, Lista Mestra de Documentos do Sistema da Qualidade, Procedimentos Operacionais Padrão Gerenciais, Procedimentos Operacionais Padrão Técnicos e de Equipamentos, Formação de Auditores Internos da Qualidade, Sistema de Auditoria Interna da Qualidade, Análise Crítica do Sistema da Qualidade, Solicitação de Acreditação, Auditoria Externa, Acreditação, Melhoria Contínua). A acreditação do LBE envolveu os seguintes Núcleos, Setores e Chefias da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Núcleo de Gestão da Qualidade (NGQ), Núcleo de Comunicação Organizacional (NCO), Núcleo de Tecnologia da Informação

(NTI), Setor de Gestão de Pessoas (SGP), Setor de Gestão de Patrimônio e Suprimentos (SPS), Setor de Implementação de Programação de Transferência de Tecnologia (SIPT), Chefia Geral (CGE), Chefia Adjunta de Administração (CHADM) e Chefia Adjunta de Transferência de Tecnologia (CHTT).

Resultados e Discussão

Um grande número de resultados obtidos a partir da implantação do modelo corporativo de gestão nas coleções de microrganismos e da acreditação junto à CGCRE/INMETRO podem ser enumerados: implantação de um programa de treinamento e sensibilização nas normas de qualidade e em temas técnicos, implantação da gestão de documentos e registros, implantação de um sistema de informação para as coleções de microrganismos, implantação da gestão de equipamentos e instrumentos de medição, adequação das instalações físicas, controle das condições ambientais, implantação do programa 5S, implantação de um sistema de auditoria interna e a melhoria contínua.

Conclusões

As coleções estruturadas e organizadas por meio de um modelo de gestão único e integrado são essenciais para a sociedade brasileira, pois geram produtos, tecnologias e serviços que podem causar impactos diretos na melhoria da qualidade de vida da população. São exemplos desses benefícios os bioinseticidas, capazes de controlar insetos-praga e mosquitos transmissores de doenças sem causar danos à saúde humana, aos animais e ao meio ambiente, o uso de microrganismos no processo de elaboração de bebidas, alimentos, combustíveis, fixação de nitrogênio, proteção da saúde animal e controle biológico.

A acreditação de ensaios na Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 trouxe os seguintes benefícios para o LBE e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Rastreabilidade aos ensaios (Registros); Confiabilidade dos resultados (Programa de Equipamentos, Obras e Reformas, Programa de treinamento, Padronização de procedimentos, Sistema de Auditoria Interna); Gestão do conhecimento (Procedimentos, Instruções, Registros); Competência técnica atestada (nacional/internacional); Minimização/Eliminação do retrabalho e desperdício;

Melhoria do ambiente de trabalho; Satisfação do cliente, ganho de mercado (aumento da competitividade).

Referências

ABNT ISO GUIA 34:2012. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. 2ª Ed. 04 de setembro de 2012. 41 p.

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração. 2ª Ed. 30 de setembro de 2005. 31 p.

DOQ-CGCRE-034. Versão Brasileira do Documento Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para centros de recursos Biológicos: documento de caráter orientativo. Coordenação Geral de Acreditação. INMETRO. Set/2012. 47 p.

NIT-DICLA-061. Requisitos sobre a Acreditação dos Laboratórios de Ensaio dos Produtores de Materiais de Referência dos Centros de Recursos Biológicos. INMETRO. Rev. 02. Dezembro de 2012. 13 p.

Castro CSP, Coutinho MV, Silva FA, Silva GA, Lima LHC, Brito MAVP, Cunha MH, Avidos MFD, Burle ML, Aquino M, Lopes RB, Pontes RMS, Costa SPP (2015) Diretrizes de Gestão para Coleções de Microrganismos da Embrapa. <https://www.embrapa.br/documents/1355163/8357672/Cartilha+Diretrizes+de+Gestao+para+Colecoes+de+Microrganismos+da+Embrapa/4401fe79-2fa2-4135-9fb5-db72f878b01b>

Pontes RMS, Castro CSP, Coutinho MV, Lima LHC (2015) Requisitos Corporativos de Qualidade para Coleções de Microrganismos da Embrapa. <https://www.embrapa.br/documents/1355163/8357672/Cartilha+Requisitos+Corporativos+de+Qualidade+para+Colecoes+de+Microrganismos+da+Embrapa/42320ac2-aebf-471b-86ce-63a4f6f08b24>

Agradecimentos

À Embrapa, ao CNPq e à FINEP pelo suporte financeiro. Às equipes do NGQ, LBE e projeto GESTCOL por todo empenho e trabalho desenvolvido no desenvolvimento do modelo corporativo de gestão para as coleções de microrganismos da Embrapa e no processo de acreditação dos ensaios do LBE junto à CGCRE/INMETRO. À Chefia

Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo apoio e comprometimento com o processo de acreditação dos ensaios do LBE junto à CGCRE/INMETRO.

Uso de marcadores fenotípicos e bioquímicos para caracterização de isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*

Couto F.A.^{1,2,3}, Santos C.⁴, Dias E.S.³, Lima N.², Batista L.R.^{3,5}

^{1,2,3}Instituto Federal Goiano, Ceres, GO, Brasil/ ²Centro de Engenharia Biológica, Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal, ³Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, ⁴Departamento de Ciências Químicas e Recursos Naturais, BIOREN-UFRO, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, ⁵Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

Emails: fabiana.couto@ifgoiano.edu.br, nelson@ie.uminho.pt, esdias@dbi.ufla.br, cledir.santos@ufrontera.cl, luisrb@dca.ufla.br

Resumo

Os fungos do gênero *Aspergillus* seção *Flavi* representam uma das seções mais importantes do gênero e apresentam elevada variabilidade morfológica e bioquímica. Com o advento da abordagem polifásica, sua taxonomia tem sido constantemente revisada. O presente trabalho teve como objetivo utilizar diferentes metodologias para verificar o poder discriminatório dos métodos morfológico, bioquímico, molecular e de espectrometria de massas de isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*. Trinta e um isolados foram analisados pelos métodos macro e micromorfológicos, potencial micotoxigênico, sequências parciais do gene da calmodulina e espectros de massas pela técnica de MALDI-TOF MS. Os dendrogramas foram gerados e os resultados foram comparados. Foi possível identificar pelo método morfológico 100% dos isolados dos quais 90,6% foram produtores de micotoxinas. Os resultados do MALDI-TOF MS apresentaram elevado poder discriminatório. Contudo, através da base de dados utilizada (SARAMIS™), não foi possível a identificação de todos os isolados por MALDI-TOF MS. Os dados da biologia molecular confirmaram todos os resultados obtidos pela caracterização morfológica. A integração dos diferentes métodos de identificação fúngica é fundamental para obter uma caracterização taxonômica eficiente, conduzindo a uma utilização segura desses fungos em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Identificação de fungos, MALDI-TOF, Morfologia de fungos.

Introdução

Aspergillus seção *Flavi* são fungos do subgênero *Circumdati* (Klich, 2002) considerados patógenos de humanos e animais, alérgenos e produtores de micotoxinas, sendo as principais dentro destas as aflatoxinas e o ácido ciclopiazônico (Rodrigues et al., 2009). Essas espécies representam risco à indústria de alimentos, pois provocam deterioração aos produtos agrícolas armazenados (Baquião et al., 2013).

Tradicionalmente, os fungos pertencentes à seção *Flavi* têm sido caracterizados pela técnica morfológica. Entretanto, a identificação clássica utiliza características morfológicas variáveis, por isso é considerada demorada e necessita de profissionais qualificados (Sirisomboon et al., 2013). Sendo assim, a biologia molecular tem sido uma ferramenta fundamental para complementar os dados morfológicos e permitir a correta identificação dos fungos (Simões et al., 2013). Contudo, as técnicas moleculares também apresentam limitações, pois observa-se com frequência que a similaridade genética entre as espécies da Seção *Flavi* tem dificultado a elaboração de marcadores moleculares eficientes (Rodrigues et al., 2009). Além de permitir a identificação das espécies de fungos, as técnicas moleculares também têm sido requeridas para distinguir as espécies toxigênicas das não toxigênicas, através da correlação da presença ou ausência de genes envolvidos na biossíntese das micotoxinas (Samson e Varga, 2012).

A identificação da seção *Flavi* é considerada complexa e assim como em outros grupos de fungos, está em constante evolução (Rodrigues et al., 2011). Sendo assim, é importante compreender que até ao momento nenhum método *per se*, seja ele morfológico, bioquímico ou molecular, é capaz de discriminar todas as espécies. Por esse motivo é que a abordagem polifásica tem sido fortemente apoiada pelos taxonomistas (Rodrigues et al., 2011; Simões et al., 2013). Adicionalmente, novas técnicas têm sido incluídas na abordagem polifásica para a identificação de fungos, como é o caso da técnica de MALDI-TOF MS (Rodrigues et al., 2011), que gera espectros de massa e funcionam como “impressões digitais” únicas para cada microrganismo.

O objetivo do presente estudo foi utilizar dados morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, molecular e de espectrometria de massas por MALDI-TOF MS para caracterizar 31 isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*, oriundos da Coleção de Culturas do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA, Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras, MG, Brasil) e da Micoteca da Universidade do Minho (MUM, Braga, Portugal).

Material e métodos

Caracterização morfológica dos isolados

Vinte isolados de *Aspergillus* da seção *Flavi* foram obtidos da CCDCA (Tabela 1). Onze espécies representando linhagens tipo e de referência obtidas da MUM foram também utilizadas (*A. bertholletius*- MUM 12.11, *A. flavus*- MUM 10.232, *A. minisclerotigenes*- MUM 10.203, *A. mottae*- MUM 10.231, *A. novoparasiticus*- MUM 15.15, *A. oryzae*- MUM 10.242, *A. parasiticus*- MUM 10.201, *A. sergii*- MUM 10.219, *A. sojae*- MUM 10.241, *A. tamarii*- MUM 00.10 e *A. transmontanensis*- MUM 10.214).

Os fungos foram crescidos em quatro meios de cultivos diferentes e padronizados: Czapeck Yeast Ágar – CYA, incubados às temperaturas de 25 e 37 °C por sete dias; Extrato de Malte- MEA a 25 °C por sete dias e Czapek – CZ a 25 °C por sete dias. Após o período de crescimento, foram observadas as características morfológicas (macro e microscópicas) descritas conforme Klich (2002). Os isolados foram cultivados no meio *A. flavus* e *A. parasiticus* Agar (AFPA; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), por cinco dias a 25 °C, no escuro.

Análise micotoxigênica

Os isolados foram cultivados em meio Yeast Extract Sucrose Agar - YES e incubados a 25 °C por sete dias. A extração das aflatoxinas foi realizada conforme Bragulat et al. (2001). As amostras foram analisadas utilizando um HPLC equipado com um detector de fluorescência Jasco FP-920. As separações cromatográficas foram realizados em uma coluna C18 (Waters Spherisorb ODS2, 4,6 mm x 250 mm, 5 mm), equipado com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária.

A produção de ácido ciclopiazônico também foi analisada. Todos os isolados foram cultivados no meio Czapeck Yeast Ágar – CYA e incubados a 25 °C por 14 dias e a extração da micotoxina seguiu o protocolo de Gqaleni et al. (1997). As amostras foram analisadas utilizando um HPLC equipado com um detector Varian 2050 UV (285 nm). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna EuroSpher 100 NH2 (Knauer, 4,6 mm x 250 mm, 5m), precedido de uma pré-coluna com a mesma fase estacionária.

Perfis proteômicos por MALDI-TOF MS

As culturas de *Aspergillus* foram cultivadas em meio de cultivo MEA e incubadas no escuro por cinco dias a 28 °C. A *Escherichia coli* DH5 α foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS. Após o período de incubação, *c.a.* de 1 μ g da mistura esporo/micélio jovem de cada microrganismo foi transferido diretamente da placa de cultura para o placa de aço inoxidável de MALDI-TOF MS. Imediatamente, 0,5 μ l de solução de matriz (75 mg/ml de ácido 2,5- diidroxibenzoico em água/etanol/acetonitrila (1:1:1) com 0,03% de ácido trifluoroacético) foram adicionados a cada poço da placa.

As análises foram realizadas em um sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipado com um laser de nitrogênio (337 nm). Após a obtenção dos espectros, as listas de picos foram exportadas para o programa SARAMIS™ (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Germany, www.anagnostec.eu), onde se obteve a identificação microbiana, por meio de comparação das listas de picos das amostras individuais com as listas de picos disponíveis no banco de dados SARAMIS™.

Sequenciamento parcial do gene da calmodulina

Os vinte isolados de *Aspergillus* seção *Flavi* da CCDCA foram selecionados para esta análise. Após a extração do DNA, realizou-se a amplificação parcial do gene da calmodulina (primers CL1 5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3' e CL2A 5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3'). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel a 1% de agarose e corados com Syber Green. Os fragmentos de DNA foram visualizados e fotografados num transiluminador MiniBIS Pro, DNR. Os produtos da PCR foram sequenciados pela Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul). As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados do GenBank, usando o algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, USA). As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Neighbor-joining no programa MEGA5.

Resultados e discussão

Caracterização morfológica

Com base nas análises macroscópicas (CYA, CZ e MEA) e microscópicas, os 20 isolados da CCDCA distinguiram-se em três principais morfotipos: I - 13 isolados com coloração verde-claro, com conídios lisos a finamente rugosos e variação no morfotipo, sendo uni e biseriados (*A. flavus*), II - 4 isolados que apresentaram distinta cor marrom, presença de conídios globosos, com parede rugosa e predominantemente bisseriados (*A. tamarii*), e III - três isolados que apresentaram coloração verde-escuro, esporos esféricos com parede rugosa e morfotipos predominantemente uniseriados (*A. parasiticus*) (Tabela 1). Rodrigues *et al.* (2011) analisaram isolados de *Aspergillus* da seção *Flavi* e, com base nas análises morfológicas, também obtiveram três morfotipos, sendo eles *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. tamarii*. Dentre os isolados analisados neste estudo, um se destacou dos demais (CCDCA 42), pois apresentou no reverso do meio CYA 37 °C, uma coloração mais escura do que os outros isolados de *A. tamarii*. A espécie da Seção *Flavi*, *A. bertholletius* também mostrou característica diferenciada nesse meio de cultivo, com um crescimento lento (Taniwaki *et al.*, 2012). Portanto, outras análises foram necessárias para confirmar sua identificação morfológica.

Perfil micotoxigênico

As micotoxinas produzidas em vários substratos pelos fungos filamentosos também têm sido utilizadas para auxiliar o estudo taxonômico. Entre os fungos da CCDCA e da MUM, 70,96% (22/31) foram produtores de aflatoxinas, sendo 70,96% (22/31) de isolados produtores de aflatoxina do tipo B e 25,8% (8/31) do tipo G (Tabela 1). Diversos autores também têm utilizado o perfil micotoxigênico para complementar os dados taxonômicos (Silva *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2012; Taniwaki *et al.*, 2012). Para as estirpes de *A. flavus*, observaram-se diferentes padrões de síntese de aflatoxinas, de acordo com o substrato utilizado. Quarenta por cento dos isolados (6/15) de *A. flavus* sintetizaram AFLA B1 e CPA, 46,6% (7/15) produziram BI, B2 e CPA e em apenas 13,33% (2/15) dos isolados não foi detectada a síntese de micotoxinas, de acordo com a metodologia utilizada (HPLC). Os isolados de *A. tamarii* também apresentaram elevado perfil toxigênico pois 100% (4/4) dos isolados não produziram aflatoxinas, mas sintetizaram ácido ciclopiazônico. Observou-se que o perfil micotoxigênico de *A. parasiticus* foi bem consistente, pois sintetizou AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 e não produziu CPA (Tab 1).

Tabela 1 Marcadores morfológicos e bioquímicos utilizados na identificação dos isolados *Aspergillus* seção *Flavi*

Origem dos isolados						Perfil químico				
Código da Coleção	Classificação fenotípica	Origem	Diâmetro dos conídios (µm)	Textura	Seriação	AFLA B1	AFLA B2	AFLA G1	AFLA G2	CPA
MUM 12.11	<i>A. bertholletius</i>	Castanha do Brasil	6.0	f/e	u	-	-	-	-	+
CCDCA 044	<i>A. flavus</i>	Pimenta	4.5	l	b	+	-	-	-	-
CCDCA 046	<i>A. flavus</i>	Uva	4.5	l	b	+	+	-	-	+
CCDCA 047	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	3.8	l	b	+	-	-	-	+
CCDCA 048	<i>A. flavus</i>	Cafê	3.5	l	u/b	+	-	-	-	+
CCDCA 049	<i>A. flavus</i>	Cafê	4.0	l	b	+	+	-	-	+
CCDCA 050	<i>A. flavus</i>	Uva	4.0	l	b	+	-	-	-	+
CCDCA 051	<i>A. flavus</i>	Uva	4.5	f/r	u/b	+	+	-	-	+
CCDCA 052	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	4.5	f/r	u/b	+	-	-	-	+
CCDCA 053	<i>A. flavus</i>	Pimenta	4.5	l	u/b	n/d	n/d	-	-	+
CCDCA 054	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	3.8	f/r	b	+	+	-	-	+
CCDCA 055	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	3.8	l	u/b	+	-	-	-	+
CCDCA 056	<i>A. flavus</i>	Uva	4.3	l	u/b	+	+	-	-	+
CCDCA 057	<i>A. flavus</i>	Cafê	4.5	f/r	u/b	n/d	n/d	-	-	-
CCDCA 058	<i>A. flavus</i>	Ração Humana	4.5	f/r	u/b	+	+	-	-	+
MUM 10.232	<i>A. flavus</i>	Milho	4.8	l	b	+	+	-	-	+
MUM 10.203	<i>A. minisclerotigenes</i>	Fruto de Prunus dulcis	3.5	l	b	+	+	-	-	+
MUM 10.231	<i>A. mottae</i>	Milho	3.5	f/r	b	+	+	+	+	+
MUM 15.15	<i>A. novoparasiticus</i>	-	3.5	r	b	+	+	+	+	-
MUM 10.242	<i>A. oryzae</i>	-	4.5	f/r	u	-	-	-	-	+
CCDCA 043	<i>A. parasiticus</i>	Cafê	4.5	r	u	+	+	+	+	-
CCDCA 045	<i>A. parasiticus</i>	Cafê	4.5	r	u/b	+	+	+	+	-
CCDCA 059	<i>A. parasiticus</i>	Uva	4.5	r	u	+	+	+	+	-
MUM 10.201	<i>A. parasiticus</i>	Fruto de Prunus dulcis	4.5		u	+	+	+	+	-
MUM 10.219	<i>A. sergii</i>	Fruto de Prunus dulcis	3.5	r	u	+	+	+	+	+
MUM 10.241	<i>A. sojae</i>	-	4.5	f/r	u	-	-	-	-	-
CCDCA 041	<i>A. tamaritii</i>	Cafê	5.0	r	b	-	-	-	-	+
CCDCA 042	<i>A. tamaritii</i>	Ração Humana	5.5	r	b	-	-	-	-	+
CCDCA 060	<i>A. tamaritii</i>	Uva	5.0	r	b	-	-	-	-	+
MUM 00.10	<i>A. tamaritii</i>	Fruto de Prunus dulcis	5.0	r	b	-	-	-	-	+
MUM 10.214	<i>A. transmontanensis</i>	Fruto de Prunus dulcis	4.5	r	b	+	+	+	+	-

u: uniseriado; b: bisseriado; n/d: não detectado; AFLA: aflatoxina; CPA: ácido ciclopiazônico; l:liso; f/r: finamente rugoso; r: rugoso; f/e: finamente; equinulado e n/d: não detectado.

Além das aflatoxinas, os fungos da Seção *Flavi* também são conhecidos por produzirem outro tipo de micotoxina, conhecida como ácido ciclopiazônico (Chang *et al.*, 2009). No presente trabalho, 70,96% (22/31) dos isolados foram produtores de CPA. As principais espécies conhecidas como produtoras de CPA são *A. flavus* e *A. tamarii*, mas *A. parasiticus* não sintetiza essa micotoxina (Rodrigues *et al.*, 2009).

Análise por MALDI-TOF MS

Os 31 isolados de *Aspergillus* da seção *Flavi* utilizados neste estudo foram agrupados em 13 diferentes *clusters*. Observa-se que a análise de MALDI-TOF MS permitiu discriminar espécies morfológicas e bioquimicamente relacionadas (Figura 1).

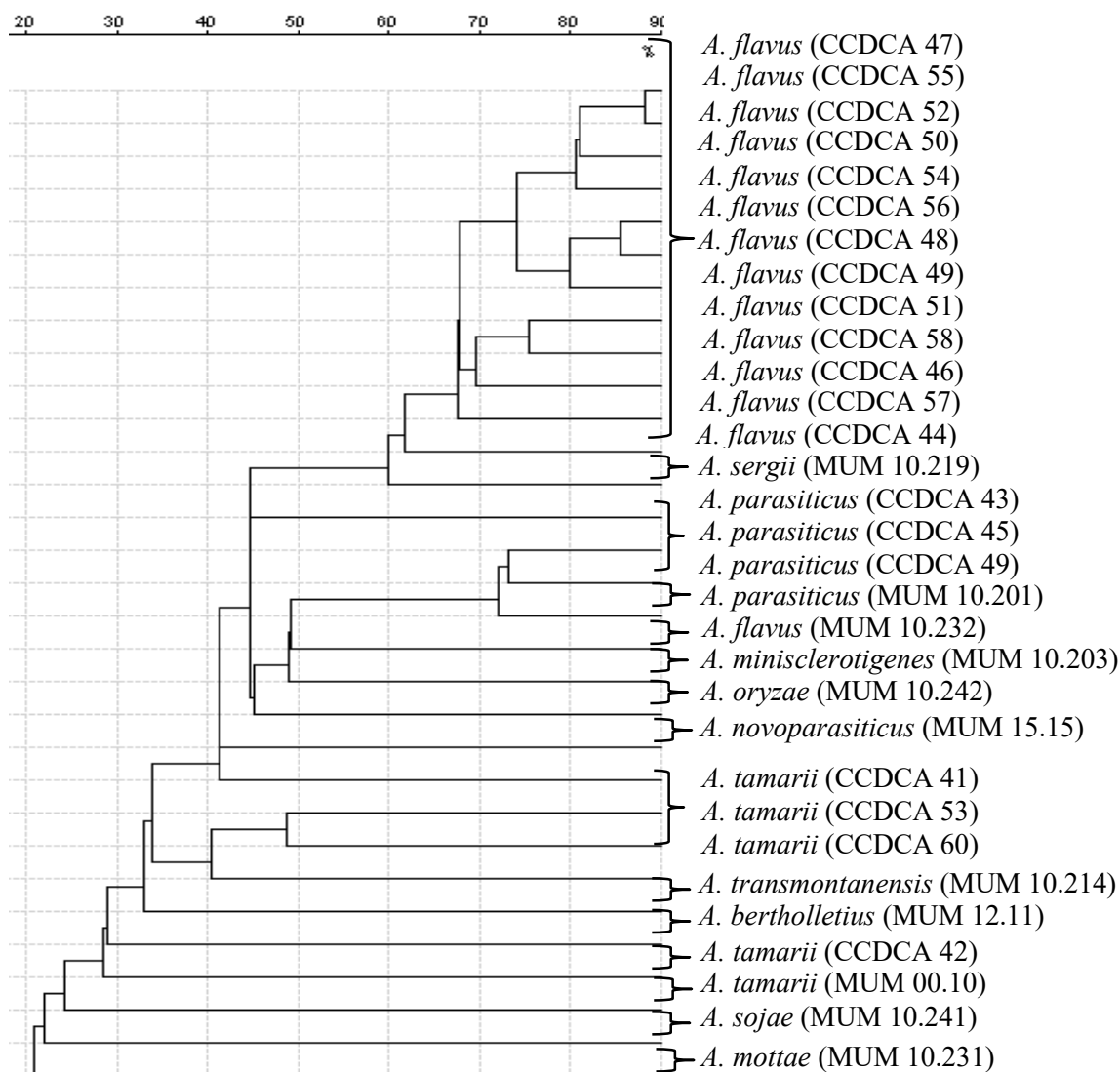


Figura 1 Dendrograma construído com base das massas de proteínas obtidas no MALDI-TOF MS das linhagens de *Aspergillus* seção *Flavi*.

Os isolados da MUM não se agruparam com os isolados da CCDCA, pois o método de armazenamento utilizado pelas duas coleções de cultura influenciou na análise de proteínas. Através desses biomarcadores, o isolado (CCDCA 42) identificado morfologicamente como *A. tamaritii* não se agrupou com os demais *A. tamaritii*. Portanto, a análise de biologia molecular foi necessária para esclarecer esses resultados. Neste trabalho observa-se pela primeira vez o perfil proteômico das espécies *A. novoparasiticus* e *A. bertholletius* e o agrupamento dessas com as outras espécies pertencentes à seção *Flavi*. Por meio do número e das massas de proteínas, essas espécies notoriamente formaram grupos separados das demais espécies.

Identificação molecular

A confirmação da identificação morfológica e por perfis proteômicos (MALDI-TOF MS) dos 20 isolados da CCDCA foi realizada através de análises de biologia molecular. A Figura 2 apresenta a árvore filogenética obtida a partir do sequenciamento parcial do gene da calmodulina.

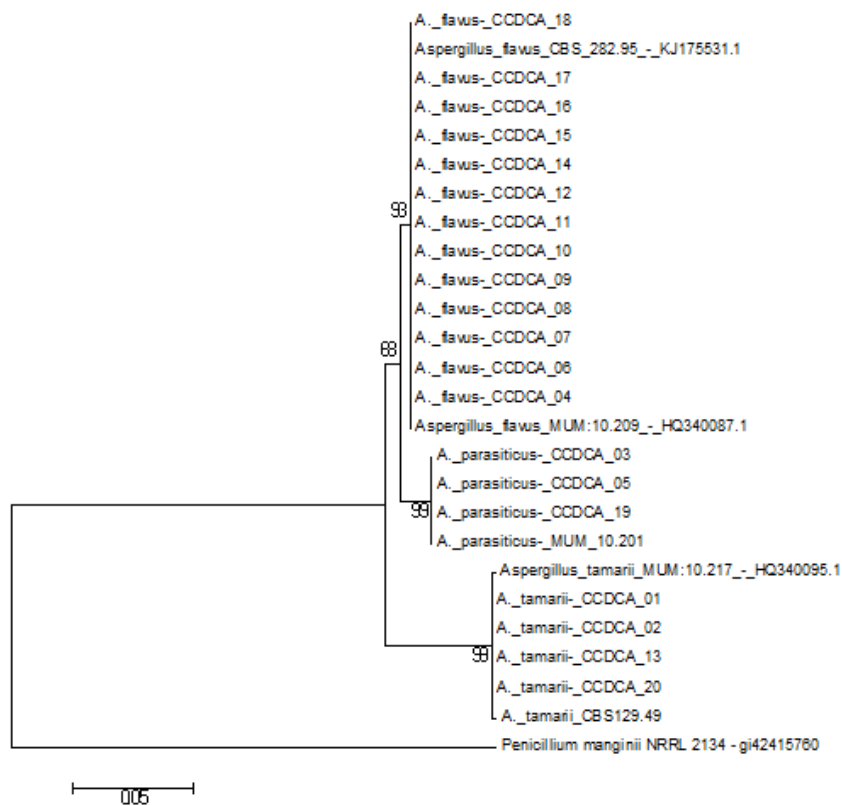


Figura 2 Árvore filogenética (Neighbor Joining) baseada no sequenciamento parcial do gene da calmodulina dos isolados da CCDCA e de seqüências de referência obtidas do GenBank.

O resultado da biologia molecular confirmou a identificação dos 20 isolados da CCDCA identificados morfológicamente, incluindo o isolado CCDCA 42, identificado como *A. tamarii*, mas que não se agrupou com os isolados dessa espécie pelos dados da técnica de MALDI-TOF MS. Novos estudos precisam ser conduzidos com maior número de isolados de *A. tamarii*, provenientes de diferentes origens geográficas. Neste caso, utilizando-se o sequenciamento de outras regiões do genoma, para verificar se existem espécies crípticas dentro da espécie *Aspergillus tamarii*.

Conclusões

O uso dos métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares permitiu uma identificação mais precisa das espécies da Seção *Flavi* preservadas na CCDCA.

Esses dados mostram a robustez da técnica morfológica, pois 100% dos isolados identificados pela análise morfológica foram confirmados por biologia molecular e quando a morfologia é comparada aos perfis proteômicos (MALDI-TOF MS) para identificação de fungos, obteve-se 95% de confiabilidade.

Referências

Baquião AC, Oliveira MMM, Reis TA, Zorzete P, Atayde DD, Correa B (2013) Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. Food Chemistry 139: 1127 – 1132.

Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ (2001) An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. Int J Food Microbiol 71: 139 -144.

Brase S, Encinas A, Keck J, Nising CF (2009) Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. Chemical Reviews 109: 3903- 3990.

Gqleni N, Smith JE, Lacey J, Gettinby G (1997) Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. Appl Environ Microb 63: 1048 -1053.

Klich MA (2002) Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. Mycologia 94: 21–27.

Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z (2009) A polyphasic approach to the identification and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Int J Food Microbiol* 129:187–193.

Rodrigues P, Santos C, Venâncio A, Lima N (2011) Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *J Appl Microbiol* 111: 877-892.

Samson R, Varga J (2012) Molecular Systematics of *Aspergillus* and its Teleomorphs. In *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press. Wymondham, UK.

Santos C, Fraga M E, Kozakiewicz Z, Lima N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Res Microbiol* 161: 168-175.

Silva FC, Chalfoun SM, Batista LR, Santos C, Lima N (2015) Use of polyphasi approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolates from commodities in Brazil. *Ann Microbiol* 1-11.

Simões MF, Pereira L, Santos C, Lima N (2013) Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. *In: Malik, A., Grohmann, E., Alves, M. (eds.) Management of Microbial Resources in the Environment*. Springer, The Netherlands, 91-117.

Sirisomboon C, Putthang R, Sirisomboon P (2013) Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. *Food Control* 33: 207-214.

Soares C, Rodrigues P, Peterson SW, Lima N, Venâncio A (2012) Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia* 104: 682–697.

Taniwaki M, Pitt J, Iamanaka B, Sartori D, Copetti M, Balaiee A, Fngaro MH, Frisvad JC (2012) *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *Plos one* 7: 1-7.

AGRADECIMENTOS

Fabiana Couto agradece à CAPES (Brasil), pela concessão da bolsa do PDSE- Proc.8161-12-7.

Variabilidade genética de *Ralstonia solanacearum* utilizando marcadores AFLP.

Demosthenes L.C.R.¹, Bentes J.L.S.¹, Costa Neto P.Q.¹

¹.Universidade Federal do Amazonas.

Emails: liacristine@ufam.edu.br, jlbentes@ufam.edu.br, senaneto16@yahoo.com.br

Resumo

Ralstonia solanacearum é considerada uma das mais importantes bactérias fitopatogênicas do mundo, causa a murcha bacteriana, uma doença que afeta várias espécies de plantas cultivadas, ornamentais e silvestres causando perdas econômicas. O marcador AFLP foi utilizado para analisar a variabilidade genética entre 30 isolados de *R. solanacearum* provenientes de áreas produtoras de hortaliças de quatro municípios no Estado do Amazonas. As seis melhores combinações de *primers* geraram um total de 432 *loci* polimórficos. Os dados dos perfis eletroforéticos dos marcadores AFLP foram analisados para a similaridade, variando de 47 *loci* à 103 na combinação E+AT/M+C. O coeficiente de similaridade de Jaccard estimado entre os 30 isolados avaliados variou de 0,01 à 0,98. O dendrograma gerado pelo método UPGMA separou os isolados em seis grupos com coeficiente de correlação cofenética no valor de $r = 0,98$. O marcador AFLP foi eficaz em analisar a variabilidade genética entre indivíduos de *R. solanacearum*.

Palavras-chave: murcha bacteriana, pimentão, marcador AFLP

Introdução

A bactéria *R. solanacearum* é uma espécie heterogênea, que apresenta grande diversidade fenotípica e genotípica, refletindo numa ampla variedade de hospedeiros, agressividade e adaptação aos diferentes climas, influenciada pelo genótipo do hospedeiro, *habitat* natural e práticas agrícolas utilizadas (Castillo e Greenberg, 2007). *R. solanacearum* é tradicionalmente classificada em raças e em biovars (Hayward, 1994). No entanto, em virtude da heterogeneidade da espécie os cientistas sugerem um

novo conceito, que não se trata de uma espécie, mas sim de um complexo de espécies, definido como um conjunto de espécies fortemente relacionadas (Fegan e Prior, 2005). Fegan e Prior (2005), analisaram a sequência espaçadora intergênica (ITS) 16S-23S e propuseram uma nova classificação hierárquica na qual, a diversidade existente na espécie foi subdividida em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevar e clone. Os filotipos são determinados por PCR-Multiplex, de acordo com as variações de tamanho da sequência na região ITS, existindo quatro filotipos identificados: filotipo I (estirpes da Ásia); filotipo II (Américas); filotipo III (África); e filotipo IV (Indonésia, Austrália, Japão e Filipinas). No filotipo II está a estirpe mais conhecida como *R. solanacearum* raça 3 biovar 2 que ataca várias solanáceas, incluindo tomate, pimentão e batata (Castillo e Greenberg 2007). Cada filotipo é subdividido em grupos menores denominados sequevares, que se refere a uma sequência altamente conservada dentro da região sequenciada do gene da endoglucanase (*egl*). Já os clones são identificados por técnicas como AFLP que permitem identificar diferenças genéticas em outras áreas do genoma.

O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética de isolados de *R. solanacearum* utilizando marcadores AFLP, para obter informações que sirvam de subsídio para o estabelecimento de medidas de manejo da murcha bacteriana no Amazonas.

Material e métodos

Foram utilizados 30 isolados de *R. solanacearum* provenientes da coleta de plantas com sintomas de murcha bacteriana dos municípios de Iranduba, Manacapuru, Manaus e Presidente Figueiredo do Estado do Amazonas. Caules de plantas com sintomas foram levados ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, onde foi feito o isolamento da bactéria, testes bioquímicos de identificação da espécie e de patogenicidade.

O DNA genômico de cada um dos isolados obtidos foi extraído conforme metodologia descrita por Rosa (2008), com modificações e a quantificação foi realizada em gel de agarose 0,8% por comparações visuais de sua fluorescência com aquelas de padrões de massa molecular conhecida de DNA do fago lambda nas concentrações de 50 e 100 ng.µL⁻¹, utilizando o corante *gel red* (Uniscience) para coloração das amostras, que foram diluídas em água ultra-pura, padronizadas a uma concentração de 10 ng.µL⁻¹ e armazenadas à - 20 °C até o uso.

As condições de AFLP foram utilizadas seguindo os procedimentos propostos por Vos *et al.* (1995). Foram realizadas reações de digestão do DNA com a combinação das enzimas de restrição *EcoRI/MseI*, em seguida a ligação dos adaptadores, seguido das reações de pré-amplificação utilizando 6 conjuntos de iniciadores complementares às seqüências dos sítios das enzimas de restrição com um nucleotídeo seletivo e por último as reações de amplificação seletiva onde foram testadas 25 combinações de *primers*. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% realizada no sistema de eletroforese Sequi-Gen GT sob potência constante de 50 W por três horas. O padrão de bandas apresentado nos géis foi analisado visualmente, quantificando a presença de bandas entre 50 a 450 pb. *Locos* polimórficos foram analisados para presença/ausência de banda, representados por 1 e 0, respectivamente. Os dados binários foram submetidos à análise de variância pelo programa Genes (Cruz 2006). A similaridade genética entre os genótipos foi analisada através do coeficiente de Jaccard (Jaccard 1901). A matriz de similaridade foi analisada através do método UPGMA – *Unweightes Pair-group Method with Arithmetic Average*. A consistência das ramificações do dendrograma foi verificada por meio da amostragem repetitiva de dados com 1000 repetições, utilizando o programa Genes (Cruz 2006).

Resultados e discussão

Os testes realizados para a identificação bioquímica dos isolados produziram os resultados esperados para *R. solanacearum*. A análise dos marcadores AFLP obtidos identificou que das 24 combinações de *primers* testadas, variando de 1 a 3 nucleotídeos combinados, seis foram selecionadas por terem gerado um perfil de bandas satisfatório com boa intensidade e quantidade de *loci* polimórficos identificados, evidenciando o alto nível de polimorfismo dos isolados analisados. As seis combinações de *primers* utilizadas apresentaram um total de 433 bandas sendo cinco monomórficas e 428 polimórficas, variando de 47 *loci* na combinação E+AAC/M+CAC até 103 na combinação E+AT/M+C. A variação genética entre os isolados estimada através do coeficiente de similaridade de Jaccard variou de 0,01 à 0,98. Os isolados mais relacionados entre si, MAO31 e PRESFIG33 apresentaram coeficiente de similaridade genética de 0,98.

A partir da matriz de similaridade foi gerado o dendrograma obtido pelo método UPGMA sendo possível separar os isolados em seis grupos. No grupo I estão os isolados MAO31, PRESFIG33, MAO30, MAO26, IRAND27, MAO28, MANAC19,

IRAND20, IRAND13, MANAC14, MANAC9, IRAND11, IRAND6, MANAC15, IRAND3, MAO29, o valor de *bootstrap* de 100% confirma a estabilidade desta ramificação.

No grupo II ficaram os isolados MANAC8 e MANAC16, com valor de *bootstrap* de 100%, demonstrando que está ramificação é consistente, aparecendo sempre que as análises foram efetuadas pelo programa. O grupo III foi formado pelos isolados IRAND10, IRAND12, IRAND1, MANAC2 e PRESFIG35. O grupo IV foi representado pelos isolados IRAND17, MAO34, IRAND21 e MANAC24. Os grupos V e VI foram formados por apenas um isolado cada um IRAND4 e MANAC23, respectivamente, que permaneceram isolados dos demais grupos.

O coeficiente de correlação cofenética, valor calculado entre a matriz de dados binários e o dendrograma gerado, representa a confiabilidade dos dados e apresentou valor de $r = 0,98$, confirmando a robustez do dendrograma obtido.

A utilização de testes bioquímicos se baseia em características metabólicas e a habilidade em utilizar certos substratos, produção ou redução de substâncias, temperatura ótima de crescimento, reações específicas a certos corantes entre outros. Kelman (1954) avaliou a característica de isolados de *R. solanacearum* em vários tipos de meios e relatou que colônias normais quando em meio contendo tetrazólio, as colônias normais são fluídas brancas com o centro rosado, enquanto colônias avirulentas são completamente vermelhas. Os resultados obtidos concordam como os obtidos por Lemessa e Zeller (2007) que utilizaram testes bioquímicos clássicos para a identificação e caracterização de isolados de *R. solanacearum*.

A análise AFLP dos isolados de *R. solanacearum* foi efetiva em detectar a variabilidade genética deste complexo, observada pelo grande número de ramificações detectadas no dendrograma. A análise obtida pelos *primers* selecionados mostrou que aqueles que continham as bases seletivas A, C e T foram mais efetivas do que as outras combinações, pois apresentaram perfis eletroforéticos mais informativos quanto à diversidade entre os isolados estudados, ou seja, as combinações de *primers* com a presença dessas bases apresentou maior número de bandas.

Em estudo utilizando marcadores AFLP, Kositrana *et al.* (2002) avaliaram a diversidade genética de *R. solanacearum* isolados de diversos hospedeiros na Malásia e Tailândia e encontraram um nível de similaridade de 30% entre as estirpes desses países. Os autores verificaram ainda a separação em três grupos que foram correlatos às biovars das estirpes, diferente do resultado que foi obtido com os isolados do presente

estudo, onde não foi possível correlacionar os grupos com as biovares das estirpes utilizadas, possivelmente por se tratarem todos os isolados obtidos de solanáceas e apenas dois biovares.

A análise dos coeficientes de similaridade gerados permitiu verificar que a variabilidade genética observada entre os isolados foram causadas pelo perfil genético de cada isolado e não pela procedência dele ou hospedeiro, uma vez que a maior diversidade foi encontrada entre os isolados, formando grupos com isolados de diferentes procedências. Resultado semelhante foi obtido por Jeong *et al.* (2007) que analisaram a variabilidade genética de 125 isolados de *R. solanacearum*, sendo 109 oriundos de províncias da Coreia e 16 de outras localidades do mundo através de marcadores moleculares AFLP. Obtiveram 110 bandas polimórficas e obtiveram um dendrograma com a formação de dois grupos, no qual o primeiro grupo conseguiu agrupar todos os isolados originários da Coreia e do Japão, enquanto no segundo grupo ficaram agrupados os isolados dos países restantes. O estudo não permitiu correlacionar a variabilidade genética com a origem geográfica do isolado, do hospedeiro ou biovar. Algumas inconsistências também foram detectadas quando somente as biovares foram consideradas na análise, agrupando conjuntamente isolados de raças e biovares diferentes. O único grupo consistente foi o que agrupou todos os isolados da raça 3 biovar 2.

A análise dos coeficientes de similaridade gerados permitiu verificar que a variabilidade genética observada entre os isolados foram causadas principalmente pelo perfil genético de cada isolado e não pela procedência dele ou hospedeiro, uma vez que a maior diversidade foi encontrada entre os isolados sendo formado grupos com diferentes procedências.

Conclusão

O marcador AFLP distinguiu a variabilidade genética existente entre os isolados de *R. solanacearum* utilizando seis combinações de primers com a formação de seis grupos.

Referências

Castillo JA, Greenberg JT (2007) Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*: 1225-1238.

Creste S, Tulmann neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*: 19: 299-306.

Cruz CD (2006) Program Genes: multivariate analysis and simulation. UFV, Viçosa, MG.

Fegan M, Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. *Bacterial wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex. Saint Paul, MN, USA. APS Press.

Hayward A.C (1994) Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In Hayward AC, Hartman GL, Eds.. *Bacterial wilt: The disease and its causative agente Pseudomonas solanacearum*. Wallingford. CAB.

Jeong Y, Kim J, Kang Y, Lee S, Hwang I (2007) Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*, *Plant disease* 91: 1277-1287.

Kelman A (1954). The relationship of patogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.

Kositrana K, Julapark C, Frederick RD, Schadd NW (2002) Genetic variability of *Ralstonia solanacearum* strains from pepper (*Capsicum annum*) in Thailand and their genetic relationship to strains from other hosts, *Thai Journal of Agricultural Science* 35: 415-426.

Lemessa F, Zeller W (2007) Isolation and characterisation of *Ralstonia solanacearum* strains from *Solanaceae* crops in Ethiopia, *Journal of Basic Microbiology* 47: 40–49.

Rosa DD (2008) Método rápido de extração de DNA de bactérias, *Summa Phytopathologica* 34: 259-261.

Vos PR, Hogers M, Bleeker M, Van De Lee Reijans T, Hornes M, Fritjers A, Pot, J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids research* 23: 4407-4414.

Análise de variáveis que influenciam a produção de biomassa de actinomicetos

Fonseca T.R.B.¹, Palheta R.A.¹, Souza B.C.¹, Marinho N.M.V.¹, Ebinuma V.C.S.², Teixeira M.F.S.¹

¹UFAM - Universidade federal do Amazonas (Avenida General Rodrigo Octávio, 3000 - Coroado).

²UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Rodovia Araraquara - Jaú/km 01).

Emails: tamisfonseca@gmail.com, nmvinhote@hotmail.com, valeriac@fcfar.unesp.br

Resumo

Os Actinomicetos, assim como os demais micro-organismos, sofrem influência de diferentes fatores no seu crescimento micelial como constituição do meio de cultura e fatores físicos. A constituição do meio de cultura, juntamente com a capacidade metabólica do organismo, afeta a síntese de metabólitos e o crescimento celular que está diretamente relacionado com a formação da biomassa durante o crescimento. O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência da velocidade de agitação e temperatura, além dos efeitos da variação de concentração da fonte de carbono e nitrogênio, na produção da biomassa micelial de Actinomicetos. Para a realização dos ensaios utilizou-se um planejamento fatorial 2⁴ com variação dos fatores independentes. Os resultados demonstraram uma maior significância da interação entre a velocidade de agitação e a temperatura, seguido da concentração do filtrado de soja, influenciando positivamente na produção de biomassa. A otimização das condições de cultivo são de extrema importância para resultados satisfatórios de produção, seja de biomassa ou de metabólitos.

Palavras-chave: crescimento micelial, fermentação submersa, planejamento fatorial.

Introdução

Os Actinomicetos constituem um grupo extremamente diverso; são bactérias Gram-positivas, classificadas na ordem Actinomycetales, aeróbias e com crescimento semelhante ao de fungos filamentosos. Em outros membros da ordem, os filamentos se fragmentam e consequentemente só podem ser observados em algum estágio do ciclo de crescimento. Apresentam distribuição cosmopolita, sendo encontrados predominantemente no solo. Entretanto, podem também estar presentes em ambientes aquáticos e em associação com líquens e plantas (Batista *et. al.*, 2010; Silva-Vinhote *et. al.*, 2011).

Destacam-se por apresentar um papel importante na ecologia, atuando na ciclagem de nutrientes, fixação de nitrogênio, além de serem produtores metabólitos secundários extremamente diversos como antibióticos, vitaminas e enzima (Silva-Vinhote *et. al.*, 2011).

A constituição do meio de cultura, juntamente com a capacidade metabólica do organismo, afeta a síntese de metabólitos e o crescimento celular que está diretamente relacionado com a formação da biomassa durante o crescimento. Fontes nutricionais como carbono, nitrogênio, minerais e fatores ambientais como tempo, temperatura e pH têm uma profunda influência. A temperatura é um dos principais fatores ambientais que afetam o crescimento de muitos micro-organismos (Sales-Campos e Andrade, 2010; Antunes *et al.* 2013). O objetivo deste estudo foi a avaliar a interferência da velocidade de agitação e temperatura, além dos efeitos da variação de concentração da fonte de carbono e nitrogênio na produção da biomassa micelial de Actinomicetos.

Material e Métodos

Este experimento foi realizado no laboratório de Micologia do Departamento de Parasitologia/Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas.

O micro-organismo selecionado, Actinomiceto A8, foi reativado a partir do preservado pelo método Castellani em meio ágar ISP2A (amido 1%, extrato de levedura 0,4%, extrato de malte 1%, dextrose 0,4%, ágar 2%), pH 7,3 em placa de Petri por 10 dias a 25 °C com manutenção da cultura a cada 30 dias.

Em frascos de vidro com capacidade de 125 mL foram distribuídos 50 mL de cada meio de cultura e em seguida levados à autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização e o crescimento do micro-organismo, retirou-se 10 discos de 0,8 cm de diâmetro e inoculou-se no meio de fermentação selecionado, MPE, composto por cloreto de sódio (NaCl) 0,5%, carbonato de cálcio (CaCO₃) 0,2%, glicose e farelo de soja com variação das suas concentração de acordo com o planejamento fatorial. As inoculações foram feitas assepticamente em Câmara de Fluxo Laminar Contínuo.

Ao término do terceiro dia de fermentação realizou-se a filtração em papel de filtro Whatmann nº 1 da biomassa micelial com o auxílio de uma bomba à vácuo. A biomassa retida no filtro foi levada à estufa a 105 °C até a obtenção de peso constante. O peso seco foi determinado pela diferença entre o peso total e o peso do papel de filtro.

A fermentação foi conduzida com base em um planejamento fatorial de 2⁴ com repetição do ponto central em *shaker*, onde a variável resposta foi a produção de biomassa e os fatores independentes foram temperatura (25 °C, 30 °C, 35 °C), velocidade de agitação (150 rpm, 180 rpm, 210 rpm), concentração de glicose (1%, 2%, 3%) e concentração de nitrogênio (1%, 2%, 3%).

Para análise estatística dos resultados foi usado o *software* Statistica 10.0 com base na tabela de ANOVA e no gráfico de Pareto.

Resultados e discussão

Visando atingir os objetivos, planejamentos experimentais vêm sendo empregados para aperfeiçoar vasta gama de bioprocessos (Gonçalves *et al.*, 2012). Através do planejamento fatorial, é possível reduzir o número de experimentos e avaliar as variáveis significativas juntamente com seus efeitos (Bruns e Scarmino, 2006). Em adição, juntamente com a ferramenta estatística, a metodologia de superfície de resposta (MSR) é frequentemente usada para aperfeiçoar um processo usando ferramenta estatística. Este modelo é usualmente construído para os fatores definidos de um meio por equação polinomial quadrática para descrever os efeitos de interação entre as variáveis (Zafar *et al.*, 2012). O objetivo deste conjunto de técnicas estatísticas é executar o plano experimental pela construção de modelos empíricos e avaliar o efeito independente das variáveis na desejável variável resposta. Esta metodologia reduz o número de experimentos e fornece informação suficiente para um resultado aceitável estatisticamente (Guo *et al.*, 2012).

Para avaliar o efeito de diferentes variáveis (velocidade de agitação, temperatura, concentração de glicose e concentração do filtrado de soja) no crescimento microbiano do Actinomiceto A8, empregou-se um planejamento fatorial completo 2⁴, constituindo 20 ensaios. A análise de variância (ANOVA) mostrou que as variáveis independentes, concentração de filtrado de soja, temperatura e a interação entre as variáveis temperatura e velocidade foram significativas ao processo para um intervalo de confiança de 95%. O planejamento apresentou falta de ajuste não significativa, o que demonstra a boa interação entre os resultados previstos e obtidos experimentalmente.

Tabela 1. Tabela de análise de variância (ANOVA) para um intervalo de confiança de 95%, onde a variável resposta é a produção de biomassa do Actinomiceto A8.

ANOVA: Var. : Biomassa; R ² : 0,8513; Adj: 0,68607; 2** (4-0) design; MS Residual = 0,580668; DV: Biomassa					
Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Concentração de glicose (%)	0,3425	1,0	0,3425	0,5899	0,4621
(2) Concentração de filtrado de soja (%)	4,6322	1,0	4,6322	7,9773	0,0199
(3) Temperatura (°C)	5,7900	1,0	5,7900	9,9713	0,0116
(4) Agitação (rpm)	2,4925	1,0	2,4925	4,2924	0,0682
1 by 2	0,0000	1,0	0,0000	0,0000	0,9972
1 by 3	1,7128	1,0	1,7128	2,9498	0,1200
1 by 4	0,3502	1,0	0,3502	0,6030	0,4573
2 by 3	2,6479	1,0	2,6479	4,5602	0,0615
2 by 4	1,1702	1,0	1,1702	2,0152	0,1894
3 by 4	10,7797	1,0	10,7797	18,5644	0,0020
Erro	5,2260	9,0	0,5807		
Total SS	35,1441				

Os parâmetros da fermentação tais como tempo, agitação, temperatura, pH e vitaminas, fontes de carbono e de nitrogênio podem ser determinantes no controle do processo, por isso é necessário um conhecimento da fisiologia microbiana e do comportamento celular do micro-organismo.

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 1), a interação entre as variáveis apresentou o efeito mais significativo, no nível positivo. A temperatura como variável sozinha apresentou um efeito negativo, o que indica que trabalhar com esta variável no nível inferior (25 °C) promoverá resultados superiores. Por outro lado, a concentração de filtrado de soja apresentou efeito positivo e trabalhar com uma maior concentração (> 3%) deste

substrato gerará melhores resultados. Como a interação entre temperatura e velocidade de agitação apresentou efeito positivo e a variável independente temperatura sozinha efeito negativo, trabalhar com a velocidade de agitação no nível inferior (150 rpm) acarretaria em resultados mais promissores.

Fatores como velocidade de agitação, concentração de glicose e as demais interações não apresentaram resultados significativos para a produção da biomassa micelial.

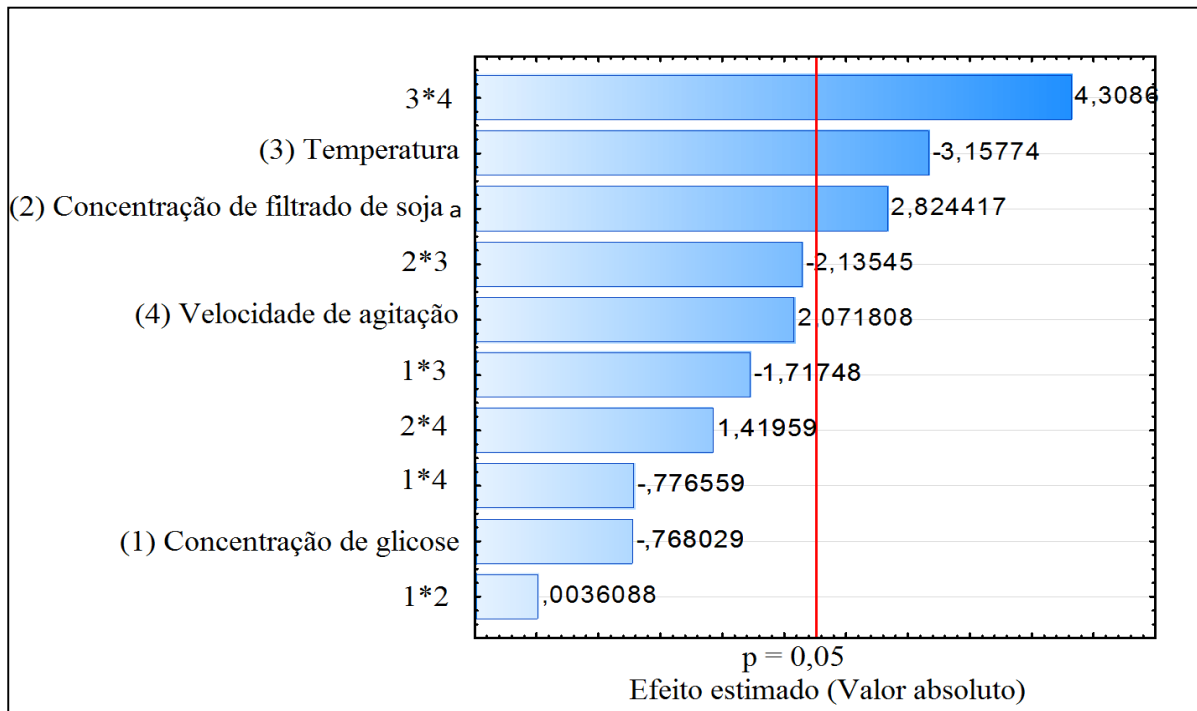


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de biomassa do Actinomiceto A8.

Corroborando com os dados obtidos para o Actinomiceto A8, o gênero *Streptomyces* apresenta um maior crescimento micelial quando se tem uma maior concentração de filtrado de soja, 4% e uma baixa concentração de glicose 1% (Nascimento *et al.*, 2010). As fontes de nitrogênio também proporcionaram um melhor crescimento em *Penicillium citrinum*, sendo o farelo de soja o segundo melhor substrato (Tavares *e. al.*, 1998).

No trabalho de Tavares *et. al* (1998) verificou-se também que o uso de temperaturas em torno de 25 °C favorecem a maior produção de biomassa.

Conclusão

As interações físicas, agitação e temperatura apresentaram uma maior significância na produção de biomassa micelial do Actinomiceto A8 quando comparado aos outros fatores avaliados, no entanto para otimização das condições é necessário a realização de mais estudos.

Referências

- Antunes, et al. (2013). Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. Rev. Bras. Bioc., 11(2):131-138.
- Batista, et al. (2010). Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. Unimontes Cien., 12(1):60-69.
- Bruns, R.E.; Scarminio, B.B.N. (2006). Statistical design: chemometrics. Amsterdam: Elsevier. 412p.
- Gonçalves, et al. (2012). Use of response surface methodology to optimize production of pectinases by recombinant *Penicillium griseoroseum* T20. Biocatalysis and Agri. Biotech,1(2):140-146.
- Guo, J. et al. (2012). Process optimization for microwave-assisted direct liquefaction of *Sargassum polycystum* C. Agardh using response surface methodology. Biores. Tech., 120, 19-25.

Sales-Campos, et al. (2010). Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. *Interciencia*, Caracas, 35(3):198-201.

Silva-Vinhote, et al. (2011). Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems. *Australian J. Basic Appl. Sci.*, 5, 910-918.

Tavares, et al. (1998). Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. *Química Nova*, 21, 6.

Zafar, et al. (2012). Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 by using genetic algorithm based on artificial neural network and response surface methodology. *Biocatalysis and Agri. Biotech.*, 1(1):70-79.

Identificação molecular de fungos filamentosos isolados dos sintomas de superbrotamento em guaranazeiro

Lobo, I.K.C.^{1,2}, L.B. Almeida^{1,2}, Souza Á.², Sousa N. R.², Silva G.F.²

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Coroado I - Manaus/AM), ²EMBRAPA Amazônia Ocidental (Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural, Caixa Postal 319 - Manaus/AM, Brasil). E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

O complexo superbrotamento, cujo agente causal é o fungo *Fusarium decemcellulare*, destaca-se como uma das principais doenças que acometem o guaranazeiro na região Amazônica. Entender a dinâmica da comunidade de fungos presente nas lesões e a interação com fatores bióticos e abióticos pode contribuir com o combate à doença. O objetivo deste trabalho foi identificar os diferentes fungos presentes nos três sintomas do superbrotamento em guaranazeiro e nos tecidos assintomáticos. Foi obtido um total de 77 fungos isolados a partir de tecidos sintomáticos e assintomáticos. Após uma triagem realizada por meio da técnica ERIC-PCR, 46 isolados foram analisados com base nas regiões ITS e D1/D2 da subunidade 28S do DNA ribossomal, resultando na identificação de 9 gêneros e 8 diferentes espécies de fungos no material analisado, além de 4 gêneros que não puderam ser identificados a nível de espécie. *F. decemcellulare* foi detectado nos três sintomas do superbrotamento, como esperado. Além disso, foram constatados fungos endofíticos com potenciais de controle biológico, como *Fusarium poae* e fungos do gênero *Pestalotiopsis*. O presente trabalho, portanto, apresenta informações que podem fundamentar novas táticas de combate ao superbrotamento.

Palavras-chave: complexo superbrotamento, comunidade de fungos, ITS.

Introdução

O guaraná é extraído das sementes de *Paullinia cupana* H.B.K. *Typica* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) e assume importante papel social e econômico na Amazônia brasileira e no estado da Bahia, devido a seu uso na agricultura familiar, suas propriedades medicinais e estimulantes (Atroch *et al.*, 2010).

O clima amazônico contribui para maior proliferação de doenças e estas são uma das principais causas da diminuição da produção de guaraná no estado do Amazonas, sendo que os danos e a incidência variam de acordo com o agente causal. Diante das dificuldades de controle, o complexo superbrotamento é, atualmente, um dos principais problemas da cultura do guaranazeiro na região amazônica. O primeiro relato atribuindo a causa do superbrotamento a *F. decemcellulare* foi feito por Bastista (1983). No estudo, 30 dias após as inoculações, foram observados os sintomas típicos da doença.

O complexo superbrotamento ataca diferentes partes da planta e apresenta três sintomas bem característicos: 1- hiperplasia floral, ocorrendo hiperplasia e hipertrofia atingindo toda a inflorescência; 2- superbrotamento de gemas vegetativas e florais, consistindo em brotações sucessivas a partir de pontos muito próximos uns dos outros, ao longo dos ramos; 3- galhas do caule, que é o entumescimento do coleto, podendo tomar grandes extensões do caule (Batista, 1983). Em função desse quadro, é inviável economicamente a realização de pulverizações com fungicidas como estratégia de controle da doença.

Muitos micro-organismos são fundamentais na prevenção de doenças da planta, bem como no seu crescimento e entender a dinâmica da comunidade fúngica presente nas lesões pode colaborar com o desenvolvimento de táticas mais eficientes de combate à doença. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar os diferentes fungos presentes nos três diferentes sintomas do superbrotamento em guaranazeiro.

Material e Métodos

Isolamento, Cultivo Monospórico e Extração de DNA genômico

O isolamento foi feito dos três sintomas de superbrotamento, além de material seco e tecidos assintomáticos provenientes dos clones 48 e 70, em condições de ocorrência natural da doença, no campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental (Rodovia AM 010, km 29, Manaus-AM). Foram realizadas a assepsia (álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto) e lavagem com água estéril, procedimento repetido 3 vezes. Em seguida, fragmentos dos diferentes tecidos foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura Ágar-Água. Depois, as colônias crescidas foram repicadas para o meio BDA (2 g L⁻¹ de peptona, 10 g L⁻¹ de dextrose, 16 g L⁻¹ de ágar, 1,5 g L⁻¹ de caseína, 2 g L⁻¹ de extrato de levedura e 250 g L⁻¹ de batata). O cultivo monospórico foi realizado por meio de diluição em água estéril a 1-10

unidades por campo microscópico (lente de 10x). Em seguida, 1 mL desta suspensão foi vertido em meio BDA, sendo as placas incubadas invertidas, à temperatura ambiente, por 24 a 36 horas. O esporo germinado foi transferido para outra placa de Petri com meio de cultura BDA. O DNA total dos fungos foi extraído segundo Doyle e Doyle (1990).

Análise da diversidade e identificação dos isolados

Amplificações e Sequenciamento

Após o isolamento, os 77 isolados obtidos (Tabela 1) foram, posteriormente, triados por meio da técnica ERIC-PCR, para definir os isolados com diferentes perfis de bandas a seguirem para o sequenciamento.

Tabela 1. Fungos isolados dos sintomas de superbrotamento, tecido assintomático e material seco dos clones 48 e 70, antes da triagem, totalizando 77 isolados.

Clone	Superbrotamento de gemas vegetativas	Superbrotamento de gemas vegetativas (material seco)	Hiperplasia floral	Galhas do caule	Tecido Assintomático
48	F52, F53, F54, F55, F56, F57, F58	F45, F46, F47, F48, F49, F50, F51	F59, F60, F61, F62, F63, F64, F65, F66, F67	-	F68, F69, F70, F71, F72, F73, F74, F75, F76, F77
70	F12, F13, F14, F15, F16, F17, F18, F19, F20, F21	F22, F23, F24, F25, F26, F27, F28, F29, F30, F31, F32, F33	F34, F35, F36, F37, F38, F39, F40, F41, F42, F43, F44	F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11	-

Os fungos selecionados tiveram a região do DNA ribossomal ilustrada na Figura 1 sequenciada e os *primers* utilizados para a amplificação foram ITS5 (F) (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAGG-3') (White *et al.*, 1990) e NL4 (R) (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnel, 1993).

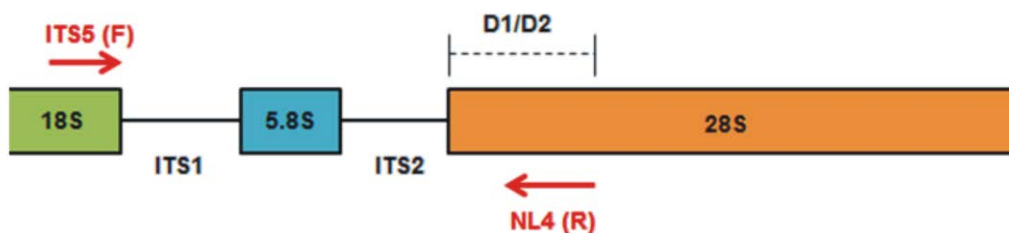


Figura 1. Região para identificação dos isolados (1000 a 1200 pb).

Análises das seqüências, alinhamento e filogenia

Cada fragmento teve as duas fitas sequenciadas pelo método de Sanger e uma seqüência consenso foi obtida para as análises subsequentes. As seqüências foram comparadas com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o auxílio da ferramenta BLAST. Em seguida, foram alinhadas e os filogramas foram construídos por meio do *software* Mega 6.0.

Resultados e Discussão

Isolamento e identificação molecular

Após a triagem com ERIC-PCR, 46 isolados tiveram a região do DNA ribossomal, ilustrada na Figura 1, sequenciada e os fungos identificados são os que constam na Tabela 2:

Tabela 2. Identificação de fungos isolados dos clones 48 e 70.

Clone	Superbrotamento de gemas vegetativas	Superbrotamento de gemas vegetativas (material seco)	Hiperplasia floral	Galhas do caule	Tecido Assintomático
48	<i>Diaporthe</i> sp., <i>Nigrospora oryzae</i> , <i>Pestalotiopsis</i>	<i>Microdochium</i> sp.	-	-	<i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Diaporthe citri</i>
70	<i>Nigrospora oryzae</i> , <i>Diaporthe</i> sp., <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>Phomopsis</i> sp.,	<i>Phomopsis</i> sp., <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>Colletotrichum thailanicum</i>	<i>Albonectria rigidiuscula</i> , <i>Diaporthe citri</i>	<i>Poitrasia circinans</i> , <i>Fusarium polyphialidicum</i>	-

A comunidade fúngica isolada inclui *Poitrasia circinans*, *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora oryzae*, *Fusarium* sp., *F. polyphialidicum*, *F. poae*, *Albonectria*

rigidiuscula, *Colletotrichum thailandicum*, *Diaporthe* sp., *D. citri*, *D. phaseolorum*, *Phomopsis* sp. e *Microdochium* sp.. Desta forma, foi possível a identificação de 9 gêneros e 8 espécies de fungos. O fato de as demais espécies do presente trabalho não terem sido identificadas pode ser justificado pela região que foi trabalhada (ITS), uma vez que para o gênero *Colletotrichum*, por exemplo, o gene *gapdh* é mais eficiente na distinção de espécies (Weir *et al.*, 2012). Assim, há a necessidade de complementação das análises com outras regiões do DNA.

Este tipo de estudo, acerca da comunidade fúngica presente nos sintomas do superbrotamento em guaranazeiro, ainda não havia sido realizado. Em guaranazeiro, fungos associados à planta saudável têm sido estudados e os gêneros mais comuns encontrados em *Paullinia cupana* var. *sorbilis* são *Guignardia*, *Phomopsis*, *Glomerella* (*Colletotrichum*) e *Xylaria*. Gêneros menos frequentemente encontrados são *Fusarium*, *Dreschrella*, *Pestalotia*, *Curvularia*, *Humicola* e *Nodulisporium* (Azevedo *et al.*, 2000).

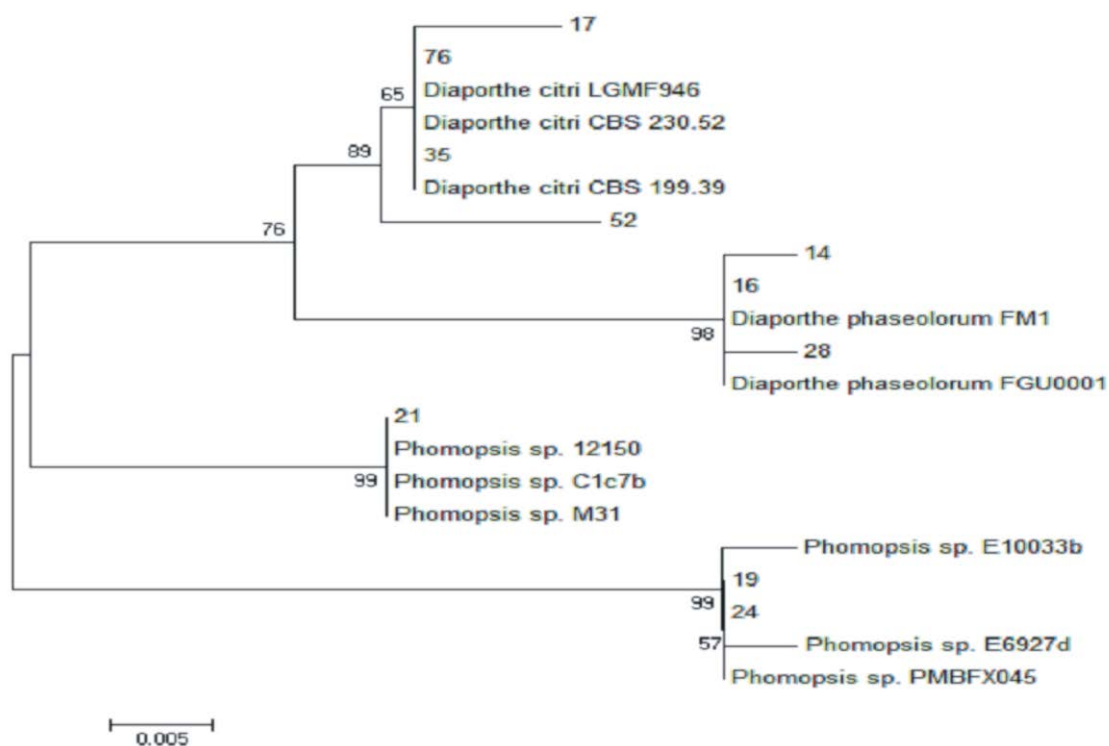


Figura 2. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança dos isolados identificados como *Phomopsis/Diaporthe*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. 14: F14, 16: F16, 17: F17, 19: F19, 21: F21, 24: F24, 28: F28, 35: F35, 52: F52, 76: F76.

No presente trabalho, fungos do gênero *Phomopsis/Diaporthe* (Figura 2) foram predominantes na identificação dos isolados e também de maior número de espécies

identificadas, seguidos por fungos dos gêneros *Fusarium/Albonectria* (Figura 3), *Nigrospora* (Figura 4), *Poitrasia* (Figura 5), *Pestalotiopsis* (Figura 6), *Colletotrichum* (Figura 7) e *Microdochium* (Figura 8).

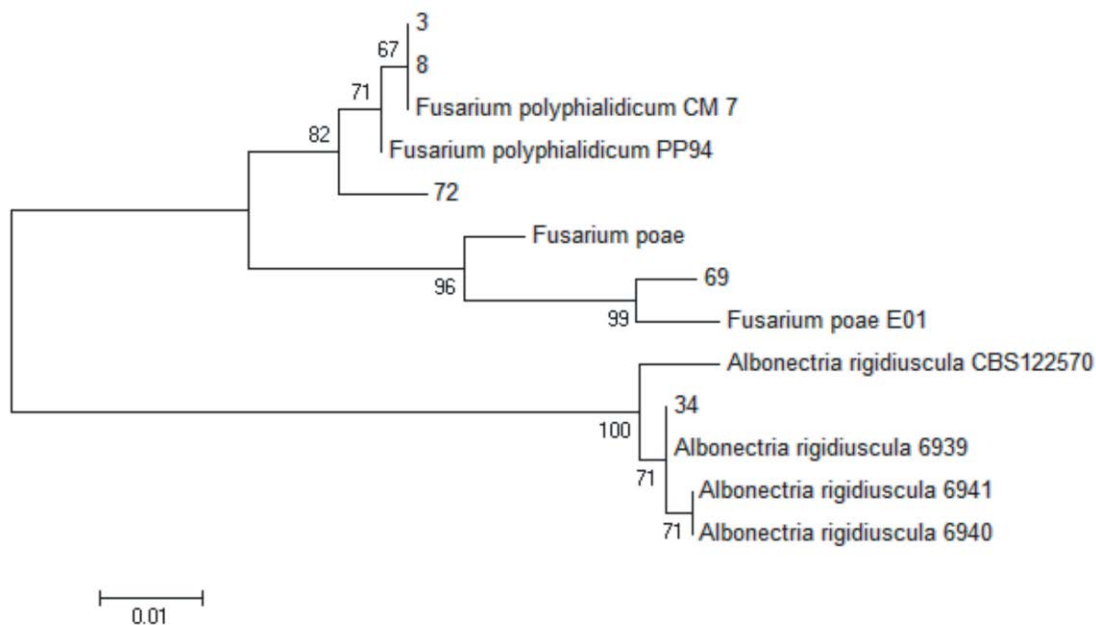


Figura 3. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança dos isolados identificados como *Fusarium/Albonectria*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **3:** F3, **8:** F8, **34:** F34, **69:** F69, **72:** F72.

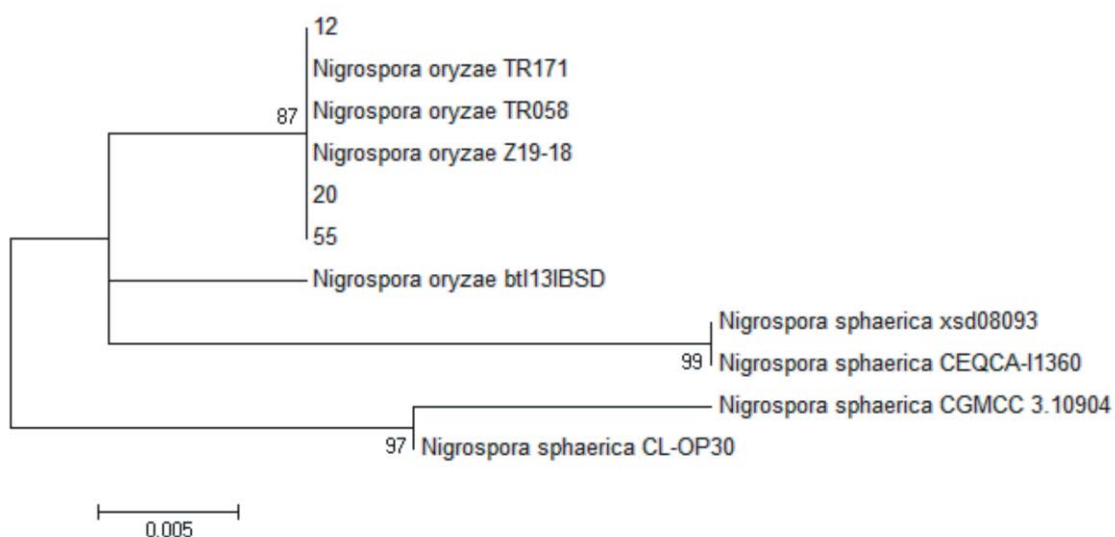


Figura 4. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança dos isolados identificados como *Nigrospora oryzae*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **12:** F12, **20:** F20, **55:** F55.

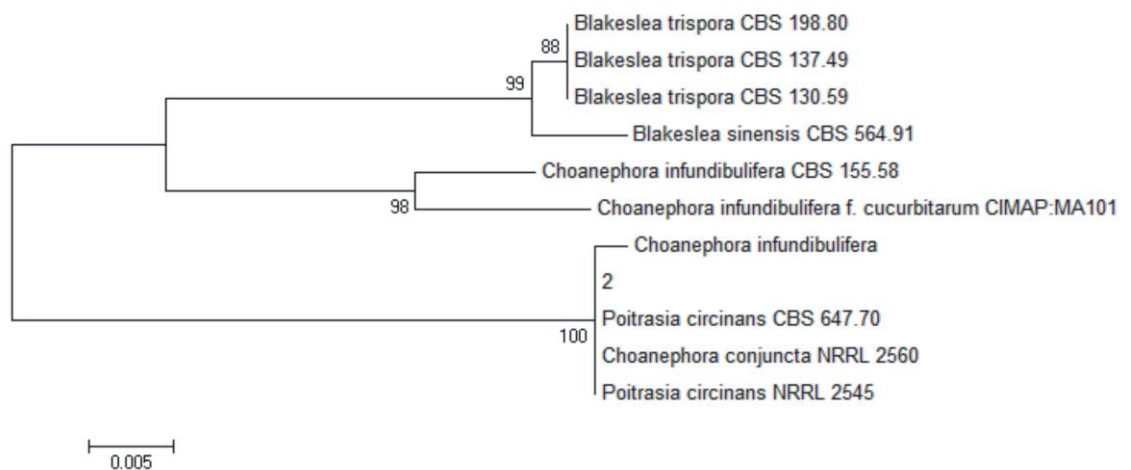


Figura 5. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança do isolado identificado como *Poitrasia circinans*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **2:** F2.

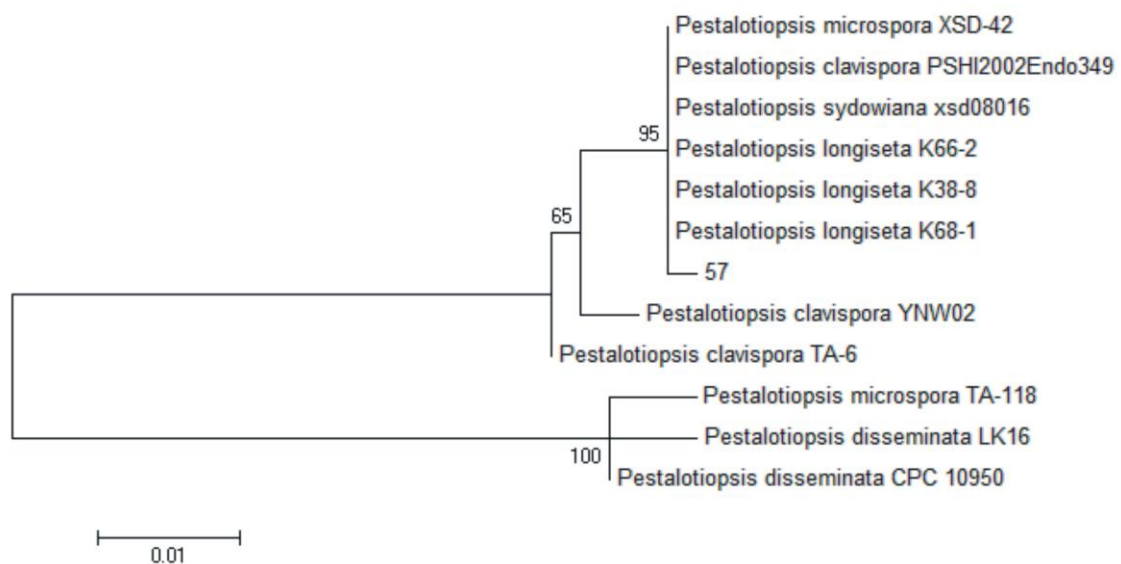


Figura 6. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança do isolado identificado como *Pestalotiopsis* sp.. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **57:** F57.

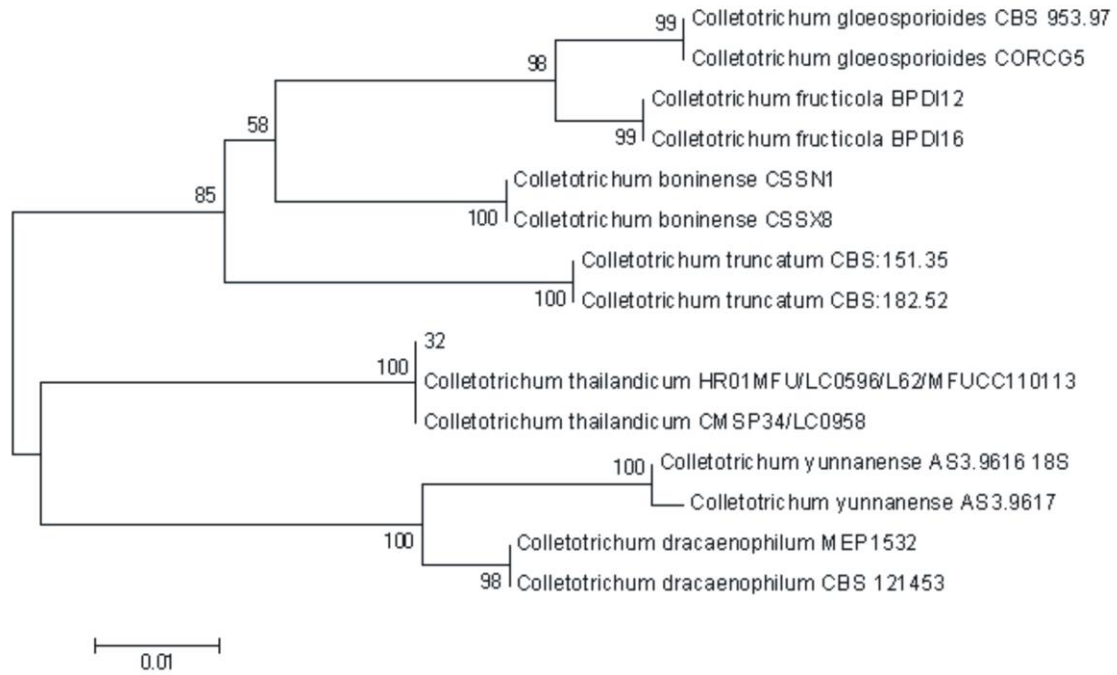


Figura 7. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança do isolado identificado como *Colletotrichum thailandicum*. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **32:** F32.

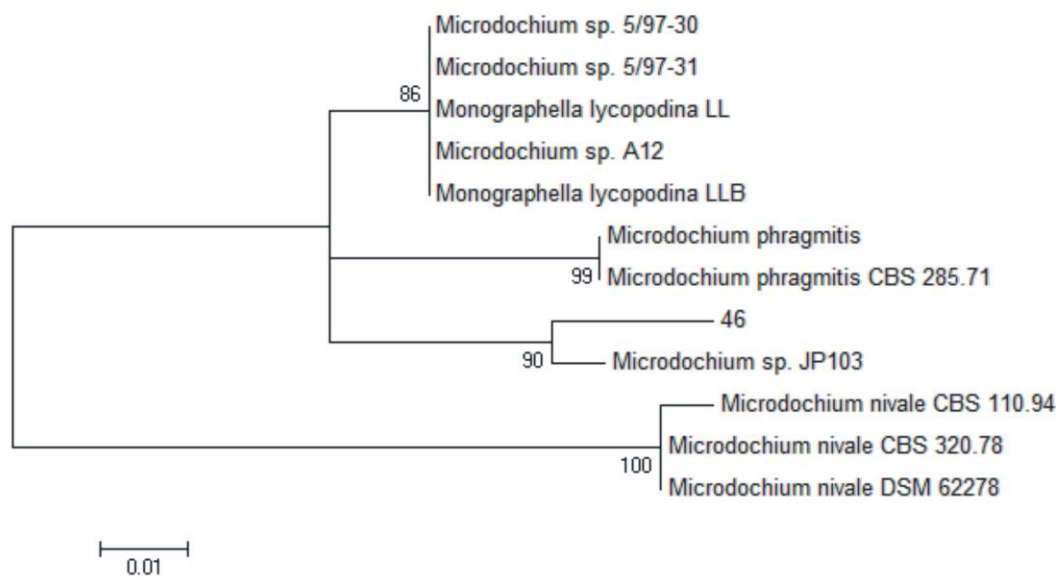


Figura 8. Análise filogenética molecular pelo método de Máxima Verossimilhança do isolado identificado como *Microdochium* sp.. *Bootstrap* mostrado próximo de cada ramo. Análises evolucionárias conduzidas no *software* MEGA 6.0. **46:** F46.

Os fungos do gênero *Diaporthe*, cuja forma assexuada é denominada *Phomopsis*, ocorrem como endófitos, sapróbios e também como patógenos de plantas

(Gomes *et al.*, 2013). Foram identificados como sendo também alguns dos endofíticos isolados dos sintomas de superbrotamento em guaranazeiro *F. polyphialidicum* e *F. poae*. *F. poae* produz, comumente, uma ou mais micotoxinas (Stenglein, 2009), interessante a estudos de antagonismo contra *F. decemcellulare*, agente causal do superbrotamento. Alguns isolados foram identificados como *N. oryzae*, do qual observou-se uma especificidade pelo sintoma superbrotamento de gemas vegetativas, uma vez que *N. oryzae* não é comum como endofítico em guaranazeiro (Azevedo *et al.*, 2000). Em todos os sintomas analisados foram obtidos isolados identificados como *F. decemcellulare* (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula*). Segundo Guimarães (2013), *F. decemcellulare* trata-se de um complexo de espécies homotáticas e heterotáticas. Guimarães (2013) observou, ainda, que os isolados heterotáticos causadores de galhas e superbrotamento em cacauzeiro e mangueira pertencem a uma espécie filogeneticamente distinta da espécie homotática, não causadora dos sintomas. Os gêneros com menos isolados identificados neste trabalho foram, além de *Colletotrichum*, os gêneros *Poitrasia*, *Microdochium* e *Pestalotiopsis*.

Conclusões

Foram observados endofíticos com potenciais para controle biológico, como *Fusarium poae* e fungos do gênero *Pestalotiopsis*.

Foi observada também a especificidade de *Nigrospora oryzae* pelo sintoma superbrotamento de gemas vegetativas, considerando que o mesmo não está sequer entre os fungos menos frequentemente isolados de guaranazeiro.

O primeiro relato de isolamento da comunidade fúngica dos sintomas de superbrotamento em guaranazeiro, portanto, apresenta informações essenciais a estudos mais aprofundados sobre estes fungos, buscando melhores estratégias para o controle do superbrotamento.

Referências

Atroch AL, Nascimento filho FJ do, Resende MDV, Lopes R, Clement CR (2010) Avaliação e seleção de progênies de meios-irmãos de guaranazeiro. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 53:123-130.

Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, Araújo WL (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 3:40-65.

Batista MF (1983) Doenças do guaranazeiro. Embrapa UEPAE – Circular Técnica 9. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/665065>.

Doyle J J, Doyle J L (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW (2013) *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 31:1-41.

Guimarães EA (2013). Biologia reprodutiva, filogenia e patogenicidade de *Fusarium decemcellulare*. Lavras, Minas Gerais, Brasil, 58 p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras).

O'Donnell K, (1993) *Fusarium* and its near relatives. *In*: Reynolds, D.R.; Taylor, J.W.(eds). The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, CAB International, Wallingford, United Kingdom, 225–233.

Stenglein SA (2009) *Fusarium Poae*: A Pathogen That Needs More Attention. *Journal of Plant Pathology* 91: 25-36.

Weir BS, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J.(eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., New York, USA, 315-322.

Variáveis que influenciam a produção de biomassa de actinomicetos

Marinho N.M.V.¹, Fonseca T.R.B.¹, Palheta R.A.¹, Souza B.C.¹, Ebinuma V.C.S.², Teixeira M.F.S.¹.

¹ Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Av. Gal. Rodrigo O. Jordão Ramos, 3000,

² Universidade Estadual de São Paulo, Rodovia Araraquara-Jaú/km 01 CEP 14801-902 - Araraquara - SP/Brasil. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

Resumo

Os actinomicetos, bactérias filamentosas, Gram positivas, assim como os demais microorganismos sofrem influência de diferentes fatores no seu crescimento micelial como constituição do meio de cultura e fatores físicos. A composição do meio de cultura, juntamente com a capacidade metabólica do organismo afeta a síntese de metabólitos e o crescimento celular que está diretamente relacionado com a formação da biomassa durante o crescimento. O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência da velocidade de agitação e temperatura, além dos efeitos da variação de concentração da fonte de carbono e nitrogênio, na produção da biomassa micelial de actinomicetos. Para a realização dos ensaios utilizou-se um planejamento fatorial 2^4 com variação dos fatores independentes. Os resultados demonstram uma maior significância da interação entre a velocidade de agitação e a temperatura, seguido da concentração do filtrado de soja influenciado positivamente na produção de biomassa. A otimização das condições de cultivo são de extrema importância para resultados satisfatórios de produção, seja de biomassa ou de metabólitos.

Palavras-chave: Bactérias filamentosas, Planejamento Fatorial; Agitação; Temperatura.

Introdução

Os actinomicetos constituem um grupo extremamente diverso, são bactérias Gram-positivas, classificadas na ordem Actinomycetales, aeróbias e com crescimento semelhante ao de fungos filamentosos. Em outros membros da ordem, os filamentos se fragmentam e conseqüentemente só podem ser observados em algum estágio do ciclo de crescimento.

Apresentam ampla distribuição no ecossistema, sendo encontrados predominantemente no solo, entretanto, podem também estar presentes em ambientes aquáticos e em associação com líquens e plantas (Batista *et al.*, 2010; Silva-Vinhote *et al.*, 2011).

Destacam-se por apresentar um papel importante na ecologia, atuando na ciclagem de nutriente, fixação de nitrogênio, além de serem produtores metabólitos secundários extremamente diversos como antibióticos, vitaminas e enzimas (Silva-Vinhote *et al.*, 2011).

Dentre os metabólitos secundários os actinomicetos destacam-se principalmente pela produção de uma grande diversidade de antibióticos (Rincón-Enríquez *et al.*, 2014). Estima-se que a ordem produza em torno de 3.000 antibióticos, sendo 90% pelo gênero *Streptomyces*. Este o único gênero microbiano capaz de produzir todos os grupos de antibióticos: aminoglicosídeos, macrolídeos, ansamacrolídeos, β -lactâmicos, peptídeos, glicopeptídeos, antraciclinas, tetraciclina, nucleosídeos, polienos e quinonas (Nascimento *et al.*, 2010, Carvalho, 2011, Nascimento *et al.*, 2014).

A constituição do meio de cultura, juntamente com a capacidade metabólica do organismo, afeta a síntese de metabólitos e o crescimento celular que está diretamente relacionado com a formação da biomassa durante o crescimento. Fontes nutricionais como carbono, nitrogênio e fatores ambientais como tempo, temperatura e pH têm uma profunda influência. A temperatura é um dos principais fatores ambientais que afetam o crescimento de muitos micro-organismos (Sales-Campos e Andrade, 2010; Antunes *et al.*, 2013).

Os estudos da interação das fontes de carbono e nitrogênio são importantes na medida em que estes compostos apresentam uma complexidade estrutural e são fontes utilizadas para um bom desempenho metabólico. O efeito da interação das diferentes concentrações e de fontes de carbono e nitrogênio pode ser um fator importante para promover melhoria na eficiência fermentativa e melhorar a produção dos metabólitos (Santos *et al.*, 2014).

O objetivo deste estudo foi a avaliar a interferência da velocidade de agitação e temperatura, além dos efeitos da variação de concentração da fonte de carbono e nitrogênio na produção da biomassa micelial de actinomicetos.

Material e métodos

Este experimento foi realizado no laboratório de Micologia do Departamento de Parasitologia/Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

Meios de esporulação e manutenção dos micro-organismos

O micro-organismo (*Streptomyces* sp. DPUA 1549) preservado pelo método

Castellani foi reativado em meio ágar ISP-2A (amido 1%, extrato de levedura 0,4%, extrato de malte 1%, dextrose 0,4%, ágar 2%), pH 7,3 em placa de Petri por 10 dias a 25 °C até esporulação do mesmo, com manutenção da cultura a cada 30 dias.

Fermentação Submersa

Em frascos de vidro com capacidade de 125 mL foram distribuídos 50 mL de cada meio de cultura e em seguida levados à autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização e o crescimento do micro-organismo retirou-se 10 discos de 0,8 cm de diâmetro e inoculou-se no meio de fermentação selecionado, MPE, composto por cloreto de sódio (NaCl) 0,5%, carbonato de cálcio (CaCO₃) 0,2%, glicose e farelo de soja com variação das suas concentração de acordo com o planejamento fatorial. As inoculações foram feitas assepticamente em Câmara de Fluxo Laminar Contínuo.

Ao término do terceiro dia de fermentação realizou-se a filtração em papel de filtro Whatmann nº 1 da biomassa micelial com o auxílio de uma bomba à vácuo. A biomassa retida no filtro foi levada à estufa a 105 °C até a obtenção de peso constante. A biomassa seca ou o peso seco foi determinado pela diferença entre o peso total e o peso do papel de filtro.

Planejamento fatorial para o crescimento micelial

Os estudos de produção foram realizados baseados em um planejamento experimental. Inicialmente foram avaliados fatores como diferentes concentrações de fontes de nitrogênio e de carbono, agitação e temperatura utilizando um planejamento completo 2⁴ com 4 pontos centrais (Tabela 1). Após os experimentos foram realizadas as análises estatísticas dos resultados (biomassa), com o auxílio do software Statistica 10.0 e Minitab 16.

Tabela 1. Níveis dos fatores estudados no planejamento fatorial completo 2⁴ para o crescimento micelial e produção de antibióticos por *Streptomyces* sp. DPUA 1549.

Fatores	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Concentração de glicose (%)	1	2	3
Concentração de filtrado de soja (%)	1	2	3
Temperatura (°C)	25	30	35
Agitação (rpm)	150	180	210

Resultados e discussão

Para avaliar o efeito de diferentes variáveis (velocidade de agitação, temperatura, concentração de glicose e concentração do filtrado de soja) no crescimento microbiano do *Streptomyces* sp. DPUA 1549 empregou-se um planejamento fatorial completo 2^4 (Tabela 2), constituindo 20 ensaios. A análise de variância (ANOVA) mostrou que as variáveis independentes, concentração de filtrado de soja, temperatura e velocidade de agitação e a interação entre as variáveis temperatura e velocidade foram significativas ao processo para um intervalo de confiança de 95%. O planejamento apresentou falta de ajuste não significativa, o que demonstra a boa interação entre os resultados previstos e obtidos experimentalmente. A partir das análises dos resultados pôde-se observar que o R^2 apresentou resultado significativo.

Tabela 2. Planejamento fatorial para avaliação do crescimento micelial de *Streptomyces* sp. DPUA 1549.

Standard Run	Design: 2**(4-0) design				
	Concentração de glicose (%)	Concentração de filtrado de soja (%)	Temperatura (°C)	Velocidade de agitação	Biomassa (g)
1	1	1	25	150	3,843
2	1	1	25	210	3,400
3	1	1	35	150	3,363
4	1	1	35	210	4,574
5	1	3	25	150	5,592
6	1	3	25	210	5,065
7	1	3	35	150	2,361
8	1	3	35	210	5,934
9	3	1	25	150	5,547
10	3	1	25	210	2,581
11	3	1	35	150	1,342
12	3	1	35	210	4,534
13	3	3	25	150	5,873
14	3	3	25	210	5,485
15	3	3	35	150	2,410
16	3	3	35	210	4,158
17 (C)	2	2	30	180	4,805
18 (C)	2	2	30	180	5,172
19 (C)	2	2	30	180	5,006
20 (C)	2	2	30	180	4,113

De acordo com o gráfico de Pareto, a interação entre as variáveis apresentou o efeito mais significativo, no nível positivo. A temperatura como variável sozinha apresentou um

efeito negativo, o que indica que trabalhar com esta variável no nível inferior (25 °C) promoverá resultados superiores. Por outro lado, a concentração de filtrado de soja apresentou efeito positivo e trabalhar com uma maior concentração (> 3%) deste substrato gerará melhores resultados. Como a interação entre temperatura e velocidade de agitação apresentou efeito positivo e a variável independente temperatura sozinha efeito negativo, trabalhar com a velocidade de agitação no nível inferior (150 rpm) acarretaria em resultados mais promissores.

Fatores como velocidade de agitação, concentração de glicose e as demais interações não apresentaram resultados significativos para a produção da biomassa micelial.

A Tabela de análise de variância (ANOVA) mostrou que a interação entre as variáveis temperatura e velocidade de agitação (3by4) foram significativas ao processo para um intervalo de confiança de 95%. De acordo com o gráfico de Pareto (Gráfico 1), a interação entre as variáveis apresentou o efeito mais significativo, no nível positivo, logo este fator influencia diretamente no crescimento micelial de *Streptomyces* sp. DPUA 1549.

A temperatura como variável sozinha apresentou um efeito negativo, o que indica que trabalhar com esta variável no nível inferior promoverá resultados superiores. Por outro lado, a concentração de filtrado de soja apresentou efeito positivo e trabalhar com uma maior concentração deste substrato pode gerar melhores resultados. Como a interação entre temperatura e velocidade de agitação apresentou efeito positivo e a variável independente temperatura sozinha efeito negativo, trabalhar com a velocidade de agitação no nível inferior ocasionaria resultados mais promissores.

Os parâmetros da fermentação tais como tempo, agitação, temperatura, pH e vitaminas, fontes de carbono e de nitrogênio podem ser determinantes no controle do processo, por isso é necessário um conhecimento da fisiologia microbiana e do comportamento celular do micro-organismo.

Corroborando com os dados obtidos para o *Streptomyces* sp. DPUA 1549, o gênero *Streptomyces* apresenta um maior crescimento micelial quando se tem uma maior concentração de filtrado de soja, 4% e uma baixa concentração de glicose 1% (NASCIMENTO et. al, 2009). As fontes de nitrogênio também proporcionaram um melhor crescimento em *Penicillium citrinum*, sendo o farelo de soja o segundo melhor substrato (TAVARES et. al, 1998). No trabalho de Tavares et. al (1998) verificou-se também que o uso de temperaturas em torno de 25 °C favorecem a maior produção de biomassa.

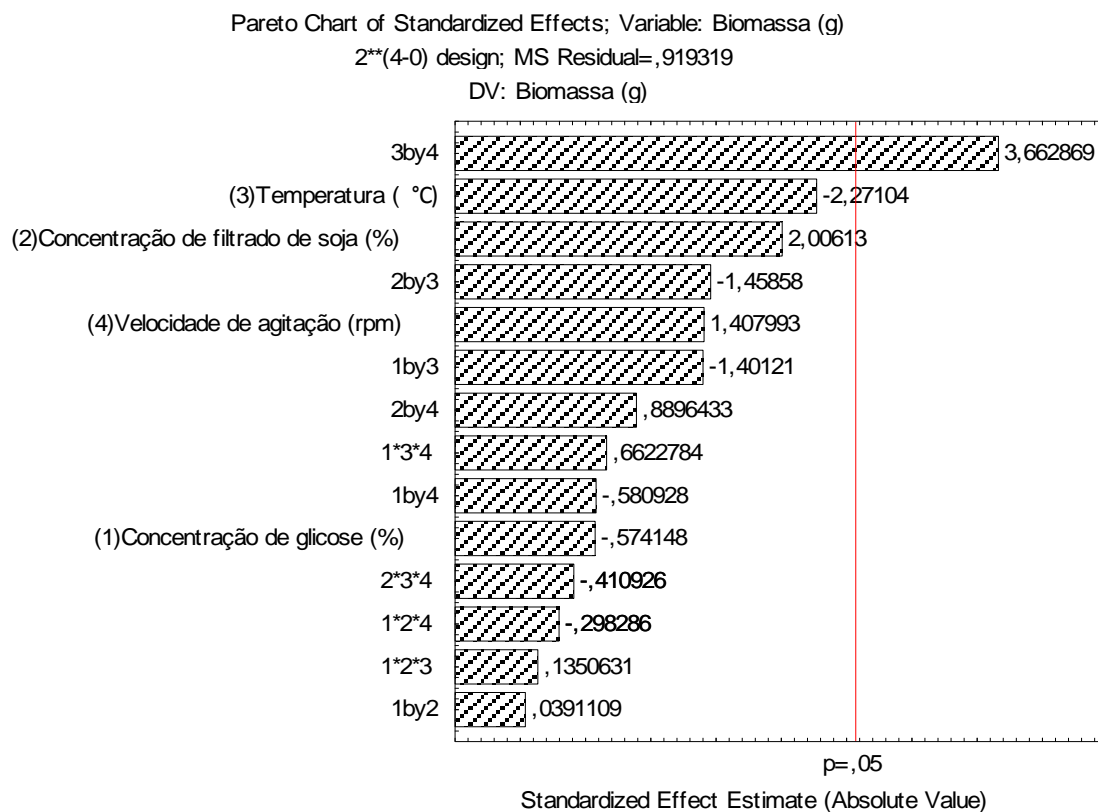


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis, tendo como variável resposta a produção de biomassa de *Streptomyces* sp. DPUA 1549.

Conclusão

As interações físicas, agitação e temperatura apresentaram uma maior significância na produção de biomassa micelial do *Streptomyces* sp. DPUA 1549 quando comparado aos outros fatores avaliados, entretanto para otimização das condições é necessário a realização de mais estudos.

Referências

Antunes, TC, Salamoni SP, Frazzon APG, Germani JG, Van Der Sand ST (2013) Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. Ver. Bras. Bioc., 11, 2, 131-138.

Batista WB, Nobre SAM, Nobre PB, Fernandes BHA, Gomes HAR, Aguiar RM, Melo GA, Pereira GVN (2010) Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. Unimontes Científica, v. 12, n. 1/2, p. 60-69.

Carvalho TS (2011). Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 26 fls.

Nascimento RP (2006) Estudo da produção de endoxilanas por *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 Utilizando resíduos agro-industriais. Tese de doutorado: Doutor em Ciências (Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 164 fls.

Nascimento TP, Porto TS, Porto ALF (2009) Efeito da fonte de carbono e de nitrogênio na produção de metabólitos antimicrobianos por *Streptomyces* sp. IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão, 2009. Recife. <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0833-1.pdf>>.

Nascimento TP, Porto CS, Teixeira MFS, Porto TS, Porto ALF (2014) Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. ante isolados de mastite caprina. Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot, 66(1):101-108.

Rincón-Enríquez G, López-Pérez L, Quiñones-Aguiar EE (2014) Efectividad biológica *in vitro* de actinomicetos sobre el agente causal del tizón de halo en frijol. Revista Fitotecnia Mexicana, 37(3):229-234.

Sales-Campos C, Minhoni MTA, Andrade MCN (2010) Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. Interciencia, Caracas, 35(3):198-201.

Santos EFS, Schautz CA, Cardoso CAL, Ernandes JR, Batistote MO (2014) Efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. Ciência e Natura, 35(2):9-14.

Silva-Vinhote NM, Pereira TM, Astolfi Filho S, Matsuura T (2011) Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems. Australian Journal of Basic e Applied Sciences, 5(5): 910-918.

Tavares VB, Sivieri K, Ceron CR, Silva R e Trabuço e (1998) Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. Química Nova, 21, 6.

Diagnóstico molecular por PCR-RFLP e gene *LYS2* para identificação de *Fusarium decemcellulare*

Matos K.S.¹, Hanada R.E.¹, Silva G.F.²

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Fitopatologia, 69080-971, Manaus, AM, Brasil. ²Embrapa Amazônia Ocidental, Laboratório de Biologia Molecular, 69010-970, Manaus, AM, Brasil. E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

Fusarium decemcellulare é encontrado como agente causal de doenças com diferentes sintomas em diversas espécies de plantas em regiões tropicais e subtropicais. Em guaranazeiro, espécie nativa da Amazônia de importância econômica e social, a doença denominada de complexo superbrotamento é atualmente um dos principais problemas da cultura. Técnicas moleculares são cada vez mais requeridas para identificação rápida e segura de patógenos como complemento as técnicas convencionais. O objetivo do trabalho foi desenvolver métodos moleculares por PCR e PCR-RFLP para rápida identificação de *F. decemcellulare*. O desenvolvimento do método baseado em PCR-RFLP foi realizado com base em 42 sequências do rDNA (18S, ITS1, ITS2, 5.8S e 28S) de 26 espécies do gênero *Fusarium* e identificado perfil de clivagem específico para Fdc com a enzima *HaeIII*. O diagnóstico baseado em PCR foi feito com base em sequências do gene *lys2* de 26 espécies do gênero *Fusarium* foram analisadas e *primers* específicos foram desenvolvidos para *Fdc*, denominados de Fdc Lys2 399F e Fdc Lys2 R, e Fdc Lys2 654F e Fdc Lys2 832R. Ambos os métodos mostraram-se eficientes para diagnóstico de *Fusarium decemcellulare*.

Palavras-chave: superbrotamento, hiperplasia floral, galhas, *Paullinia cupana*, marcador molecular.

Introdução

Fusarium decemcellulare Brick (teleomorfo *Albonectia rigidiuscula*) é encontrado como agente causal de doenças em mais de 80 espécies de plantas em

regiões tropicais e subtropicais (Farr e Rossman, 2016). No Brasil, culturas economicamente importantes como mangueira, cacaueiro, seringueira e guaranazeiro são afetadas pelo patógeno. Em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.), espécie nativa de importância econômica e social da Amazônia, a doença é caracterizada por diferentes sintomas, como hiperplasia floral, superbrotamento das gemas vegetativas e galhas no caule. A doença denominada de complexo superbrotamento é atualmente um dos principais problemas da cultura (Atroch, 2002).

A identificação de *F. decemcellulare* (Fdc) é comumente realizada por caracteres morfológicos, em que muitas vezes pode ser complicada e demorada, devido à plasticidade das características morfológicas e das condições a serem testadas. O uso de técnicas moleculares é cada vez mais requerido para identificação rápida e segura de patógenos. Nas últimas décadas várias técnicas e marcadores moleculares têm sido desenvolvidos contribuindo para a identificação e diferenciação de espécies em *Fusarium*, dentre eles PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) baseada em padrões de restrição com o uso de enzimas selecionadas com base em sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisado (Lee *et al.*, 2000; Bogale *et al.*, 2007) e o gene *lys2 Aminoacidipato reductase*, específico em fungos e importante para a biossíntese da lisina foi indicado como um possível marcador genético para identificação de isolados do gênero *Fusarium* (Watanabe *et al.*, 2011a; 2011b).

O objetivo do trabalho foi desenvolver métodos moleculares baseados em ITS PCR-RFPL e via amplificação do gene *lys2* para rápida identificação de *Fusarium decemcellulare*.

Material e métodos

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular na Embrapa Amazônia Ocidental em Manaus, AM.

O desenvolvimento da técnica baseada em PCR-RFLP foi realizada com base em 42 sequências do rDNA (18S, ITS1, ITS2, 5.8S e 28S) de 26 espécies do gênero *Fusarium* obtidas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): *F. acuminatum*, *F. armeniacum*, *F. asiaticum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. decemcellulare*, *F. dimerum*, *F. dimerum* var. *violaceum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. kyushuense*, *F. langsethiae*, *F. lateritium*, *F. nurragi*, *F. oxysporum* f.

sp. raphani, *F. oxysporum* f. *sp. rapae*, *F. poae*, *F. phyllophilum*, *F. solani*, *F. solani* f. *sp. mori*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *Gibberella moniliformis*, *G. intermedia* e *G. zaeae*. O alinhamento das sequências foi realizado usando o programa MUSCLE e sítios de restrição foram identificados usando a ferramenta *Search (Find motif)* no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). O método foi validado usando isolados monospóricos previamente identificados como *F. decemcellulare* de guaranazeiro e como controle *Fusarium solani* f. *sp. piperis* e *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense*. O DNA dos isolados foi extraído usando o método CTAB de Doyle e Doyle (1987). A amplificação foi realizada usando os *primers* ITS5 (White *et al.*, 1990) e NL4 (O'Donnell, 1993) com posterior clivagem com a enzima *HaeIII* (sítio de restrição GGCC) a 37 °C por 3 horas. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 2%.

Primers específicos para o Fdc com base no gene *lys2* foi realizado com base em 40 sequências de 26 espécies do gênero *Fusarium* (mesmas espécies da metodologia anterior), incluindo duas sequências de *F. decemcellulare* utilizadas por Watanabe *et al.*, (2011b) (AB586966 e AB586967) foram obtidas no banco de dados do NCBI e alinhadas no programa MEGA 6.0. Por meio da análise da homologia das sequências e da presença de dois íntrons encontrados somente nas sequências de *F. decemcellulare*, pares de *primers* específicos foram desenvolvidos para a amplificação da região conservada do gene *lys2* denominados de Fdc *lys2* 399F (5'-GTGCAGCTTCTTGTCATTG-3') e Fdc *lys2* 639R (5'-TCTCGCTCCTAAAGGCCGTATAC-3'), e Fdc *lys2* 654F (5'-CATCAGTGGCTAACAGACA G-3') e Fdc *lys2* 832R (5'-GCTGTCAATATCATTGAGCTC-3') (Figura 1).

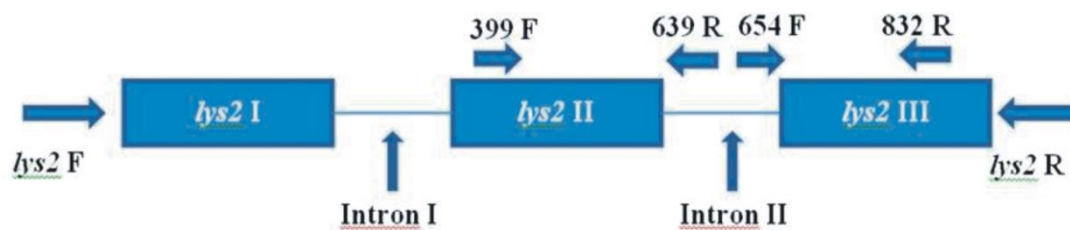


Figura 1 Esquema estrutural (éxons e íntrons) da região conservada do gene *lys2* em *F. decemcellulare*. *Primers* (F - forward e R - reverse) foram desenvolvidos a partir do íntron II localizado apenas em *F. decemcellulare*.

A reação da PCR foi realizada com um volume final de 25 µl contendo 1µL de DNA de *F. decemcellulare*, 1µL de cada *primer*, 2,5 µL de tampão, 1,0 µL de dNTPs, 1,5 µL de MgCl₂ e 0,2 µL de Taq DNA. Na amplificação, a desnaturação inicial foi de 94 °C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final de 72 °C por 1 minuto. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 2%.

Resultados e discussão

Nas análises de polimorfismo, a perda do primeiro sítio de restrição localizado na região ITS 1 ocorreu devido a inserção de cinco nucleotídeos (GCTCG) entre as duas citosinas (Figura 2) que gerou um fragmento de restrição ~500pb em *F. decemcellulare* (*A. rigidiuscula* e *Albonectria albosuccinea*) e fragmentos menores nas outras espécies de *Fusarium* que possuem pelo menos cinco sítios de restrição (Figura 3).

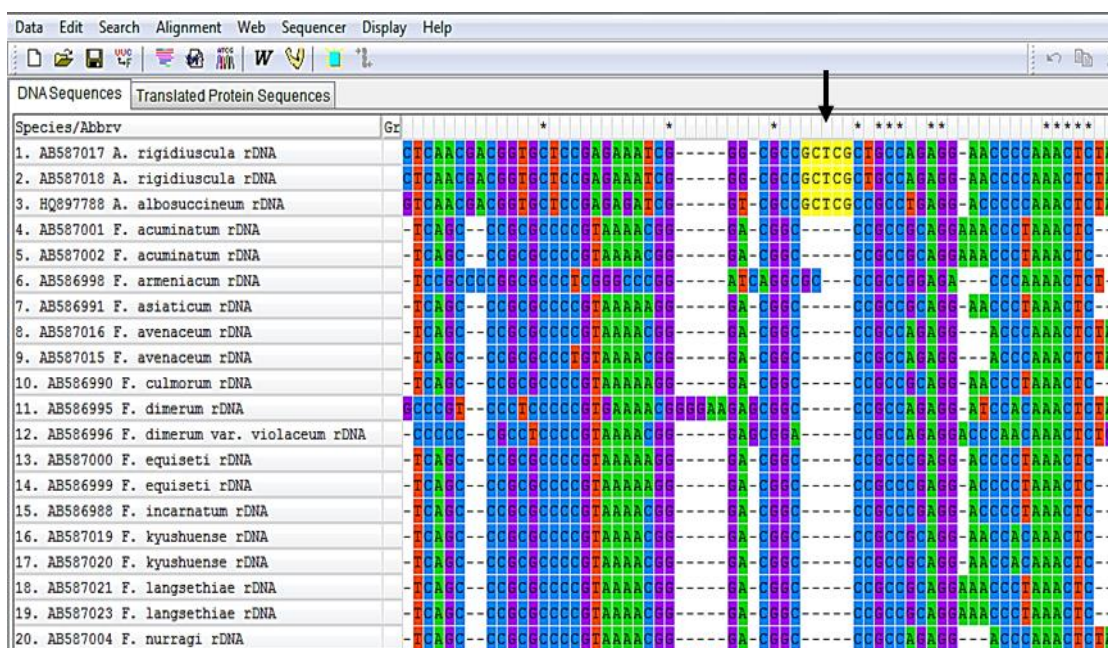


Figura 2 Alinhamento das sequencias da região rDNA (18S, ITS1,ITS2, 5.8S e 28S) das espécies do gênero *Fusarium*. Na região ITS 1 ocorre a inserção de cinco nucleotídeos (GCTCG) entre duas citosinas (seta) em *Fusarium decemcellulare* (fase sexuada: *Albonectria rigidiuscula* e *A. albosuccineum*).

A digestão do produto ITS com diferentes enzimas de restrição revelou perfis diferentes entre *F. decemcellulare* e a espécie controle, possibilitando a diferenciação inter e intra-específica. Análise *in silico* com *HaeIII* permite diferenciar 24 das 26

espécies de *Fusarium* analisadas neste trabalho. O método de PCR-RFLP foi validado utilizando isolados de *F. decemcellulare* de guaranazeiro e como controle *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *F. solani* f. sp. *piperis* o que permitiu separar as espécies podendo ser observado o padrão de bandas geradas após clivagem com a enzima *HaeIII* em gel de agarose a 2% (Figura 3).

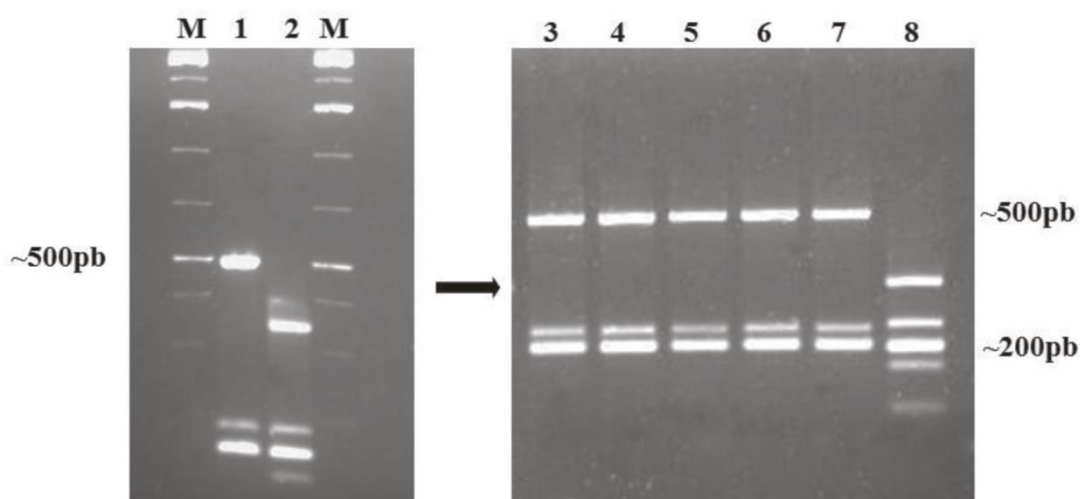


Figura 3 PCR-RFLP clivagem com a enzima *HaeIII* em gel de agarose (2%). M representa o marcador 1kb plus (invitrogen). Números 1, 3-7 representam isolados de *Fusarium decemcellulare*, 2 - *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e 8 - *F. solani* f. sp. *piperis*.

As análises de PCR-RFLP baseiam em tamanho de fragmentos gerados por amostras de DNA após clivagem com enzimas de restrição e são comparadas entre número e tamanho de fragmentos que surgem após a digestão do DNA (Marques *et al.*, 2002). As relações genéticas de 12 espécies de *Fusarium* foram investigadas usando a região ITS e PCR-RFLP com sete enzimas de restrição e cinco grupos foram encontrados de acordo com o polimorfismo observado entre as espécies analisadas (Lee *et al.*, 2000). A técnica de PCR-RFLP proporcionou um diagnóstico simples e barato para a identificação de *Fusarium redolens* e membros de três clados de *F. oxysporum* (Bogale *et al.*, 2007).

Validação do diagnóstico para Fdc baseado no gene *lys2* foi confirmado tanto em gel por meio da amplificação do fragmento do tamanho esperado (~260pb), quanto por meio do sequenciamento do amplicon. Das diferentes combinações de *primers* desenvolvidas neste trabalho os *primers* Fdc *lys2* 399F e 639R foram selecionados como os *primers* mais eficientes (Figura 4).

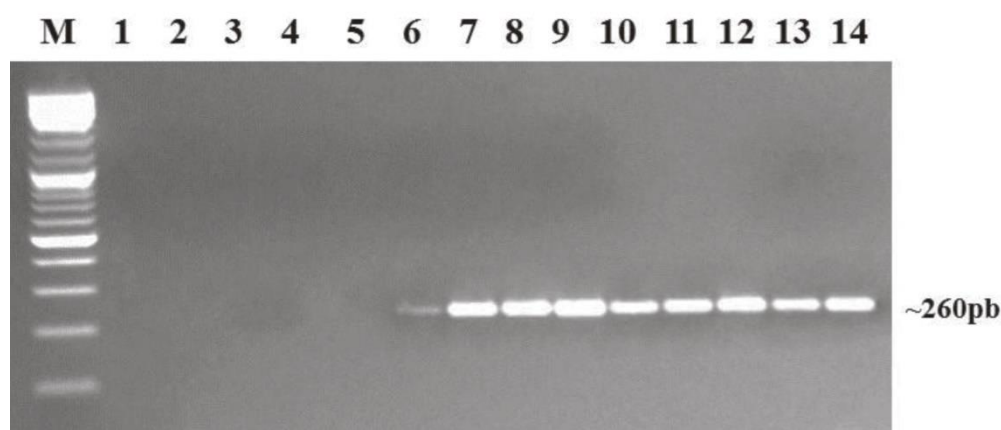


Figura 4 Identificação de *Fusarium decemcellulare* com base na amplificação do gene *lys2* usando os *primers* Fdc 399R e Fdc 639R. M - representa o marcador 1kb plus (invitrogen). Números de 1 a 5 representam diferentes fungos filamentosos isolados de guaranazeiro, e 6 a 14 representam isolados de *F. decemcellulare*.

O gene *lys2* é específico em fungos e está relacionado com a síntese da lisina. Resultados indicam que esse gene foi submetido à seleção positiva dentro do gênero *Fusarium*. Estudo avaliou seis marcadores genéticos para identificar isolados de diferentes espécies do gênero *Fusarium* e o gene *lys2* apesar de não ser considerado um bom marcador para análise filogenética em *Fusarium*, devido a possível transferência horizontal (Watanabe *et al.*, 2011a; 2011b), neste trabalho mostrou-se um interessante marcador para identificação de Fdc, devido a ocorrência de um íntron presente apenas nessa espécie.

As técnicas de diagnóstico molecular têm sido utilizadas na taxonomia de microrganismos e aplicadas também em programas de melhoramento genético. Elas permitem avaliar a variabilidade em nível de DNA e identificar diferenças entre isolados e espécies (Marques *et al.*, 2002). O uso de ferramentas moleculares para a identificação de fungos apresenta diversas vantagens como, alta sensibilidade, especificidade e rapidez, e pode ser um diagnóstico mais rápido do que por métodos convencionais. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo os marcadores moleculares PCR-RFLP e gene *lys2* podem ser utilizados para diagnóstico rápido e seguro de *F. decemcellulare* como complemento a identificação convencional.

Conclusão

Os métodos moleculares desenvolvidos no estudo, PCR-RFLP e amplificação da região correspondente ao íntron II do gene *lys2*, foram eficientes para a identificação de *Fusarium decemcellulare*.

Referências

Atroch AL (2002) Aspectos gerais da cultura do guaraná. *Foods and Food Ingredients. J Jpn* 204:53-59.

Bogale M, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET (2007) Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol Lett* 271:27-32.

Doyle JJ, Doyle JL, Hortorium LHB (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Farr DF, Rossman AY. (2016). Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>. Acessado em 12 Jan 2016.

Lee Y, Yong C, Byung M (2000) PCR-RFLP and Sequence Analysis of the rDNA ITS Region in the *Fusarium* spp. *J Microbiol* 38:66-73.

Marques EK, Ikuta N, Lunge VR, Fonseca ASK (2002) Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: Serafini, A.M., Barros, N.M., Azevedo, J.L. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agropecuária, Caxias do Sul, 101-130.

O'Donnell K (1993) *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D.R., Taylor, J.W. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic. Wallingford, CAB International, 225-233.

Rossman AY, Samuels GJ, Rogerson CT, Lowen R (1999) Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, *Ascomycetes*). *Stud Mycol* 42:134-137.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.

Watanabe M, Yonezawa T, Lee K, Kumagai S, Sugita H, Gotod K, Hara Y (2011a) Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. *J Sci Food Agric* 91:2500-2504.

Watanabe M, Yonezawa T, Lee K, Kumagai S, Sugita Y, Goto K, Hara Y (2011b) Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology* 11:322.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: PCR protocols: A guide to methods and application, Academic Press, 315-322.

Avaliação de metodologias de preservação para manutenção de microrganismos do Filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA

Oliveira L.A.¹, Cortez A.C.A.², Souza J.V.B.³

¹. INPA (airesluciana01@gmail.com); ². PPG-BIONORTE (accortez@inpa.gov.br); ³. INPA (joão.souza@inpa.gov.br)

Resumo

Os fungos têm grande importância na microbiologia, pois atuam como agentes das infecções conhecidas como micoses que acometem todos os seres vivos. Para a medicina e a indústria estes são de suma importância devido à produção de metabólitos, para o desenvolvimento e produção de medicamentos, drogas, fermentos, corantes e conservantes, e atuam também como agentes de controle biológico. O Filo Ascomycota compreende inúmeros gêneros de fungos. Entre eles estão os gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp e *Cladosporium* sp, alvos deste estudo. São encontrados na poeira e no ar e desempenham papel importante na patologia médica, como elementos alergizantes. Assim, muitas asma ditas “de clima” estão na dependência ou em relação íntima com a flora micótica do ar. O gênero *Candida* compreende leveduras que possuem um habitat bastante amplo. No homem, essa levedura habita a mucosa digestiva e a mucosa vaginal. A infecção pode atingir mucosas, tecido cutâneo e em alguns casos pode ser sistêmica. A grande diversidade genética do Reino Fungi torna relevante a conservação de suas culturas em coleções de laboratórios de microrganismos. A manutenção dos microrganismos por longos períodos é de vital importância para a utilização destes em pesquisas e na indústria. Por isso, técnicas de conservação foram desenvolvidas sendo todas alternativas plausíveis para a manutenção fúngica, embora os resultados sejam variados. Os métodos usualmente empregados em laboratórios de coleção para a manutenção de microrganismos são repique contínuo, água destilada esterilizada, liofilização, sílica gel, e os que foram avaliados neste trabalho que são óleo mineral, criopreservação a -70°C e refrigeração a 5°C. O presente trabalho consistiu em investigar qual metodologia é mais adequada para a manutenção

de microrganismos do filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* incorporados à coleção de microrganismos de interesse médico do INPA no período de janeiro de 2007 a fevereiro de 2010 que vinham sendo mantidos sob óleo mineral e repique contínuo. Da Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA, foram selecionadas 223 amostras de *Candida* sp e 250 amostras de fungos do Filo Ascomycota. Estas foram reativadas em Agar Sabouraud e submetidas aos métodos de preservação. A cada 90 dias durante 180 dias as culturas foram avaliadas quanto a sua viabilidade. As três metodologias avaliadas apresentaram resultados satisfatórios tanto para os microrganismos do Filo Ascomycota como para as leveduras do gênero *Candida*.

Palavras-chave: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*.

Introdução

Os fungos têm grande importância na microbiologia, pois atuam como agentes das infecções conhecidas como micoses que acometem todos os seres vivos (Lacaz *et al.*, 2002). Para a medicina e a indústria estes são de suma importância devido à produção de metabólitos, para o desenvolvimento e produção de medicamentos, drogas, fermentos, corantes e conservantes (Rocha *et al.*, 2009). O Filo Ascomycota compreende inúmeros gêneros de fungos. Entre eles estão os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*, alvos deste estudo. São encontrados na poeira e no ar e desempenham papel importante na patologia médica, como elementos alergizantes. O gênero *Candida* compreende leveduras que possuem um habitat bastante amplo. No homem, essa levedura habita a mucosa digestiva e a mucosa vaginal. A infecção pode atingir mucosas, tecido cutâneo e em alguns casos pode ser sistêmica. A grande diversidade genética do Reino Fungi torna relevante a conservação de suas culturas em coleções de laboratórios de microrganismos. A manutenção dos microrganismos por longos períodos é de vital importância para a utilização destes em pesquisas e na indústria. Por isso, técnicas de conservação foram desenvolvidas sendo todas alternativas plausíveis para a manutenção fúngica, embora os resultados sejam variados. Os métodos usualmente empregados em laboratórios de coleção para a manutenção de microrganismos são repique contínuo, água destilada esterilizada, liofilização, sílica gel, e os que foram avaliadas neste trabalho que são óleo mineral, criopreservação a -70° C e refrigeração a 5° C (Figueiredo, 2001; Nakasone *et al.*,

2004). O presente trabalho consistiu em investigar qual metodologia é mais adequada para manutenção de microrganismos do filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* incorporados à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA no período de janeiro de 2007 a fevereiro de 2010 que vinham sendo mantidos sob óleo mineral e repique contínuo.

Material e Métodos

Foram selecionadas 223 amostras de *Candida* sp. e 250 amostras de fungos do Filo Ascomycota da Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. Estas foram reativadas em Agar Sabouraud e submetidas aos métodos de preservação.

Foram avaliadas três metodologias de preservação: conservação em óleo mineral, conservação em refrigeração a 5° C e Criopreservação a -70° C.

Conservação em óleo mineral: A técnica de preservação foi realizada como descrito por Braz *et al.* (2009). As culturas foram repicadas em tubos contendo meio de cultivo Agar Sabouraud com cloranfenicol. Em seguida, essas foram cobertas com uma camada de óleo mineral esterilizado. As culturas foram mantidas a temperatura ambiente.

Conservação em Refrigeração a 5° C: A técnica de preservação foi realizada como descrito por Diogo *et al.* (2005). As culturas também foram repicadas em tubos contendo meio de cultivo Agar Sabouraud. Em seguida, as culturas foram armazenadas em refrigerador com temperatura controlada em 5° C.

Criopreservação a -70° C: A técnica de preservação foi realizada como desenvolvida no Laboratório de Micologia, CSAS-INPA. Em microtubos de 2mL estéreis foram acrescentados de 0,8 mL de água destilada estéril, 0,05 mL de dimetil-sulfóxido DMSO (crioprotetor), 0,1 de glicerol (crioprotetor), 10 mg de miçangas (2mm, com orifício) estéreis e 100 mg de biomassa dos isolados fúngicos, essa última obtida como descrito nos itens anteriores. Os frascos foram armazenados a temperatura de -70° C.

Reativação dos microrganismos submetidos às metodologias de preservação: A cada 90 durante 180 dias as culturas foram reativadas como descrito por Girão *et al.* (2004), modificado para que fossem avaliadas quanto a sua viabilidade. Para as amostras submetidas às metodologias de óleo mineral e refrigeração a 5° C, uma alçada da colônia foi semeada em meio de cultivo Agar Sabouraud. Na metodologia de

criopreservação a -70°C , uma miçanga foi retirada e também semeada em meio de cultivo Agar Sabouraud.

Resultados

Das 223 amostras de leveduras preservadas, 100% apresentaram viabilidade para a metodologia de óleo mineral, 98% para a refrigeração a 5°C e 97% para a criopreservação a -70°C após 90 dias. Portanto, após 180 dias, o percentual de viabilidade para a metodologia de óleo mineral baixou para 67% e as demais metodologias permaneceram em média 97% de viabilidade. Das 250 amostras do filo Ascomycota preservadas, sendo *Aspergillus* sp. (n=58), *Penicillium* sp. (n=54), *Fusarium* sp. (n=77) e *Cladosporium* sp. (n=61), também apresentaram resultados satisfatórios quanto a viabilidade em todas as três metodologias após 90 dias. O gênero *Aspergillus* sp. apresentou um percentual de 98% tanto para a metodologia de óleo mineral quanto para a refrigeração a 5°C . E a metodologia de criopreservação teve uma viabilidade de 94% para os microrganismos deste gênero. Os demais gêneros apresentaram resultados semelhantes, onde as três metodologias tiveram um percentual em média de 95% de viabilidade para as três metodologias empregadas. Após 180 dias, o percentual de 90% se manteve para as três metodologias nos gêneros *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp. e 100% no gênero *Cladosporium* sp. Apenas o gênero *Fusarium* apresentou um percentual em média de 65% após 180 dias.

Em relação aos casos de contaminação, nas amostras do gênero *Candida*, a metodologia que apresentou maior frequência foi a conservação sob óleo mineral. Porém, a frequência dos casos não foi significativa, sendo apenas 0,6% e 0,5% após 90 e 180 dias, respectivamente. Nas amostras do Filo Ascomycota, as três metodologias apresentaram casos de contaminação, mas também não foram tão significativos.

Nas amostras de leveduras, os casos de inviabilidade celular foram observados nas três metodologias de preservação. Porém, a metodologia de óleo mineral obteve um percentual de 31,6% após a segunda recuperação (180 dias). Nas amostras do Filo Ascomycota, as três metodologias também apresentaram casos de inviabilidade celular.

Discussão

Lima (1991) obteve 98,7 % de viabilidade na preservação de espécies de *Fusarium sp.* sob óleo mineral durante períodos de 4 a 35 anos. No estudo realizado por Da Silva *et al.* (2010), a viabilidade de culturas de espécies de *Penicillium sp.* também preservadas sob óleo mineral foi de 43,3 %. Segundo o autor, a inviabilidade foi observada somente nas culturas estocadas por 12 a 16 anos.

Em trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2010) utilizando a técnica de criopreservação a -70° C em amostras de leveduras do gênero *Malassezia* obteve-se 100% de viabilidade entre as amostras.

Conclusões

As três metodologias avaliadas neste estudo apresentaram resultados satisfatórios tanto para os microrganismos do Filo Ascomycota como para as leveduras do gênero *Candida*. Porém, verificou-se que a metodologia de criopreservação a -70° C foi a que obteve melhores resultados tanto em relação a contaminação, uma vez que as amostras se apresentaram com maior pureza, como a inviabilidade celular das amostras, pois foi a que demonstrou melhor crescimento fúngico.

A metodologia de conservação sob óleo mineral foi a que esteve mais relacionada com contaminação e inviabilidade celular. Apenas o gênero *Fusarium* apresentou casos significativos de inviabilidade celular em todas as metodologias após 180 dias de conservação.

Referências

- Braz SCM, Motta CMS, Massa DML, Neves RP, Magalhães OMC (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.
- Da Silva JC, Fernandes OCC, Martins MS, Rodrigues AC, Teixeira MFS (2010) Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 30: 48-54.
- Diogo HC, Sarpleri A, Pires MC (2005) Fungi preservation in distilled water. An Bras Dermatol, 8: 591- 4.
- Figueiredo MB (2001) Métodos de preservação de fungos patogênicos. Biológico. 63: 73-82.
- Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG (2004) Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes

métodos de conservação. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 37: 229-233.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, De Melo NT (2002) *Tratado de Micologia Médica*. 9. ed. São Paulo: Sarvier. Lima, D.M.M. 1991. Preservação de espécies de *Fusarium* sob óleo mineral. Pesq. agropec. bras., Brasília, 26: 853-855.

Lima DMM (1991) Preservação de espécies de *Fusarium* sob óleo mineral. Pesq. agropec. bras, 26: 853-855 p.

Nakasone KK, Peterson AW, Jong S (2004) Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller G.M, Bills, G.F, Foster, M.S. Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, 37-47.

Oliveira ACP, Oliveira JAA, Cortez ACA (2010) *Malassezia* spp. (Cryptococcaceae) Identificação e Criopreservação das amostras conservadas na Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA do ano de 2006. XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA.

Rocha RM et al (2009) *Trichophyton rubrum*: manutenção e viabilidade por crio e hidropreservação.

Identificação de espécies do gênero *Candida* mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA

Oliveira¹L.A.¹, Cortez A.C.A.², Souza J.V.B.³

¹. INPA (airesluciana01@gmail.com); ². PPG-BIONORTE (accortez@inpa.gov.br); ³. INPA (joão.souza@inpa.gov.br)

Resumo

O gênero *Candida* compreende um grupo de leveduras encontrado em diversos ecossistemas. São considerados patógenos oportunistas, produzindo infecções com vários tipos de manifestações clínicas. A onicomicose é uma infecção fúngica que acomete tanto as unhas das mãos como dos pés. Pode afetar a matriz, placa ungueal e leito ungueal. É conhecida a manifestação de resistência no gênero *Candida* nas diferentes espécies, o que dificulta o tratamento da candidíase e o que justifica identificar leveduras em nível de espécie, pois consiste em um passo crucial para prescrição da terapêutica antifúngica adequada. O presente trabalho consistiu em identificar isolados do gênero *Candida* sp. mantidos na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA em nível de espécie para que sejam conhecidas as principais espécies relacionadas com infecções de unha em seres humanos. Foram utilizadas 15 amostras de *Candida* sp. pertencentes a Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. Os testes utilizados para identificação das leveduras foram avaliações dos aspectos macro e micromorfológicos, filamentação em ágar-fubá, meio cromógeno e assimilação de carbono. As amostras provenientes de unhas de pacientes com onicomicose foram identificadas como 67% (10) *Candida parapsilosis*, 13% (2) *Candida tropicalis* e 7% (1) *Candida albicans*.

Palavras-chave: *Candida* spp, onicomicose, identificação de leveduras.

Introdução

O gênero *Candida* compreende um grupo de leveduras encontrado em diversos ecossistemas, inclusive na microbiota residente de humanos e animais. São considerados patógenos oportunistas, produzindo infecções que se manifestam clinicamente por lesões superficiais da pele e mucosas, ou em alguns casos pode ser sistêmica, muitas vezes severa ou letal. Há uma ocorrência crescente de infecções por esses fungos, assim como a identificação de novas espécies patogênicas, principalmente em imunocomprometidos (Dal Vesco *et al.*, 2011). A *Candida*, em parasitismo no hospedeiro, no exame direto do material clínico, apresenta blastosporos ou pseudohifas com tamanho de 2-3x4-6µm, ovalada e/ou alongada com brotamento; e quando isolada em meio de cultivo são visualizados blastoconídeos, hifas e pseudohifas. Quando cultivada em ágar Sabouraud dextrose a 35°C tem crescimento em 24-48h, apresentando macroscopicamente colônias com aspectos brilhantes ou opacas, coloração branca a creme, textura cremosa, bordas regulares ou irregulares e odor de levedo. Microscopicamente é possível observar blastoconídeos esféricos de 8-12µm ou ovais (6-10x3,6-6µm) com paredes finas, ausência de cápsula, algumas espécies podem apresentar clamidoconídeos terminais ou intercalares (Lacaz *et al.*, 2002). As principais espécies dentro do gênero são *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. rugosa* (Sidrim e Rocha, 2004). É conhecida a manifestação de resistência no gênero *Candida* nas diferentes espécies, o que dificulta o tratamento da candidíase e o que justifica identificar leveduras no nível de espécie, pois consiste em um passo crucial para prescrição da terapêutica antifúngica adequada (Atique, 2006). Este trabalho consistiu em identificar as amostras de *Candida* sp. mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA em nível de espécie através dos testes usualmente utilizados para identificação de leveduras.

Material e Métodos

Foram utilizadas 15 amostras de *Candida* sp. pertencentes a Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. Os testes utilizados para identificação das leveduras foram avaliações dos aspectos macro e micromorfológicos, filamentação em ágar-fubá, meio cromógeno e assimilação de carbono.

Aspectos macromorfológicos: A caracterização macromorfológica das colônias leveduriformes foi realizada através da observação em ágar Sabouraud dextrose cloranfenicol.

Aspectos micromorfológicos: Foi realizado microcultivo em lâmina como descrito por Lacaz, 2002. O meio de cultura Agar fubá acrescido de TWEEN 80 foi distribuído 3mL ainda líquido em lâminas de microscopia. Após a solidificação, as leveduras cultivadas foram semeadas em estrias nesta lâmina, e recobertas com lamínula estéril. Essa preparação foi mantida de 2 a 3 dias à 25 °C e em seguida foram realizadas leituras microscópicas diárias para a verificação de produção de filamentação e de clamidoconídios.

Meio Cromogênico: As leveduras foram semeadas em placas com meio de cultivo CHROMagar Candida®. Após um período de incubação de 24 a 48 h, foi observada a coloração que as leveduras apresentaram no meio e feito a identificação específica.

Assimilação de carboidratos: Foi aplicado o teste de assimilação de carboidrato como descrito por Sidrim e Moreira (1999). Foi utilizado um meio basal destituído de qualquer fonte de carbono. Foi preparada uma suspensão da levedura a partir de colônias jovens, com crescimento de 48h em ágar Sabouraud dextrose e cloranfenicol a 36°C, a qual foi diluída em água destilada estéril. Uma alíquota do inóculo foi adicionada a uma placa de Petri contendo Agar base carbono. Foram adicionados os seguintes açúcares: glicose, lactose, sacarose, galactose, maltose, rafinose. As mesmas foram observadas quanto à turbidez na placa ou formação de um halo ao redor do açúcar desenvolvido pela assimilação específica de cada levedura confirmando assim a espécie.

Resultados

As 15 amostras estudadas, possuíam as características macromorfológicas de leveduras do gênero *Candida*. Após 24 ou 48 h da semeadura dessas em meio Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, mostraram-se com colônias esbranquiçadas, aspectos brilhantes ou opacas, lisas ou rugosas, textura cremosa e odor de levedo.

Quanto ao microcultivo, onde as leveduras foram semeadas em meio de cultivo Agar-fubá acrescido de Tween 80, das 15 amostras estudadas, uma apresentou positividade para presença de clamidoconídeos.

Todas as 15 amostras também foram semeadas em meio CHROMagar Candida® para identificação das espécies de acordo com a coloração. Neste meio de cultivo *C. albicans* aparece com uma coloração verde, *C. tropicalis* tem uma coloração azul e as demais espécies como rosa claro, lilás ou branca. Uma colônia apresentou coloração verde, duas apresentaram coloração azul e 12 apresentaram coloração rosa claro, lilás ou branca.

A prova de assimilação de carbono determina a capacidade das diferentes espécies de leveduras desenvolverem-se a partir de diferentes substratos. A positividade caracteriza-se pela presença de um halo ao redor do açúcar assimilado. Nesse estudo foram utilizados os seguintes açúcares: glicose, galactose, maltose, rafinose, sacarose e lactose. A leitura foi realizada como descrita por Koneman (2001).

Portanto, das 15 amostras mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA, 80% (12) foram identificadas como espécies não *albicans*, sendo 67% (10) *Candida parapsilosis* e 13% (2) *Candida tropicalis*. Foi identificada apenas 7% (1) como *Candida albicans*. E 2 amostras não puderam ser identificadas pelas metodologias utilizadas e foram caracterizadas como *Candida* spp.

Discussão

Em um estudo realizado por Demitto *et al.* (2012), foram obtidos 91 isolados provenientes de amostras de urina, hemocultura, ponta de cateter, secreção orotraqueal, entre outros, sendo 38 *Candida albicans*, 23 *C. tropicalis*, 16 *C. glabrata*, 10 *C. parapsilosis* e quatro *C. krusei*, confirmando que são frequentes as infecções por leveduras do gênero *Candida* spp., o que torna essas espécies um importante alvo de estudos. Em um estudo realizado por Nogueira (2005), dos 200 isolados provenientes de onicomicoses de unhas dos dedos das mãos de pacientes de Belo Horizonte, 40% (80 isolados) foram identificados como *C. parapsilosis*, 32% (64 isolados) como *C. albicans*, 26% (52 isolados) como *C. tropicalis* e 2% (4 isolados) como *C. guilhermondii*. Souza *et al.*, (2007) em seu estudo realizado em Maringá, Paraná também teve como espécie mais frequentemente isolada *C. parapsilosis* (44,61%), seguida por *C. tropicalis* (21,59%) e *C. albicans* (14,78%). Alguns autores como

Gautret e Rodier (2000) e Silva *et al.*, (2005) também observaram a prevalência da espécie *Candida parapsilosis*, a qual, também neste trabalho foi encontrada como principal espécie envolvida em infecções causados por leveduras do gênero *Candida*.

Conclusão

Nos últimos anos, cada vez mais vem ocorrendo o surgimento de espécies não *albicans* como agentes da Candidíase, em especial, a *Candida parapsilosis* que foi a espécie mais observada nesse estudo. Este tipo de infecção esteve por muito tempo relacionada com a presença de *Candida albicans*, sendo esta a espécie de *Candida* mais bem estudada.

Referências

- Atique TSC (2006) Pesquisa das Espécies e Sensibilidade Antifúngica de *Candida* sp. em Indivíduos Soropositivos para o HIV. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde- Eixo Temático Medicina e Ciências Correlatas. São José do Rio Preto.
- Dal vesco ED, Ricci B, Costa, GA, Lamonato, IR; Oliveira, NM, Onofre, SB (2011) Quantificação e identificação de *Candida* na cavidade oral de crianças. RBAC, 43: 217-21.
- Demitto FO, Do Amaral RCR, Biasi RP, Guilhermetti E, Svidzinski TIE, Baeza LC (2012) Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. J Bras Patol Med Lab. v. 48. n. 5. 315-321 p.
- Gautret P, Rodier MH, Lacroix KC, Jacquemin JL (2000) Case Report and Review. Onychomycosis due to *C. parapsilosis*. Mycoses. v. 43, 433-435 p.
- Koneman EW (2001). Micologia. In: Koneman E W (2001) Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5. ed. São Paulo: MEDSI; 995-1078 p.
- Lacaz CS.; Porto E, Martins, JEC, Heins-vaccari EM, De Melo NT (2002) Tratado de Micologia Médica. 9. ed. São Paulo: Sarvier.

Nogueira CC (2005) Prevalência, fatores de virulência e susceptibilidade a drogas antifúngicas de amostras de *Candida* spp. Isoladas de pacientes com onicomicoses provenientes de Belo Horizonte, MG. Dissertação de mestrado, UFMG.

Sidrim JJC, Moreira JLB (1999) Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Editora Guanabara Koogan. cap. 09. 77-88 p.

Sidrim JJC, Rocha MFG (2004) Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 408p.

Silva JO, Capuano DM, Takayanagui OM, Giacometti JRE (2005) Enteroparasitoses e onicomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Revista Brasileira de Epidemiologia. v. 8, n. 4, 385-92 p.

Souza EAF, Almeida LMM, Guilhermetti E, Mota VA, Rossi RM, Svidzinski TIE (2007) Frequência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. An Bras Dermatol; 82 (2): 151-6 p.

Caracterização de *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) por meio de ERIC-PCR

Queiroz C.Á.¹, Silva A.F.¹, Cruz J.C.², Silva G.F.², Sousa N.R.², Matos K.S.³, Hanada R.E.⁴

¹Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Federal do Amazonas – UFAM / Embrapa Amazônia Ocidental; ²Embrapa Amazônia Ocidental; ³Pós-doutoranda - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; ⁴Instituto de Pesquisa da Amazônia. E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é uma espécie de grande importância para a região Amazônica, suas sementes são ricas em cafeínas sendo utilizadas como matéria-prima para a produção de bebidas industrializadas e energéticos. O Brasil é o único produtor mundial de guaraná em escala comercial, sendo os estados do Amazonas e Bahia responsáveis por 19,5% e 72,4% da produção. Um dos principais responsáveis pela baixa produção no Amazonas são as doenças causadas por fungos, entre elas o superbrotamento que tem como agente etiológico *Fusarium decemcellulare* que vem se tornando um problema sério para a cultura. Neste trabalho foram analisados 76 isolados obtidos dos três principais sintomas 26 da hipertrofia da gema vegetativa, 16 hipertrofia floral, 18 isolados de galha no caule e 16 isolados de raiz, caule e folhas de guaranazeiro que apresentava sintomas. A diversidade foi avaliada via marcador ERIC-PCR por meio de 18 bandas polimórficas obtidas. A similaridade genética variou de 0,43 a 1 e com base na similaridade genética maior que 0,48% foi possível reunir os isolados em três grandes grupos independentes do local de coleta ou sintomas.

Palavras-chave: Superbrotamento, Hipertrofia floral, galhas e marcador molecular.

Introdução

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da Amazônia de grande importância para a região, pois suas sementes são ricas em cafeína, matéria-prima para a produção de bebidas industrializadas e energéticos. Além da cafeína, o guaraná apresenta outros compostos químicos como flavonóides e taninos, que lhes conferem características estimulantes e medicinais (Campos *et al.*, 2011). O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná em escala industrial, o Estado da Bahia contribui com 72,4% da produção e o Amazonas com 19,5% (IBGE 2013). Entre os vários fatores que contribuem para essa baixa produtividade no Estado do Amazonas, o superbrotamento é uma doença que foi detectada no Amazonas no início da década de 80 e só em 2014 nas plantações baianas, causada pelo agente etiológico *Fusarium decemcellulare*, atualmente vem se tornando um problema sério para a cultura do guaraná, pois afeta desde o estágio de mudas às plantas adultas impedindo seu desenvolvimento (Araújo *et al.*, 2007).

Em levantamento realizado por Araújo *et al.* (2007) constatou-se que a doença tem ocorrência generalizada nos municípios produtores do estado do Amazonas, contudo a maior prevalência foi observada em Urucará (41,36%), Itacoatiara (31,43%), Maués (27,89%) e Boa Vista do Ramos (23,77%). A doença afeta órgãos em crescimento ativo como as gemas vegetativas e apresenta pelo menos três sintomas bem característicos como o superbrotamento das gemas vegetativas (caracterizado pela presença de inúmeras brotações a partir de uma gema, apresentando entrenós curtos a partir dos quais surgem vários ramos secundários), hipertrofia floral (caracterizada pelo endurecimento e secamento das flores impossibilitando a polinização) e galhas no caule (caracterizadas por inúmeros brotos numa mesma gema, formando uma massa desordenada e compacta).

Desde a identificação do agente etiológico na década de 80 por Batista e Bolkan (1982) e os trabalhos epidemiológicos realizados por Araújo *et al.* (2007), pouca importância foi dada a este patossistema e inúmeras questões ainda continuam sem respostas, não se sabe exatamente como esse fungo penetra no hospedeiro, se em guaranazeiro existe a ocorrência de formas homotáticas (não patogênicas) e heterotáticas (patogênicas) como observado em cacauzeiro, muito menos sobre a diversidade e comportamento da população nas áreas produtoras de guaraná. Diante disso, a presente pesquisa visa analisar a diversidade genética de *F. decemcellulare* isolado de mudas e plantas adultas de guaranazeiro com sintomas de superbrotamento, hipertrofia floral ou galhas por meio do marcador molecular ERIC-PCR.

Material e métodos

A presente pesquisa foi realizada no laboratório de Biologia Molecular na Embrapa da Amazônia Ocidental (CPAA) localizada na cidade de Manaus-AM.

Isolamento de F. decemcellulare

O isolamento de *F. decemcellulare* foi realizado a partir dos três diferentes sintomas de 39 plantas de guaranazeiro de Manaus, Maués e Presidente Figueiredo em 2013. Todos os tecidos coletados foram submetidos ao isolamento indireto conforme descrito por Santos (1983). A partir do isolamento foi realizado o cultivo monospórico onde foram obtidos 76 isolados de *F. decemcellulare* (Tabela 1). Os isolados foram crescidos em meio batata-dextrose BD sob agitação de 150 rpm para obtenção de massa micelial, que foi filtrada e em seguida realizada a extração de DNA utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). A quantificação de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro *Nanodrop* e em gel de agarose (0,8%).

Marcadores ERIC-PCR

A diversidade genética de *F. decemcellulare* foi analisada por meio do marcador molecular ERIC-PCR utilizando os *primers* ERIC 1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' e ERIC F- 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'. As reações de PCR foram realizadas com: 1X de tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de T), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,5mM de dNTP, 50ng de DNA, 0,2µM de cada *primer* e 1U de enzima Taq DNA polimerase (*Karpa*). As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 48 °C por 1 min, 65 °C por 5 min, seguido pela extensão final de 65°C por 16 minutos.

Análises de dados

A partir dos géis obtidos pelo marcador ERIC-PCR, foi construído uma matriz de dados binários onde 1 representa a presença e 0 a ausência da banda. A diversidade foi calculada pelo coeficiente de similaridade de Dice usando o *software* NTSYSpc-2.02 (Rohlf et al., 2009). A matriz de similaridade foi utilizada para construção do dendrograma baseada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Averages*).

Tabela1- Isolados de *Fusarium decemcellulare* obtidos de mudas e plantas adultas de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) com sintomas de superbrotamento (hiperplasia da gema vegetativa, hipertrófica floral ou galhas)

ISOLADOS	LOCAL DA COLETA	ORIGEM DO GENOTIPO	TECIDO	SINTOMA DA PLANTA	ISOLADOS	LOCAL DA COLETA	ORIGEM DO GENOTIPO	TECIDO	SINTOMA DA PLANTA
F01	Mudas/Ma	PL 001	RM	HGV	F82	Mudas/Ma	38	Flor	HF
F02	Mudas/Ma	PL 002	RM	HGV	F85	Mudas/Ma	41	Flor	HF
F04	Pl.Ad/Ma	CL 003	RM	HGV	F86	Mudas/Ma	41	Flor	HF
F05	Pl.Ad/Ma	CL 003	RM	HGV	F87	Mudas/Ma	41	Flor	HF
F07	Pl.Ad/Ma	CL 001	RM	HGV	F89	Mudas/Ma	42	Flor	HF
F08	Pl.Ad/Mu	CL 601	Flor	HF	F90	Mudas/Ma	FMI 305 A	RM	HGV
F12	Mudas/Mu	626	RM	HGV	F92	Mudas/Ma	FMI 305 A	RM	HGV
F14	Mudas/Mu	300 ^a	Flor	HF	F94	Mudas/Ma	FMI 305 A	RM	HGV
F17	Pl.Ad/Mu	CL 300-C	RM	HGV	F96	Mudas/Ma	306 B	Ra	Ga
F19	Pl.Ad/Mu	CL 300-B	Flor	HF	F97	Mudas/Ma	307 B	Ra	Ga
F19B	Pl.Ad/Mu	CL 300-B	Flor	HF	F100	Mudas/Ma	310 B	Ra	Ga
F20	Pl.Ad/Mu	CL 300-C	RM	HGV	F105	Mudas/Ma	P384	Ra I	Ga
F21	Pl.Ad/Mu	CL 217-A	RM	HGV	F109	Mudas/Ma	P382	Ra	Ga
F22	Pl.Ad/Mu	CL 217-A	RM	HGV	F112	Mudas/Ma	P385	Fo	TA
F23	Pl.Ad/Mu	CL 300-A	Flor	HF	F114	Mudas/Ma	E29	Ra	Ga
F24	Pl.Ad/Mu	CL 300-A	Flor	HF	F115	Mudas/Ma	E29	Ra	Ga
F26	Pl.Ad/Mu	CL 619	RM	HGV	F119	Mudas/Ma	E29	Ca	Ga
F27	Mudas/Mu	021	Flor	HF	F120	Mudas/Ma	E29	Ca	Ga
F28	Mudas/Ma	022 (887)	Ca	Ga	F121	Mudas/Ma	E29	Ca	Ga
F29	Mudas/Ma	023 (889)	Ca	Ga	F125	Mudas/Ma	E29	Fo	TA
F30	Mudas/Ma	023 (889)	Ca	Ga	F127	Mudas/Ma	FMI 305 A	Ca	Ga
F31	Mudas/Ma	023 (889)	Ca	Ga	F129	Mudas/Ma	1816	Ca	Ga
F34	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F132	Mudas/Ma	1816	Ra	HGV
F37	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F134	Mudas/Ma	1816	Ca	HGV
F38	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F135	Mudas/Ma	1816	RM	HGV
F40	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F137	Mudas/Ma	575 B	Ca	Ga
F41	Mudas/Ma	24	Fo	TA	F139	Mudas/Ma	576 B	Ca	Ga
F52	Mudas/Mu	12	RM	HGV	F141	Mudas/Ma	1752	Flor	HF
F53	Mudas/PF	26	Flor	HF	F143	Mudas/Ma	1752	Flor	HF
F54	Mudas/PF	26	Flor	HF	F145	Mudas/Ma	1752	Fo	TA
F57	Mudas/PF	26	RM	HGV	F146	Mudas/Ma	1752	Fo	TA
F58	Mudas/PF	26	RM	HGV	F147	Mudas/Ma	1752	Fo	TA
F59	Mudas/PF	28	RM	HGV	F148	Pl.Ad/Ma	1779 (217)	Fo	TA
F60	Mudas/PF	28	RM	HGV	F149	Pl.Ad/Ma	1779 (217)	Fo	TA
F62	Mudas/PF	29	RM	HGV	F152	Mudas/Ma	(296) (145)	Ca	HGV
F63	Mudas/Ma	29	RM	HGV	F155	Mudas/Ma	(296) (145)	Ca	HGV
F80	Mudas/Ma	37	Flor	HF	F170	Mudas/Ma	P 702	Ca	Ga

‘**Origem:** Pl.Ad (Planta Adulta); Ma (Manaus); Mu (Maués); PF (Presidente Figueiredo).

‘‘**Sintomas Tecidos:** HGV (Hiperplasia Gema Vegetativa); HF (Hiperplasia Floral); Ga (Galha); Ra (Raiz); Ca (Caule); Fo (Folhas); RM (Ramo); TA (Tecido assintomático).

Resultados e Discussão

Com uma ampla gama de hospedeiros, *F. decemcellulare* já foi reportado em mais de 75 diferentes espécies de plantas em regiões tropicais e subtropicais (Farr e Rossman 2016). Porém recentes trabalhos indicam a existência de um complexo de espécies morfológicamente semelhantes por meio dos caracteres usualmente utilizados para identificação como a análise de macro e microconídios. Análise filogenética realizada por Guimarães (2013) confirmam a separação entre homotáticos e heterotáticos, já verificada deste a década de 70 por meio de marcador morfológico no qual os homotáticos apresentam quatro ascósporos por asco, enquanto que os isolados heterotáticos possuem oito ascósporos por asco.

Apesar da importância econômica deste patógeno, ainda não foram realizados estudos sobre a diversidade genética ou estrutura de população. Neste trabalho foram analisados 76 isolados caracterizados morfológicamente como *F. decemcellulare*, obtidos de 38 plantas de guaranazeiro, sendo 28 mudas mantidas em casa de vegetação e 10 clones adultos. Dos tecidos sintomáticos foram obtidos 26 isolados oriundos da hiperplasia da gema vegetativa, 16 da hipertrofia floral e 18 das galhas do caule e 16 isolados foram obtidos da raiz, caule ou tecido foliar de plantas que apresentavam sintomas de hiperplasia da gema vegetativa ou galhas (Tabela 1).

A análise da diversidade genética dos 76 isolados foi realizada por meio do marcador ERIC-PCR por meio de 18 bandas polimórficas foram obtidas. Com base na similaridade genética maior que 0, 48% foi possível verificar que a técnica de ERIC-PCR foi capaz de reunir os isolados em grupos independentes do local de coleta ou sintomas (Figura 1). Demonstrando que a variação do tipo de sintoma não estar relacionado com uma possível especialização fisiológica ou genética do patógeno e sim com o local de infecção no hospedeiro que vai expressar sintomas com morfologia diferentes.

A elevada diversidade observada para *F. decemcellulare* em guaranazeiro e a possível indicação de uma única população independentemente do local de coleta, pode ser um indicativo de fluxo de material vegetal ou do patógeno entre as diferentes regiões de coleta. Outro fator determinante no aumento da diversidade genética de um patógeno é possibilidade de terem diferentes tipos de reprodução podendo ser sexuada/fluxo gênico, assexuada/fluxo genotípico ou mista, aumentando capacidade de mutação e seleção de genes de virulência que é maior que a capacidade de mutação e seleção de gene de resistência do hospedeiro (McDonalds e Linde 2002).

Outra explicação para essa alta diversidade seria a ocorrência das formas homotática e heterotática em *F. decemcellulare* e conseqüentemente dos alelos funcionais idiomorfos conhecidos como MAT-1 e MAT-2 presentes no mesmo cromossomo (Alexander e Carmichael, 1973; Leslie e Summerell, 2006; Guimarães 2013). Isolados homotáticos possuem os MAT-1 e MAT-2 podendo se autofecundar, nesses casos é raro os recombinantes serem reproduzidos, já a forma heterotática para sua reprodução é indispensável o encontro de isolados que possuem *mating types* distintos e tem como conseqüência o aumento da diversidade genética da população (Duarte et al., 1999; Leslie e Summerell, 2006).

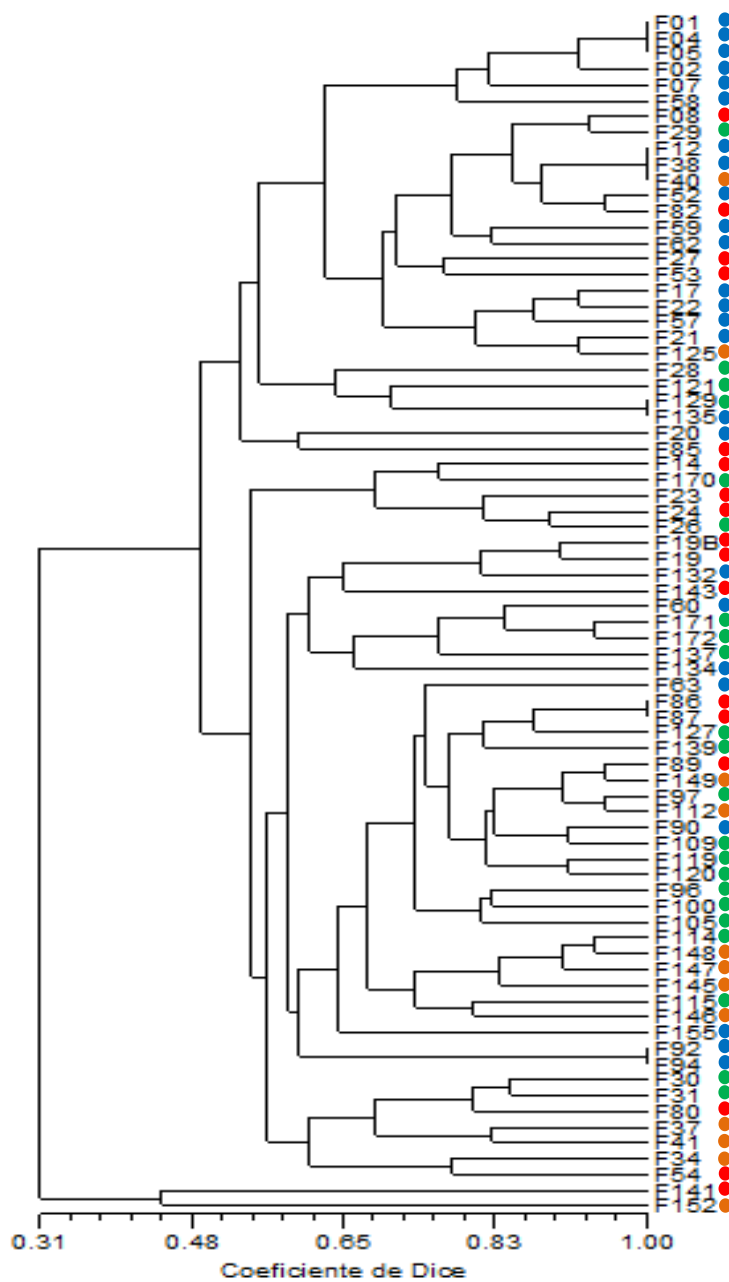


Figura 1 Dendrograma da similaridade entre os 76 isolados de *Fusarium decemcellulare*, obtido pelo método UPGMA. Cada planta utilizada foi caracterizada de acordo com os sintomas em hiperplasia da gema vegetativa, hipertrofia floral e galha. A origem de cada tecido é indicada pelos círculos:

● Folha; ● Hipertrofia floral; ● Galha; ● Hipertrofia da gema vegetativa.

Resultado semelhante aos encontrados neste trabalho foram visto por Silva (2009) que utilizando os marcadores RAPD e SSR em 66 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* coletado em diferentes municípios em Santa Catarina, viu que os mesmos não se agruparam por origens geográficas, os isolados foram distribuídos indistintamente nos grupos apresentando uma alta diversidade entre eles.

Conclusão

Com a utilização da técnica do ERIC-PCR foi possível observar o agrupamento dos isolados independente do sintoma ou local de coleta, confirmando uma alta diversidade genética de *F. decemcellulare* em guaranazeiro.

Referências

- Alexander JV, Cook R J (1965) *Fusarium* species and *Calonectria* associated with cushion gall of Cacao in Central America. *Cacao* 10: 15-16.
- Alexander JV, Carmichael NM (1973) "Divergent patterns of ascus development in homothallic and heterothallic isolates of *Calonectria rigidiuscula*." *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 100: 35-40.
- Araújo JCA, Pereira JCR, Gasparotto L, Arruda MR, Moreira A (2007) Embrapa - Comunicado Técnico. Antracnose do guaranazeiro e seu controle. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/681674/1/ComTec462007.pdf>
- Batista MF, Bolkan HA (1982) O superbrotamento do guaranazeiro. *Fitopatol. Bras.* 7: 315-317.
- Campos MPO, Riechelmann R, Matins LC, Hassan BJ, Casa FBA, Del-Giglio A (2011) Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. *J. Altern. Complement. Med.* 17: 505-512.
- Doyle JJ, Doyle JL, Hortorium LHB (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Duarte M LR (1999) Doenças de plantas no Trópico úmido Brasileiro. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 296p.
- Farr DF, Rossman AY (2016) *Fungal Databases*, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved December 12, disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>.

Guimarães EA (2013) Biologia Reprodutiva, Filogenia e patogenicidade de *Fusarium decemcellulare*. (Dissertação). Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa_201308.pdf>. Acesso em: 10 de Set. 2014.

Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell. 388p.

McDonald B.A, Linde C (2002) "Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance." *Ann. Rev. Phytopathol.* 40: 349-379.

Rohlf FJ (2009) NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.2. Exeter Software, Setauket, NY.

Santos ABC, Tabosa SAS, Mendes RGP, Ataíde PF (1983) Etiologia do Superbrotamento da mangueira no estado do Pará. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Resumos do Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Brasília, 1985, v.8, p.595.

Silva CMD (2009) Análise da diversidade genética por marcadores RAPD e SSR em *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* no Estado de Santa Catarina (Tese). Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.

Minipreparação de múltiplas amostras para extração de DNA total bacteriano em microplacas de 96 poços

Silva M.S.¹, Gama A.M.², Moraes A.B.¹, Nonato L.S.¹, Carvalho N.O.¹, Spira B.², Yamane T.^{3,4}, Mota .J.¹

¹UFAM - Universidade Federal do Amazonas, ²USP - Universidade de São Paulo ³UEA - Universidade do Estado do Amazonas, ⁴CBA – Centro de Biotecnologia da Amazônia
Emails: ssmarcelo1@hotmail.com, auri_matos@yahoo.com, adriane_abm@hotmail.com, luana_nonato@hotmail.com, nanicarvalhoss@gmail.com, benys@usp.br, tetsuo@usp.br, adolfo.mot@gmail.com

Resumo

Para acessar o DNA bacteriano, são empregados vários processos de rompimento da parede celular: aqueles baseados no uso de enzimas como lisozima e proteinase K; químicos, como o tiocianato de guanidina, e físicos, como maceração do material congelado, ou em agitadores na presença de esferas de vidro. Entretanto, várias metodologias em uso são normalmente demoradas e com muitas etapas, aumentando a probabilidade de contaminação resultante da excessiva manipulação e ainda a utilização recorrente de solventes orgânicos como o fenol e clorofórmio que geram resíduos tóxicos e danosos ao ambiente. Diante o exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um método prático e rápido de extração de DNA bacteriano de múltiplas amostras simultaneamente, ajustado para o padrão de microplacas de 96 poços. O protocolo apresentado nesse trabalho permite a extração de DNA bacteriano de múltiplas amostras simultaneamente, em quantidade e qualidade compatíveis com metodologias baseadas em PCR. O procedimento é rápido, prático e barato, tornando viáveis economicamente diversos trabalhos de prospecção de micro-organismos cultiváveis que necessitam de identificação molecular.

Palavras-chave: Genética de micro-organismos, extração do DNA.

Introdução

O primeiro passo de todas as técnicas que precisam acessar a informação genética é a extração dos ácidos nucleicos. Com exceção das metodologias que usam

RNA como a fonte inicial de informação genética, todas as demais que buscam determinar, manipular, reproduzir, modificar ou recombinar, necessitam em primeira instância de DNA em quantidade e qualidade que permitam seu processamento (Fiorentin et. al. 2009).

Para acessar o DNA bacteriano, são empregados vários processos de rompimento da parede celular: aqueles baseados no uso de enzimas como lisozima e proteinase K; químicos, como o tiocianato de guanidina, e físicos, como maceração do material congelado, ou em agitadores na presença de esferas de vidro. Entretanto, várias metodologias em uso são normalmente demoradas e com muitas etapas, aumentando a probabilidade de contaminação resultante da excessiva manipulação e ainda a utilização recorrente de solventes orgânicos como o fenol e clorofórmio que geram resíduos tóxicos e danosos ao ambiente.

Explorando as dificuldades citadas, a indústria da biotecnologia tem investido em alternativas viáveis e eficientes para superar tais limitações, os “kits” para extração de DNA e RNA trouxeram praticidade e ganho de tempo na bancada, entretanto o custo ainda é elevado, variando entre R\$ 20,00 e R\$ 30,00, por amostra, o que em geral obriga o pesquisador a rever estudos mais amplos, e eventualmente combinar amostras para reduzir os custos com a extração.

Diante o exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um método prático e rápido de extração de DNA bacteriano de múltiplas amostras simultaneamente, ajustado para o padrão de microplacas de 96 poços.

Material e métodos

Coleta e isolamento das amostras

Para reproduzir as condições de muitos trabalhos realizados com amostras ambientais, foram utilizadas bactérias oriundas de amostras coletadas do Rio Negro, Rio Araçá e Solimões. As coletas foram realizadas na profundidade de 15 cm, conforme determina CETESB (2011) para esse tipo de coleta, com o auxílio de garrafas devidamente esterilizadas.

As amostras coletadas foram diluídas sucessivamente em 0.9% Solução Salina até a concentração de 10^{-5} , e semeadas pela técnica de espalhamento de placa nos seguintes meios de cultura: Ágar Triptona de Soja (TSA) e Ágar Luria-Bertuni (LB) e Cetrimide Ágar; depois incubadas a 30° C pelo período de 24 horas.

Cultivo e extração de DNA

O protocolo foi modificado a partir de Mota e Nobrega (2013), que estabeleceram o método de minipreparação de DNA de leveduras em microplacas de 96 poços.

Algumas amostras selecionadas ao acaso foram inoculadas em uma microplaca de 96 poços fundo chato (Costar 96) com 300 µl de caldo TSA. Essas foram incubadas à 30° C por um período de 18h sem agitação.

Após o período de incubação, 50 µl da cultura foram transferidos para outra microplaca e centrifugadas a 3650 g, durante 10 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o excesso do meio de cultura foi drenado por inversão da placa em papel absorvente.

Foram adicionados 100 µL da solução de lise 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 2mg/ml lisozima), seguida de incubação à 37° C por 30 min; Para lise da membrana citoplasmática foram adicionados 10 µL de 10% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e 5 µg de proteinase K, seguido de incubação a 55° C por 30 min, ou até a obtenção de uma solução translúcida, o que indica lise celular completa.

Para extração dos debris celulares e proteínas totais, foram adicionados 110 µl de 5M acetato de potássio, homogeneizando bem as amostras com aspirações sucessivas de forma cautelosa para não contaminar os poços adjacentes, seguido de incubação a -20 °C durante 30 min. O esperado para essa fase é um precipitado branco viscoso.

A placa foi então, centrifugadas a 3650 g por 15 min e 100 µl do sobrenadante foram transferidos para uma nova microplaca de fundo em “V” previamente preparada com 100 µL de álcool isopropílico em cada poço. A placa permaneceu a -20°C por 15 min seguido de centrifugação a 3650 g e 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado uma vez com 200 µL de 70% etanol, seguido de centrifugação a 3650 g por 5 min, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado permaneceu à temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual. O DNA foi hidratado com 30 µL tampão de TE/RNase (10 mM Tris HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA e 10 µg.ml⁻¹ RNase). Cinco microlitros de cada extrato foram aplicados em gel de agarose 0,8 % corado com 0.2 µg.ml⁻¹ brometo de etídio. O DNA total também foi analisado em NanoDrop2000c para se determinar quantidade e qualidade das amostras.

Resultados e discussão

Foram testados com esse protocolo aproximadamente 300 isolados, e após o período de incubação, houve massa celular suficiente para a realização das extrações para a maioria das amostras. Nessa etapa é desnecessário determinar o crescimento celular, como o protocolo visa objetividade, havendo turvação mínima do meio já se atinge o número suficiente de células para uma extração com bom rendimento. Entretanto, para isolados de crescimento rápido onde grande massa celular é atingida em um período curto, a diluição das células torna-se necessária, pois a quantidade elevada de massa celular satura o tampão de extração dos debris celulares, e portanto a qualidade dos produtos de extração cai.

Tentativas em usar um tampão de extração sem proteinase K renderam bem menos DNA por amostra e em muitos casos, não houve produto que pudesse ser visualizado em gel de agarose, dessa forma optamos por manter a enzima no tampão. O tempo de incubação com o tampão de lise 2 é variável, a lise de algumas amostras ocorre quase que instantaneamente, outras, porém, demoram mais, entretanto, em nossos ensaios, 20 min foram suficientes para a lise completa de todas as amostras testadas que pode ser facilmente constatada pela transição de uma solução turva para uma solução cristalina.

Foi possível extrair DNA de todas as amostras isoladas o que sugere um protocolo de extração eficiente para os mais diversos tipos bacterianos e com diferentes estruturas de parede (Fig. 1).

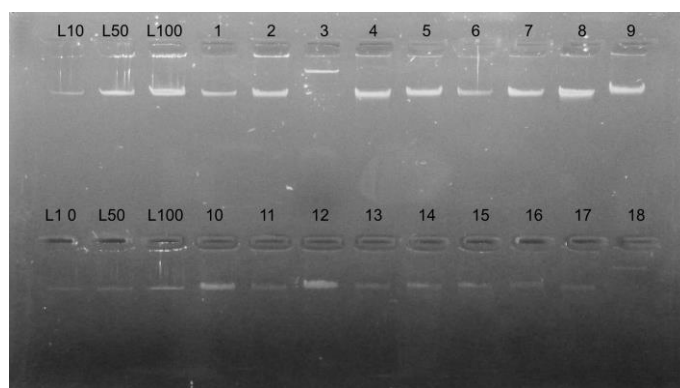


Figura 1. Gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio. Perfil eletroforético do DNA total bacteriano extraído. L10, L50 e L100, marcador lambda contendo 10, 50 e 100 ng de DNA respectivamente. Números de 1 a 18, isolados testados nesse estudo. Imagem representativa.

A quantidade média de DNA total extraído foi de 200 ng/μl, sendo a menor concentração 108 ng/μl e a maior, 476 ng/μl. As diferenças observadas se devem, em geral, à massa celular, algumas bactérias conseguem atingir uma maior densidade que se reflete diretamente no produto da extração.

Existem diversas técnicas para extração de DNA bacteriano a partir de amostragem ambiental, entretanto, nenhum método é universalmente aplicável, já que algumas amostras, devido à sua própria natureza, requerem a adaptação do método (Zhou et al., 1996). Com o protocolo de extração proposto nesse trabalho foi possível realizar a extração de DNA de todos os isolados. As diferenças entre os isolados, nas quantidades de DNA extraído, podem ser explicadas pelo crescimento diferencial apresentado pelas diferentes amostras.

A quantidade total de DNA extraído varia dentro da escala de nanograma, o que é suficiente para todas as metodologias que usam como base a PCR. Para técnicas que necessitam de maior quantidade de DNA (escala de micrograma) ou um DNA com excelente grau de pureza esse não é o método mais indicado.

O grande diferencial do protocolo proposto nesse trabalho é que ele permite a extração de DNA total de múltiplos isolados bacterianos simultaneamente, em microplacas de 96 poços. Além disso, há uma redução significativa no número de passos e a utilização de solventes orgânicos quando comparado com metodologias muito difundidas como a extração com fenol e clorofórmio.

Levando-se em consideração a diversidade cultivada, este método se apresenta como uma alternativa viável para trabalhos que precisam genotipar um grande número de amostras ambientais. A extração de DNA em geral é uma dificuldade para a maioria desses trabalhos, por dois motivos básicos: custo e tempo.

Todas as etapas de identificação molecular subsequentes à extração já são feitas com a manipulação simultânea de múltiplas amostras usando microplacas com 96 poços, sendo as mais comuns, PCR e sequenciamento. Dessa forma, o presente método certamente é uma contribuição importante, principalmente para a realidade da região Norte, onde pesquisas envolvendo prospecção de micro-organismos resultam em um grande número de isolados armazenadas e identificadas em criotubos de preservação.

Conclusões

O protocolo apresentado nesse trabalho permite a extração de DNA bacteriano de múltiplas amostras simultaneamente, em quantidade e qualidade compatíveis com metodologias baseadas em PCR.

O procedimento é rápido, prático e barato, tornando viáveis economicamente diversos trabalhos de prospecção de micro-organismos cultiváveis que necessitam de identificação molecular.

Referências

Fiorentin, F.; Moraes, A.J.; Celant, V.A.; Bonett, L.P. (2009). Testes de extração de DNA de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* usando o protocolo miniprep (modificado de Raeder; Broda, 1985). Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente, 28 a 30 de abril de 2009. UNIOESTE, Cascavel – Paraná – Brasil.

Miranda, R.R., Montanhini, M.T.M., Boreiko, S., Bittencourt, J.V.M. (2011). Evaluation of genomic dna extration from food interest bactéria. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Org. Carlos Jesus Brandão et al., São Paulo: CETESB; Brasília: ANA.

Mota, A.J., Back-Brito G.N., Nobrega F.G. (2009). "A practical and rapid microplate method for yeast genomic DNA extraction." MYCOSES. Vol. 52. Commerce Place, 350 Main ST, Malden 02148, MA USA: Wiley-Blackwell Publishing, INC.

Primers* específicos para a determinação de MAT-1 em *Fusarium decemcellulare

Siqueira V.K.S.¹, Matos K.S.¹, Hanada R.E.¹, Gualberto G.F.², Silva G.F.²

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Fitopatologia, 69080-971, Manaus, AM, Brasil. ²Embrapa Amazônia Ocidental, Laboratório de Biologia Molecular, 69010-970, Manaus, AM, Brasil. E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

Fusarium decemcellulare (Fdc) é caracterizado por ser endófito ou patogênico a diversas plantas em regiões tropicais e subtropicais. Em guaranazeiro é o agente causal de superbrotamento um dos principais problemas da cultura. O estudo do sistema *mating type*, idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2*, além de fornecer uma compreensão detalhada para delimitar espécies dentro de complexos de espécies, é fundamental para estudo da dinâmica e do potencial de variação genética de um patógeno. *Primers* degenerados disponíveis na literatura para determinar *mating type* em várias espécies de *Fusarium*, não foi capaz de amplificar o *MAT-1* em Fdc. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver *primers* específicos para determinar *MAT-1* em *F. decemcellulare*. Inicialmente *primers* degenerados foram desenhados com base nas sequências do *MAT-1* disponíveis no NCBI, amplificado em Fdc e o fragmento do tamanho esperado foi clonado e sequenciado para o desenho de iniciadores específicos que foram validados usando população de isolados de Fdc de diferentes locais de coleta no Amazonas.

Palavras-chave: superbrotamento, heterotalismo, homotalismo, gene *MAT*.

Introdução

Fusarium decemcellulare Brick (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula*) está presente principalmente em regiões tropicais, podendo ser endófito ou patogênico a diversas plantas (Farr e Rossman, 2016).

Em guaranazeiro, espécie nativa da Amazônia, *F. decemcellulare* causa a doença denominada de superbrotamento (hipertrofia floral, hiperplasia das gemas vegetativas e galhas no caule) sendo um dos principais problemas da cultura (Atroch, 2002). E apesar da

relevância econômica da doença, ainda pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva, variabilidade genética, estrutura da população ou sobre o potencial evolutivo e risco deste patógeno.

A identificação de espécie biológica por meio de cruzamentos em laboratório pode ser útil quando não há marcadores morfológicos suficientes para delimitar espécies (Rossmann *et al.* 1999; Leslie e Summerell, 2006) como em *F. decemcellulare* que existem evidências de que representa um complexo de espécies com diferença filogenética entre isolados homotáticos e heterotáticos, uma clara identificação molecular por PCR dos *Mating type* é útil e pode auxiliar nos cruzamentos entre os isolados (Guimarães, 2013).

O sistema de cruzamento entre fungos é denominado de *mating type*, consiste em um loco *MAT* e geralmente apresenta dois idiomorfos, *MAT-1* e *MAT-2*. Os genes do loco *MAT* possuem regiões conservadas entre espécies distantes, que codificam proteínas denominadas HMG-box (*high mobility group*) e α -box que regulam todo o processo de reprodução sexual. Em espécies heterotáticas o cruzamento ocorre entre isolados de *mating types* opostos, enquanto que em espécies homotáticas, os isolados são autoférteis (Leslie e Summerell, 2006).

Estudos baseados em determinação de *mating type* e cruzamentos têm sido utilizados para delimitar espécies dentro de *Gibberella fujikuroi species complex* (GFC) que é composto por distintas espécies filogenéticas e biológicas, e que anteriormente eram denominadas apenas como *Fusarium moniliforme* (Leslie e Summerell, 2006). *Primers* degenerados foram desenvolvidos para determinar *mating type* em várias espécies de *Fusarium* (Kerényi *et al.*, 2004). Esses *primers* foram testados em *F. decemcellulare*, entretanto, somente o idiomorfo *MAT-2* foi amplificado. O presente trabalho teve como objetivo desenhar *primer* específico para determinar *MAT-1* em *F. decemcellulare* para auxiliar estudos de indução da fase sexuada em laboratório.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular na Embrapa Amazônia Ocidental em Manaus, AM.

Sequências da região conservada *MAT-1* de 20 isolados de *Fusarium* foram obtidas no banco de dados do GenBank (AJ535627.3, AJ535626.3, AJ535625.4, AM295820.1, AF100925.1, AM295817.1, AM295819.1, AM295818.1, AM295816.1, AM295815.1, AM295814.1, AM295302.1, AM295301.1, AJ876530.1, AM072517.1, AM072514.1,

AM072513.1, AM072512.1, AJ876534.1, AJ876531.1). As sequências foram alinhadas no programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) e *primers* degenerados foram desenhados para *MAT-1* denominados de fus052 F (5'-AAGCGCCCTCTBAAYGSYTTC-3') e *MAT-1* fus241 R (5'-TTRGCAATYARRGCCCATTTG-3').

Os *primers* degenerados desenhados para *MAT-1* foram testados com as amostras de DNAs de *F. decemcellulare*. A reação da PCR foi realizada com um volume final de 20 µL, com 1µL de *primers* (0,25 µM), tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100), 1,2 µL MgCl₂ (1,5 mM), 0,4 µL dNTP (0,2 mM), 0,05 U/µL Taq polimerase, 20 ng/µL de DNA e água destilada. As condições de ciclos foram: desnaturação inicial de 94 °C por 30 segundos, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 90 segundos, e extensão final de 70 °C por 1 minuto.

Os fragmentos amplificados foram clonados com o kit CloneJET PCR Cloning (*Thermo Scientific*), segundo as recomendações descritas pelo fabricante. Os clones foram selecionados por PCR de colônia para confirmação de cada fragmento, para extração de plasmídeo e purificados para sequenciamento, usando o kit *BigDye*® Terminator v3.1 e sequenciados em um sequenciador 3500 Genetic Analyser.

O alinhamento das novas sequências de nucleotídeos foi através do programa MEGA 6.0 e a partir da homologia dessas sequências foi realizado o desenho de *primers* específicos para determinação de *MAT-1* para *F. decemcellulare* no PRIMER 3. Os *primers* degenerados *MAT-2* de Kerényi et al., (2004) também foram testados com os isolados de *F. decemcellulare*.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % para a visualização dos resultados. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com o marcador Fermentas 1 Kb.

Resultados e discussão

Os *primers* degenerados desenhados para determinação de *MAT-1* foram testados com isolados de *F. decemcellulare* e dois fragmentos foram observados com 189 pb e 373 pb. Os fragmentos foram clonados e sequenciados.

A sequência do fragmento de 373 pb do gene *MAT-1* de *F. decemcellulare* apresentou dois íntrons e dois blocos de sequências conservadas (Figura 1).

```

1  AAGCGCCCTCTTAACGCCTTTCATGGCTTTTCGAAAGTGAGTGCCAAACTTCTGCTAACGAA
1  K R P L N A F M A F R
61  TCCGATGCTGACTTCGACAAGCATATTACCTCAAACCTTTCCGGAATATCCGCAGAAGC
21  Y Y L K L F P E Y P Q K L
121 TCGTGTCTGGCTTCCTCACCACCCTCTGGAACAAGGACCATAATCGCAACAAATGGGCCC
41  V S G F L T T L W N K D H N R N K W A L
181 TAAAAGCGCCCTCTTAACGCCTTTCATGGCTTTTCGAAAGTGAGTGCCAAACTTCTGCTAAC
61  K K R P L N A F M A F R
241 SAATCCGATGCTGACTTCGACAAGCATATTACCTCAAACCTTTCCGGAATATCCGCAGA
81  Y Y L K L F P E Y P Q K
301 AGCTCGTGTCTGGCTTCCTCACCACCCTCTGGAACAAGGACCATAATCGCAACAAATGGG
101 L V S G F L T T L W N K D H N R N K W A
361 CCCTGATTGCCAA

```

Figura 1 Sequência do fragmento de 373 pares de base do gene *MAT-1* de *Fusarium decemcellulare* obtido a partir do DNA genômico. Os aminoácidos deduzidos são apresentados abaixo de cada sequência. Em vermelho dois íntrons localizados *in silico* e em negrito dois blocos de sequências conservadas.

Os *primers* específicos para *MAT-1* em *F. decemcellulare* foram desenhados através do alinhamento das sequências clonadas no MEGA 6.0, denominados de *MAT-1* FDC F (5'-ACGCTTTCATGGCTTTTCG-3') e *MAT-1* FDC R (5'-GCCCATTTGTTGCGATTATG-3').

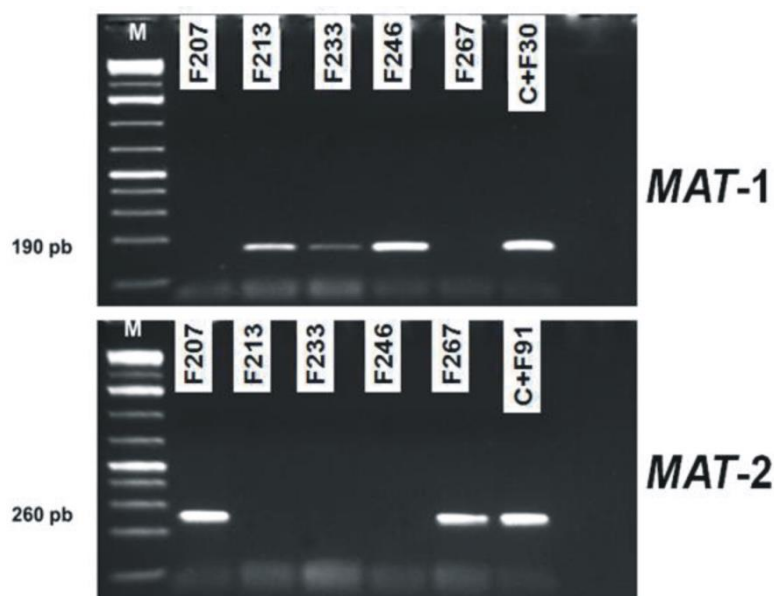


Figura 2 Gel de agarose mostrando a determinação de *mating type* em cinco isolados de *Fusarium decemcellulare* utilizando os *primers* desenhados para *MAT-1* e os *primers* para *MAT-2* (Kerényi et al., 2004). **A)** Amplificação do gene *MAT-1* (190 pb). **B)** Amplificação do gene *MAT-2* (260 pb). M- marcador 1 Kb Plus (Fermentas); C + – controle positivo para cada *mating type*.

O total de 42 isolados de *F. decemcellulare* foram testados com os *primers* específicos desenhados para *MAT-1* e com os *primers* de Kerényi *et al.*, (2004) para *MAT-2*, resultando em 26 isolados *MAT-1* e 16 isolados *MAT-2*, com 190 e 260pb, respectivamente (Figura 2).

O conceito biológico de espécies vem sendo aplicado com sucesso para delimitar espécies principalmente dentro de complexo de espécies (Leslie e Summerell, 2006; Zhan *et al.*, 2007). No gênero *Fusarium*, o complexo de espécies amplamente estudado é o GFC, em que *primers* foram desenvolvidos para determinar *mating type* e auxiliar na identificação de várias espécies biológicas (Steenkamp *et al.*, 2000). De acordo com Guimarães (2013), *F. decemcellulare* representa um complexo de espécies com caracteres morfológicos semelhantes.

Primers degenerados testados anteriormente para determinar o *mating type* de espécies de *Fusarium* (Kerényi *et al.*, 2004) forneceram resultado satisfatório somente para o idiomorfo *MAT-2* em isolados de *F. decemcellulare*. Provavelmente, a não funcionalidade dos *primers* para *MAT-1* pode estar relacionada com a divergência de sequência que pode ocorrer mesmo em regiões conservadas para esse gênero (Steenkamp *et al.*, 2000). O idiomorfo *MAT-1* é relativamente mais complexo, pois possui três genes (*MAT-1-1*, *MAT-1-2* e *MAT-1-3*), sendo que *MAT-1-1* codifica proteína da α -box com funções importantes na formação de peritécios e ascósporos. *MAT-1-2* e *MAT-1-3* aumentam a eficiência dos cruzamentos. Já o idiomorfo *MAT-2* tem somente a proteína HMGbox, que desempenha papel importante na ascosporigênese e na determinação de cruzamentos específicos (Yun *et al.*, 2000).

Os *primers* específicos desenvolvidos no presente estudo podem ser utilizados com sucesso para determinar o *MAT-1* em *F. decemcellulare* e assim, auxiliar estudos de indução da fase sexuada em laboratório para a identificação de espécies biológicas. Além disso, é possível identificar isolados heterotáticos de isolados homotáticos. Em homotáticos, ocorre a amplificação de ambos idiomorfos, como foi observado em *F. graminearum* (Kerényi *et al.*, 2004). As espécies homotáticas carregam genes para ambos os *mating types* que podem estar ligados ou não no mesmo genoma (Yun *et al.*, 2000).

Conclusão

Os *primers* específicos desenvolvidos no presente estudo podem ser utilizados com sucesso para determinar o *MAT-1* em *F. decemcellulare* e assim, auxiliar estudos de indução da fase sexuada em laboratório para a identificação de espécies biológicas.

Referências

- Atroch AL (2002) Aspectos gerais da cultura do guaraná. *Foods and Food Ingredients. J Jpn* 204:53-59.
- Farr DF, Rossman AY (2016) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>. Acessado em 12 Jan 2016.
- Guimarães EA (2013) Biologia reprodutiva, filogenia e patogenicidade de *Fusarium decemcellulare*. Minas Gerais, Brasil, 68p. (M.Sc. Dissertação Universidade Federal de Lavras. UFLA).
- Kerényi Z, Moretti A, Waalwijk C, Oláh B, Hornok L (2004) Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol* 70:4419-4423.
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell. 388p.
- Rossman AY, Samuels GJ, Rogerson CT, Lowen R (1999) Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, *Ascomycetes*). *Stud Mycol* 42:134-137.
- Steenkamp ET, Wingfield BAD, Coutinho TA, Zeller KA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Leslie JF (2000) PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Giberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4378-4382.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Yun SH, Arie T, Kaneko I, Yoder OC, Turgeon BG (2000) Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet Biol.* 31:7-20.
- Zhan J, Torriani SFF, McDonald BA (2007) Significant difference in pathogenicity between *MAT1-1* and *MAT1-2* isolates in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet Biol.* 44:339-346.

Produção de proteases por *Aspergillus* spp estocados na Coleção de Fungos da Amazônia - CFAM do Instituto Leônidas e Maria Deane

Araújo CPM^{1,2}, Silva LM^{1,2}, Lima AKS¹, Torres DR¹, Silva JC¹, Fernandes OCC¹. ¹Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/FIOCRUZ, Manaus - AM. ²Faculdade Estácio do Amazonas, Manaus – AM. Email: ofernandes@amazonia.fiocruz.br

Resumo

O aproveitamento de fontes naturais, como microrganismos, para produção de novos bio-produtos vem sendo o principal incentivo para o desenvolvimento de diversos setores da indústria. As proteases de *Aspergillus* spp. são largamente exploradas em diversas indústrias devido à sua atividade em vários pH e temperaturas. Para o presente estudo foram selecionadas 11 amostras de *Aspergillus* da Coleção de Fungos da Amazônia- CFAM/FIOCRUZ –AMAZÔNIA, com o objetivo de encontrar cepas produtoras de protease. As culturas foram reativadas e autenticadas mantendo assim suas características morfológicas e fisiológicas para todas as amostras viáveis. Quanto a atividade proteolítica qualitativa observou-se que todos os isolados de *Aspergillus* apresentaram positividade para produção de proteases, como também apresentaram bons índices enzimáticos destacando-se *Aspergillus japonicus* (CFAM 0240) com 7 mm de halo ao redor do “cup plate”. A atividade proteolítica variou entre os indivíduos da mesma espécie, sendo estes capazes de degradar a caseína presente no meio sólido. Já na avaliação quantitativa observamos que houve uma variação da atividade proteolítica, com valores variando de 8,09 U/ml (*A. japonicus* CFAM 0240) a 22,49 U/ml (*A. oryzae* CFAM 0540), o que demonstra que a produção de proteases pode variar entre fungos de espécies diferentes. Esse estudo contribuiu para que futuramente a importação de enzimas para o Brasil não seja uma necessidade e sim, mais uma opção, tendo em vista que microrganismos oriundos da região amazônica apresentam potencial para produção enzimática.

Palavras-chave: *Aspergillus*, Fungos, Proteases microbianas.

Introdução

O aproveitamento de fontes naturais, como microrganismos, para produção de novos bio-produtos vem sendo o principal incentivo para o desenvolvimento de diversos setores da indústria. A biodiversidade do Brasil apresenta grande potencial para a busca de novos fármacos e biomarcadores enzimáticos, disponível para transformação em produtos úteis e de maior valor agregado, dentre eles as enzimas (Zimmer *et al.*, 2009).

As proteases estão classificadas dentro do grupo das hidrolases, estas correspondem à aproximadamente 75% das enzimas industriais, sendo 65% das enzimas comercializadas mundialmente representadas por aquelas que degradam proteínas (Yin *et al.*, 2014). Embora as enzimas mais estudadas sejam de origem animal e vegetal, as enzimas de origem microbiana surgem como uma alternativa mais simples e barata, correspondendo a 90% das proteases comercializadas (Inácio *et al.*, 2014).

Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica, requerem espaço limitado para cultivo e são susceptíveis à manipulação genética (Bon *et al.*, 2008). Os fungos são uma das principais fontes desta enzima, estes a secretam para o meio externo com a finalidade de degradar as proteínas cujos produtos desta hidrólise servem como fonte de nutrientes para o processo de multiplicação celular.

As proteases de *Aspergillus* spp. são largamente exploradas em diversas indústrias devido à sua atividade em vários pH e temperaturas (Haq, 2006). Algumas espécies deste gênero apresentam a capacidade de produzirr proteases neutras, ácidas e alcalinas, como é o caso de *Aspergillus oryzae* (Inácio, 2014; Said & Pietro, 2004).

A relevância deste grupo de enzimas rica em diversidade estrutural e mecanismos de ação se refletem na importância das suas aplicações em processos industriais, tais como, proteases utilizadas em detergentes que precisam ter estabilidade em ampla gama de pH e em altas temperaturas, bem como compatibilidade com agentes oxidantes (Sumantha, 2006).

Para obtenção destas enzimas pode-se utilizar dois métodos, a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido. Na fermentação submersa a cultura estoque a ser utilizada é cultivada em frascos contendo meio de crescimento e mantidos em agitação até atingir a fase de crescimento exponencial. Este tipo de fermentação é bastante utilizado devido a facilidade de crescimento dos micro-organismos em

condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (Feitosa, 2009).

Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Aspergillus* spp. quanto à produção de proteases.

Material e métodos

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram testadas 11 amostras de fungos filamentosos, estocados na Coleção de Fungos da Amazônia - CFAM. Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório multiusuário em saúde/Micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ Amazônia.

Reativação das culturas preservadas

As culturas fúngicas foram repicadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Extrato de Malte- Ágar (MEA) e mantidos à 28 °C, em incubadora tipo BOD, durante sete dias, para reativação, verificação da pureza e realização dos testes.

Condições de cultivo para produção de enzima

Os testes foram realizados segundo a metodologia descrita por Manachini *et al.* (1987). Inicialmente, 1mL da suspensão de esporos na concentração de 5×10^6 dos isolados serão transferidos para frascos erlenmeyer contendo 30mL da solução de Manachini suplementado com gelatina à 0,5% com a finalidade de estimular a secreção da enzima em questão. Esses meios foram mantidos à 120 rpm por 96 horas a 28 °C em agitador orbital. Após esse período, a massa micelial foi separada do extrato enzimático por filtração a vácuo em sistema de milipore, e o filtrado obtido foi utilizado nos testes de atividade enzimática. Cada isolado foi individualmente testado para secreção de proteases.

Avaliação qualitativa em meio sólido

Após o período de crescimento celular e separação da massa micelial, aproximadamente 150 µL dos extratos enzimáticos foram inoculados nas placas de Petri contendo o meio ágar gelatina à 5% suplementado com leite desnatado à 5%, onde foram feitas perfurações circulares (técnica de “cup plate”), com diâmetro de 1cm. As

placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 18 a 24 horas. Os extratos enzimáticos foram avaliados qualitativamente, onde a produção enzimática foi avaliada pela formação de halos determinados em mm. Não foi necessária adição de revelador, uma vez que a hidrólise da caseína do leite pode ser percebida, pelo halo incolor, ao redor do ponto de aplicação do filtrado.

Determinação da Atividade de proteolítica

A atividade de protease foi determinada utilizando-se caseína como substrato, como descrito por Fleuri & Sato (2008). A mistura de reação contendo 1,5 mL de solução 2,0% de caseína; 1,0 mL de tampão fosfato 0,15 M, pH 7,5 e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada a 30 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3,0 mL de solução a 0,4 M de ácido tricloroacético (TCA), seguida de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 4000 rpm. A absorbância do filtrado foi determinada a 280 nm, sendo uma unidade de atividade definida como aquela capaz de aumentar em uma unidade a absorbância do filtrado, nas condições do ensaio. Foi preparado um tubo branco para cada amostra, com a adição de TCA antes da adição da enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Fleuri & Sato 2008).

Resultados

Durante o processo de reativação e autenticação nos 11 isolados de *Aspergillus* spp. em meio Extrato de Malte-Ágar (MEA) estocados na Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM, foi possível observar suas características morfológicas e fisiológicas, como a coloração e tamanho da colônia, textura e tamanho de conídios e conidióforos. Verificou-se que 100% dos isolados mantiveram suas características morfofisiológicas após o período de 11 a 15 anos de conservação em água destilada.

Quanto aos resultados obtidos acerca da atividade proteolítica pela técnica de “cup plate” (protease qualitativa) foi possível observar que todos os isolados apresentaram halos translúcidos ao redor do “cup plate”, com diâmetros variando de 1 a 7 mm, o que indicam bons índices enzimáticos para a enzima testada, destacando-se o isolado *Aspergillus niger* (CFAM, 0240) com 7 mm. Observou-se que a atividade proteolítica variou entre os indivíduos da mesma espécie, sendo estes capazes de degradar a caseína presente no meio sólido. Características de produção de proteases por esses isolados também similares aos obtidos em estudos realizados por Yadav

(2015), que caracterizou uma serina protease alcalina obtida a partir de *A. flavus* (MTCC 9952).

Já na avaliação quantitativa observamos que houve uma variação da atividade proteolítica, com valores variando de 8,09 U/ml (*A. japonicus* CFAM 0240) a 22,49 U/ml (*A. oryzae* CFAM 0540), o que demonstra que a produção de proteases pode variar entre fungos de espécies diferentes, em que algumas se destacam em relação às outras (figura 1).

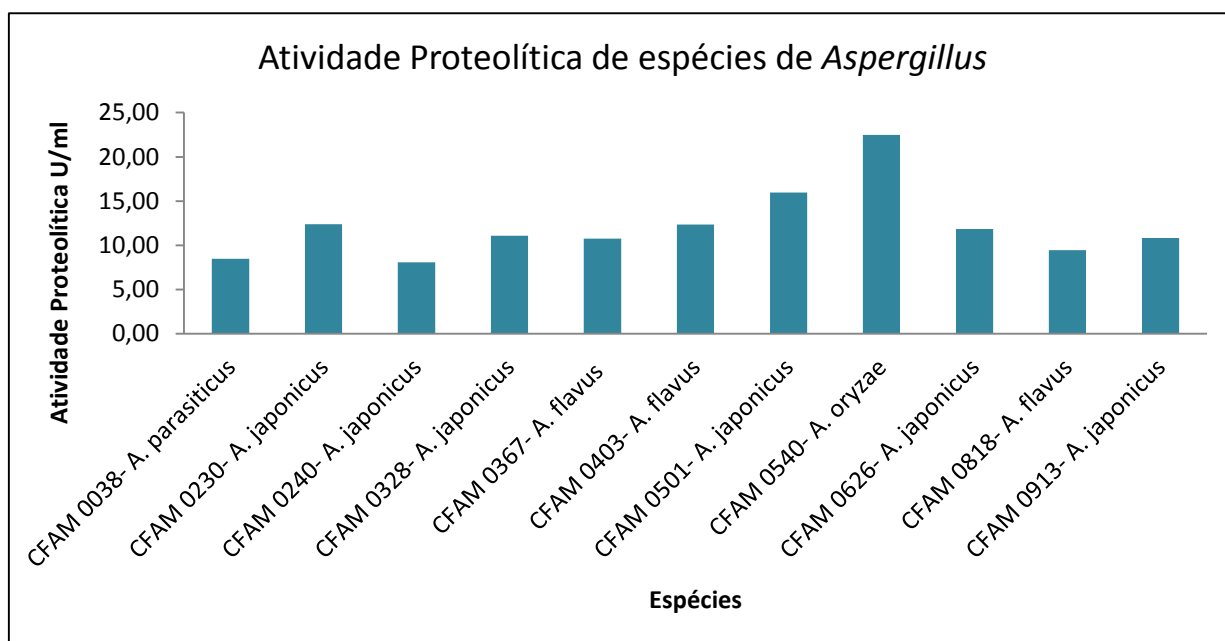


Figura 1. Atividade proteolítica (U/mL) de *Aspergillus* spp. por fermentação submersa

Discussão

Os resultados obtidos em nossos estudos acerca da autenticação mostraram que as culturas estudadas mantiveram as suas características peculiares de acordo com Monteiro (2012), que também avaliou as características macro e micromorfológicas do gênero *Aspergillus* spp, sendo que estes foram isolados de solo preservado do cerrado. Provavelmente, a predominância da viabilidade das culturas esteja relacionada à ausência de subcultivo, a idade do inóculo e à permanência do micélio em estado de latência, condições as quais auxiliam na diminuição de mutações (Silva *et al.*, 2010).

Com base na análise proteolítica qualitativa nota-se que *Aspergillus* é um produtor significativo da enzima estudada, sendo estas muito utilizadas na indústria, devido apresentarem atividade em uma ampla faixa de pH e temperatura e uma única espécie pode produzir proteases neutras, ácidas ou alcalinas, como é o caso de *Aspergillus oryzae* (Inácio, 2014; Said e Pietro, 2004).

Nos dados quantitativos, o valor máximo de atividade proteolítica foi observado em *A. oryzae* CFAM 0540: 22,49 U/ml, valor, acima dos encontrados por Murthy & Kusumoto (2015) que avaliaram a produção de proteases na espécie de *A. oryzae* RIB40 (ATCC 42149) em fermentação em estado sólido utilizando pó de polpa de batata como substrato. Em outro estudo feito por Shirasaka *et al.* (2012), ao avaliar a espécie *A. oryzae* KSK-3 obtiveram produção de proteases de 2,96 U/ml, este foi submetido à fermentação em meio GYP, onde a protease encontrada apresentou ação fibrinolítica e indicada para tratamento fibrinolítico de uso oral e aplicações nutraceuticas. Isso demonstra que a atividade proteolítica pode variar entre fungos da mesma espécie, dependendo da metodologia e condições de cultivo utilizadas.

Conclusão

O Brasil, hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, além de apresentar um uso ainda reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado com outros países. Assim, a inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática faz-se necessário. Estudos como este contribuem para opção de obtenção de enzimas de cepas de *Aspergillus* oriundas da região amazônica e que futuramente poderão ser alternativa às enzimas importadas.

Referências

- Bon EPS, Ferrara MA, Carmo ML (2008) Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: *Interciencia*: 433-488.
- Feitosa IC (2009) Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. Sergipe, Brasil, 104p. (Dissertação), Mestrado em Engenharia de processos, Universidade Tiradentes.
- Fleuri LF, Sato HH (2008) Study of different parameters in the production of Lytic enzymes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28: 299-310.
- Haq IU, Mukhtari H, Umber H (2006) Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. *J. Agricult. Soc. Sci.* 2:23-25.
- Inácio FD, Ferreira RO, Araujo CAV, Brugnari T, Castoldi R, Peralta RM, Souza CGM (2014) Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. *Biomed Research International*. 1-10.
- Manachini PL, Fortina MG, Parini C (1987) Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters* 9: 219-224.
- Monteiro MCP (2012) Identificação de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. Minas gerais, Brasil, 76p. (Dissertação) Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras, UFLA.
- Murthy PS, Kusumoto Ken-Ichi (2015) Acid protease production by *Aspergillus oryzae* on potato pulp powder with emphasis on glycine releasing activity: A benefit to the food industry. *Food and Bioprocess Technology*. 96: 180-186.
- Said D, Pietro RCLR (2004) Enzimas como agentes biotecnológicos. *Legis Summa*, Ribeirão Preto, Brasil. 412p.
- Shirasaka N, Naitou N, Okamura K, Kusuda M, Fukuta Y, Terashita T (2012) Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. *Mycoscience* 53: 354–364.
- Silva JC, Fernandes OCC, Martins MS, Rodrigues Jr AC, Teixeira MFS (2010) Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 30: 48-54.
- Sumantha A, Larroche C, Pandey A (2006) Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology* 44: 211–220.
- Yadav SK, Bisht D, Tiwari S, Darmwal NS (2015) Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from

Aspergillus flavus MTCC 9952 mutant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*: 667-677.

Yin C, Zheng L, Chen L, Tan Q, Shang X, Ma A (2014) Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172: 2119–2131.

Zimmer KR, Borré GL, Trentin DS, Woicickoski Jr C, Frasson AP, Graeff AA, Gomes P, Macedo AJ (2009) Enzimas Microbinas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato* 10: 123-137.

Bactérias lácticas e sua importância na indústria de alimentos e saúde: Uma revisão

Lima AKO¹; Taube Júnior PS²

¹Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. ²Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. E-mail: kelbislima@gmail.com, pstjunior@yahoo.com.br

Resumo

Sem compreender, o ser humano produz culturas naturais altamente resistentes contra a ação de patógenos alimentares e contribui para a sustentação da saúde humana. As bactérias ácido-lácticas (BAL) estão envolvidas nesse estágio produzindo substâncias que agem contra o ataque de patógenos e possuem importância na gênese de alimentos conservados. Os produtos fermentados vêm utilizando estas bactérias de forma eficaz e adquirindo menos efeitos nocivos. Através desse processo são formados microrganismos que atenuam o tempo de fermentação dos alimentos inibindo o crescimento de deteriorantes e formando produtos menos tóxicos à saúde. Por meio de pesquisa bibliográfica, observou-se o interesse de pesquisadores e consumidores na busca de alimentos processados que exprimissem segurança e a partir da utilização de bactérias lácticas e sua incontestável relevância para a obtenção de produtos de melhor qualidade, custo e validade conclui-se que estudos aprofundados sobre o tema são necessários para o emprego de pesquisas em torno da aplicação das BAL em diversas novas classes de alimentos.

Palavras-chave: bactérias ácido-lácticas, bacteriocinas, alimentos fermentados.

Introdução

Desde que os antibióticos passaram a ser utilizados em larga escala, bactérias começaram a desenvolver capacidade de resistência (Martinez e Baquero, 2000). A contaminação de alimentos por microrganismos patogênicos é um problema sério uma vez que causa grandes índices de morbidade (Jay, 2000). De acordo com Dias et al. (2008), microrganismos com propriedades antimicrobianas são utilizados como conservantes naturais e tem como vantagem a inibição do desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas sem o uso de substâncias indesejáveis.

As bactérias ácido-lácticas (BAL) são consideradas o maior grupo de bactérias com ação probiótica (Collins *et al.*, 1998) e apesar de serem aerotolerantes são bactérias características de ambientes anaeróbios e suportam valores de pH muito baixos, porém a tolerância à acidez é variável entre as estirpes. Segundo Axelsson (1993), elas são cocos ou

bastonetes gram-positivos, não esporogênicos, fermentadores e produtores de ácido lático como resultado final da fermentação, apresentando metabolismo e características fisiológicas semelhantes. Ocorrem na microbiota normal após o processamento de alimentos e suas atividades metabólicas contribuem para inibir ou retardar a multiplicação de bactérias patogênicas ou deteriorantes (Chesca *et al.*, 2009).

O potencial antagônico que promove biopreservação conferido às bactérias lácticas deve-se a produção de enzimas bacteriolíticas, subprodutos da via metabólica e entre elas destacam-se as bacteriocinas (Pereira e Gomez, 2007). Trata-se de um peptídeo antimicrobiano que apresenta atividade antimicrobiana sobre um amplo espectro de bactérias (Benech *et al.*, 2002).

Esta revisão reúne diversos trabalhos publicados que retratam o cenário da história, aplicação e benefícios das bactérias lácticas na indústria alimentícia, além da sua relação no tratamento e prevenção de doenças através da conservação e posterior ingestão de alimentos livres de contaminação e tem como finalidade revisar de forma sistêmica as referências disponíveis, investigar e analisar a utilização das BAL na melhoria na qualidade de vida das pessoas.

Material e Métodos

Para esse estudo de revisão da literatura foram realizadas pesquisas em diversas bases eletrônicas de dados, entre elas: Portal FAPESP, CAPES, Elsevier, Lilacs, Pubmed, SCIELO e SCIENCE DIRECT usando os seguintes descritores: ácido lático, *lactic acid bacteria* e bactérias lácticas. Ao final da pesquisa foram selecionados artigos científicos publicados em revistas, anais de congressos, além de capítulos de livros, teses, dissertações e monografias. Os assuntos mais procurados nesses trabalhos consultados eram aqueles que focavam a relação direta da produção e conservação de alimentos, principalmente os fermentados, a partir da utilização de bactérias ácido-lácticas e suas substâncias, tais como as bacteriocinas e também o alcance desse grupo de microrganismos na saúde humana a partir da ingestão de alimentos minimamente processados. Buscou-se entender os processos antigos e atuais que levaram ao uso, impactos, benefícios, custos e perspectivas dessas bactérias como método biológico eficiente para melhorar a condição dos alimentos provenientes de origens fermentadas. Esta revisão bibliográfica reúne opiniões de vários autores e de seus estudos para os mais diversos fins sobre a produção e utilização de bactérias ácido-lácticas.

Resultados e Discussão

Utilizar microrganismos com propriedades antimicrobianas para conservar alimentos tem como vantagem a inibição do desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas sem o uso de substâncias indesejáveis (Dias *et al.*, 2008).

As bactérias ácido-láticas (BAL) compõem um importante grupo de alimentos funcionais definidos como suplementos alimentares que ao serem ingeridos apresentam benefícios sobre a saúde do hospedeiro (Sanders, 2003). Dentre os possíveis mecanismos de ação estão a síntese de substâncias microbianas contra bactérias patogênicas, a competição por nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos patogênicos e a inativação de suas toxinas e seus receptores (Matsumoto *et al.*, 2005; Pant *et al.*, 2007). O interesse pelos efeitos benéficos à saúde promovidos pelas bactérias com características probióticas tem provocado um aumento mundial nas vendas de produtos alimentícios contendo esses microrganismos (Araújo, 2007).

Duarte *et al.* (2013), concluíram que essas bactérias são capazes de inibir o crescimento de estirpes patogênicas, com cepas da mesma espécie, conferindo especificidade e o gênero *Lactobacillus* é, com certeza, o mais amplo dos gêneros incluídos nesse grupo e são amplamente distribuídos na natureza.

Esse grupo de bactérias está presente na natureza, principalmente no leite e também habitam os tratos digestivo, respiratório e urogenital dos animais (Hove *et al.*, 1999). Um dos principais metabólitos produzido por elas é o ácido lático e ele é o responsável por diminuir o pH do meio e isso seria o suficiente para diminuir o efeito de inibição sobre muitos microrganismos (Redondo, 2008)

Devido à grande importância econômica das bactérias lácticas para a indústria de fermentação, os estudos sobre a fisiologia, bioquímica, genética e biologia molecular desses microrganismos tiveram um avanço significativo, o que levou à detecção de outros compostos que ocasionam o fenômeno da antibiose, como as bacteriocinas (Davidson e Hoover, 1993). Em geral são pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas e hidrofóbicas, apresentam de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, alto ponto isoelétrico e variam quanto ao organismo produtor, espectro de ação, peso molecular e propriedades bioquímicas (Verheul *et al.*, 1997)

Seu mecanismo de ação das bacteriocinas é complexo sendo que geralmente atuam destruindo a integridade da membrana citoplasmática pela formação de poros, o que provoca a perda de pequenos compostos e íons. Aparentemente, as bacteriocinas se ligam à membrana

plasmática por meio de ligações eletrostáticas com fosfolípidios carregados negativamente (Montville e Chen, 1998).

A atividade dessas proteínas no alimento pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo, a mudança na solubilidade e carga eletrostática, ligação aos componentes do alimento, inativação por proteases e mudanças morfológicas no organismo alvo (Ganzle *et al.*, 1999).

A natureza química das bacteriocinas faz com que essas substâncias sejam facilmente degradadas no trato gastrointestinal do homem e animais, muitas vezes perdendo sua toxicidade (Piard *et al.*, 1992). De acordo com Marugg (1991), estudos realizados com várias bacteriocinas mostraram que elas não são tóxicas nem provocam reações imunológicas adversas e, por isso, possuem grande potencial como conservadores naturais nos alimentos.

Conclusões

Com isso, a aplicação de bactérias ácido-láticas para uso no processo de melhoramento e conservação de produtos da classe dos fermentados demonstra-se eficaz. Mesmo com avanços, sob aspectos futuros é importante a realização de novos trabalhos buscando aprofundar os conhecimentos a respeito da aplicação das bactérias lácticas como agentes conservadores de alimentos para preencher lacunas ainda existentes.

Referências

- Araújo EA (2007) Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e de Inulina. Viçosa, Brasil, 67p. (Dissertação). Mestrado em Tecnologia de Alimentos. UFV.
- Axelsson L (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In*: Salminen, S., Wright, A.T., Ouwehand, A. (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, New York, USA, 1-66.
- Benech, RO, Kheadr EE, Laridi R, Lacroix C, Fliss I (2002) Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by *in situ* production in mixed culture. *Appl Environ Microbiol*, 68:3683-3690.
- Chesca, AC, Castro HKD, Silveira MD, D'Angelis CEM (2009) Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo de baixa umidade frente a *Staphylococcus aureus* ATCC6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC7644. *Hig Aliment*, 23:123-128.
- Collins JK, Thornton G, Sullivan GO (1998) Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J*, 8:487-490.

- Davidson PM, Hoover DG (1993) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *In: Salminen, S., Wright, A.T., (eds). Lactic Acid Bacteria. Moscow, USA, 127-159.*
- Dias PA, Steurer K, Zonta MN, Timm CD (2008) Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de *kefir* contra *Staphylococcus aureus*. 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado, RS.
- Duarte MCKH, Cortez NMDS, Cortez MAS, Franco RM (2013) Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpe patogênica. *Enciclopédia Biosfera, 9:25-36.*
- Ganzle MG, Weber S, Hammes WP (1999) Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int J Food Microbiol, 46:207-217.*
- Hove H, Nørgaard H, Mortensen PB (1999) Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *Eur J Clin Nutr, 53:339-350.*
- Jay JM (2000) Modern food microbiology. London: Aspen Publ.
- Martinez JL, Baquero F (2000) Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother, 44:1771-1777.*
- Marugg JD (1991) Bacteriocins, their role in developing natural products. *In: Dekker M. (eds). Food Biotechnol, New York, USA, 305-312.*
- Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, Suzuki A, Sata M (2005) Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol, 140:417-426.*
- Montville TJ, Chen Y (1998) Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl Microbiol Biotechnol, 50:511-519.*
- Pant N, Marcotte H, Brussow H, Svensson L, Hammarstrom L (2007) Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. *BMC Microbiol, 7:86-94.*
- Pereira VG, Gómez RJHC (2007) Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus* contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciências Agrárias, 28:229-240.*
- Piard JC, Muriana PM, Desmazeaud MJ, Klaenhammer TR (1992) Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl Environ Microbiol, 58:279-284.*
- Redondo NC (2008) Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416. Araraquara, Brasil, 109p. (Dissertação). Mestrado em Alimento e Nutrição. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP).
- Sanders ME (2003) Probiotics: considerations for human health. *Nutrit Reviews, 61:91-100.*

Verheul A, Russell NJ, Hof RV, Rombouts FM, Abee T (1997) Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. Appl Environ Microbiol, 63:3451-3457.

Enzimas extracelulares de *Aspergillus* e *Penicillium* conservados na Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM

Lima A.K.S.¹, Torres D.R.¹, Fernandes O.C.C.¹, Silva J.C.¹, Mendes L.², Araújo C.P.M.²

¹-Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ. ²- Universidade – Faculdade Estácio do Amazonas. E-mail: ofernandes@amazonia.fiocruz.br

Os microrganismos, como fontes de recursos renováveis atreladas às vantajosas características microbianas, tem sido alvo de constantes investigações em função do seu potencial biotecnológico, como produção de enzimas extracelulares, catalisadoras naturais e não tóxicas ao meio ambiente. Este estudo avaliou enzimas extracelulares de 30 culturas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* conservados na Coleção de Fungos da Amazônia. As culturas foram reativadas em meio seletivo e incubadas a 28 °C por sete dias. Na indução enzimática foi utilizado meio líquido solução de Manachini suplementado com os respectivos substratos indutores e após o processo de fermentação, os extratos foram filtrados a vácuo e submetidos a avaliação qualitativa em meio sólido específico: ágar celulose, ágar lipase, ágar amido e ágar leite acrescentado 5% de gelatina e incubadas a 28 °C por 24 horas para avaliação da capacidade de produção das enzimas. A detecção da atividade enzimática baseou-se na observação de um halo formado ao redor das colônias. Das 30 amostras selecionadas para o estudo, 80% (24) mostraram-se viáveis após o processo de reativação e destas, 91,6% (22) apresentaram halo de degradação nos ensaios enzimáticos para pelo menos uma das enzimas estudadas, sendo que 27,2% (06) das culturas apresentaram halo de degradação para todas as enzimas. Com este estudo observa-se que as culturas mostraram-se promissoras para a produção de enzimas extracelulares de interesse industrial.

Palavras-chaves: Fungos Filamentosos, Água, Enzimas, Amazônia.

Introdução

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e menor consumo energético, já que as enzimas são biodegradáveis e, sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis. São importantes insumos intermediários nas indústrias químicas, alimentares, têxteis entre outras. Apresentam maior interesse, aquelas obtidas a partir de

micro-organismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos e um maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais (Orlandelli *et al.*, 2012; Rocha, 2010; Chandra *et al.*, 2010).

Dentre os fungos produtores de enzimas extracelulares, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, mesmo apresentando uma especificidade de degradação de alimentos, biodeterioração e patogenicidade ao homem e animais, estão sendo muito utilizados nas aplicações biotecnológicas devido às suas propriedades metabólicas, sendo fontes de produção de diversas enzimas de interesses orgânicos, antibióticos e micotoxicológicos (Tavares *et al.*, 2012).

Dentre as enzimas produzidas por estes gêneros estão as lipases, que apresentam múltiplas aplicações nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos, biodiesel e também no tratamento de efluentes; as celulases, utilizadas na indústria têxtil e de papel/celulose e na produção de bioetanol de segunda geração; as amilases, aplicadas nas indústrias de panificação, têxtil, farmacêutica, laticínios e sucroalcooleira e as proteases, que apresentam larga aplicação em produtos industriais e domésticos, além de possuírem grande aplicação farmacêutica devido ao potencial fibrinolítico destas enzimas, sendo usadas no tratamento da trombose (Singh *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Doolotkeldieva e Bobusheva, 2011).

Diante a importância industrial das enzimas, este trabalho avaliou o potencial de produção de enzimas extracelulares de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* conservados na Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM.

Material e métodos

Foram selecionadas 30 amostras fúngicas dos gêneros *Aspergillus* (CFAM 0158, 0555, 0161, 0540, 0701, 0115, 0034, 0143, 0052, 0148, 0131, 0006, 0004 e 0160) e *Penicillium* (CFAM 0180, 0059, 0061, 0250, 0271, 0991, 0021, 0134, 0065, 0510, 0105, 0047, 0190, 0290, 0155 e 0289) conservadas em blocos de gelose na Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM, da FIOCRUZ Amazônia - ILMD.

Reativação das culturas preservadas

As amostras testadas foram reativadas em placas de Petri contendo Ágar Extrato de Malte – MEA e mantidas em estufa de crescimento, do tipo BOD, a 28 °C por sete dias.

Para a indução enzimática foi utilizado meio líquido solução de Manachini suplementado com o substrato indutor para cada enzima. Em Erlemayer de 25mL contendo 10mL da solução de Manachini e seus respectivos substratos indutores, foram inoculados 1mL da suspensão de esporos na concentração de 5×10^6 . A fermentação líquida ocorreu nas seguintes condições: 120 rpm por 96 horas a 28 °C.

Após o período de fermentação, os cultivos foram filtrados a vácuo e o extrato enzimático foi avaliado qualitativamente em meio sólido específico para cada enzima, ágar celulose, ágar lipase, ágar amido e ágar leite acrescentado de 5% de gelatina. (Teixeira *et al.*, 2011), onde a produção enzimática foi avaliada pela formação de halos determinados em mm e incubadas a 28 °C, em BOD, por cinco dias. Para a visualização do halo de degradação da atividade enzimática do amido foi utilizado vapor de iodo. Para visualização do halo de degradação para celulase foi utilizada a solução de vermelho do congo 0,1% (p/v) e NaCl 1M. Para a lipase foi observada a formação de cristais em torno das colônias (Teixeira *et al.*, 2011) e para a protease, foi observada a formação de halo translúcido. Foram consideradas potenciais produtoras de enzimas, as culturas que apresentaram as características descritas para cada avaliação enzimática.

Resultados e discussão

Das 30 amostras selecionadas para o estudo, 80% (24) mostraram-se viáveis após o processo de reativação e destas, 91,6% (22) apresentaram halo de degradação para pelo menos uma das enzimas estudadas, sendo que 27,2% (06) das culturas apresentaram halo de degradação para todas as enzimas estudadas, sendo elas: *Penicillium fellutanum* CFAM 0061, *Aspergillus niger* CFAM 0161, *Penicillium* sp. CFAM 0290, CFAM 0289 e CFAM 0180 e *P. fellutanum* CFAM 0059, com halos variando de 1 a 2mm para proteases, 1 a 3mm para amilases, 2 a 5mm para celulases e 1 3mm para lipases (Figura 1).

Nos testes de lipases observou-se que 81,8% (18) das culturas apresentaram resultado positivo, sendo quatorze (14) pertencentes ao gênero *Penicillium*.

Nos ensaios de proteases, 68,1% (15) das culturas apresentaram resultado positivo com formação de halo de degradação, variando de 1mm (*Penicillium* sp. CFAM 0179, CFAM 0155 e CFAM 0289) a 5mm (*A. niger* CFAM 0158).

Nos testes de amilases, 54,5% (12) das culturas apresentaram halo de degradação variando de 2mm (*Penicillium* sp. CFAM 0290 e CFAM 0289; *P. fellutanum* CFAM 0061) a 16mm (*A. sydowii* CFAM 0115).

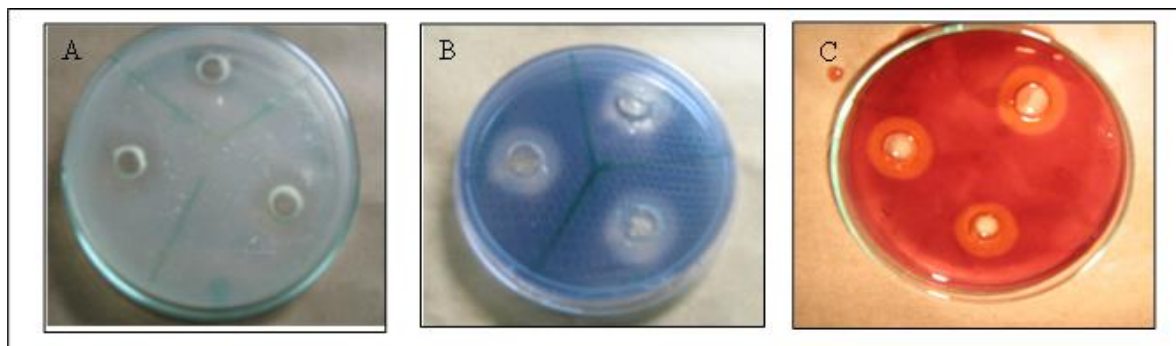


Figura 1. (A) *Penicillium* sp. produtor de proteases; (B) *Aspergillus sydowii*; produtor de amilases e (C) *Penicillium* sp. produtor de celulases.

E nos ensaios de celulases, 54,5% (12) das culturas apresentaram halo de degradação entre 1,5mm (*P. citrionigrum* CFAM-0105, *A. niger* CFAM-0158, *P. rugulosum* CFAM-0250) a 5mm (*Penicillium* sp. CFAM-0289) para doze (Figura 2).

Pereira (2012) avaliou o potencial de produção de celulases para fungos de vários gêneros isolados do solo, dentre estes, representantes dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Foi observado por estes autores, a variação de produção entre os gêneros e também entre espécies do mesmo gênero, conforme também foi observado neste estudo. Esses autores encontraram, usando *A. niger* e *Penicillium* sp., halos com tamanhos maiores dos encontrados neste estudo. Com isolados de *P. rugulosum* e *P. fellutanum*, Ruegger e Tornisielo (2004) não encontraram produção de enzimas celulolíticas.

De acordo com Messias *et al.* (2011), as lipases podem ser produzidas por diferentes micro-organismos, tais como *A. niger*, *A. oryzae* e *P. citrinum*, corroborando com os resultados obtidos neste estudo, com exceção de *Aspergillus oryzae* que não apresentou produção da enzima.

Silva *et al.* (2013) destacam o gênero *Aspergillus* spp como produtores de proteases, assim como o gênero *Penicillium* sp. Desta forma, os resultados encontrados no presente estudo são corroborados com os dados da literatura, visto que as diferentes espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* utilizadas foram produtoras de proteases.

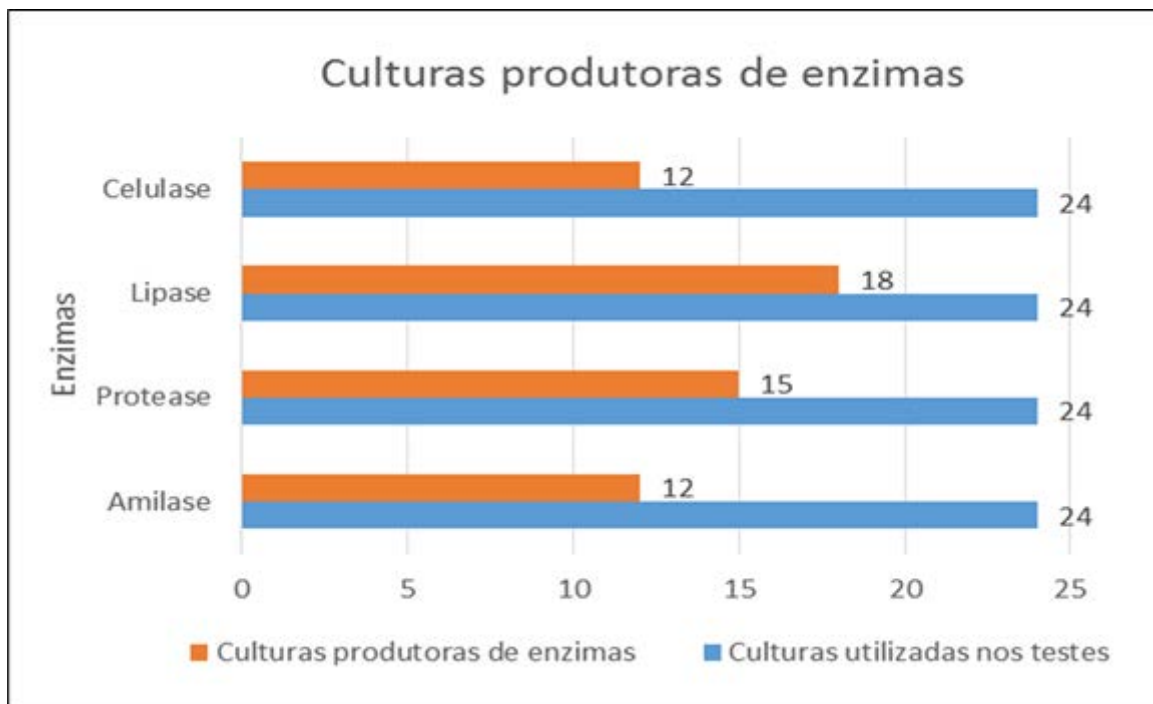


Figura 2. Total de culturas produtoras de enzimas.

Segundo a literatura e dados apresentado por Souza et al. (2010), o gênero *Aspergillus* apresenta-se promissor na produção de amilases e os resultados obtidos confirmam esses resultados, já que das oito amostras, seis apresentaram positividade nos testes e o *Aspergillus sydowii* CFAM 115 apresentou o maior halo de degradação.

Conclusões

Cepas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentam-se promissoras para a produção de enzimas extracelulares de interesse industrial, com destaque para a produção de lipases e celulasas. São recomendados ensaios mais específicos, a fim de quantificar a atividade enzimática e otimizar a produção enzimática, podendo ser estudados substratos alternativos, de baixo custo, a fim de reduzir os custos com a produção das enzimas.

Referências

Castro MA, Pereira Jr N (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova* 33: 181-188.

Chandra M, Kalra A, Sharma PK, Kumar H, Sangwan RS (2010) Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. *Biomass and Bioenergy* 34:805-811.

Doolotkeldieva TD, Bobusheva ST (2011) Screening of Wild-Type Fungal Isolates for cellulolytic Activity. *Microbiology Insights* 4: 1–10.

Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL (2013) Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters* 587:1155–116.

Messias JM, Costa BZ, Lima VMG, Giese EC, Dekker RFH, Barbosa AM (2011) Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina 213-234.

Orlandelli RC, Specian V, Felber AC, Pamphile JA (2012) Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *Sabios Revista de Saúde e Biologia*.

Pereira VM (2012) avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen). Universidade Federal de Lavras /UFLA.

Rocha CP (2010) Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Ruegger MSJ, Tauk-tornisielo MS (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 27: 205-211.

Singh S, Singh S, Bali V, Sharma L, Mangla J (2014) Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry. Department of Biotechnology and Biosciences, Lovely Professional University, Punjab, India.

Souza PM, Magalhães PO (2010) Application of microbial α -amylase in industry: A review. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 850-861.

Tavares ACD, Fonseca JS, Fonseca TRB, Barroncas JF, Souza RAT, Silva TA, Teixeira MFS (2012) Enzimas Extracelulares de Fungos Anamórficos Isolados de *Morinda citrifolia* L. Universidade Federal do Amazonas – Faculdade de Biotecnologia. Manaus-AM. BBR - *Biochemistry and Biotechnology Reports* 5433: 2316-5200.

Teixeira MFS, Silva TA, Palheta RA, Carneiro ALB, Atayde HM (2011) Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas). Manaus-AM: Edua 255: 142-143.

Produção de etanol a partir de meio de cultura hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Maciel MJM¹, Farias JA², Silva IR², Souza FRF², Procópio REL²

¹ Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, ²Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, Manaus, AM. Emails: marciajaque7@gmail.com, saraaraujo.farias@gmail.com, ingridreis.alvrinho@hotmail.com, flavia.cba@suframa.gov.br, procopio@usp.br

Resumo

O bagaço da cana-de-açúcar é um dos resíduos advindos da intensa atividade das indústrias da cana-de-açúcar sendo o Brasil destaque mundial no uso de energias renováveis. Para conversão do açúcar do bagaço de cana em etanol são utilizadas as leveduras desde a antiguidade. As leveduras utilizadas no trabalho foram a *Pichia stipitis*, a CBAFB07 e CBAFB09. O meio de cultura líquido utilizado foi o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar a 50%. Cada levedura foi inoculada no período de 10 dias em 3 litros de meio líquido, no fermentador BIOFLO 110, para verificar a produção de etanol foram retiradas alíquotas de 100 ml a cada 24 horas, e para verificar o crescimento das leveduras, elas foram crescidas em meio ágar sabouraud no intervalo de 12 horas até 96 horas. A produção de etanol foi verificada, e desde o primeiro dia foi obtido álcool, a levedura CBAFB09 apresentou maior produção no quarto dia com 5,7% em comparação com as outras leveduras. No crescimento em placas de Petri a levedura *Pichia stipitis* foi a que apresentou o maior crescimento em 48 horas de incubação.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano, fermentação, biocombustível.

Introdução

O Brasil possui uma ampla diversidade de ecossistemas, devido à sua extensão, possui diferentes habitats, assim como muitas espécies de animais, plantas e micro-

organismos. A região amazônica ainda abriga espécies desconhecidas, dentre eles algumas espécies de fungos, que se reproduzem com grande facilidade nesta área (Bruce *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.* 2012).

Os fungos são seres heterotróficos, eucariontes, que se alimentam de matéria morta, sendo muito importantes para o ambiente por decomporem matéria orgânica, ajudando na ciclagem de nutrientes. Além de serem ubíquos, encontrando-se em animais, solos e plantas. Eles podem ser unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares, como os fungos filamentosos (Womack *et al.* 2015; Souza *et al.* 2004). Os fungos têm sido muito utilizados na Biotecnologia, por serem capazes de degradar diversos resíduos agroindustriais, gerando produtos diversos como o etanol, por exemplo.

O Brasil gera diversos resíduos agroindustriais. Entre estes, o bagaço de cana-de-açúcar é predominante com relação a outros países. Ele também gera outros resíduos agroindustriais como palha de cana-de-açúcar, palha de soja, palha de arroz e sabugo de milho (Sarrouh *et al.* 2014).



Fig. 1. Cana-de-açúcar e seu bagaço triturado

Os resíduos agroindustriais, fontes renováveis de carbono e energia, têm sido objeto de intensa pesquisa, para a produção de alimentos, forragens, químicos, além de combustíveis líquidos.

A biotecnologia industrial tem sido considerada uma das rotas mais promissoras para sustentabilidade das atividades industriais. Utilizar leveduras da microbiota amazônica capazes de crescer em meio de cultura contendo hidrolisado ácido do bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono e verificar a capacidade de produção de etanol dessas leveduras utilizando o bagaço de cana-de-açúcar foram os objetivos deste estudo.

Material e métodos

As leveduras utilizadas foram a *Pichia stipitis*, como padrão, e a CBAFB07 e CBAFB09, que são leveduras selvagens isoladas de fezes de bovinos. As leveduras foram crescidas em meio de extrato de levedura por 48 horas. O meio de cultura líquido utilizado foi o meio de cultura de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, que foi feito utilizando a proporção de 50 g de bagaço seco de cana-de-açúcar adicionando 250 ml de ácido sulfúrico a 1%, a mistura foi deixada em repouso por 24 horas, autoclavada por 40 minutos. O bagaço foi prensado e neutralizado com NaOH, até chegar ao pH 5, depois a mistura foi filtrada à vácuo. Para compor o meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar a 50%, foram adicionados 1,25 g/L de extrato de levedura, 1,1 g/L de KH_2PO_4 e 40 ml/L de solução de sais e ácido cítrico.

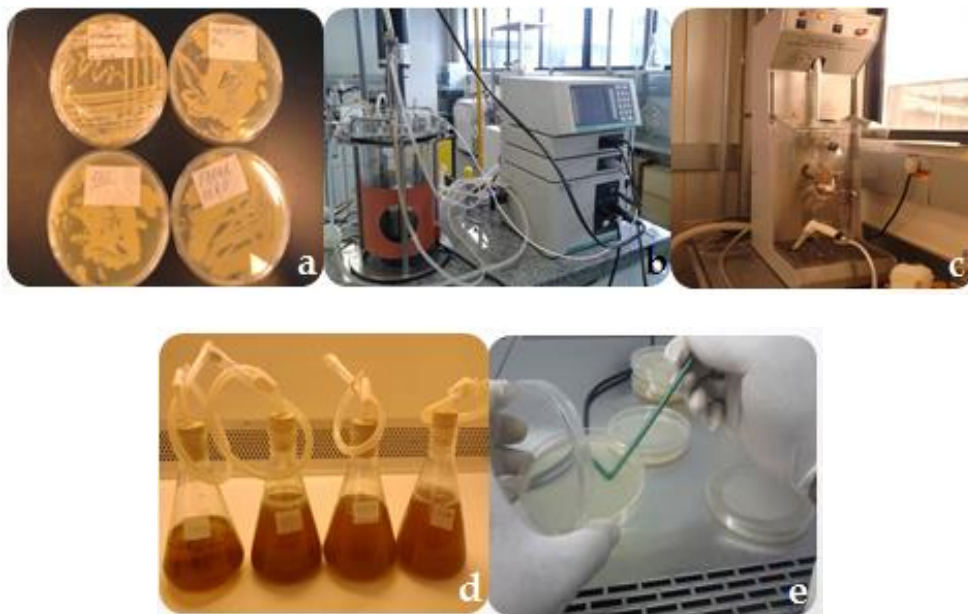


Fig 2. a) placas de Petri contendo as quatro leveduras. b) fermentador BIOFLO 110. c) alcoômetro utilizado para verificar a produção alcoólica. d) erlenmeyers contendo o meio de cultura hidrolisado de cana de açúcar. e) plaqueamento das leveduras em meio ágar sabouraud para crescimento.

Cada levedura foi inoculada no período de 10 dias em 3 litros de meio líquido, no fermentador BIOFLO 110 com béquer de 5 litros, a 35 graus celsius, 103 rpm e pH inicial 5.

Para verificar a produção de etanol foram retiradas alíquotas de 100 ml a cada 24 horas, adicionou-se 5 ml de hidróxido de cálcio e 3 gotas de antiespumante, depois foram colocadas no destilador eletrônico, as amostras foram resfriadas a 20 graus celsius para leitura no alcoômetro.

Para verificar o crescimento das leveduras, elas foram crescidas em meio ágar sabouraud no intervalo de 12 horas até 96 horas, totalizando 8 contagens, a 35 graus celsius em BOD. As placas foram feitas em triplicata, e retirada uma média da contagem delas para demonstrar o seu desenvolvimento.

Resultados e Discussão

As leveduras tiveram crescimento em todas as placas de onde se fez a média de crescimento das triplicatas, a levedura CBAFB07 foi a que teve menor crescimento, apresentando um pico somente às 24 horas com 9 UFC, e não apresentando crescimento nos outros horários verificados.

A levedura CBAFB09 teve um pico de crescimento até às 48 horas, e tendo um declínio nas próximas 12 horas, permanecendo estável nas 12 horas seguintes, e teve mais um pico de crescimento às 84 horas de incubação, mesmo assim ela cresceu em todos os horários, e apresentou picos maiores de crescimento às 48 e 72 horas.

A levedura *Pichia stipitis* foi a que apresentou o maior crescimento às 48 horas de incubação, diminuindo o crescimento nas 12 horas seguintes, apresentando o segundo pico semelhante ao primeiro às 72 horas.

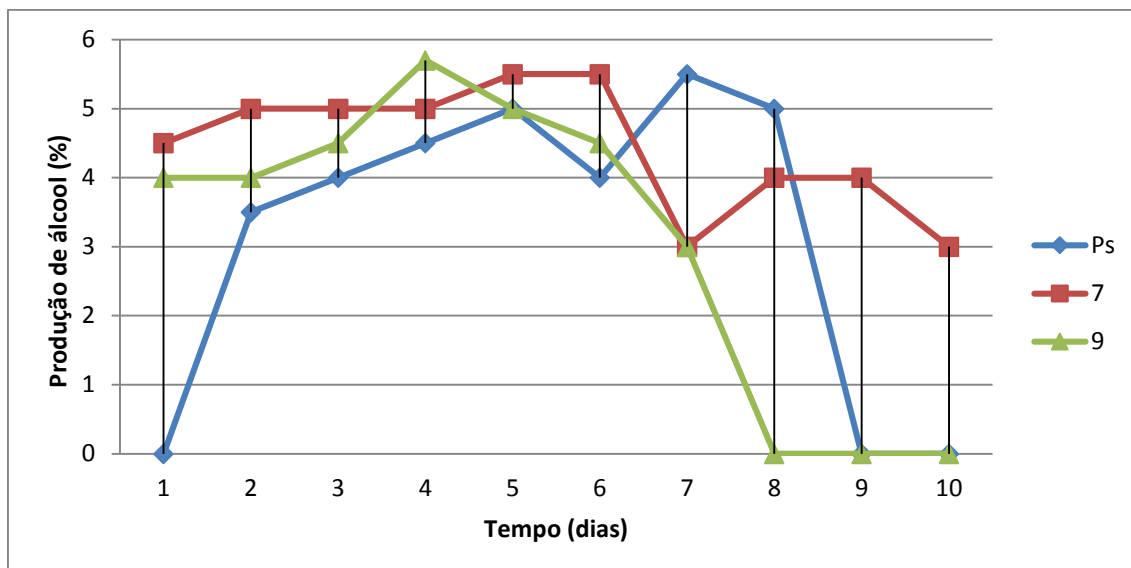


Fig. 4. Produção de álcool no período de 10 dias pelas leveduras Ps (*Pichia stipitis*), 7 (CBAFB07) e 9 (CBAFB09).

Na produção de etanol se verificou que desde o primeiro dia foi obtido o álcool, a levedura CBAFB09 se manteve estável na produção com 4% inicialmente, e apresentou maior produção no quarto dia com 5,7%, diminuindo nos dias subsequentes até chegar a 3% e não produzindo mais nos 3 dias restantes, já a levedura CBAFB07 iniciou com 4,5% de álcool e no quinto e no sexto dia teve os maiores picos de crescimento no com 5,5% de etanol produzido em ambos, caindo para 3% de produção nos dias restantes. A *Pichia stipitis* não teve produção alcoólica no primeiro dia, no segundo dia teve 3,5% de resultado, aumentando gradativamente nos dias seguintes até a sua maior produção no sétimo dia com 5,5% de etanol produzido, no dia seguinte produziu 5% de álcool, e não apresentou resultado nos dois dias finais de experimento.

A busca por mais alternativas de produção de biocombustíveis é primordial, uma vez que o uso exclusivo de combustíveis fósseis é arriscado para a população mundial, uma vez que não é um recurso renovável. A utilização do meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar propiciou o carbono necessário para o crescimento das cepas de leveduras e produção do álcool.

A reutilização deste resíduo é viável economicamente, desde que se tenha bastante material disponível. A busca por leveduras selvagens é de fundamental importância para a descoberta de mais espécies com potencial biotecnológico. A metodologia utilizada

visou a melhor produção de etanol sob as condições testadas. A temperatura ótima de fermentação das leveduras é em torno de 25 a 33 °C e o pH ótimo está entre 4,5 e 5,5 (du Preez *et al.* 1985) estando os experimentos dentro desta faixa de pH e temperatura para obtenção de melhores resultados.

De acordo com Agbogbo e Coward-Kelly (2008), a levedura *Pichia stipitis* tem sido usada na fermentação de vários tipos de biomassa pré-tratadas como, sabugo de milho, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, entre outras. Delgenes *et al.* (1988), mostrou que a levedura produziu 50 g/L de etanol inicialmente, ou seja 5%, o que corrobora com os resultados obtidos, onde se chegou à máxima de 5,7% com a levedura CBAFB09.

Estudos com a *Pichia stipitis* mostraram que o meio de cultura e seus nutrientes influenciaram o crescimento e a produção de etanol (Slininger *et al.* 2006). O crescimento das leveduras no meio de cultura ágar sabouraud, nas 96 horas de incubação foram ideais apenas para *Pichia stipitis* e a CBAFB09, sendo que a levedura CBAFB07 não obteve tanto sucesso em seu desenvolvimento, apresentando um pico em 24 horas. Este resultado nos mostra que novas análises devem ser feitas, variando a composição do meio e as influências físicas, como temperatura, pH e tempo de incubação.

Conclusão

Os problemas ambientais e de escassez de reservas energéticas no mundo mostram que soluções alternativas devem ser buscadas, e uma delas é o etanol, álcool produzido através de fermentação de açúcares por leveduras, portanto tecnologias capazes de melhorar o desempenho da produção etanólica ganham importância no país. O setor de cana-de-açúcar brasileiro é um dos maiores produtores de álcool combustível, gerando muitos resíduos da planta, o que pode ser utilizado como fonte de carbono para fermentação e produção alcoólica por micro-organismos. Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar a produção de etanol pelas leveduras selvagens e de uma levedura padrão na fermentação do bagaço de cana-de-açúcar, além do seu crescimento microbiano. Os resultados de produção alcoólica com as leveduras selvagens foram concernentes com as referências citadas, o que nos mostra que mais estudos nesta abordagem devem ser feitos, como análises cromatográficas, por exemplo.

Referências

- Agbogbo FK, Wenger KS (2008) Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett* 30:1515–1524.
- Bruce T, Castro A, Kruger R, Thompson CC, Thompson FL (2012) Microbial diversity of Brazilian biomes. *Genom Appl Dev World* 217-247.
- Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM (1988) The ethanol tolerance of *Pichia stipitis* Y7124 grown on a D-xylose, Dglucose and L-arabinose mixture. *J Ferment Technol* 66(4):417–422.
- Du Preez JC, Bosch M, Prior BA (1985) Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme Microb Technol* 8:360–364.
- Rodrigues JLM, Pellizari VH, Mueller R, Baek K, Jesus EC, Paula FS, Mirza B, Hamaoui Jr GS, Tsai SM, Feigi B, Tiedje JM, Bohannan BJM, Nusslein K (2013) Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*.110(3): 988-93.
- Sarrouh BF, Santos JC, Cunha MAA, Franco RF (2014) Potential biomass resources for cellulosic ethanol production in Brazil: availability, feedstock analysis, feedstock composition, and conversion yields. *Biof. Braz.* 97-123.
- Slininger PJ, Dien BS, Gorsick SW, Liu ZL (2006) Nitrogen source and mineral optimization enhances D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y- 7124. *Appl Microbial Cell Physiol* 72(6):1285–1296.

Produção e extração de proteases por fermentação extrativa

Martim SR¹, ¹Silva TA¹, Teixeira LS¹, Cruz-Filho R F¹, Fonseca TRB¹, Marinho NMV¹, Santos-Ebinuma, VC², Teixeira MFS¹.

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, ² Universidade Estadual Paulista-UNESP E-mails: lelacarvalho21@yahoo.com.br, salomao.martim@gmail.com; tacionadeamorim@gmail.com; lorisasimas@gmail.com; rfilho@ufam.edu.br; tamis_f@hotmail.com; nmvinhote@hotmail.com; mteixeira@ufam.edu.br

Resumo

A etapa de extração é importante passo para introduzir bioprodutos no mercado. O método de fermentação extrativa é atrativo por integrar produção e extração em uma única etapa. O objetivo deste trabalho foi avaliar fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas (SDFA)-polietileno glicol (PEG)/sais de fosfato- para produzir e extrair proteases de diferentes micro-organismos (*Actinomiceto*, *Aspergillus pulverulentus*, *Fusarium solani* e *Serratia* sp). O cultivo submerso foi realizado em agitador rotativo em sistemas compostos por PEG 4000 g/mol e fosfato de potássio. Os parâmetros de purificação determinados foram: coeficiente de partição (K) e seletividade (Se). Dentre os resultados obtidos, as proteases produzidas por *Actinomiceto*, *A. pulverulentus* e *F. solani* particionaram para a fase rica em PEG (K>1) enquanto que as proteases de *Serratia* sp para a fase pobre em PEG (K<1). Em termos de Se, as proteases que migraram para a fase PEG apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando que é possível produzir e extrair testes biocatalisadores por fermentação extrativa.

Palavras-chaves: protease, fermentação extrativa, micro-organismo, biotecnologia

Introdução

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é amplamente utilizado para purificação de biomoléculas com aplicação nos mais diversos campos da biotecnologia, como por exemplo, enzimas, anticorpos e proteínas estruturais. Tais sistemas se separam em duas fases aquosas quando dois polímeros (por exemplo, PEG e dextrana) ou um polímero e um sal apropriado (por exemplo: fosfato ou citrato) são misturados e determinadas condições termodinâmicas sejam estabelecidas. A alta concentração de água (entre 70-90%) em tais sistemas favorece a estabilidade de moléculas biologicamente ativas durante a separação quando comparado com sistemas de duas fases em solvente orgânicos (Hatti-Kaul, 2000; Johansson, 1998). Uma aplicação alternativa destes sistemas aquosos é o processo da fermentação extrativa, o qual integra o processo de fermentação e o de extração visando aumentar a produtividade e diminuir os custos do processo (Viana-Marques et al., 2011). O conceito desta técnica é um processo de purificação que envolve a integração de uma etapa de extração como primeiro estágio de processo de extração para simultaneamente sintetizar e remover o bioproduto de interesse (Show et al., 2012). Além disso, neste sistema de extração as células são consideradas imobilizadas em uma das fases enquanto que o produto-alvo é particionado para a outra fase do sistema (Baniket al., 2003). Nos últimos anos, o interesse pela aplicação da fermentação extrativa tem aumentado e diversas biomoléculas têm sido extraídas por essa tecnologia, tais como: ácido clavulânico (Viana-Marques et al., 2011), lipase (Ooiet al., 2011; Show et al., 2012), fosfatase (Pandey e Banik, 2011), β -caroteno e luteína (Chavez-Santoscoy et al., 2010) e elastase (Ying et al., 2005). Neste contexto, este trabalho visa estudar a extração de proteases produzidas por diferentes micro-organismos pelo método de fermentação extrativa em um sistema polimérico de duas fases aquosas (SPDFA) composto por PEG/sal fosfato.

Material e Métodos

Os micro-organismos testados foram Actinomiceto, *Aspergillus pulverulentus*, *Fusarium solani*, os quais foram cedidos pela Coleção de Cultura do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA) e *Serratia* sp, oriundo do

Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas. Os meios empregados para o cultivo dos micro-organismos foram: extrato MGYP, para fungos; caldo Muller Hinton, para bactérias, e; meio MPE, para actinomiceto. Para a fermentação extrativa foram preparados sistemas de duas fases aquosas de Polietileno Glicol 4000 g/mol - Sais de fosfato de potássio (PEG-Sal) com uma massa total de 20 gramas, por pesagem das quantidades apropriadas de soluções concentradas de PEG (50% p/p) e sais de fosfatos (40% p/p) e meio de cultivo em frascos Erlenmeyer de 125 mL. O meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. O cultivo submerso foi realizado em agitador rotativo a 150 rpm, 30° C e 72 horas. O caldo proveniente da fermentação extrativa foi centrifugado a 5.500xg por 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sistema de duas fases foi visualizado e as fases inferior e superior cuidadosamente coletadas com auxílio de seringa sem perturbar a interface. A dosagem de proteína do sobrenadante foi realizada através do método de Bradford (1976) modificado enquanto que a atividade da protease foi determinada de acordo com método descrito por Leighton *et al.* (1973). Os parâmetros de purificação determinados foram: coeficiente de partição (K = atividade da enzima na fase polimérica/atividade da enzima na fase salina) e seletividade (Se = coeficiente de partição da enzima alvo/coeficiente de partição de proteínas totais).

Resultados e Discussão

Em todas as condições experimentais avaliadas houve separação de fases e todos os micro-organismos utilizados nessa pesquisa foram capazes de produzir proteases no sistema de fermentação extrativa com duas fases aquosas. Para os micro-organismos *F. solani* e *A. pulverulentos* obteve-se um coeficiente de partição de $1,91 \pm 0,00$ e $2,01 \pm 0,52$, respectivamente. Para o actinomiceto foi obtido um coeficiente de partição de $1,38 \pm 0,43$. Este resultado indica que as proteases destes micro-organismos migraram preferencialmente para a fase top do sistema, rica em PEG. Por outro lado, as proteases produzidas por *Serratia* sp migraram preferencialmente para a fase bottom do sistema, pobre em PEG, com $K = 0,51 \pm 0,03$. Considerando o coeficiente de partição das proteínas, para todos os micro-organismos estas apresentaram K inferior a 1, sendo seus valores de $0,57 \pm 0,18$, $0,65 \pm 0,03$, $0,41 \pm 0,11$ e $0,28 \pm 0,04$ para *F. solani*, *A. pulverulentos*, Actinomiceto e *Serratia* sp, respectivamente. Estes resultados

demonstram que de maneira geral, as proteínas presentes no meio fermentado de todos os micro-organismos avaliados apresentam maior afinidade pela fase rica em sal do sistema. Em relação a seletividade, a qual é dependente dos valores de coeficiente de partição das proteases e proteínas totais, o Actinomiceto apresentou melhor resultado de Se ($3,78 \pm 0,39$), sendo este 2 vezes superior ao obtido para proteases de *Serratia* SP ($1,81 \pm 0,21$). Os resultados de Se para *F. solani* e *A. pulverulentos* foram $3,41 \pm 1,19$ e $3,09 \pm 0,71$, respectivamente.

A produção de proteases por todos os micro-organismos no sistema de fermentação extrativa era esperado devido ao alto conteúdo de água e a baixa tensão interfacial as quais constituem ambiente biocompatível para a célula. As proteases produzidas por Actinomiceto, *F. solani* e *A. pulverulentos* migraram preferencialmente para a fase superior rica em PEG, possivelmente pela forte interação das regiões apolares da proteína com o polímero. Todavia, as proteases produzidas por *Serratia* sp migraram preferencialmente para a fase pobre em PEG. e o resultado de Se foi inferior a das outras cepas. Os altos resultados de Se para as proteases de Actinomiceto, *F. solani* e *A. pulverulentos* eram esperados uma vez que foi obtido valores de K superiores a 1 para as proteases e inferiores a 1 para as proteínas. A presença de contaminantes e as interações de cargas, hidrofóbicas, entre pontes de hidrogênio e forças de Vander Walls são fatores que podem interferir na eficiência da partição e na Se (Cavalcanti et al., 2006). Assim, os resultados de Se para as proteases obtidas por Actinomiceto, *F. solani* e *A. pulverulentos* foi satisfatório e mostrou que a técnica de extração empregada conseguiu separar as enzimas alvo de proteínas provenientes do meio fermentado destes micro-organismos. A *Serratia* sp é uma bactéria gram-negativa enquanto que actinomiceto é uma bactéria filamentosa e os demais micro-organismos são fungos filamentosos (Tortora et al., 2005). Desta maneira e considerando os resultados obtidos, as proteases obtidas possuem estruturas químicas diversas e pertencem a diferentes classes, sendo que as produzidas por *Serratia* sp apresentam baixa afinidade pelo PEG. De acordo com o exposto, o sistema de fermentação extrativa utilizando duas fases aquosas (PEG-Fosfato) pode ser utilizado para produção e separação de proteases dos micro-organismos testados. Porém, o tipo de protease e a sua afinidade por uma das fases do sistema é dependente da cepa empregada.

Conclusão

O sistema de fermentação extrativa utilizando duas fases aquosas (PEG-Fosfato) pode ser utilizado como sistema integrado de produção e extração de proteases dos microorganismos testados. Entretanto, o tipo de protease e a sua afinidade por uma das fases do sistema é dependente da cepa empregada.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior) pelo suporte financeiro.

Referências

Chavez-Santoscoy A, Benavides J, Vermaas W, Rito-Palomares M (2010) Application of aqueous two-phase systems for the potential extractive fermentation of cyanobacterial products. *Chem Eng Technol*.33:177-182.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*72:248-254.

Cavalcanti MTH, Porto TS, Barros Neto B, Lima-Filho JL, Porto ALF, Pessoa Jr A (2006) Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. *J Chromatogr B* 833:135-140.

Hatti-Kaul R (2000) Aqueous two-phase systems: methods and protocols: methods and protocols. Humana Press, Totowa, NJ.

Johansson, G (1998) Affinity partitioning of proteins using aqueous two-phase systems. In: JANSON, J.-C.; RYDÉN, L., eds. Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications. 2.ed. New York: Jan-Christer Janson & Lars Rydén, Wiley-VCH, 1998

Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973) The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 76:103-122.

Ooi CW, Hii SL, Kamal SMM, Ariff A, Ling TC (2011) Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. *Process Biochem* 46:68-73.

Pandey SK, Banik RM (2011) Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresource Technol* 102:4226-4231.

Show PL, Tan CP, ShamsulAnuar M, Ariff A, Yusof YA, Chen SK, Ling TC (2012) Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. *BioresourTechnol* 116:226-233.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2005) Microbiologia. Artmed, Porto Alegre, RS.

Viana Marques DA, Pessoa Jr A, Lima-Filho JL, Converti A, Perego P, Porto AL (2011) Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 using aqueous two-phase system. *Biotechnol Prog* 27:95-103.

Ying X, Guo-Qing H, Jing-Jun L (2005) Effective extraction of elastase from *Bacillus* sp. fermentation broth using aqueous two-phase system. *J Zhejiang Univ Sci B* 6:1087-1094.

Extração líquido-líquido de proteases de *Pleurotus albidus* (DPUA 1692) empregando sistema de duas fases aquosas (peg-fosfato)

Martim SR¹, Silva LSC¹, Machado ARG¹, Teixeira RA¹, Santos-Ebinuma VC², Cruz-Filho R F¹,
Teixeira MFS¹

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM. ²UNESP - Universidade Estadual Paulista - UNESP Emails: salomao.martim@gmail.com; larissasvetlanas@gmail.com; ritamachado.nutri@hotmail.com; raiane.aila@hotmail.com; - rfilho@ufam.edu.br; mteixeira@ufam.edu.br.lelacarvalho21@yahoo.com.br

Resumo

No presente estudo, sistema de duas fases aquosas (SDFA) composto de polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio foi utilizado para avaliar a influência da massa molar do PEG (MMPEG), concentração do PEG (CPEG) e concentração de fosfato (CFOSF) na partição da protease produzida por cultivo submerso de *Pleurotus albidus* DPUA 1692. As maiores CPEG e CFOSF exerceram efeitos positivos no rendimento de partição das proteases. Levando em consideração o fator de purificação foi observado que maiores valores de MMPEG, CPEG e CFOSF promoveram resultados superiores. As melhores condições de extração foram obtidas com 6000 g mol⁻¹ (MMPEG), 19,7 % (CPEG) e 17,7 % (CFOSF), que proporcionaram rendimento de 78,57 % e fator de purificação de 1,65. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que maiores massas molares de PEG geram melhores resultados e que SDFA pode ser empregado como técnica de purificação de baixa resolução a fim de extrair proteases do meio fermentado de *Pleurotus albidus* DPUA 1692.

Palavras-chaves: purificação, cogumelo, enzima

Introdução

O desenvolvimento de novos processos de extração e purificação de proteínas é uma etapa limitante na produção de bioprodutos. A extração líquido-líquido é um sistema formado por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si, obtidas pela adição de polímeros hidrofílicos ou um desses polímeros e um sal (Porto et al., 2008). As proteases somam cerca de 60% do total de enzimas comercializadas mundialmente (Gupta et al., 2008). Esses biocatalisadores têm uma grande variedade de aplicações biotecnológicas, principalmente em formulação de detergentes, bebidas e processamento de alimentos, amaciamento de couro, tratamento de águas residuais e formulações médicas (Merheb et al., 2007). Os fungos fazem parte do grupo de organismos investigados quanto à produção destas enzimas, e como produtores destas moléculas apresentam muitas vantagens. Um desses benefícios se deve ao fato de que as enzimas produzidas são normalmente extracelulares, facilitando sua recuperação (Germano et al., 2003). O gênero *Pleurotus* compreende um grupo de cogumelos comestíveis de interesse comercial devido a seu sabor refinado, capacidade de produzir biocompostos antitumorais, antivirais, antibióticos, anti-inflamatórios, antioxidantes entre outros. O cultivo deste fungo vem crescendo devido principalmente a menor complexidade das técnicas de cultivo, e sua capacidade de adaptar-se a diferentes meios de crescimento, graças a sua capacidade em produzir uma grande variedade de enzimas (Campos et al., 2010; Lechner e Albertó, 2011). Porém, há carência de estudos reportando a purificação de proteases produzidas por *P. albidus* encontrados na Amazônia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da massa molar do PEG (MMPEG), concentração do PEG (CPEG) e concentração de fosfato (CFOSF) no rendimento e na purificação de protease produzida por *P. albidus* DPUA 1692.

Material e Métodos

Culturas viáveis e puras de *P. albidus* reativadas em ágar batata dextrose + extrato de levedura 0,5% (p/v) foram usadas neste trabalho. Para o bioprocessamento foram utilizados frascos Erlenmeyer (125 mL) nos quais foram adicionados 50 mL de meio de cultivo GYP que foram esterilizados por 15 minutos. Em seguida foram adicionados ao meio de cultivo discos miceliais de 5 mm de *P. albidus* e a fermentação submersa foi conduzida durante cinco dias, a 30 °C em agitador

orbital a 150 rpm. Posteriormente os extratos foram filtrados em papel de filtro comum. O filtrado foi submetido ao processo de extração líquido-líquido utilizando o sistema de duas fases aquosas (SDFA) que foi preparado utilizando solução de polietilenoglicol de diferentes pesos moleculares (550, 4000 e 6000), a 50%, solução de Sais de Fosfato de 40 % e extrato enzimático, constituindo uma massa total de 3 gramas. Em tubos cônicos graduados (15 mL), quantidades necessárias de PEG e de sal foram misturadas para a manutenção do pH 5,8 e, em seguida, o conteúdo destes tubos foi agitado em vortex, adicionando-se em seguida o extrato enzimático. Após agitação em vortex, os SDFA permaneceram em repouso até separação das fases. Posteriormente os volumes das fases foram medidos, as fases foram coletadas e analisadas quanto à concentração de proteínas totais utilizando-se o Kit Comercial Doles, Brasil. A atividade proteolítica foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Leighton et al. (1973) que utiliza azocaseína a 1% (p/v) como substrato enzimático. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,1 em 1 hora e expressa em U/mL. Para avaliação da purificação pelo SDFA foram avaliados os parâmetros (rendimento e fator de purificação).

Resultados e Discussão

Para avaliação da purificação das proteínas pelo sistema de duas fases aquosas foram analisadas as respostas, rendimento e fator de purificação. Para o sistema composto por 550 g mol⁻¹(MMPEG), 16,7 % (CPEG) e 14,8 % (CFOSF) não foram observados valores de rendimento extrativo e de fator de purificação. Com a utilização de PEG com massa molecular de 500 g mol⁻¹ foram observados apenas valores intermediários de rendimento e de fator de purificação. Em relação ao rendimento extrativo os três maiores valores deste parâmetro (62,08; 69,15 e 78,57) foram observados quando foram empregadas concentrações de 19,7 % (PEG) e 17,7 % (sais de fosfato), independentemente da massa molar de PEG utilizada no sistema. Os resultados obtidos neste estudo variaram de 3,93 % a 78,57 %. Os menores de rendimento foram observados quando foram empregadas 6000 g mol⁻¹(MMPEG), 11,8 % (CPEG) e 9,8 % (CFOSF). Os maiores rendimentos (78,57%) observados para *P. albidus* obtidos foram verificados quando utilizou-se 6000 g mol⁻¹(MMPEG), 19,7 % (CPEG) e 17,7 % (CFOSF). Em relação ao fator de purificação verificou-se que o maior (1,65) e o menor valor (0,08) do fator de

purificação foram obtidos com a utilização de 6000 g mol⁻¹(MMPEG). O menor valor para este parâmetro foi observado com MMPEG (6000 g mol⁻¹), CPEG (11,8 %), CFOSF (9,8 %), ao passo que o maior valor do fator de purificação foi encontrado quando foram utilizados MMPEG (6000 g mol⁻¹), CPEG (19,7 %) e CFOSF (17,7 %). Houve incremento deste parâmetro com a elevação de (CPEG) e de (CFOSF).

O rendimento indica quanto (em %) da proteína de interesse ativa presente no material de partida foi recuperado ao final da purificação. Em relação a este parâmetro verificou-se que CPEG e CFOSF exerceram efeitos positivos, isso significa que o aumento de CPEG e CFOSF favoreceu o incremento deste parâmetro. Porém, a elevação da MMPEG não influenciou positivamente no rendimento extrativo das proteases excretadas por *P. albidus*. Este resultado difere daqueles obtidos por Ratanapongleka (2010) que ao utilizar PEG de baixas massas molares observaram elevação de 80 % no rendimento de lacases extraídas de *Agaricusbisporus*. Além disso, os resultados obtidos neste estudo são inferiores aos encontrados por Cavalcanti et al. (2008) que reportaram rendimentos de 168 % na extração de fosfolipase C utilizando SDFa composto por PEG/ fosfato. Segundo Mayerhoff et al. (2004) altos valores na recuperação dessas biomoléculas podem ser explicadas pela diminuição na concentração de inibidores enzimáticos e ativação da enzima pela interação com os componentes do sistema que podem favorecer a atividade enzimática. Quanto ao fator de purificação verificou-se influência positiva com a elevação dos parâmetros MMPEG, CPEG, CFOSF. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Kirsch et al., 2012 que verificaram interação significativa e positiva entre MMPEG, CPEG e CFOSF, indicando que aumento simultâneo destas três variáveis contribuíram para melhorar o fator de purificação de proteases excretadas por *Lentinus citrinus*.

Conclusão

O sistema de duas fases aquosas de PEG / fosfato aquosa revelou baixa eficiência na purificação total de proteases a partir de *P. albidus*, embora represente uma ferramenta simples, economicamente viável e promissora para uso nas etapas iniciais de processos de purificação enzimática.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior) pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Campos C, Dias DC, Valle JS, Colauto NB, Linde GA (2010) Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. *Arq Ciênc Vet Zool* 13:19-24.

Cavalcanti MTH, Porto TS, Barros Neto B, Lima-Filho JL, Porto ALF, Pessoa Jr A (2006) Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. *J Chromatogr B* 833:135-140.

Cavalcanti MTH, Porto TS, Barros Neto B, Lima-Filho JL, Porto ALF, Pessoa Jr A (2008) Purification of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A in PEG-phosphate aqueous two-phase systems: a factorial study. *J Chem Technol Biotechnol* 83:158-162

Germano S, Pandey A, Osaku CA, Rocha SN, Soccol CR (2003) Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme Microb Tech* 32:246-251.

Gupta A, Joseph B, Mani A, Thomas G (2008) Biosynthesis and properties of an extracellular thermostable serine alkaline protease from *Virgi bacillus pantothenicus*. *World J Microbiol Biotechnol* 24:237-243.

Kirsch LS, Pinto ACS, Teixeira MFS, Porto TS, Porto ALF (2012) Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the peg/phosphate aqueous two-phase system. *Quim Nova* 35:1912-1915.

Lechner BE, Albertó E (2011) Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Rev Iberoam Micol* 28:148-154.

Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973) The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 76:103-122.

Mayerhoff ZDVL, Roberto IC, Franco TT (2004) Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochem Eng J* 18:217-223.

Merheb CW, Cabral H, Gomes E, Da-Silva R (2007) Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chem* 104:127-131.

Nitsawang S, Hatti-Kaul R, Kanasawuda P(2006) Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme Microb Tech* 39:1103-1107.

Porto TS, Silva GMM, Porto CS, Cavalcanti MTH, Barros Neto B, Lima-Filho JL, Converti A, Porto ALF, Pessoa Jr A (2008) Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chem Eng Process* 47:716-721.

Ratanapongleka, K (2010) Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems. *Int. J. Chem. Eng. Appl.*1:191-198.

Comparação entre processos de fermentação na produção de enzimas por cogumelos comestíveis

Silva LSC¹, Machado ARG¹, Martim S¹, Teixeira RA¹, Cruz Filho RF¹, Teixeira MFS¹.

¹ UFAM/ Universidade Federal do Amazonas. E-mail. larissasvetlanas@gmail.com

Resumo

Dentre os fungos que produzem enzimas de interesse comercial, os cogumelos tem despertado interesse devido a sua facilidade de cultivo e alta produção de enzimas extracelulares por processos biotecnológicos. Neste estudo foi avaliada a produção de amilase, celulase, lipase e protease por *A. mixotricha* e *P. albidus*, em fermentação submersa (FSm) e fermentação semi-sólida (FSS). Os macrofungos foram cultivados em BDA+YE, por 12 dias. A FSm foi realizada em GYP (extrato de peptona-glicose-extrato de levedura) e conduzida a 25 °C, 150 rpm. A FSS foi feita em casca de cupuaçu+semente de açaí (1:1, p/p). A atividade enzimática qualitativa foi determinada pelo método de *cup plate* nos meios ágar amido, ágar celulose, ágar gelatina leite e ágar lipase, medindo-se o diâmetro do halo formado, em milímetros. A determinação quantitativa de proteases foi feita segundo Leighton (1973). Os cogumelos testados apresentaram atividade enzimática nos dois tipos de fermentação, com exceção de lipase, sendo *P. albidus* o mais promissor. Os resultados demonstram o potencial desses fungos na produção de enzimas utilizando os dois tipos de fermentação, porém a FSS foi considerada mais eficaz.

Palavras-chave: basidiomicetos, enzimas, fermentação submersa.

Introdução

Cogumelos comestíveis são macrofungos que possuem propriedade nutricional e medicinal, além de serem importantes fontes de compostos bioativos como, antimicrobiano, antioxidantes e enzimas, tais como proteases, celulasas, amilases, lipases, xilanases, pectinases, entre outras (Orsine et al., 2012). Durante o crescimento do micélio as enzimas são liberadas no meio para degradar os materiais insolúveis

presentes no substrato em moléculas simples e solúveis, que são posteriormente utilizadas por enzimas intracelulares pelo cogumelo (Iketani et al., 2013). A produção de enzimas vem ganhando espaço no mercado por serem relativamente fáceis de produzir em larga escala, eficientes e exigirem investimentos de baixo custo. Ocupam um importante papel em diversos segmentos industriais, como fábricas têxteis, farmacêuticas, de detergentes, de alimentos e bebidas, processos de recuperação de prata, entre outros (Abhijit, 2012). Dentre os bioprocessos empregados na produção de enzimas, a fermentação submersa e a fermentação semi-sólida têm sido amplamente utilizadas (Sankaralingam et al., 2012). A fermentação submersa, por ser realizada em meio nutriente líquido, tem a facilidade de crescimento dos micro-organismos em condições controladas de pH e temperatura (Anbu, 2008). Já a fermentação semi-sólida, o meio de cultura é composto por substratos sólidos e apresenta pouca disponibilidade de água, o que faz com que essa condição de crescimento tente se aproximar do habitat natural do cogumelo (Fonseca et al., 2014). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas (amilase, celulase, lipase e protease) pelos cogumelos comestíveis *Auricularia mixotricha* e *Pleurotus albidus* por fermentação submersa e fermentação semi-sólida.

Material e métodos

As espécies *A. mixotricha* (DPUA 1695) e *P. albidus* (DPUA 1692) foram cultivadas em ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura 0,5% (p/v), a 25 °C, sem luz, durante doze dias. Dos cultivos obtidos foram retirados 10 discos miceliais (10 mm) para serem inoculados em 50 mL de GYP [(glicose 2% (p/v) + peptona 1% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v), pH 7,0]. A FSm foi conduzida a 25° C, 150 rpm, por cinco dias. O extrato bruto foi separado da massa micelial em membrana de acetato de celulose (0,45 µm). Na FSS, 10 discos miceliais de 10 mm de diâmetro foram inoculados em casca de cupuaçu + semente de açaí (1:1, p/p), pH 7,0, umidade 65%. Após miceliação do substrato, as enzimas foram extraídas em água destilada esterilizada [resíduo miceliado/mL de água destilada (2:20, p/v)] em frascos de Erlenmeyer de 125mL, mantidos a 30 °C, 180 rpm. Após 30 minutos os extratos foram recuperados por filtração em membrana de acetato de celulose (0,45 µm). Para avaliação da atividade enzimática em meio sólido, 100 µL do extrato bruto foram inoculados em *cup plate* de 5 mm de diâmetro em ágar amido (amilase), ágar celulose (celulase), ágar gelatina leite

(protease) e ágar lipase. Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas foram mantidas a 25 °C durante 18 horas. Para evidenciar a atividade de amilase, foi utilizado vapor de iodo sublimado como revelador. Para evidenciar o halo de celulase, foi utilizada solução de vermelho Congo a 0,1% e NaCl 1M. A atividade das enzimas foi determinada medindo-se o diâmetro do halo formado, em milímetros. Para a determinação quantitativa da atividade de proteases, utilizou-se 150 µL do extrato e 250 µL de azocaseína 1% em tampão Tris-HCl, pH 7,2, realizando-se a leitura a 440nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzimas capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em 1 hora. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados

Independentemente do bioprocesso empregado *A. mixotricha* e *P. albidus* produziram pelo menos duas das enzimas estudadas. Nos ensaios qualitativos realizados com os extratos de *A. mixotricha* obtidos por fermentação submersa foram observados halos de degradação para celulase (16,5 mm) e protease (18 mm). Na determinação quantitativa de protease a atividade média enzimática foi de 21,56 U/mL. Porém, este macrofungo não apresentou atividade enzimática para amilase e lipase. Os extratos de *P. albidus* apresentaram atividade para amilase (24 mm), celulase (19 mm) e protease (21,5 mm), sendo estes resultados superiores aos encontrados para *A. mixotricha*. Na determinação proteolítica quantitativa a atividade média enzimática foi de 42,44 U/mL. Conforme observado para a *A. mixotricha* também não foi encontrada atividade de lipase para *P. albidus*. Nos ensaios qualitativos realizados com os extratos de *A. mixotricha* obtidos por fermentação semi-sólida, foram observados halos de degradação para amilase (16 mm) e celulase (22 mm). Porém, não foram encontradas atividades enzimáticas para protease e lipase. Na determinação quantitativa de protease a atividade média enzimática foi de 35,48 U/mL. Os extratos de *P. albidus* apresentaram halo de degradação para atividade de amilase (26 mm), celulase (24-25 mm) e protease (15-26 mm). Na determinação proteolítica quantitativa a atividade média enzimática foi de 78,29 U/mL. Na fermentação semi-sólida não foi observada produção de lipase por *P. albidus*.

Discussão

Enzimas são produzidas por diferentes micro-organismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias, tanto em fermentação submersa quanto em fermentação semi-sólida (Rao et al., 1998). Nesta pesquisa foi observada a atividade de amilase por *A. mixotricha* apenas quando cultivada na matriz sólida enquanto que *P. albidus* expressou essas enzimas quando submetido aos dois bioprocessos. Amilases são muito utilizadas na indústria de alimentos, constituindo aproximadamente 25% do mercado de enzimas (Sindhu et al., 1997). Em relação às celulases, as produzidas por fungos têm sido bastante estudadas devido o seu potencial em biotecnologia, são utilizadas nas indústrias têxteis e de papel (Souza et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos os dois macrofungos foram eficientes na síntese de celulase, o que os torna uma potencial fonte dessas enzimas. Estudo realizado por Fonseca et al. (2014) avaliaram a produção de proteases por *P. ostreatoroseus* no mesmo substrato utilizado nesta pesquisa encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo com *A. mixotricha* e *P. albidus*. Enzimas proteolíticas somam 60% do total de vendas e são utilizadas em diversos setores industriais, tais como de alimentos e bebidas, formulação de detergentes (Aftab et al., 2006; Santos e Sato, 2009). Há uma diferença muito grande nos dois tipos de fermentação em relação a produção de enzimas e metabólitos secundários. Os resultados desta pesquisa se assemelham com os de pesquisas atuais que sugerem que a fermentação semi-sólida apresenta vantagens quando comparada a fermentação submersa (Santos et al., 2008). Aspectos físico-químicos, como baixa quantidade de água, são fatores que contribuem para o melhor rendimento deste processo. É um método barato, com baixos níveis de água residual e fácil recuperação das enzimas de interesse (Viniestra-Gonzales, 1997).

Conclusão

Em todos os experimentos realizados, *P. albidus* foi o mais eficiente, expressando maior atividade enzimática quando comparado a *A. mixotricha*, dado que evidencia a capacidade dessa espécie em produzir enzimas de interesse comercial por processos biotecnológicos e utilizando substrato de baixo custo.

Referências

- Abhijit R (2012). Protease Enzyme- Potential Industrial Scope. *IJTech* 2:01-04.
- Aftab S, Ahmed S, Saeed S, Rasool SA (2006) Screening, Isolation and Characterization of Alkaline Protease Producing Bacteria from Soil. *Pak J Biol Sci* 9:2122-2126.
- Anbu P, Annaduray G, Lee J-F, Hur B-K (2009). Optimization of alkaline protease production from *Shewanella oneidensis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 84:54-62.
- El-Zalaki ME, Hamza MA (1979). Edible mushrooms as producers of amylases. *Food Chem* 4:203-211.
- Fonseca TRB, Barroncas JF, Teixeira MFS (2014) Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. *RBTA* 8:1227-1236.
- Iketani A, Nakamura M, Suzuki Y, Awai K, Shioi Y (2013). A novel serine protease with caspase- and legumain-like activities from edible basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Fungal Biol* 117: 173-181.
- Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973) The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 76:103-122.
- Souza HQ, Oliveira LO, Andrade JS (2008). Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *SBCTA* 28.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Desh-Pande VV (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *MMBR* 62:597-635.
- Sankaralingam S, Shankar T, Ramasubburayan R, Prakash S, Kumar C (2012). Optimization of Culture Conditions for the Production of Amylase from *Bacillus licheniformis* on Submerged Fermentation. *AEJAES* 12: 1507-1513.
- Santos D, Sarrouh B, Santos J, Pérez V, Silva S (2008) Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em Biotecnologia. *Janus* 3:4-11.
- Santos LF, Sato HH (2009). Production of alkaline protease from *Cellulosi microbium cellulans*. *Braz J Microbiol* 40:54-60.
- Sindhu GS, Sharma P, Chakrabarti T, Gupta, JK (1997). Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme Microb Technol* 21:525-530.
- Orsine, JVC, Brito LMB, Novaes MRCG (2012). Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e Farmacológicas. *Revista HCPA* 4: 452-460.

Agradecimentos: CAPES, CNPq

Atividade proteolítica dos extratos aquosos de biocompósitos formulados com cogumelos comestíveis utilizando como matriz casca de abacaxi

Souza¹, R.A.T.; Fonseca², T.R.B.; Silva³, L.S.C.; Teixeira², M.F.S.

¹ Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – UFAM, Manaus – AM. ² Coleção de Culturas DPUA – UFAM, Manaus - AM. ³ Programa de Pós Graduação em Diversidade Biológica – UFAM, Manaus – AM. Emails: raiane.aila@hotmail.com, tamis_f@hotmail.com, larissasvetlanas@gmail.com, mteixeira@ufam.edu.br

Resumo

Os cogumelos comestíveis são importantes veículos de nutrientes e além de suas características nutritivas excretam diversos biocompostos de interesse industrial. Podem ser produzidos nos mais diversos substratos, inclusive em resíduos agroindustriais. O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de proteases por três diferentes biocompósitos originados da miceliação de cogumelos comestíveis na casca de abacaxi, um resíduo abundante na cidade de Manaus. O biocompósito foi obtido através de fermentação submersa, conduzida a 25 °C até completa miceliação do substrato. Do biocompósito, foram retirados 2g e adicionados a 20mL de água destilada esterilizada para obtenção do extrato aquoso. A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se azocaseína como substrato. Os extratos exibiram excelente atividade proteolítica, com média variando de 277 a 294 U/ml. Esses resultados mostram que os resíduos agroindustriais são substratos em potenciais para o cultivo de cogumelos e possibilitam a secreção de importantes metabólitos secundários por esses fungos.

Palavras-chave: Fermentação semi-sólida, basidiomicetes, resíduos agroindustriais.

Introdução

Cogumelos comestíveis são macrofungos extensamente cultivados ao redor do mundo desde a antiguidade. Estes basidiomicetes são muito apreciados pelas suas características gastronômicas e propriedades medicinais, pois possuem alto teor de

proteínas e fibras, baixo teor de lipídeos e ainda produzem vários metabólitos como antimicrobianos, antioxidantes, imunoestimuladores, entre outros (FINIMUNDY et al.,2013).

Além das características nutricionais, os cogumelos possuem um elevado potencial produtivo, tempo de geração curto, são mais fáceis de serem trabalhados de modo independente e crescem nos mais diversos substratos. Desta forma, a produção de cogumelos surge como uma alternativa promissora para a reciclagem de resíduos, diminuindo o impacto ambiental causado pelo descarte de resíduos da agricultura A produção destes macrofungos agrega valor a partir de produtos de baixo ou nenhum custo e permite, ainda, a utilização dos resíduos secundários gerados no processo (Campos-Sales *et al.*, 2011).

Estes basidiomicetes também são fontes de enzimas proteolíticas. As proteases constituem uma classe de enzimas participantes em diversas funções fisiológicas e importantes ferramentas tecnológicas em diversos processos, principalmente nas indústrias de alimentos, detergentes e farmacêutica. Deste modo, as enzimas proteolíticas representam as enzimas mais produzidas comercialmente na atualidade e ocupam cerca de 65% das vendas mundiais de enzimas (Kumar e Takagi, 1999).

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi investigar proteases em extrato aquoso de biocompósito produzido a partir da miceliação de casca de abacaxi pelos cogumelos comestíveis *Pleurotus florida*, *Pleurotus albidus* e *Lentinus citrinus*.

Material e métodos

Os biocompósitos utilizados nesse estudo foram elaborados a partir de fermentação semi sólida, utilizando-se casca de abacaxi como substrato e como inóculo discos miceliais retirados de culturas matriz dos cogumelos comestíveis *Pleurotus albidus*, *Pleurotus florida* e *Lentinus citrinus*, cultivados em ágar Saboraud. De cada cultura matriz foram retirados 20 discos miceliais e inoculados no substrato, com 70% de umidade. A fermentação semi-sólida foi conduzida a 25 °C até completa miceliação do substrato. O produto final foi desintegrado e desidratado a 60°C, em estufa de secagem com circulação de ar forçado.

Para recuperação dos extratos, os biocompósitos foram triturados em triturador doméstico e depois de triturados, 2g do resíduo miceliado foi adicionado em 20 mL de água destilada esterilizada, em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram então mantidos em shaker, com temperatura de 30 °C e agitação 180 rpm. Após 30 minutos os

extratos brutos foram recuperados por filtração em tecido de algodão e filtrado em membrana de polietersulfônica com porosidade de 0,22µm para a posterior determinação da atividade de proteases. O pH dos extratos foi mensurado com o auxílio de peagâmetro.

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se 150 µL do extrato bruto adicionado a 250 µL de azocaseína 1% (p/v), preparada em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,2. As amostras e os brancos foram preparados em triplicata e incubados a 25 °C por 1 hora em câmara escura. A reação foi, então, interrompida com 1,2 mL de TCA [ácido tricloroacético 10% (p/v) e em seguida centrifugada por 10 minutos a 4 °C. Do sobrenadante foi retirado 800 µL, adicionando-se 1,4 mL de NaOH 1M. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância a 440 nm de 0,1 em 1 hora. Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão).

Resultados e Discussão

As enzimas proteolíticas têm origem de diversas fontes e nos últimos anos, os fungos se caracterizam como uma fonte muito promissora de compostos bioativos. Diversos cogumelos comestíveis vêm sendo relatados como fonte de proteases, como a exemplo *Pleurotus eryngii* (Cha *et al.*, 2010), *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa* (Park *et al.*, 2007) e *Pleurotus ostreatoroseus* (Fonseca, 2014).

Atualmente, diversos trabalhos vêm explorando o potencial de resíduos agroindustriais para a produção de proteases. Ravikumar *et al.*, (2012) cultivaram *Pleurotus sajor-caju* em diversos resíduos, selecionando o melhor para a produção de proteases e Liang *et al.*, (2006) observaram a produção destas enzimas no cultivo de *Monascus purpureus* em meio composto por casca de camarão e caranguejo.

Os resultados mostram a produção de proteases em extrato aquoso extraídos dos três diferentes compósitos formulados a partir de resíduo agroindustrial e diferentes espécies de cogumelos comestíveis e podem ser observados na tabela 1. Em todos os extratos recuperados dos compósitos foram determinados a atividade de proteases. Apesar de todos os extratos terem produzido atividade enzimática bastante expressiva, dentre os três extratos avaliados, a maior atividade proteolítica foi determinada no extrato aquoso composto por casca de abacaxi e *Lentinus citrinus* (296,55 U/mL). Nos biocompósitos formulados com *Pleurotus albidus* e *Pleurotus flórida* a atividade

proteolítica foi 270,44 U/mL e 280,55 U/mL, respectivamente, com diferença significativa entre os três valores observados.

Tabela 1. Atividade proteolítica dos extratos aquosos de casca de abacaxi e cogumelos comestíveis.

Amostra	pH do extrato aquoso	Atividade proteolítica (U/mL)
Casca de abacaxi e <i>Pleurotus albidus</i>	4,3	270,44 ± 1,39 ^c
Casca de abacaxi e <i>Pleurotus florida</i>	5,5	280,55 ± 3,87 ^b
Casca de abacaxi e <i>Lentinus citrinus</i>	6,0	296,55 ± 2,41 ^a

* médias que não dividem uma letra são significativamente diferentes

Os resultados obtidos para os cogumelos do gênero *Pleurotus* foram superiores aos encontrados por Fonseca *et al.* (2014), que avaliaram diversos substratos miceliados por *Pleurotus ostreatoroseus*. Os valores obtidos para o cogumelo comestível *Lentinus citrinus* também foi superior ao encontrado por Kirsch *et al.* (2011) estudando o cogumelo de mesma espécie.

Quanto aos valores de pH nos extratos, foi verificada variação dos valores nos três extratos avaliados. O extrato aquoso do biocompósito obtido a partir da miceliação de casca de abacaxi por *Pleurotus albidus* apresentou o valor mais baixo, com uma média de pH de 4,3, sendo classificado como ácido. O extrato do biocompósito de *Pleurotus florida*, apresentou uma faixa de pH de 5,5, e o extrato obtido de biocompósito de *Lentinus citrinus*, por outro lado, apresentou um valor de pH médio de 6, podendo ser classificados como levemente ácidos. Estes resultados mostraram que os cogumelos estudados produziram enzimas proteolíticas de pH ácido a levemente ácido e apesar de pertencerem a famílias próximas, as características de suas proteases são distintas, podendo ser aplicadas em diversos fins industriais, incluindo indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia e química.

O uso de resíduos agroindustriais na fermentação submersa de microrganismos é uma alternativa para a redução da contaminação ambiental oriunda do descarte inadequado destes resíduos, além de ser uma fonte alternativa de produção de metabólitos, auxiliando na redução do custo de produção desses compostos bioativos (Nakamura, 2011).

Conclusões

A casca de abacaxi é um substrato com grande potencial para o cultivo de cogumelos comestíveis.

O biocompósito gerado ao final deste processo pode ser utilizado como fonte de enzimas proteolíticas derivadas de basidiomicetos.

Referências

Campos-Sales C, Andrade MCN (2011) Aproveitamento de resíduos madeiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amazonica* 41: 1-8.

Cha WS, Park SS, Kim SJ, Choi DB (2010) Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. *Bioresource Technol* 101: 6475–6481.

Finimundy TC, Gambato G, Fontana R, Camassola M, Salvador M, Moura S, Hess J, Henriques JÁ, Dillon AJ, Roesch-Ely M (2013) Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising *in vitro* antitumor activity. *Nutr Res* 33:76-84.

Fonseca TRB, Barroncas JF, Teixeira MFS (2014) Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. *Rev Bras Tecnol Indust.* 8:1227-1236.

Kirsch LS, Pinto AC, Porto TS, Porto AL, Teixeira MFS (2011) The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms* 13:185-192.

Kumar CG, Takagi H (1999) Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. *Biotechnol Adv*, Oxford 17:561-594.

Liang TW, Lin JJ, Yen YH, Wang CL, Wang SL (2006) Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus*

purpureus CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme Microb Tech* 38:74-80.

Nakamura M, Iketani A, Shioi Y (2011) A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates. *Mycoscience* 52:234–241.

Park SE, Li MH, Kim JS, Sapkota K, Kim JE, Choi BS, Yoon YH, Lee JC, Lee HH, Kim CS, Kim SJ (2007) Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. *Biosci Biotech Biochem* 71:2214-2222.

Ravikumar G, Gomathi D, Kalaiselvi M, Uma C (2012) A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*: production, purification and partial characterization. *Asia Pac J Trop Biomed* 2:411-417.

Clonagem e expressão do um inibidor de fosfolipase A2

Verçosa J.V.M.¹, Neiva M.¹, Carmo E.J.³, Asfolfi Filho S.¹

¹ Universidade Federal do Amazonas. Emails: jv_vercosa@hotmail.com,
marcinha.n@gmail.com, edsonjuniorbio@yahoo.com.br

Resumo

Uma das consequências dos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* é o edema formado no local da picada que freqüentemente gera efeitos secundários como a necrose tecidual e a mionecrose, podendo levar à perda tecidual, levando em muitos casos à perda parcial ou total do membro. Essa necrose é mediada em grande parte pelas fosfolipases A2 devido ao processo inflamatório induzido por sua atividade enzimática. Existem diversos inibidores naturais de fosfolipases A2 de origem animal e vegetal. Esses inibidores de fosfolipases A2 isolados e caracterizados de plasmas ou soros de serpentes, denominados de PLIs tornaram-se importantes alvos de pesquisa, devido suas possíveis aplicações biotecnológicas. O gene de um inibidor de fosfolipase de *Bothrops moojeni* foi obtido por síntese química e clonado no vetor de expressão pGSM, dando origem ao vetor pGSMPLI, que foi inserido na bactéria BL21 (DE3). Os clones recombinantes foram induzidos por adição de IPTG por 4 horas e a expressão analisada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Essa análise apresentou como resultando uma banda forte de massa aproximadamente de 20 kDA, correspondente a massa esperada da proteína recombinante, indicando assim a expressão do inibidor PLI. A proteína expressa será futuramente analisada quanto a sua atividade biológica.

Palavras-chave: expressão heteróloga; inibidor; fosfolipase;

Introdução

As fosfolipases A₂ (PLA₂) compõem uma família de enzimas chave no metabolismo de fosfolípidios de membranas celulares e são encontradas em diversos tecidos de mamíferos, artrópodes e venenos de serpentes. As Fosfolipases A₂ secretórias constituem um dos principais componentes dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e tem sido estudada principalmente devido aos diversos efeitos fisiopatológicos em que está envolvida, como miotoxicidade, indução de edema. Também são muito estudadas no ramo da neurociência, principalmente na doença de Alzheimer (DA). (Schaeffer, 2004).

Uma das consequências dos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* é o grande edema formado no local da picada que frequentemente gera efeitos secundários como a necrose tecidual e a mionecrose, podendo levar à perda tecidual abundante levando em muitos casos à perda parcial ou total do membro afetado. Essa necrose é mediada em grande parte pelas fosfolipases A₂ devido ao intenso processo inflamatório induzido por sua atividade enzimática bem como pela rabdomiólise (Gutierrez e Lomonte, 1989; Arantes, 2012). Do veneno da população de *B. atrox* de Manaus, foram isoladas e parcialmente seqüenciadas duas isoformas de fosfolipase A₂ (Lopez-Lozano *et al.*, 1999). Uma delas possui estrutura com homologia para Lys-49 e foi denominada BaPLA₂M-I miotóxica sem atividade enzimática e a outra com homologia para Asp-49 denominada BaPLA₂M-II com atividade enzimática. Em estudo feito com veneno de 21 exemplares adultos de *B. atrox* procedentes de diferentes regiões geográficas do Estado do Amazonas, com a finalidade de verificar a frequência das duas isoformas de PLA₂, observou-se que 76,19% apresentaram BaPLA₂M-I e 100% BaPLA₂M-II. (Neiva, 2009).

Os inibidores de fosfolipases (PLIs) são glicoprotéínas monoméricas ou multiméricas que formam complexos solúveis com PLA₂ inibindo sua ação (Ohkura *et al.*, 1997). Esses inibidores de fosfolipases A₂ isolados e caracterizados de plasmas e/ou soros de serpentes, denominados de PLIs tornaram-se importantes alvos de pesquisa, devido suas possíveis aplicações biotecnológicas, na busca de novos fármacos de interesse na clínica-médica e científica. (Soares, 2009).

Obter novas informações a respeito de inibidores de PLA₂ é de grande importância a fim de avaliar sua possível aplicação como novo modelo terapêutico na

neutralização de diferentes tipos de Fosfolipases A2. Seu uso seria de grande valia na suplementação da soroterapia convencional, aliado a isso, o entendimento de sua interação molecular com essas enzimas tão importantes torna esse inibidores possíveis modelos para a melhor compreensão dos mecanismos de ação destas enzimas multifuncionais. (Santos filho, 2012).

Uma vez que essas proteínas são expressas no plasma dessas serpentes, sua obtenção a partir de material biológico torna-se dispendiosa e devido à necessidade de um serpente e a coleta de uma grande quantidade de sangue para a extração do plasma. Diante dessas limitações, a expressão heteróloga se torna uma importante metodologia para obtenção desses inibidores sem a necessidade de manipulação da serpente. A bactéria *Escherichia coli* é o organismo mais utilizado na expressão heteróloga de proteínas, pelo fato de ter um crescimento rápido, usar meio de cultura simples e barato, além de linhagens bem caracterizadas. Porém, dependendo da fonte nativa da proteína, a expressão pode ser obtida com outros organismos, como leveduras. (Jonasson *et al.*, 2002). O objetivo geral consiste em clonar e expressar um inibidor de fosfolipase A2.

Material e Métodos

Isolamento do gene codificador do inibidor de fosfolipase A2

A correspondente à região codificadora da proteína madura foi desenhada com base na sequência do mRNA codificador do γ -inibidor de fosfolipase A2 de *Bothrops moojeni* depositada no GenBank sob o número de acesso EU155175. Na região flangeadora da sequência gênica foram inseridos os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *Not I* a fim de direcionar a clonagem no vetor de expressão. O inserto foi então sintetizado e previamente clonado no vetor pUC57 pela empresa Genscript (Piscataway, NJ, USA). O isolamento do inserto foi feito por digestão do vetor Puc57 com as enzimas *EcoRI* e *NotI*, segundo o esquema de reação abaixo (Tabela 1).

O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose preparativo a 1% corado com brometo de etídeo, e a banda correspondente ao inserto foi cortada e purificada utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)*.

Tabela 1: Esquema da reação de restrição do vetor pUC57

Componente	Volume (μL)
DNA	5
Tampão 3	2
<i>EcoRI</i>	1
<i>NotI</i>	1
BSA	0,2
Água	10,8
TOTAL	20

Construção do vetor de expressão

Para a expressão da proteína heteróloga foi utilizado o vetor pGSM1 cuja transcrição da proteína é controlada pelo promotor T7 induzido por IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranosídeo) e possui no cassete de expressão um gene de resistência à ampicilina como marca de seleção, o sítio múltiplo de clonagem e a sequência codificadora para uma cauda de histidina na porção C-terminal expressa em fusão com a proteína heteróloga e um terminador de transcrição T7.

O vetor foi previamente digerido com as enzimas *EcoRI* e *NotI* segundo o esquema de reação abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Reação de digestão do vetor pGSM1

Componente	Volume (μL)
DNA	5
Tampão 3	2
<i>EcoRI</i>	1
<i>NotI</i>	1
BSA	0,2
Água	10,8
TOTAL	20

Após a digestão o vetor linearizado foi purificado a partir do gel de agarose a 1% utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)*.

Após a purificação foi feita a ligação do inserto ao vetor segundo o esquema de reação abaixo (Tabela 3) a 16°C durante a noite.

Tabela 3: Reação de ligação ao vetor de expressão

Componente	Volume (µL)
Vetor (pGSM)	2
Inserto (PLI)	5
Tampão	1
T4 DNA Ligase	1
Água	1
Total	10

Após a ligação 1µL da reação foi utilizado para a transformação da linhagem DH5α de *E. coli* por eletroporação. Uma alíquota de 100µL foi semeada em meio LB com ampicilina (100µg/mL) para seleção dos clones transformantes.

A partir dos clones obtidos na transformação, foram selecionados 6 colônias, que foram inoculadas para extração plasmidial, e nova digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* para confirmação da presença do inserto.

Indução da Expressão do PLI E. coli

Os clones positivos para a presença do inserto, foram selecionados para a indução da expressão da proteína heteróloga e o vetor obtido foi denominado pGSMPLI (Figura 1).

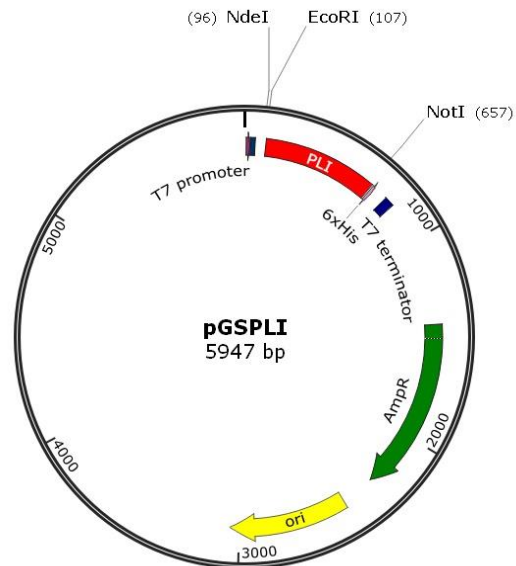


Figura 1: Mapa do Vetor pGSPLI – PLI: gene codificador do inibidor de fosfolipase A2; AmpR: gene de resistência à ampicilina; ori: origem de replicação; múltiplo sitio de clonagem (MCS).

O vetor construído foi utilizado para transformação de bactérias da linhagem BL21 (DE3) por eletroporação, nas condições de 1900V e 8,9ms. Para indução foi feito um pré-inóculo de 8 colônias em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100µg/mL) que foram incubados durante a noite a 37°C sob agitação. Após isso, foi retirada uma alíquota de 500µL que foram inoculados em 30mL de meio LB nas mesmas condições anteriores. O inóculo foi monitorado até atingir a densidade óptica DO=0,7, quando então foi adicionado 1 mM de IPTG e a cultura foi mantida sob agitação por mais 5 horas. Após esse tempo, a cultura bacteriana foi centrifugada por 10 minutos a 4000rpm a 4°C. Após esse período o material foi mantido a -80°C até o processamento para extração das proteínas.

Extração de proteínas solúveis e insolúveis

O pellet obtido em cada amostra foi ressuscitado em 400µL de Tampão TE (20 mM Tris-HCl pH 7,5; EDTA 5mM), 10µL de lisozima (20mg/mL) e incubados por 10 minutos a 20°C. As células foram lisadas em sonicador com pulsos de 30 segundos durante 5 minutos. Ao extrato obtido foram então adicionados 4µL de Triton X100 10% e centrifugado por 10 minutos, a 4°C a 4000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado do pellet, que foi ressuscitado em 400µL de tampão TE e 4µL de Triton 100x 10%.

Análise da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE

A análise da expressão da proteína recombinante foi feita inicialmente por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%, utilizando as amostras contendo tanto as proteínas solúveis, quanto os insolúveis. Para aplicação no gel, 10 μ L das amostras foram misturadas com 10 μ L de tampão de amostra e fervidas por 5 minutos.

Resultados e Discussão

O sistema de expressão escolhido foi o de *E. coli*, que é um dos mais eficientes e rápidos, utilizando o vetor pGSM1 que foi extraído e clivado com as enzimas *EcoRI* e *NotI*, como demonstra a Figura 2.

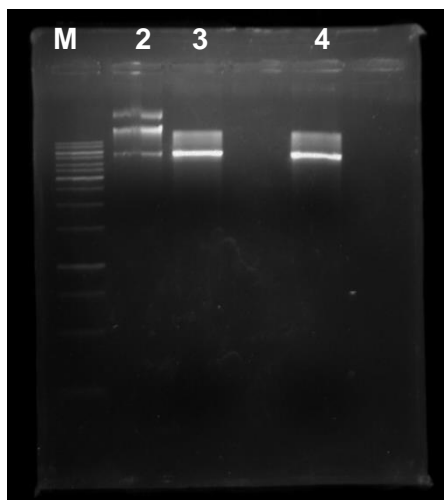


Figura 2: Digestão do vetor pGSM1- M- marcador de peso molecular 1kb; 2- vetor pGSM íntegro; 3 e 4- vetor digerido com *EcoRI* e *NotI*.

O vetor pUC57 com o inserto PLI também foi digerido com as mesmas enzimas, como demonstra a Figura 3.

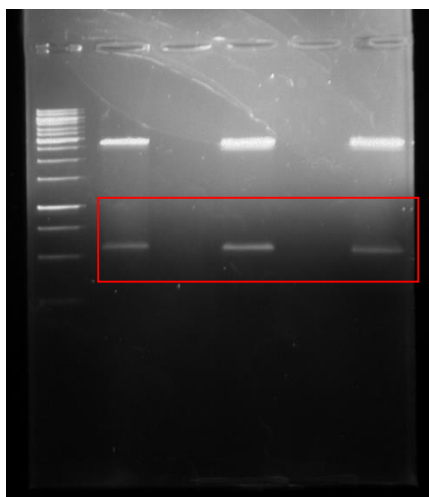


Figura 3: Digestão do vetor PUC57 – com *EcoRI* e *NotI*, liberando o inserto PLI com aproximadamente 600pb (detalhe em vermelho). No poço M, o marcador, e de 1 a 3 os plasmídeos digeridos.

A linhagem BL21 (DE3) foi escolhida para a expressão ser deficiente na produção de proteases, evitando assim a degradação da proteína heteróloga. A extração plasmidial de 8 clones selecionados e confirmados como recombinantes por análise de restrição.

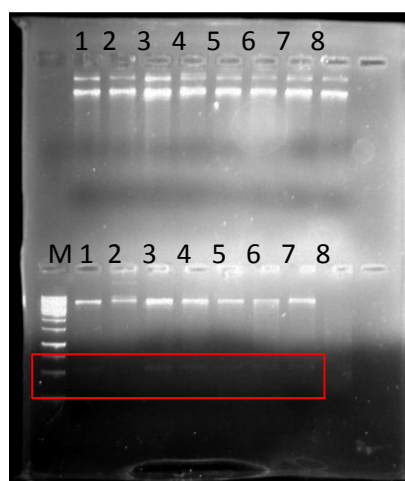


Figura 4: Análise de restrição com as enzimas *EcoRI* e *NotI* dos clones transformantes - Na parte de cima o resultado da extração do gel (plasmídeos de 1 a 8) e na parte de baixo, a confirmação por digestão, mostrando a liberação do inserto em torno de 500pb, confirmando com a presença do marcador de peso molecular no primeiro poço.

Dos 8 clones recombinantes foram selecionados 6 para indução e os extratos celulares são mostrados Figura 5. A análise por SDS-PAGE confirmou a presença da

proteína heteróloga na fração insolúvel no tamanho esperado de aproximadamente 20kDa.

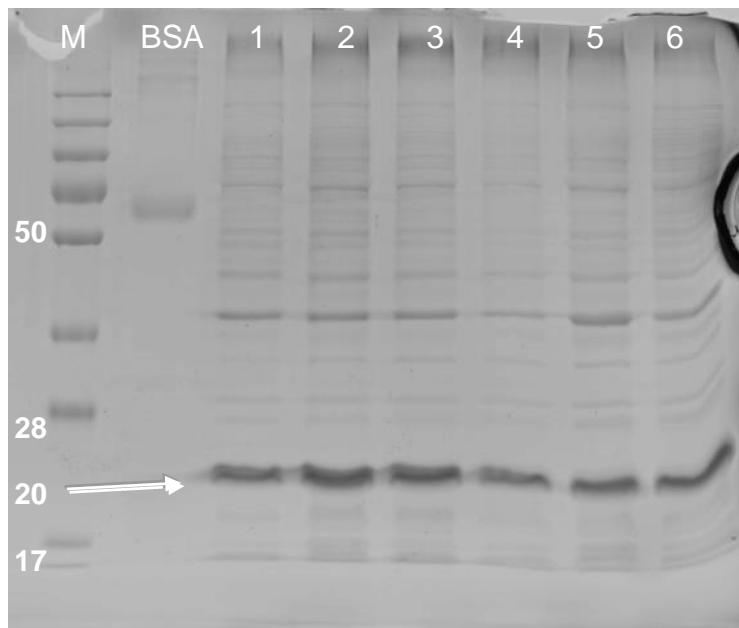


Figura 5: Gel SDS- PAGE mostrando as proteínas insolúveis extraídas e a banda mais porte, em torno de 20 kDA, o iPLA2. O primeiro poço é o marcador, seguido do controle positivo BSA, e os poços 1 a 6 são as amostras insolúveis.

Conclusão

Em virtude dos resultados obtidos, concluiu-se que o inibidor da fosfolipase foi expresso na *Escherichia coli* com excelência. O fato de a proteína ter sido encontrada no meio insolúvel corrobora os estudos realizados a partir da literatura e conhecimentos da linhagem utilizada, e o peso molecular foi confirmado a partir de técnicas de bioinformática, no Expasy. No entanto, proteínas de origem eucarionte tendem a serem expressas em sistema eucarionte, para obter as modificações pós-traducionais necessárias para seu correto enovelamento, conseqüentemente, bom funcionamento. Portanto, é imprescindível que não se pare apenas na expressão, mas que se prossiga com testes de atividade e, se houver necessidade, uma nova expressão em outro organismo.

Referências

Gutiérrez J. M., Lomonte B. (1989). Local Tissue Damage Induced by Bothrops Snake Venoms. A Review. *Memórias do Instituto Butantan*, 51:211-223.

Jonasson P., Liljeqvist S., Nygren P.A., Stahl S. (2002). Genetic design for facilitated production and recover of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35: 91-105.

López-Lozano J.L., Morhy L., Sousa M.V., Fontes W., Dias A.K.B., Muniz E., Buhrnheim P. (1998). Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of two phospholipases A2 isoforms from *Bothropsatrox* snake venom from Manaus-Brazil. *Toxicon*, 38:487-595. Supplement. V symposium of the Brazilian Society on Toxinology.

Neiva M. (2011). Transcriptoma da glândula de veneno de *Bothropsatrox* – São Paulo.

Soares A. M. (2011). Molecular characterization of an acidic phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. *Arch Toxicol*, 85:1219-1233.

Schaeffer E.L. (2010). Enriquecimento ambiental como estratégia para promover a neurogênese na doença de Alzheimer: possível participação da fosfolipase A₂. *Rev. Psiquiatr. Clín.* vol.37 no.2 São Paulo.

Avaliação da atividade anticandida de extratos de fungos do gênero *Pestalotiopsis* spp. isolados de ambientes amazônicos

Banhos E.F.¹, Souza A.Q.L.², Lima G.A.¹, Souza A.F.¹, Souza A.D.L.².

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (Bionorte), Universidade Federal do Amazonas – UFAM. ² Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM

Emails: sandrobanhos@yahoo.com.br, antoniaqlsouza@gmail.com,
greiciane.andrade@yahoo.com.br, andreiaferreira2020@gmail.com, souzadq@gmail.com

Resumo

Os fungos do gênero *Pestalotiopsis* da ordem Melaconiales, família Amphispinariaceae, demonstram potencial biotecnológico como fonte de recursos naturais na busca de fármacos. Esta pesquisa avaliou a atividade anticandida de *Pestalotiopsis* spp isolados da Amazônia. 24 linhagens foram cultivadas em Erlenmeyer (250mL), com 100mL de BDL, por 25 dias, 24°C. O meio fermentado extraído com AcOEt e o micélio com MeOH:AcOEt(1:1). Testados frente à *Candida albicans* (Fiocruz-CFAM-1342). Utilizou-se método de diluições em caldo, com NBT como revelador e Nistatina (2.0mg mL⁻¹) controle positivo. 11 demonstraram resultado positivo, seis do micélio e cinco de meio líquido. O meio líquido é geralmente a fonte mais rica de moléculas bioativas. Contudo, isolou-se substâncias bioativas do micélio, indicando que o extrato do micélio também deve ser investigado na busca de compostos bioativos desse gênero. As linhagens são promissoras a atividade anticandida, por apresentarem atividade em quase 23% dos extratos avaliados.

Palavras-chave: *Pestalotiopsis*, anticandida, extratos fúngicos, bioatividade.

Introdução

Na biotecnologia os fungos já são utilizados há séculos, desde a fermentação de bebidas alcoólicas no antigo Egito, como também servindo de alimentos desde a idade

média na Europa, passando pela fabricação de pães e queijos na atualidade, até a produção de compostos bioativos através de sua capacidade metabólica, como por exemplo, a produção de antibióticos como a penicilina e ácidos (Borzani *et al.*, 2001).

O gênero *Pestalotiopsis* pertence à ordem Melaconiales, família Amphispinariaceae caracteriza-se pela presença de conidióforo dentro do corpo de frutificação denominado acérvulo. Os conídios apresentam cinco células, sendo três medianas de coloração marrom e duas células hialinas (apical e basal), com dois ou mais apêndices apicais. (Jeewon *et al.*, 2002).

No Brasil o gênero tem sido encontrado associado a espécies tropicais, este fato demonstra a capacidade de adaptação e a importância ecológica do gênero (Hanada *et al.*, 2010). Os endofíticos pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis* tem demonstrado um grande potencial biotecnológico, sobretudo para a indústria farmacêutica, tanto da obtenção de compostos antimicrobianos, isolando antifúngico como o de *P. adusta*, quanto na obtenção de compostos com atividade citotóxica frente a células tumorais humanas, como isolados de *P. photiniae* (Che *et al.*, 2009).

Esse gênero tem sido isolado como endofítico de diversas plantas tropicais e tem sido utilizado também como organismo modelo em diversos estudos de pesquisa básica e aplicada (Hanada *et al.*, 2010; Strobel *et al.*, 1996). A diversidade de compostos isolados produzidos por fungos desse gênero demonstra como esse gênero é rico do ponto de vista de seu metabolismo secundário, o que o coloca como uma fonte de recursos naturais importantes para estudos relacionadas a busca de novos fármacos. Neste trabalho avaliou-se a atividade anticandida dos extratos obtidos de linhagens de *Pestalotiopsis* associadas a espécies vegetais Amazônicas.

Material e Métodos

Foram selecionadas 24 linhagens de *Pestalotiopsis* isoladas de espécies Amazônicas inoculadas em triplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com 100 mL de meio líquido batata-dextrose (BD), acrescido de 0,2% de extrato de levedura sob condições estéreis (Souza *et al.*, 2004).

Os frascos foram incubados por um total de 25 dias, sob temperatura de 24°C. Os parâmetros de tempo e temperatura de cultivo foram determinados pelas necessidades fisiológicas do gênero. Os constituintes fixos foram divididos em extracelulares (meio de cultura fermentado) e intracelulares (micélio) para extração com solventes orgânicos

conforme descrito a seguir: AcOEt 100%, por 3 vezes, para o meio de líquido fermentado, e o micélio foi macerado em MeOH:AcOEt (1:1) por 48h e depois filtrado, por 3 vezes.

Todas as amostras foram secas em rotaevaporador e pesados. Todos os 48 extratos obtidos foram avaliados quanto a atividade anticandida, e para isso foi utilizada uma estirpe de *Candida albicans*, cedida pela coleção de microrganismos patogênicos da Fiocruz – AM código CFAM-1342, os testes foram determinados pelo método de diluições sucessivas em caldo, conforme recomendado pelo Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing do US National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997).

O bioensaio foi realizado em placas de 96 poços com 100µL de caldo saboraud dobrado, 100µL de solução dos extratos teste (2.0 mg.mL⁻¹), e 10 µL de suspensão fúngica com 1.0x10⁷ UFC.mL⁻¹, seguido por incubação a 37°C (24h) em triplicatas. Para solução dos extratos teste, estes foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 10% completado o volume final (90%) com água destilada autoclavada.

A bioatividade foi registrada como ausência de coloração nos poços depois da adição de 10µL de revelador azul de nitrotetrazólio (NBT). Nistatina (2,0mg.mL⁻¹) foi usado como controle positivo e cultivo em meio saboraud, sem aditivos, foi usado como controle negativo.

Resultados e Discussão

Dos 48 extratos brutos testados frente a *C. albicans* 11 demonstraram resultado positivo, desses, seis foram obtidos da maceração do micélio extraído com MeOH:AcOEt e cinco foram obtidos da extração líquido-líquido do meio líquido fermentado extraído com AcOEt. As linhagens de *Pestalotiopsis* que apresentaram resultado positivo foram codificadas como P10, P11, P12, P47, P46, P40, P31, P19, P23 e P33, sendo que a linhagem P10 apresentou resultado tanto no extrato obtido do meio líquido fermentado, quanto no extrato bruto obtido do micélio, completando os onze extratos brutos com resultado positivo.

O número de linhagens com resultado positivo demonstra o potencial desse gênero para obtenção de substâncias bioativas. Da mesma forma os resultados obtidos revelaram que linhagens de diferentes hospedeiros apresentaram atividade, o que indica que esse gênero possui uma versatilidade metabólica provavelmente promovida pela interrelação com seu hospedeiro, como o descrito em trabalhos como o de Strobel *et al.*, (1996).

De forma geral, os trabalhos com esse gênero têm demonstrado que uma boa seleção do hospedeiro para o isolamento de linhagens desse gênero é fundamental para a obtenção de linhagens com potencial biotecnológico (Strobel *et al.*, 1996).

Dentre os resultados obtidos também chama atenção o modo de cultivo, pois das dez linhagens que apresentaram resultado positivo frente a *C. albicans* oito foram cultivadas sob agitação (P10, P11, P12, P46, P31, P19, P23 e P31) e apenas duas em modo estático (P40 e P47). Essa informação demonstra que a aeração deve ser um fator a ser levado em consideração quando se busca compostos bioativos obtidos dessas linhagens.

Dentre as linhagens que apresentaram resultados positivos duas (P11 e P12) foram isoladas da casca do caule de *Rollinia sp*, um gênero de anonácea bem conhecida na região Amazônica. Outras duas linhagens (P19 e P47) foram isoladas das raízes da *Euterpe oleracea*, a espécie conhecida popularmente como açazeiro. Também apresentaram resultados positivos linhagens de *Pestalotiopsis* isoladas do caule de *Myrcia guianensis* (P23), uma Myrtaceae bem distribuída na região amazônica, conhecida popularmente como pedra-ume-caá ou vassourinha. Duas linhagens foram isoladas de Basidiomicetes (P31 e P33).

Os trabalhos de isolamento de compostos de *Pestalotiopsis*, nos diferentes meios de cultivo, tem mostrado que o meio líquido fermentado é a fonte mais rica de moléculas bioativas quando comparada com os extratos do micélio (Che *et al.*, 2009). Contudo em trabalho realizado por Wray *et al.*, (2011) foi possível o isolamento de Pestalotiopsonas, uma cromona presente no micélio de *Pestalotiopsis sp*, sendo que uma de suas isoformas mostrou citotoxicidade moderada, indicando que o extrato do micélio também deve ser investigado quando se busca compostos bioativos de fungos desse gênero.

Das espécies que apresentaram atividade biológica podemos destacar a espécie *P. microspora*, comumente descrita como endófito de uma variedade de espécies vegetais, tanto plantas de clima tropical quanto temperado, bastante versátil do ponto de vista metabólico, produzindo compostos bioativos como o taxol, ácido torreiânico, ácido ambuíco entre outros (Strobel, 1996, Lee *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2001).

A linhagem P40 foi isolada das folhas de uma espécie de *Gustavia elliptica*, além e uma linhagem isolada dos espinhos de *Pinus elliottii* (P10). Das dez linhagens que apresentaram resultado positivo frente a *C. albicans* oito foram cultivadas sob agitação, em incubadora B.O.D. (P10, P11, P12, P46, P31, P19, P23 e P31) e apenas duas em modo estático (P40 e P47).

Podemos destacar também os resultados de P10, identificada por biologia molecular como *P. disseminata* (B5-3) que apresentou resultados positivos tanto nos extratos de seu meio líquido fermentado quanto de seu micélio. A capacidade metabólica de fungos dessa espécie já foi descrita anteriormente por Gloer *et al.*, (2006), no isolamento das 6-Hidroxipunctaporonina A e B, sesquiterpenos em que a forma B apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Conclusões

As linhagens testadas são promissoras a obtenção de compostos com atividade anticandida, por apresentarem atividade em quase 23% dos extratos.

A produção de compostos com atividade anticandida demonstrou depender da aeração para sua obtenção.

A maioria dos extratos com bioatividade foi obtida do meio líquido, o que demonstra que este é uma fonte mais rica dessas biomoléculas.

Através do trabalho foi possível selecionar 11 linhagens do gênero *Pestalotiopsis* para etapas subsequentes de investigação, sendo elas o isolamento e identificação de compostos com propriedade biativas.

Agradecimentos

Nosso agradecimento ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, que viabilizaram a realização desse trabalho.

Referências

Borzani W, Schmidell W; Lima UA; Aquarone E (2001) - Biotecnologia Industrial vol 1. Ed. Blucher.

Che Y, Ding G, Zheng Z, Liu S, Zhang H, Guo L (2009) Photinides A-F, Cytotoxic Benzofuranone-Derived γ -Lactones from the Plant endophytic Fungus *Pestalotiopsis photiniae*. *J Nat Prod* 72: 942-945.

Gloer JB, Deyrup ST, Swenson DC, Wicklow DT (2006) Caryophyllene Sesquiterpenoids from a Fungicolous Isolate of *Pestalotiopsis disseminata*. *J Nat Prod* 69: 608-611.

Hanada RE, Pomella AWV, Costa HS, Bezerra JL, Pereira JO (2010) Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of Black-pod disease. *Fungal Biol* 30: 1-10.

Jeewon R, Liew ECY, Hyde KD (2002) Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Mol Phylogen Evol* 25: 378–392.

Lee JC, Strobel GA, Lobkosky E, Clardy JC (1996) Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *J Organ Chem* 61: 3232-3233.

Li JY, Harper JK, Grant DM, Tombe BO, Bashyal B, Hess WM, Strobel GA (2001) Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochem* 56(5): 463-468.

NCCLS (1997) Methods for dilution and antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, NCCLS Approved Standard M7-A4.

Souza AQL, Souza ADL, Filho AS, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica* 34(2):185-195.

Strobel GA, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM (1996) Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiol* 142: 435–440.

Wray V, Xu J, Aly AH, Proksch P (2011) Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata* Tetrah Letters 52: 21-25.

Pesquisa de endoparasitas em bovinos abatidos no matadouro municipal de Parintins, Amazonas

Brelaz ECDO¹, Teixeira NS², Galúcio VCA², Nunes AS² Sales-Campos C³

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM, Manaus, AM, ²Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, ³Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM. Emails: erikacdo@hotmail.com, nury_teixeira@outlook.com, vgalucio@gmail.com, biotecs7@gmail.com, ceci@inpa.gov.br

Resumo

A proposta desta pesquisa foi analisar amostras de fezes de bovinos antes de serem abatidos no Matadouro Municipal de Parintins - AM. Foram coletadas amostras nos meses de agosto, setembro e outubro (período seco) do ano de 2013, retiradas diretamente da ampola retal dos animais, conservadas sob refrigeração e levadas ao laboratório de Ciências do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - Campus Parintins. As amostras foram avaliadas quanto a presença de microrganismos como bactérias, hifas e leveduras, além de formas evolutivas de protozoários e helmintos, endoparasitas responsáveis pela ocorrência de verminoses no rebanho, sendo comum nas análises a presença de bactérias e fungos, assim como cistos de protozoários. Somente no mês de outubro foram encontrados ovos de helmintos nas amostras, este período é caracterizado pelo início da transição entre período de cheia das águas e o período seco.

Palavras-chave: Epidemiologia; Exame parasitológico de fezes; Microrganismos.

Introdução

O controle de parasitoses em bovinos e bubalinos é um importante fator na produção, por causarem grandes perdas econômicas por queda da produtividade e até morte dos animais. Os prejuízos chegam de 20% a 30% na produção de leite e carne (EMBRAPA, 2006). Animais jovens acabam sendo mais susceptíveis conforme descrição de Gottschall *et al.*(2010) em seu trabalho de levantamento da Taxa de Mortalidade de propriedades rurais, onde há perdas de 11,5% a 16,9% em grupos de animais entre 1 a 2 anos e de 0 a 1 ano de idade, respectivamente, causada por verminoses.

Os agentes etiológicos responsáveis pelas principais parasitoses são bastante resistentes podendo permanecer viáveis por longo período de tempo mesmo fora do trato gastrointestinal do hospedeiro, sendo depositados no solo, ração, forragem, pastagens, entre

outros. Além disso, algumas infecções são assintomáticas, tornando o animal um reservatório, com grande potencial de contaminação para o rebanho.

O controle estratégico de verminoses tende a reduzir a contaminação, evitar altas cargas parasitárias e contribuir para uma melhor relação custo-benefício para o produtor. De acordo com Vidotto (2002) no Brasil, bovinos criados em pastagens naturais, estão expostos à infecção por larvas de nematódeos gastrintestinais e pulmonar, particularmente dos gêneros, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Strongyloides*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* e *Dictyocaulus*. A incidência e distribuição destes parasitos apresentam variações regionais e sazonais, dependendo de vários fatores como regime pluvial, ecossistema, manejo, tipo e idade dos animais, estando diretamente ligado ao conhecimento da epidemiologia dos organismos tanto das formas de vida livre como das formas patológicas (Molento, 1999). As propostas de manejo sanitário podem resultar em uma melhor relação custo-benefício para o produtor fazendo com que este não tenha gastos com a administração excessiva de compostos químicos, sem o devido efeito na população parasitária (Mello *et al.*, 2006).

O controle das infecções parasitárias em animais de produção depende em grande parte da utilização sistemática de agentes químicos. E, apesar de o surgimento desses compostos serem um marco da tecnologia devido à sua elevada eficácia, o uso excessivo ou inadequado pode levar ao desenvolvimento de resistência nos animais às essas drogas como uma adaptação evolutiva (Heck *et al.*, 2005).

Cezar *et al.* (2008) cita que o controle das nematodíases é mais eficiente se baseado em um bom conhecimento epidemiológico básico e de particularidades regionais ou mesmo específicas do local e do tipo de sistema produtivo. Neste sentido, controlar, significa manter a carga parasitária abaixo dos níveis capazes de provocar perda econômica, assim como o pastejo simultâneo de bovinos e ovinos como descrito por Torres (2009) proporciona melhor controle da carga parasitária, e tão importante quanto conhecer os efeitos e prejuízos causados pelos endoparasitas é saber o grau em que a mesma está ocorrendo.

Comercialmente, a carne tem como finalidade alimentar a população com garantia de qualidade sanitária e saúde do consumidor. A ingestão de carne crua ou mal passada pode conter cisticercos que podem sobreviver por mais de 30 anos, nas espécies de *Taenia*, os ovos ou as proglotes eliminadas, quando ingeridas pelos hospedeiros intermediários (boi e o porco) liberam as larvas no intestino destes hospedeiros, o homem se infecta ao ingerir carne contendo cisticercos viáveis. Estes resistem à acidez gástrica e liberam larvas no lúmen intestinal, que aí mesmo evoluem para vermes adultos (Pereira, 2011).

Neste contexto, a cidade de Parintins, situada a aproximadamente 400 km² da capital Manaus – AM, com 102.033 habitantes (IBGE, 2012) detém a segunda maior economia do estado, sendo a pecuária a atividade de maior importância no setor primário contando com um rebanho efetivo de 147.382 (Neto, 2012), sua produção é destinada para o consumo local e o excedente é exportado para outros municípios, porém pouco se conhece sobre as características epidemiológicas das principais parasitoses, tão necessárias para um controle sanitário adequado.

Diante do exposto, realizou-se a análise de fezes de bovinos abatidos no Matadouro do Município para observar a presença de formas evolutivas de endoparasitas que poderiam acometer esses animais e comprometer sua comercialização.

Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Ciências no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - Campus Parintins – AM, no período de 01 de agosto a 17 de outubro de 2013. As coletas foram realizadas mensalmente, de acordo com o cronograma de abate do matadouro, onde 5 animais do sexo masculino, com peso aproximado de 200 Kg em média, eram selecionados aleatoriamente sem levar em consideração aspectos físicos, raça ou localidade de origem. Foram coletadas quinze amostras no total, em duplicata, com amostras de aproximadamente 6 gramas retiradas diretamente da ampola retal dos animais.

Para a coleta do material utilizou-se a metodologia descrita por Monteiro (2010), sendo realizada nas primeiras horas do período da manhã, com uso de luvas descartáveis. As amostras foram depositadas em potes coletores, lacrados com papel filme PVC (50), devidamente identificados e acondicionados em caixa de isopor fechada até a chegada ao laboratório.

O material utilizado foi previamente separado e a análise foi realizada pelo método direto, utilizado para a pesquisa de parasitas em pequenas quantidades de fezes, além de outras vantagens como o uso de poucos equipamentos e ser de fácil execução. Este método consiste na realização de esfregaço em lâmina com cerca de 10 – 15 mg de fezes em uma gota de solução salina com a adição de uma gota de corante Lugol forte, coberto com lamínula para em seguida ser observado em microscópio óptico.

Após a análise das amostras, as formas evolutivas encontradas foram fotografadas e comparadas morfológicamente com a literatura especializada (Taylor *et al.*, 2010), para possível identificação a nível de gênero.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos no mês de agosto (Tabela 1), caracterizado por grande volume de água nos rios, evidenciaram a presença de quantidade significativa de fibras normalmente oriundas da alimentação, grânulos de gordura, células de descamação, presença de hifas e bactérias em abundância, além de raros piócitos, células do sistema imunológico, em 40% das amostras que também apresentaram cistos característicos de protozoários com morfologia sugestiva de *Entamoeba sp.* (Figura 1).

Tabela 1: Descrição de amostras fecais coletadas e analisadas no mês de agosto.

Amostra	Sexo	Bactérias	Piócitos	Cistos de ameba	Hifas	Fibras	Outros
01	F	Presença	Presença	Presença	Presença	Ausência	
02	F	Abundante	Raros	Ausência	Ausência	Ausência	Células de descamação
03	F	Presença	Ausência	Ausência	Ausência	Presença	
04	M	Presença	Raros	Presença	Presença	Ausência	
05	F	Presença	Ausência	Ausência	Ausência	Presença	

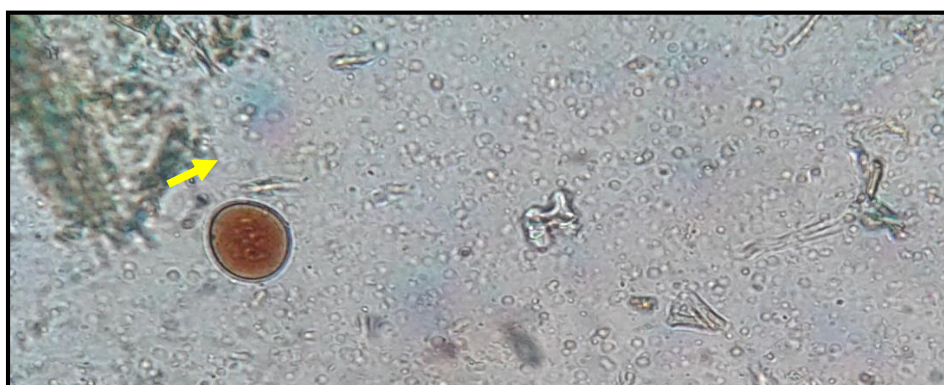


Figura 1: Cisto de protozoário com morfologia sugestiva de *Entamoeba sp.*

No mês de setembro (Tabela 2), período em que muitas áreas ainda se encontram alagadas, observou-se a ausência de formas evolutivas de protozoários e helmintos em todas as amostras avaliadas, sendo frequente e em grande quantidade a presença de bactérias e fungos.

Tabela 2: Descrição de amostras fecais coletadas e analisadas no mês de setembro.

Amostra	Sexo	Bactérias	Piócitos	Cistos de ameba	Hifas	Fibras
01	M	Presença	Ausência	Ausência	Presença	Presença
02	M	Presença	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
03	M	Presença	Ausência	Ausência	Ausência	Presença
04	M	Presença	Ausência	Ausência	Ausência	Presença

As análises realizadas no mês de outubro (Tabela 3) demonstraram um maior índice de contaminação baseado na presença de formas evolutivas características de cistos de protozoários e ovos de helmintos em 40% das amostras (Figura 02), além de uma flora bacteriana e fúngica abundante, neste período o peso médio dos animais diminuiu para 150 Kg.

Tabela 3: Descrição de amostras fecais coletadas e analisadas no mês de outubro.

Amostras	Sexo	Bactérias	Ovos de Helmintos	Cistos de Ameba	Hifas	Fibras
01	F	Presença	Ausência	Abundantes	Presença	Presença
02	M	Presença	Ausência	Poucas	Ausência	Presença
03	M	Presença	Ausência	Abundantes	Ausência	Presença
04	M	Presença	Ausência	Poucas	Ausência	Poucas
05	M	Presença	Presença	Poucas	Ausência	Poucas
06	M	Presença	Presença	Abundantes	Ausência	Presença

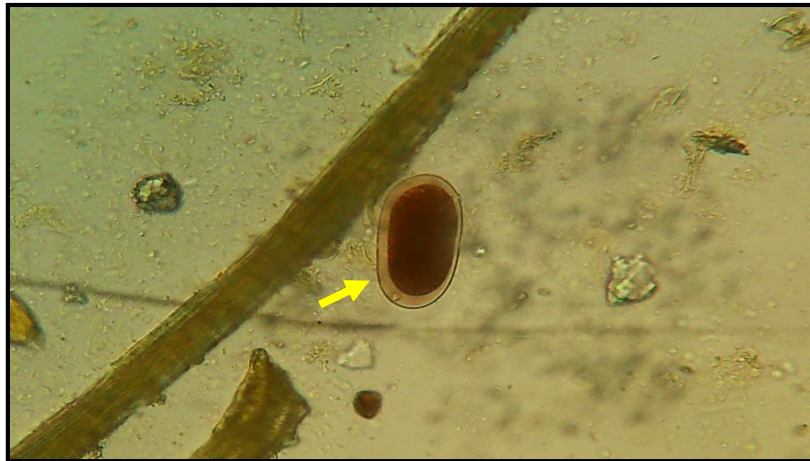


Figura 02: Imagem de ovo de helminto com morfologia sugestiva de *Strongyloides sp.*

O matadouro possui uma política efetiva de orientação aos produtores rurais quanto a vermifugação dos animais, assim como disponibiliza informações sobre o calendário de vacinas nacional, para que se obtenha um padrão de qualidade da carne comercializada no município.

Em todas as análises foi observada uma flora bacteriana abundante, o que se deve ao processo de digestão dos ruminantes, onde é comum a presença de bactérias no líquido ruminal, no intestino e massa fecal (Pimentel, 2002). Nessas amostras observou-se também numerosas hifas que acabam sendo liberadas nas fezes, pois segundo Fondevila (1998) a presença de fungos favorece a ruptura das partículas de forragens, aumentando também a superfície acessível para a ação das bactérias.

A presença de microrganismos no sistema ruminal contribui para o bom desempenho do processo de digestão, Fondevila (1998) também já descrevia a importância da função de cada um, e sua capacidade de degradar polissacarídeos estruturais, processo que dependerá de fatores ecológicos, como sua abundância no rúmen, sua relação com outras espécies microbianas, fatores relacionados com o substrato, com a estrutura anatômica e composição química das forragens e as condições ambientais para a fermentação.

O período de maior contaminação, principalmente por ovos característicos de helmintos foi o mês de outubro, período de vazante dos rios, onde a contaminação das águas está mais concentrada refletindo no em um aumento de ocorrência de verminoses (Neto, 2012).

Através do exame parasitológico de fezes pode-se obter um indicativo do estado nutricional e imunológico dos animais, pois a presença de parasitas estava normalmente associada a ocorrência de muco, diarreia e sangue nas fezes, indicativo de infecção e de maior risco de contaminação de outros animais e do próprio homem. O consumo de carne e vísceras

mal cozidas contaminadas por formas evolutivas de parasitas pode significar um sério risco saúde humana (Monteiro, 2010).

Apesar de o matadouro municipal ter uma política de orientação, não existe uma cobrança efetiva acerca dos procedimentos praticados pelos produtores que acaba por contribuir para a ocorrência de animais contaminados.

Conclusões

Os resultados demonstraram que bovinos abatidos no Matadouro Municipal de Parintins – AM, apresentam flora bacteriana e fúngica dentro do esperado, com a ocorrência de cistos de protozoários de vida livre ou oportunistas e, em geral estão livres de formas evolutivas de helmintos, com exceção dos animais abatidos no mês de outubro, possivelmente resultante do período de vazante dos rios, resultante do início do período de Terra firme no Amazonas e final do período de Várzea, onde a contaminação das águas está mais concentrada refletindo em um aumento na quantidades de parasitas no ambiente e conseqüentemente aumentando a ocorrência de verminoses no homem e nos animais.

Faz-se necessária uma maior fiscalização pelos órgãos competentes, assim como incentivo e conscientização dos produtores rurais quanto às boas práticas de manejo e condição sanitária dos animais.

Referências

- Cezar A.S., Catto J.B., Bianchin, I. (2008). Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Ciência Rural*, Santa Maria, 38(7):2083-2091.
- Embrapa (2006). Informação técnica: Francelino Goulart da Silva Netto, Méd. Vet.,M.Sc., Porto Velho, RO, outubro, 2006.
- Fondevila M. (1998). Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. Universidad de Zaragoza, España. 15: 87-106.
- Gottschall C. S. et al. (2010). Principais causas de mortalidade na recria e terminação de bovinos de corte . *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, Curitiba, 8(3):327-332.

Heck I., Leandro A., Leite C. (2005). Efeito do clima sobre a infecção parasitária em bezerros e presença de larvas em manejo rotativo de pasto em Santa Maria, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 35:116-119.

IBGE(2014). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. - www.ibge.gov.br.<Acessado em 11/09/2014>

Mello M.H.A., Depner R.A., Molento M.B., Ferreira J. (2006). Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. *Arch. Vet. Sci.*, 11:8-12.

Molento M.B.; Prichard R.K. (1999). Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 8:75-86.

Monteiro S.G. (2010) Parasitologia na medicina veterinária. 1. Ed. Rio de Janeiro: Roca.

Neto F.A.C., Pimentel N. (2012). Perfil Econômico dos Municípios do Amazonas – 8ª Sub Região – Parintins. SEPLAN. Manaus-AM.

Pereira J.R. (2011). Práticas de controle e prevalência de helmintos gastrintestinais parasitos de bovinos leiteiros em Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. Lages, 10(1):16-22.

Pimentel Neto M., Fonseca A.H. (2002). Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrointestinais de bezerros em região de baixada do estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 22(4):148-152.

Taylor M.A, Coop R,L, Wall RL. (2010). Parasitologia Veterinária. Terceira Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Torres et al. (2009). Nematódeos de ruminantes em pastagem com diferentes sistemas de pastejo com ovinos e bovinos. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 44(9):1191-1197.

Vidotto O. (2002). Estratégias de combate aos principais parasitas que afetam os bovinos. *In*. Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil / editores Geraldo Tadeu dos Santos et al. – Maringá :UEM/CCA/DZO- NUPEL, p.192-212.

Candidemia em Unidades de Terapia Intensiva: Diagnóstico e avaliação da capacidade de aderência e formação de biofilme

Couto F.M.M.¹, Andrade S.L.², Buonafina M.D.S.¹, Leal A.F.G.¹, Magalhães O.M.C.¹, Vasconcelos F.M.T.S.¹, Santos F.A.G.¹, Neves R.P.¹.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, ²Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus, AM. Email: fabiolabiologa@hotmail.com

Resumo

Candidemia é a infecção da corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida*. A capacidade de *Candida* em aderir às células hospedeiras, infectar e causar doença é dita como potencial fenômeno de virulência sendo aderência, o evento inicial na patogênese, assim como formação de biofilmes, que podem provocar resistência terapêutica. Neste estudo foram avaliados pacientes em setores de cuidados intensivos quanto a ocorrência de candidemia e cepas de *Candida* foram testadas quanto à capacidade de adesão e formação de biofilme. Foram obtidos 11 isolados de *Candida* distribuídos entre as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. Todas apresentaram capacidade de aderir-se com intensidades forte e fraca, formando biofilmes de moderado a fraco. Pode-se ressaltar que a epidemiologia fornece relevantes informações sobre incidência de agentes etiológicos. Outrossim, testes de virulência como aderência e formação de biofilme, proporciona o conhecimento do grau patogênico do agente infeccioso e condução de uma terapêutica direcionada.

Palavras-chaves: *Candida*, Candidemia, Aderência, Biofilme

Introdução

O número de casos de infecções fúngicas invasivas tem aumentado substancialmente na América Latina e no mundo, estando esse elevado número relacionado a fatores que tornam os pacientes susceptíveis a tais infecções, destacando-se as causadas por leveduras (Garnacho-Montero *et al.*, 2012).

A severidade da doença de base comumente conduz à internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) por vezes associado a um tempo prolongado, bem como uso de procedimentos invasivos. Neste sentido, as levedurosas assumem um papel de destaque como causa de infecções endógenas e exógenas por consequência da

diminuição na imunidade humoral e celular, exposição a procedimentos invasivos que medeiam a quebra das barreiras de defesas naturais, antibioticoterapia de amplo espectro, uso de imunossupressores, tempo prolongado de permanência hospitalar e outras condições que favorecem essas micoses (Monteiro *et al.*, 2011).

Nas levedurosas, espécies de *Candida* são predominantes tendo atualmente conduzido a diversos quadros clínicos, desde superficiais a invasivos, a exemplo das infecções da corrente sanguínea, sendo causa de morbidade e em muitos casos, mortalidade Garnacho-Montero *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013).

A capacidade destas leveduras, agentes etiológicos de candidemia, em se aderir às células do hospedeiro, infectar e causar doença é definida como potencial de virulência, sendo o evento inicial na patogênese destas infecções. Outra condição que facilita o estabelecimento de infecções invasivas é a formação de biofilmes, os quais são agregados celulares embebidos por uma matriz polimérica extracelular que confere elevada resistência terapêutica (Lacaz *et al.*, 2002).

Este estudo fundamenta-se em pesquisas que busquem indicar a epidemiologia para casos de candidemia em UTIs e fatores de virulência relacionados.

Material e Métodos

Coleta de amostras clínicas e obtenção dos isolados de Candida spp.

Coletas foram realizadas em pacientes internados em UTI de Hospitais do Recife-PE após aprovação pelo comitê de ética da UFPE. Amostras de sangue venoso foram coletadas, por punção e adicionadas em tubos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI) para diagnóstico laboratorial micológico. Estes foram acondicionados por 72 horas a 37°C e após turvação, alíquotas foram transferidas para placas contendo meio Sabouraud Dextrose Ágar (DIFCO) e mantidas em até 15 dias.

Após o surgimento das colônias estas foram identificadas através da taxonomia clássica e confirmadas pelo método automatizado, baseados nas características morfofisiológicas (Barnett, 2000).

Realização de testes de patogenicidade

Para análise da capacidade de aderência, células epiteliais foram obtidas da cavidade bucal de hospedeiro jovem livre de caries, com previa higienização oral, e mantidas em banho de gelo. Em todas as etapas sobre testes de aderência foi utilizado o tampão fosfato (PBS). Os isolados de *Candida* foram semeados no meio ágar

Sabouraud com de 0,5% extrato de levedura. Após 72h, as leveduras foram suspensas em 2ml de PBS contidos em tubos, centrifugadas três vezes a 1.580 rpm por 10 minutos e re-suspendidas para uma concentração final de 2×10^7 cels/mL. As células de leveduras e as epiteliais foram homogeneizadas e agitadas durante duas horas.

Posteriormente, foram montadas lâminas com azul de metileno e realizada a microscopia. Os resultados foram expressos pela média aritmética e de acordo com a quantidade de leveduras aderidas foram interpretados como forte aderência (F), fraca aderência (f) e sem aderência visível (0).

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada com uma suspensão salina dos isolados de *Candida* com concentração final de 10^6 UFC/mL. 20µl foram inoculados em 180µl de ágar Sabouraud líquido contido em microplacas, mantidas a 35°C por 24h. O conteúdo foi aspirado e os poços lavados com água destilada, colocando safranina para avaliação de acordo com a intensidade da coloração, interpretando como fraca coloração (1+); coloração mediana (2+ e 3+) e fortemente corados (4+), representados como fraca, mediana e forte formação de biofilme.

Resultados

Foram acompanhados 1.462 pacientes internados nas UTIs dos hospitais públicos Agamenon Magalhães e Getúlio Vargas, ambos localizados na cidade do Recife, PE. Destes, foram obtidas 1.275 amostras de sangue, das quais o diagnóstico de candidemia foi conclusivo em 11 casos.

Com base na avaliação clínica, todos pacientes com suspeita de candidemia apresentaram estados febris. Vômitos, diarreia e problemas respiratórios também foram sintomas diagnosticados em nossa pesquisa.

Quanto às doenças de base dos que apresentaram a infecção, as de origem cardiovascular, diabetes mellitus, doenças hepáticas e neoplasias até o momento foram as mais incidentes. Entre as condições de risco associadas, as mais frequentes foram idade avançada, uso de terapia profilática com antifúngicos, antibioticoterapia e corticoidoterapia por longo período, nutrição parenteral e transplantes.

Nas etapas de diagnóstico laboratorial micológico foram isoladas culturas de leveduras com coloração de branca a creme, superfície de textura lisa e bordos regulares e irregulares.

O método de taxonomia clássica permitiu a identificação dos agentes etiológicos em nível de espécie, assim como o sistema automatizado Vitek-2 (Vitek Systems Inc., Hazelwood, Mo, EUA).

Dos casos de candidemia diagnosticados quatro corresponderam a espécie *C. albicans*, três *C. parapsilosis*, duas *C. guilliermondii* e uma *C. tropicalis* (Tabela 1). Os 11 isolados de *Candida* foram analisados quanto a capacidade de aderência às células epiteliais, importante evento caracterizado como inicial para determinar a patogenicidade das cepas, sendo demonstrado de forma diversificada nesta pesquisa.

Tabela 1. Capacidade de aderência e formação de biofilme por isolados de *Candida* obtidos do sangue de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva.

Número de registro	Espécie	Capacidade de aderência	Formação de biofilme
12199	<i>Candida albicans</i>	F	3+
8338	<i>C. albicans</i>	f	1+
12680	<i>C. albicans</i>	F	1+
121	<i>C. albicans</i>	f	2+
1302092	<i>C. albicans</i>	f	1+
633	<i>C. guilliermondii</i>	f	1+
772	<i>C. guilliermondii</i>	F	3+
13477	<i>C. parapsilosis</i>	f	2+
5551	<i>C. parapsilosis</i>	F	1+
13531	<i>C. parapsilosis</i>	f	1+
269	<i>C. tropicalis</i>	f	3+

F: Forte aderência, f: fraca aderência; 1+: fraca formação, 2+ e 3+: moderada formação.

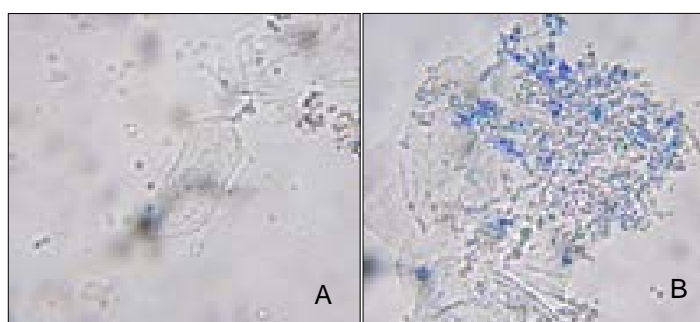


Figura 1. Células de leveduras do gênero *Candida* sp. aderidas às células do epitélio bucal. A) Fraca aderência; B) Forte aderência.

Nossos resultados apontaram forte e fraca capacidade de adesão às células epiteliais (Figura 1). Nenhum dos isolados de *Candida* avaliados apresentou incapacidade de aderir-se às células epiteliais. Todos os isolados mostraram capacidade de formação de biofilme; porém, de moderado a fraco (Figura 2). Uma cepa de *C.*

albicans (12199) e uma de *C. guiliermondii* (772) foram destaques com maiores capacidades de adesão e formação de biofilme, ou seja, maior grau de virulência.

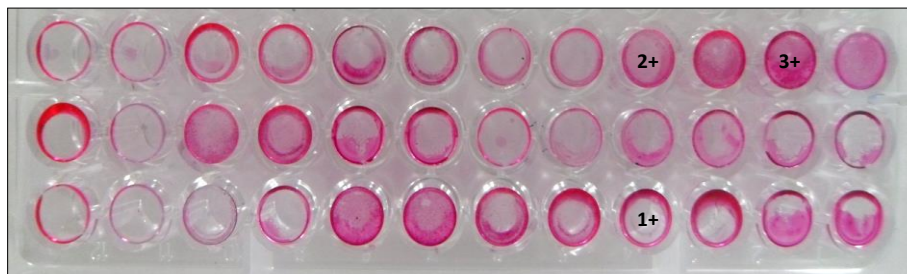


Figura 2. Placa de micro diluição demonstrando a intensidade da formação de biofilme pelos isolados de *Candida* sp. obtidas de amostras de sangue de pacientes com candidemia. 1+ (fraco); 2+ e 3+ (moderado)

Discussão

Durante as duas últimas décadas, tem ocorrido mudança no perfil epidemiológico das espécies de *Candida* isoladas em UTI. Recentemente, uma proporção crescente de episódios de candidemia tem sido causada por espécies de *Candida* não *albicans*, dado este que reflete em uma mudança epidemiológica importante (Chow et al., 2008). Contudo, *C. albicans* continua a ser a espécie predominante na maioria dos países (Calandra e Marchetti, 2002) isolada em infecções invasivas de diferentes sítios anatômicos (Leroy et al., 2009), estando também, esse dado, verificado em nossa pesquisa.

Com base no diagnóstico clínico, este é inespecífico sendo a febre o sinal mais comum, o que torna o diagnóstico de candidemia um desafio (Couto et al., 2011).

Frequentes estudos tem demonstrado importância em se investigar fatores de virulência de agentes patogênicos, sobretudo as leveduras do gênero *Candida* responsáveis por candidemia, para estabelecer estratégias de prevenção, controle e tratamento eficaz. Resultados obtidos por Tamura et al. (2007), também inferiram alto poder de aderência para isolados de *C. albicans*, conforme nossos resultados. Segundo os autores é consenso que a maior parte das candidemias seja precedida pelo evento de colonização do próprio paciente pela mesma espécie de levedura responsável pela infecção.

Biofilmes de *Candida* são difíceis de erradicar, especialmente devido a sua alta resistência a alguns antifúngicos. Consequentemente, investigações sobre a

patogenicidade de *Candida* têm sido foco na prevenção e gestão de desenvolvimento de biofilme, sua arquitetura, e resistência (Seneviratne et al., 2008). Kuhn et al. (2002), ao comparar os biofilmes formados por diferentes espécies de *Candida*, observaram que *C. albicans* produziu biofilmes mais fortes que as espécies de *Candida* não *albicans*. Contudo, conforme nossos achados, outros autores relatam que isolados de *Candida* oriundos de sangue apresentam, normalmente, biofilmes mais fracos.

Neste estudo foi observado que duas cepas se destacaram quanto a capacidade de melhor aderir-se e formar biofilme. Estes isolados podem possuir uma melhor capacidade de infecção assim como, possuir maior barreira e resistência às terapias antifúngicas devido a estes fatores. Podemos ainda salientar que todos os isolados capazes de realizar adesão às células epiteliais também apresentaram capacidade de formar biofilmes, podendo estas condições estarem correlacionadas, contudo, outros estudos precisam ser realizados para consolidar estas afirmações.

Conclusões

Espécies de *C. albicans* continuam a ser predominantes para casos de candidemia, contudo espécies não *albicans*, como *C. parapsilosis* tem também predominado.

Fatores de virulência como aderência a células epiteliais e formação de biofilme são de suma importância para avaliar o poder patogênico do agente no curso da infecção e conduzir a uma terapêutica melhor direcionada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, FACEPE, PROPESQ/UFPE pelo fomento necessário à realização das etapas inerentes a esta pesquisa.

Referências

Barnett JÁ, Payne RW, Yarrow D (2000) Yeasts: characteristics and identification. Third edition.

Calandra T, Marchetti, O (2002) Antifungal prophylaxis for intensive care unit patients: let's fine tune it. Intens Care Medic. 28.12.

Chow JK, Golan Y, Ruthazer R, Karchmer AW, Carmeli Y, Lichtenberg D (2008) Factors associated with candidemia caused by non *Candida albicans* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. Clin. Infect. Dis. 46:1206-1213.

Couto FMM, Macedo DPC, Neves RP (2011) Fungemia in a university hospital: an epidemiological approach. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44 (6):745-748.

Garnacho-Montero J, Díaz-Martín A, Márquez-Vácaro JA (2012) Management of Invasive Candidiasis in the Critically III. Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine. 324-336.

Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA (2002) Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrob Agents Chemother. 46(6), 1773-1780.

Lacaz, C. S., et al. 2002. Tratado de Micologia Médica, 9 ed., São Paulo, Sarvier.

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, Lortholary O (2009) Epidemiology management and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter prospective observational study in France (2005-2006). Crit Care Med. 37:1612-1618.

Monteiro DU, de Brum TF, Bolson C, de Oliveira, LTO, de La Rue ML (2011) Prevalência de *Candida* e *Cryptococcus* em hemoculturas oriundas de pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria, RS (HUSM) no ano de 2006. R Saúde (Santa Maria) Vol. 37, n. 2.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP (2008) Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Dis. 14(7):582-590.

Tamura NK, Negri MFN, Bonassoli LA, Svidzinski, TIE (2007) Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands. Rev Soc Bras Med Trop. 40(1):91-93.

Ye XR, Hu BJ, Gao XD, Ma J, Zhou Q, Zhou ZY, Zhou CM (2013) Analysis of clinical characteristics and risk factors associated with prognosis of patients with candidemia. Zhonghua. Oct. 93(40):3193-6.

Fatores de risco para o desenvolvimento de fungemia em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva em hospital terciário de Manaus

Cunha G.S.¹, Pimenta L.A.¹, Oliveira A.D.¹, Pio C.H.S.², Andrade S.L.¹.

¹Universidade do Estado do Amazonas (ESA/UEA), ²Fundação Hospital Adriano Jorge (FHAJ)
Emails: gisele.schneider@gmail.com, luarapimentta@hotmail.com,
ananda.duarte@hotmail.com, claudiapio@gmail.com, suannilemos@gmail.com

Introdução

Fungemia é a infecção da corrente sanguínea por fungos (Arendrup *et al.*, 2011). É um tipo de sepse, principal causa de óbito em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (Chen *et al.*, 2013). Os mesmos são submetidos a múltiplas condições de risco, como exposição a procedimentos invasivos (Colombo e Guimarães 2003), além da morbidade intrínseca à doença de base.

Outros fatores de risco para a fungemia na população em geral são frequentemente observados em pacientes de UTI, como a imunossupressão, o uso de cateter venoso central, nutrição parenteral total, hemodiálise, ventilação mecânica e múltiplas transfusões de sangue ou hemoderivados (Garey *et al.* 2006).

A incidência de fungemia entre o fim do século XIX e início do século XX apresentou aumento de 207% (Giri e Kindo 2012), tornando-se a quarta causa mais comum de infecções em corrente sanguínea, com índice de mortalidade situado entre 40 e 60%. No Brasil, a incidência é de 2,49 casos para cada 1000 admissões em hospital, média maior que a obtida nos EUA (0,5 casos para cada 1000 admissões) (Arendrup *et al.* 2011).

Há maior acometimento de homens (56%), com idade média de 51 anos entre os adultos, sendo 32% dos pacientes crianças, das quais 21% são menores de um ano (Chen *et al.*, 2013). O gênero *Candida* é o responsável por 80% dos casos de fungemia (Colombo e Guimarães 2003), com índice de mortalidade podendo chegar a 85.9% em pacientes de UTI (Chen *et al.*, 2013). Essa elevada taxa de mortalidade é correlacionada principalmente com a terapia antifúngica tardia (Sardi *et al.* 2013). Dentre as espécies mais comuns, *C. albicans* (40,9%) é a mais prevalente (Montagna *et al.* 2014).

Material e métodos

No presente estudo foram analisados os dados clínicos obtidos a partir da avaliação de prontuários eletrônicos do sistema iDoctor de 50 pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva da Fundação Hospital Adriano Jorge (FHAJ). No período de cinco meses, compreendido entre março e julho de 2014, foram selecionados somente aqueles pacientes que possuíam diagnóstico ou suspeita clínica de septicemia, independente de seu tempo de internação hospitalar, e para os quais havia sido solicitada a realização de uma hemocultura pelos médicos responsáveis pelos casos.

Os resultados das culturas foram acompanhados através dos laudos liberados pelo laboratório de análises clínicas da instituição, posteriormente adicionados aos prontuários pelos profissionais locais. No laboratório era realizada a rotina própria do hospital de isolamento em meio ágar-sangue.

Todos os pacientes incluídos na pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), concordando em participar do estudo e sendo informados sobre o que seria coletado de informações pessoais, tendo garantido seu sigilo.

Foram analisados alguns dos dados relevantes para o desenvolvimento de fungemia, como sexo; raça; faixa etária; doenças de base; utilização de medicações prévias, como corticoide, antibióticos e antifúngicos, além de outros medicamentos com efeito imunossupressor; realização de cirurgias e utilização de materiais de procedimento invasivos, como cateteres, sondas, nutrição parenteral e ventilação mecânica.

Resultados e discussão

No presente estudo foram analisados os dados clínicos de 50 pacientes hospitalizados em UTI da FHAJ, no período de março a julho do ano de 2014. Dentre eles, 56% eram homens e a faixa etária encontrada se estendeu dos 27 aos 79 anos, com idade média de 55 anos. Quanto à raça, 10% consideravam-se brancos, 80% pardos, 4% negros e 6% declararam-se indígenas.

As doenças de base encontradas e que foram causa de internação em UTI eram: Lúpus eritematoso sistêmico - LES (15 casos), hepatite crônica (11 casos), perfuração intestinal (um caso), insuficiência cardíaca descompensada - ICC (um caso), pneumonia

aspirativa (três casos), câncer (19 casos), dos quais sete eram hepáticos, nove gástricos, um de vesícula biliar e dois de próstata.

Observou-se ainda presença Diabetes Mellitus tipo 2 - DM2 - em 14 dos pacientes estudados, nunca de forma isolada como causa da internação, mas sempre concomitante à condição de base do paciente. Destes, cinco eram portadores de LES, seis de hepatite crônica, um de ICC, um de câncer hepático e um de câncer de próstata.

Quanto ao uso cateter venoso central, 30% dos pacientes o utilizaram e, 100%, acesso venoso periférico. Aproximadamente 40% utilizaram sonda vesical e 48%, sonda nasogástrica. 42% utilizaram corticoides (CEs) e 88%, antibióticos. Há registro de apenas quatro pacientes em uso de antifúngico: um deles utilizou Fluconazol, devido a um exame de escarro que evidenciou esporos e leveduras. Os demais usaram Miconazol em creme para micoses superficiais.

Todos os dados obtidos foram compatíveis com a literatura, que aponta idade média de 51 anos (Chen *et al.* 2013, Giri e Kindo 2012), próxima da encontrada nesta pesquisa, de 55 anos. Estudos como o de Montagna *et al.* (2014), mostram maior incidência no sexo masculino (56%), corroborando nossos achados (Figura 1).

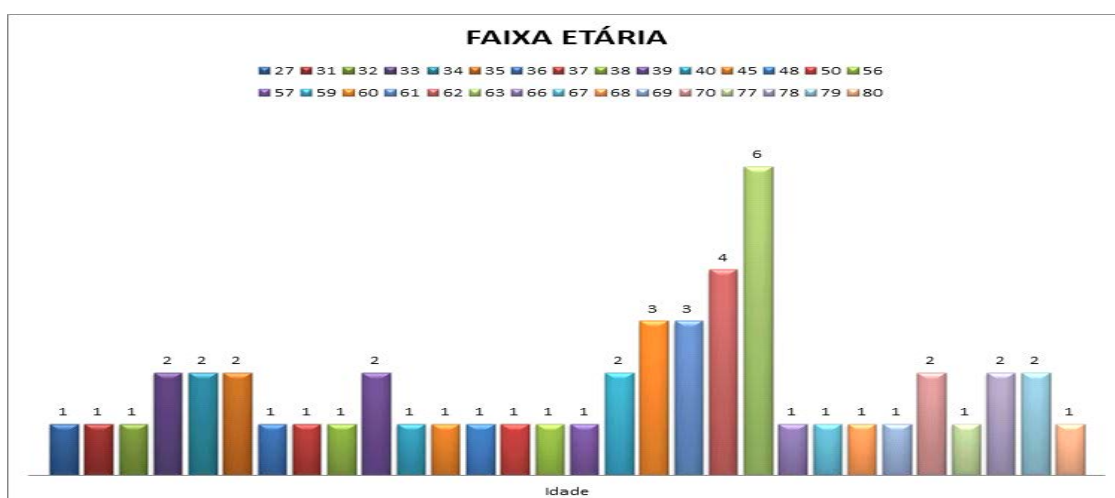


Figura 1. Faixa etária da população com fungemia

Condições imunossupressoras encontradas em nossos pacientes foram DM2 (28%), hepatite crônica (22%), uso de CEs (42%) e doenças malignas (38%). Essas formas de imunodepressão são fatores de risco significativos para fungemia, pois o controle da infecção fúngica depende da imunidade celular, principalmente neutrófilica

(Chen *et al.* 2013, Garey *et al.* 2006). A cirurgia abdominal é também relevante fator de risco, principalmente se complicada ou repetida (Arendrup *et al.* 2011, Ye *et al.* 2013). Isso foi observado no único caso de perfuração intestinal que apresentou deiscência de suturas e precisou de reoperação de urgência, sendo estes procedimentos feitos em tecidos altamente contaminados (Figura 2).

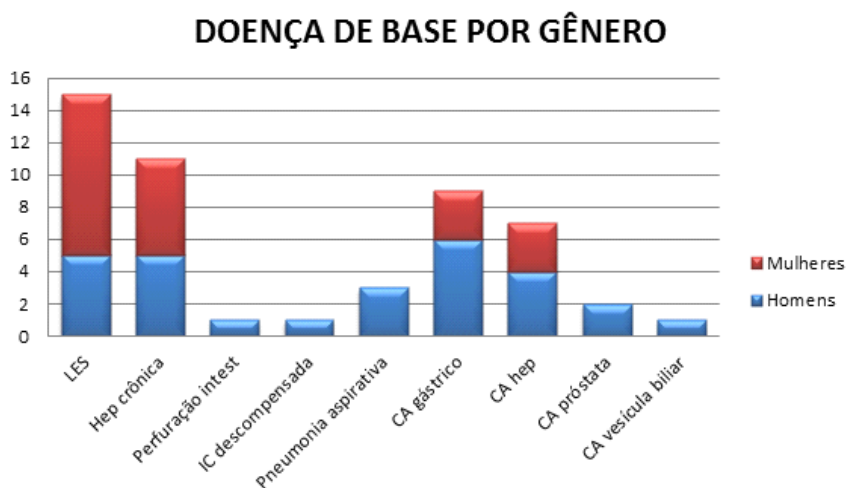


Figura 2. Doenças com base no sexo das pessoas.

Dentre as fontes de infecção exógenas mais comuns estão CVC. O estudo de Sardi *et al.* (2013) considera até 78% dos CVC contaminados por biofilme, o que é relevante ao se considerar que, na América Latina, *C. parapsilosis* é a espécie não-albicans mais comum, e mais correlacionada com a formação de biofilme (Marra *et al.* 2011). A presença de sonda vesical é fator de risco independente para candidemia, segundo Ye, *et al.* (2013), sendo utilizadas por 48% dos pacientes estudados. Antibioticoterapia foi instituída em 88% dos pacientes, e um dos mecanismos patogênicos das candidíases secundárias ao uso de antibióticos é a proliferação excessiva de leveduras quando bactérias são eliminadas. Ocorre agressão tecidual por endotoxinas fúngicas, além de efeito químico do antibiótico, o qual pode ainda levar a menor produção de globulinas que possuem potencial candidicida, como no uso de tetraciclina (Colombo e Guimarães 2003). Infecções fúngicas superficiais foram observadas em três dos pacientes estudados. Vale ressaltar que a colonização prévia por *Candida* é considerada um fator de risco independente para a disseminação por via hematogênica (Colombo e Guimarães 2003, Marra *et al.* 2011) (Figura3).

PROCEDIMENTOS INVASIVOS

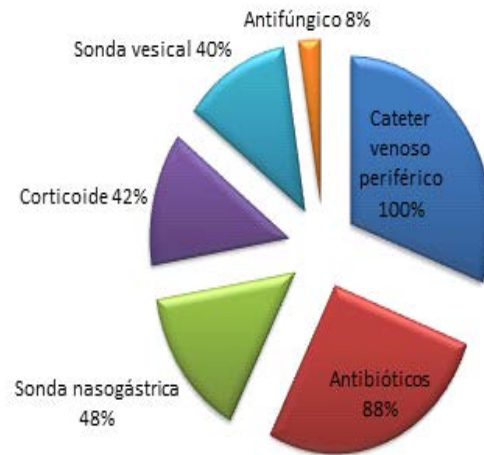


Figura 3. Procedimentos invasivos

Conclusão

Confirmamos a presença de fatores de risco bem descritos e discutidos pela literatura mundial, considerados predisponentes para o desenvolvimento de fungemia em pacientes de UTI. Desse modo, reafirmamos a necessidade de considerar a hipótese de fungemia precocemente, nos pacientes expostos às condições pesquisadas.

Referências

ajustar as referências

Não colocar apenas o nome do primeiro autor. Citar todos

Arendrup *et al.* (2011). Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungemia. *J Clin Microbiol* **volume número e páginas?**

Chen *et al.* Clinical significance of time to positivity for yeast in candidemia. *J of Microbiol, Im and Infec* 2013 **volume número e páginas?**

COLOMBO, A. L. e GUIMARAES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003 **volume número e páginas?**

GAREY, *et al.* Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis* 2006 **volume número e páginas?**

GIRI, S. and KINDO, A.J. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Ind J of Med Microbiol* 2012 **volume número e páginas?**

MARRA, *et al.* Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011 **volume número e páginas?**

MONTAGNA, *et al.* Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. *Eur Rev for Med and Pharmac Sciences* 2014

8PINHAT, *et al.* Fungal colonization in newborn babies of very low birth weight: a cohort study. *J Pediatr.* 2012 **volume número e páginas?**

SARDI, *et al.* *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 2013 **volume número e páginas?**

TOWNSEND, *et al.* SABISTON: Tratado de cirurgia: a base biológica da prática cirúrgica moderna. 18. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 2 v.

YE, *et al.* Analysis of clinical characteristics and risk factors associated with prognosis of patients with candidemia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2013 **volume número e páginas?**

Agradecimentos

Agradecemos à agência de fomento FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas).

Avaliação das formulações contendo extrato metanólico de *Libidibia ferrea* contra infecção causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Jensen B.B.¹, Comandolli-Wyrepkowski C.D.^{1,3}, Santos P.A.², Barros A.M.C.¹, Soares F.V.^{1,3}, Pinheiro F.G.¹, Domingos P.R.C.^{1,3}, Naiff M.F.¹, Franco A.M.R.¹

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; ² Universidade Federal de Goiás;

³ Universidade Federal do Amazonas. Email: afranco@inpa.gov.br

Resumo

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença infecto-parasitária, mas não contagiosa de transmissão vetorial, cujo vetor é o Flebotomíneo fêmea que inocula no hospedeiro o parasita do gênero *Leishmania* que posteriormente desenvolverá diferentes formas clínicas de acordo com cada espécie do parasita. O tratamento terapêutico para esta doença apresentam diferentes problemáticas inerentes da eficácia à via de administração. O uso de produtos naturais torna-se uma grande alternativa para o tratamento desta doença, com intuito de extrair um princípio ativo que tenha ação antileishmania. Uma dessas plantas é a *Libidibia ferrea* que em trabalhos anteriores demonstrou atividade leishmanicida contra diferentes espécies de *Leishmania in vitro*. Portanto, surge à necessidade da avaliação biológica de sua atividade perante um ensaio *in vivo*.

Palavras-chaves: *Leishmania amazonensis*, *Mesocricetus auratus*, tratamento tópico, *Libidibia ferrea*, atividade antileishmania

Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, podendo apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Gontijo *et al.*, 2003). A Leishmaniose Tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 98 países,

distribuídos nos cinco continentes (África, América, Ásia, Europa e Oceania), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos (Alvar, 2012; Brasil, 2010).

Os fármacos utilizados como terapêutica para o tratamento da LT apresenta uma série de problemas, incluindo resistência do parasito, indução de efeitos colaterais e abandono dos pacientes por serem medicamentos de administração parenteral (Silva-López, 2010). A necessidade de tratamentos com maior eficácia e segurança vem estimulando pesquisas com produtos naturais de plantas com atividade antileishmania, levando em consideração que os vegetais possuem uma diversidade química de metabólitos secundários estruturalmente únicos.

Trabalhos anteriores mostraram inibição do crescimento *in vitro* de *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Cortez, 2004; Falcão, 2010). Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar em modelo *in vivo*, utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*), a atividade de formulações tópicas contendo o extrato metanólico de *Libidibia ferrea*, uma planta nativa da região Amazônica, no tratamento da forma cutânea da Leishmaniose, a partir dos aspectos da evolução clínica e o volume da lesão resultante da infecção desses animais experimentais com *Leishmania amazonensis* após o tratamento tópico.

Material e Métodos

Animais experimentais - O modelo biológico para o estudo foram 30 hamsters (*Mesocricetus auratus*) adultos (acima de 90 dias), machos. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, e o procedimento para o tratamento dos animais infectados ocorreu nas dependências do próprio Biotério. O projeto foi aprovado por Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/INPA, sob o número 009/2012.

Procedimentos para o tratamento tópico - Foram inoculados 10^6 cel/mL do parasito *L. amazonensis* (MHO/BR/2006/IM5584) no focinho de cada animal para o desenvolvimento da lesão cutânea. Após a inoculação, os animais foram separados e agrupados em gaiolas identificadas. Os grupos foram separados para receber os tratamentos: formulação com extrato MeOH de *L. ferrea* (EMX 1), formulação placebo (EMX 2), formulação com extrato de *L. ferrea* e Glucantime® (EMX 3), tratamento

com aplicações parenterais com Glucantime® (controle positivo) e grupo sem tratamento (controle negativo). As formulações foram aplicadas uma vez ao dia, 50 mg/aplicação/animal, na área e proximidades da lesão. A área total das lesões foi aferida diariamente com um paquímetro e o aspecto morfológico foi fotodocumentado.

Após a eutanásia dos animais com Euthanyle®, as lesões foram seccionadas no eixo longitudinal e desinfetadas. Foram transferidos segmentos de tecido para tubos com meio de cultura NNN (Nicolle, 1908; Novy, McNeal, 1904) e segmento para impressão em lâmina. Os tubos de cultura com meio NNN foram incubados em estufa a 25°C durante 7 dias para observação da presença/ausência de parasitas viáveis. As lâminas foram coradas pelo método de Giemsa, e quantificadas em microscopia óptica (1000X) quanto aos valores médios de amastigotas extracelulares e interiorizados em macrófagos.

Estatística - As médias dos volumes das lesões foram analisados por ANOVA e teste Tukey, a partir do programa GraphPadPrism versão 6. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

Formulações - As formulações foram preparadas segundo metodologia confidencial, acordo Internacional entre o INPA e a Universidade de Helsinki, pelo programa VAIKUTUS – FP7 – PEOPLE – IRSES – 295262.

Resultados e Discussão

Após 30 dias da inoculação dos animais de experimentação, os hamsters apresentaram lesão característica de leishmaniose na forma cutânea na região do focinho, mostrando um aumento no volume da região.

Habitualmente são utilizados camundongos ou hamsters jovens e pré-púberes em ensaios biológicos *in vivo* para a Leishmaniose, pois estes são mais suscetíveis a infecção (Lima, 2008). Quanto a inoculação, esta pode ser realizada em diferentes partes do corpo como, na base da cauda por via intradérmica (Rodrigues, 2012), no coxim plantar (Eissa *et al.*, 2011) ou até mesmo no focinho, local definido para os experimentos do presente projeto.

Segundo Suman e Nichi (2011), através dos modelos animais é possível analisar a atividade de drogas em relação à absorção, distribuição, metabolismo e excreção e para dar uma indicação inicial da toxicidade, embora nenhum reproduza com precisão o que acontece nos humanos.

Após os vinte e cinco dias de tratamento foi possível avaliar o aspecto (macroscópico) clínico das lesões dos hamsters de todos os grupos, e determinar uma comparação entre eles. Todos os animais apresentaram lesão de forma nodular bem desenvolvida, diferentemente das lesões de animais que são infectados com o parasita *Leishmania braziliensis*, com lesões de aspecto nodulares pequenos e pouco aparentes, compatíveis para início do tratamento (Lainson, 2010).

O grupo EMX 1 durante e após o tratamento desenvolveram uma crosta na área da lesão e não foi observada uma redução da lesão como se esperava. Os animais do grupo EMX 2 durante e após o tratamento desenvolveram na lesão uma úlcera de tamanho relativamente pequeno. Os animais dos grupos EMX 3 e Controle positivo durante e após o tratamento apresentaram lesões nodulares, mas não obteve-se uma redução considerável das lesões nos animais, já que o medicamento utilizado no grupo controle é o mesmo preconizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento para Leishmaniose (Brasil, 2010). Acredita-se que por conta da suscetibilidade dos animais de experimentação a desenvolver a doença, a concentração do Glucantime® utilizada foi insuficiente, já que outros trabalhos demonstraram a necessidade de pelo menos 100 mg para a cura dos animais de experimentação (Lima, 2008; Rodrigues, 2012). Os animais do grupo controle negativo durante e após o tratamento, as lesões se agravaram e apresentaram características ulcerosas e com infecções secundárias (Figura 1).

Os fragmentos das lesões provenientes dos animais dos grupos que foram semeados em meio NNN para verificação de parasitos viáveis com grau de infectividade, todos os tubos apresentaram parasitas na forma promastigotas, com morfologias fusiformes e viáveis, no entanto somente nos grupos EMX 2, CON+ e CON- foram observadas rosetas nos cultivos após sete de dias de incubação.

Evolução da lesão durante o Tratamento

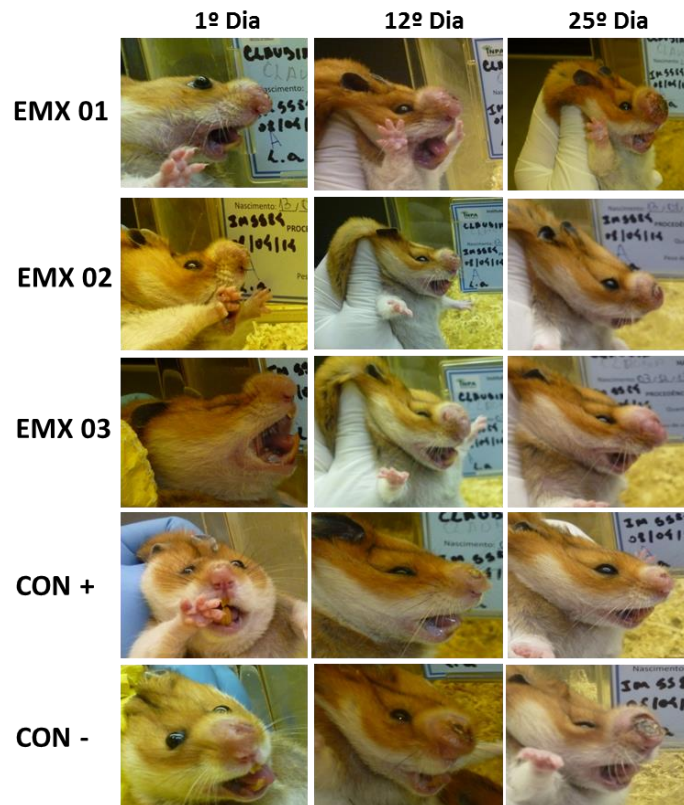


Figura 1 - Evolução clínica (observação macroscópica) das lesões em focinho de *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em diferentes fases do estudo de tratamento tópico. EMX1, EMX2 e EMX3 formulações utilizadas em sigilo científico; CON+ = tratamento com Glucantime®; CON- = grupo com ausência de tratamento.

A aferição diária dos volumes dos focinhos, registradas no decorrer do tratamento dos animais permitiu calcular as médias dos volumes das lesões e consequente avaliação da significância estatística. Pode-se observar que a partir do 13º dia o grupo CON+ demonstrou significância estatística. O grupo EMX 3 apresentou significância estatística a partir do 17º dia. O grupo EMX 2 apresentou significância estatística a partir do 19º dia. O grupo EMX 1 apresentou significância estatística a partir do 20º dia, segundo o teste Anova e Tukey com parâmetro de $p < 0,05$ referente ao grupo CON- (Figura 2).

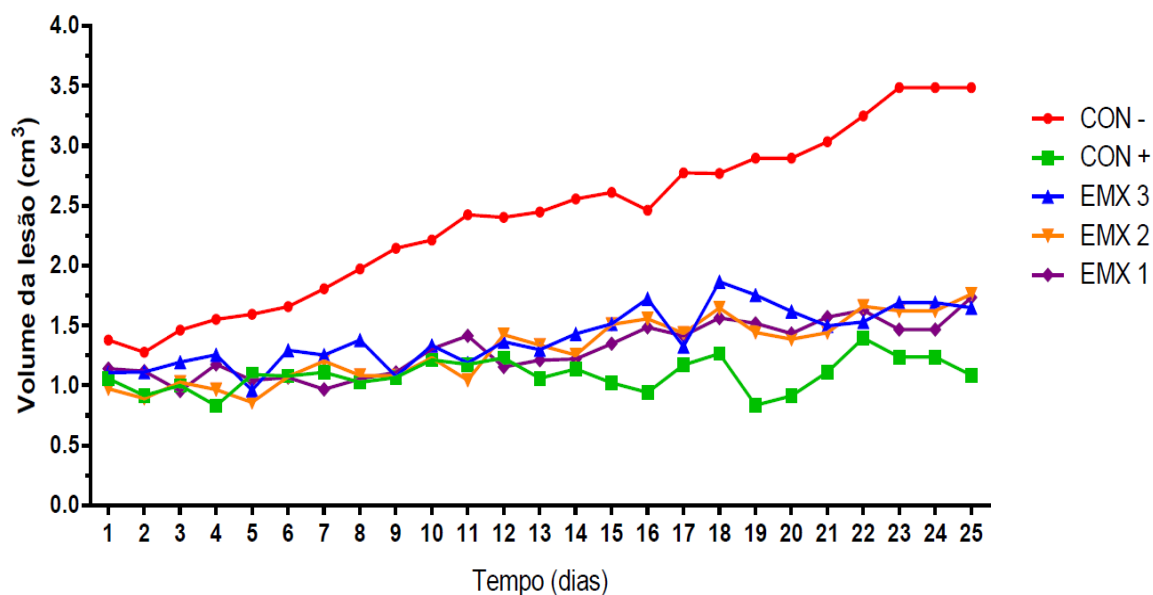


Figura 2 - Evolução clínica do volume da lesão em *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* durante o tratamento com as formulações tópicas e Glucantime®.

Conclusões

Após a análise dos resultados obtidos na avaliação das formulações, pode-se concluir que houve diferença no aspecto clínico entre os grupos tratados com formulações tópicas em relação ao controle, onde o grupo EMX1 apresentou um desempenho semelhante ao grupo com Glucantime, no entanto, a análise parasitológica demonstrou a presença de parasitas viáveis em todos os animais. Estes fatores demonstraram a necessidade da continuidade dos estudos com ajustes de concentrações nas formulações tópicas contendo princípios ativos do estrato de *L. ferrea* e um maior tempo de experimentação, além da inclusão de outros parâmetros farmacológicos a serem estudados.

Referências

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, DenBoer M (2012) WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis World wide and global estimates of its incidence. *PLoSOne*, 7: 35671.

Brasil (2010) Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde.

Cortez AC (2004) Avaliação da atividade in vitro dos extratos fitoquímicos de *Libidibia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales – Libidibiaceae) para *Leishmania* spp. e *Trichophyton* spp. Manaus, Brasil, 86p. (Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical, Universidade Federal do Amazonas. UFAM).

Eissa MM, AMER EI, EL SAWY SMF (2011) *Leishmania major*: Activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 128: 382-390.

Falcão NMS (2010) Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e análise de frações semi-purificadas de *Libidibia ferrea* Martius (Fabales: Libidibiaceae). Manaus, Brasil, 83p. (Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas. UFAM).

Gontijo B, Carvalho MLR (2003) Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 71-80.

Lainson R (2010) The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their Discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amaz Saude*, 1(2): 13-32.

Lima LFA (2008) A Influência do Gênero e da Infecção materna na resposta à *Leishmania braziliensis* em filhotes de hamster. Fortaleza, Brasil, 52p. (Dissertação de Mestrado em Patologia, Universidade Federal do Ceará. UFC).

Nicolle GL (1908) Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C.R. Acad. Sci.* 146: 842-843.

Novy FG, MacNeal WJ, (1904) On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J. Infect. Dis.* 1: 1-30.

Rodrigues LF (2012) Avaliação da atividade in vivo do antimoníato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*

isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. Minas Gerais, Brasil, 91p. (Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz).

Silva-López RE (2010) Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova* 33: 1541-1543.

Suman G, Nishi (2011) Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug Discovery. *Indian J Med. Res.* 133: 27-39.

Aspergilose pulmonar em pacientes de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa. Manaus, Amazonas

Matsuda J.S.^{1,2,5}, Wanke B.³, Assumpção I.A.⁶, Balieiro A.A.S.², Santos C.S.S.², Cavalcante R.C.S.⁴, Muniz M.M.³, Torres D.R.⁶, Martinez-Espinosa F.E.^{1,2}, Souza J.V.B.⁶.

¹- Pós-Graduação em Medicina Tropical - Universidade do Estado do Amazonas / Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas; ²- Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus, Amazonas; ³- Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/INI), Rio de Janeiro, Brasil;

⁴-Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas; ⁵- Policlínica Cardoso Fontes-Secretaria Estadual de Saúde (SUSAM), Amazonas, Brasil;

⁶- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas.

E-mail: joyce@amazonia.fiocruz.br

Resumo

A aspergilose é a mais frequente das manifestações pulmonares das micoses, o agente causal são espécies patogênicas do gênero *Aspergillus*. Considerada doença oportunista, dependendo da integridade pulmonar e da árvore tráqueo-brônquica e do estado imunológico do hospedeiro. O *Aspergillus* ssp. pode comportar-se como agente sensibilizante, colonizador ou invasor. O objetivo desta pesquisa foi descrever os casos de aspergilose pulmonar diagnosticados na Policlínica Cardoso Fontes do Estado do Amazonas-Brasil, e analisar seus aspectos clínicos, laboratoriais e desfecho. Foi realizado um estudo observacional descritivo de dezembro de 2012 a novembro de 2014. Em pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar com exame de baciloscopia direta do escarro negativo, investigando aspergilose pulmonar. O material coletado por escarro induzido foi submetido ao exame de microscopia direta, cultivo para fungos. Adicionalmente, foi coletado soro para imunodiagnóstico de *Aspergillus fumigatus*. Trinta e seis pacientes foram diagnosticados com aspergilose pulmonar, sendo 20 (56%) do sexo masculino, a idade média foi de 48,6 anos. Todos pacientes tiveram tratamento prévio para tuberculose pulmonar. Os sintomas mais comuns foram tosse (100%, n = 36) e hemoptise (80%, n = 29), 22 (61%) apresentaram aspergiloma simples, enquanto os restantes 14 (39%) pacientes apresentaram aspergilose pulmonar cavitária crônica. Quatorze (39%) dos pacientes referiram tabagismo, que apresentou uma associação (p>0,01) com os pacientes que apresentaram forma mais grave. A presente pesquisa reforça a criação de um protocolo de acompanhamento clínico e laboratorial, em parceria com o programa de controle da tuberculose, com o objetivo de identificar a aspergilose pulmonar crônica precocemente.

Palavras-chave: Aspergilose pulmonar crônica, Aspergiloma pulmonar, Bola fúngica, TB negativa

Introdução

Micoses endêmicas têm emergido como um problema de saúde pública, mas todas elas têm sido negligenciadas e deveriam ser prioritárias para pesquisa na América Latina (1).

As manifestações pulmonares das micoses se apresentam com um amplo espectro de manifestações clínicas, desde infecção subclínica, tosse autolimitada até formas graves e letais (2).

A aspergilose é a mais frequente das manifestações pulmonares das micoses, representando um grupo diverso de infecções que em comum tem como agente causal espécies patogênicas termo tolerantes do gênero *Aspergillus*. Historicamente, *Aspergillus fumigatus* é o agente mais comum das várias formas de manifestações da aspergilose pulmonar, porém, atualmente observa-se um aumento progressivo de aspergilose causada por outras espécies, como *A. flavus*, *A. Níger*, *A. terreus*, entre outras (3). Considerada doença oportunista, dependendo da integridade pulmonar e da árvore tráqueo-brônquica e do estado imunológico do hospedeiro, espécies de *Aspergillus* podem comportar-se como agente: 1-sensibilizante, 2-colonizador ou 3-invasor, causando, respectivamente, os quadros clínicos de 1-aspergiloses alérgicas como a Aspergilose Bronco Pulmonar Alérgica (ABPA). 2.1-um simples aspergiloma ou aspergilose pulmonar intracavitária crônica, 2.2-fibrose pulmonar crônica por aspergilose ou 2.3-nódulo aspergilar (4), atingindo pessoas com lesões sequelares após uma outra doença pulmonar como a tuberculose, sarcoidose, pneumotórax etc. 3-Aspergilose invasiva, muitas vezes fatal, atinge pacientes gravemente imunocomprometidos, como em pessoas com neoplasias hematológicas (5).

Aspergillus spp. são fungos de distribuição universal na natureza, cuja porta de entrada é a via aérea, causando infecção humana após o contato direto com o meio ambiente com microfocos de agentes de micoses, cujos propágulos em suspensão aérea são inalados podendo atingir hospedeiros suscetíveis (6).

Em Boletim de 2012, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou a carga mundial da aspergilose pulmonar crônica em pacientes com sequela de tuberculose pulmonar (TB), especialmente em casos com cavitação pulmonar. Assim, para 7,7 milhões de casos de tuberculose pulmonar no mundo, foram estimados 372.000 de aspergilose pulmonar crônica, no período de um ano (7).

No Brasil, dos 70.789 casos novos de TB em 2011, a estimativa anual foi de 5.663 casos de aspergilose pulmonar crônica, com a taxa de 9,6 por 100.000 habitantes, com carga global substancialmente importante que requer uma investigação mais aprofundada nos países com alta carga de tuberculose. Os casos de aspergilose pulmonar crônica poderiam ser responsáveis por alguns tratamentos errôneos, como tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa, o que torna necessária e urgente uma melhor investigação para diagnosticar esta micose oportunista (8).

O objetivo deste estudo foi descrever os casos de aspergilose pulmonar diagnosticados na Policlínica Cardoso Fontes, referência Estadual em Pneumologia Sanitária no Estado do Amazonas-Brasil e analisar seus aspectos clínicos, laboratoriais e desfecho.

Material e métodos

Declaração de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) (aprovação nº 2081 em 16/12/2011). O consentimento informado foi obtido sistematicamente, todos os participantes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido de forma voluntária, após ser dada a todas as informações suficientes e necessárias. Todos os pacientes tiveram seus dados analisados anonimamente.

Foi realizado um estudo observacional descritivo de dezembro de 2012 a novembro de 2014.

O local do estudo foi na Policlínica Cardoso Fontes, na cidade de Manaus/AM, que é Referência Estadual em Pneumologia Sanitária, referenciada principalmente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), da rede Básica de Saúde, para tratamento e/ou esclarecimento diagnóstico de pneumopatias agudas ou crônicas. Anualmente são atendidos, em média, 8.000 pacientes nos ambulatórios da Policlínica. Este centro de referência é responsável por 60% dos diagnósticos dos casos novos de tuberculose (TB) em Manaus. Em 2014 a Policlínica notificou 300 casos novos de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa (SINAN-AM, acesso em 15/02/2015).

Em pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar com exame de baciloscopia direta do escarro negativo, foi investigado aspergilose pulmonar. Os prontuários de todos os pacientes foram revisados para coletar as características do paciente. O material coletado por escarro induzido foi submetido ao exame de microscopia direta e

cultivo para fungos. Adicionalmente, foi coletado soro para imunodiagnóstico de *Aspergillus fumigatus*, anti-HIV e realizada tomografia computadorizada do tórax.

O exame microscópico direto para pesquisa de fungos foi realizado na amostra do escarro ao microscópio, entre a lâmina e a lamínula, com KOH a 10% e Tinta Nanquim (9).

Os meios de cultivo utilizados foi Sabouraud-ágar 2% com cloranfenicol e actidiona, NSA (Niger Seed Agar), BHI (infusão de cérebro e coração), de 4 a 6 tubos de cada amostra, em temperatura de 25°C a 37°C, por um período de 4 a 6 semanas.

Realizamos sorologia por Imunodifusão Dupla em Gel de Agar (IDD) seguindo o protocolo descrito por Ouchterlony, 1962 (10). Esta prova se baseia na detecção de anticorpos específicos contra os agentes fúngicos especificados, com formação de imunocomplexos que, devido ao seu alto peso molecular, precipitam formando uma linha visível. Os antígenos utilizados foram antígenos filtrados de cultura de *Aspergillus fumigatus*, produzidos "in house" a partir da cepa JJG - seguindo o protocolo descrito por Coleman e Kaufman em 1972 (11).

A análise descritiva foi expressa como média \pm desvio padrão ou percentual, enquanto que a análise estatística foi realizada utilizando o qui-quadrado ou Fisher, o nível de significância foi de 5%.

Caso de Aspergilose pulmonar crônica (APC): Paciente com manifestações clínicas (sintomáticos respiratórios, com ou sem hemoptise), e radiológicas compatíveis, e exame sorológico positivo (12).

Resultados

De um total de 400 pacientes atendidos, 36 (9%) foram diagnosticados com aspergilose pulmonar na Policlínica Cardoso Fontes no período de dois anos, sendo 20 (56%) do sexo masculino, a idade média foi de 48,6 anos (variação de 16-80 anos). Todos tiveram história de tratamento prévio para tuberculose pulmonar.

Os sintomas mais comuns apresentando entre os 36 pacientes foram tosse (100%, n = 36) e hemoptise (80%, n = 29). Entre os 36 pacientes, 22 (61%) apresentaram aspergiloma simples ou bola fúngica (Grupo 1), enquanto os demais 14 (39%) apresentaram aspergilose pulmonar cavitária crônica (APCC) ou complexa,

Grupo 2 (Tabela 1). O tabagismo apresentou uma associação ($p=0,01$) com a forma mais grave, aspergilose complexa (Tabela 1).

Tabela 1 Características dos pacientes com Aspergilose Pulmonar Crônica diagnosticados na Policlínica Cardoso Fontes - Manaus/AM 2012-2014

	GRUPO 1 (N=22, 61%) Aspergiloma Simples	GRUPO 2 (N=14, 39%) Aspergilose Complexa	P VALUE X², Fisher <0,05
Idade	47,3 (16-80)	50,6 (19-77)	*
Gênero			
Masculino	12	8	0,5
Raça/Cor			
Branca	11	5	0,3
Tabagismo	5	9	0,01
Hemoptise	16	13	0,1
HIV**	1	1	*
Sorologia Positiva <i>Aspergillus fumigatus</i>	10	13	0,004
Bola Fúngica	21	9	0,02
Lesão Pulmonar Bilateral	4	12	>0,01

*Não atende ao pressuposto do teste. **HIV= Vírus da imunodeficiência humana.

Dos 36 pacientes da presente pesquisa, 02 (6%) apresentaram o exame anti-HIV reativo (Tabela 1). A sorologia por IDD resultou positiva em 23 (64%) dos pacientes, mais frequente ($p=0,004$) nos casos com APCC. Dezesesseis (44%) pacientes apresentaram lesão pulmonar bilateral, geralmente em associação ($p>0,01$) com a APCC, forma mais grave (Tabela 1).

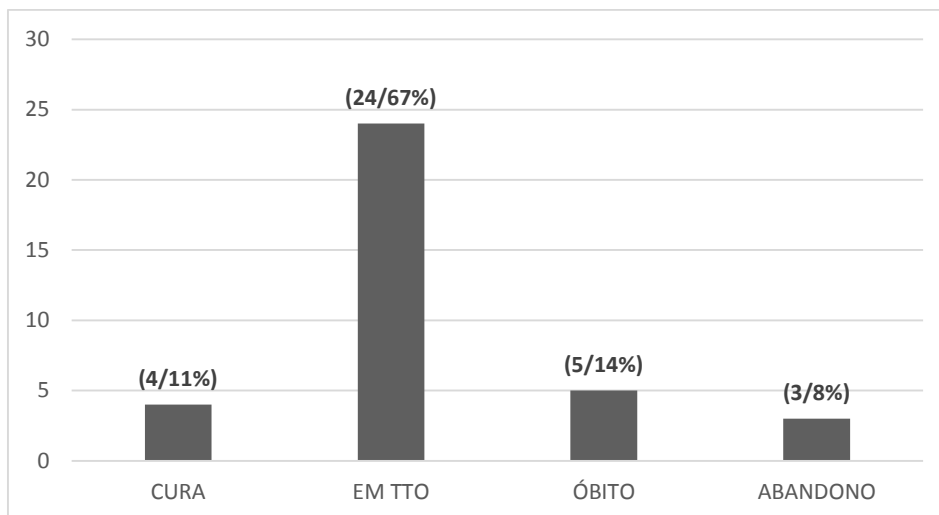


Gráfico 1- Desfecho dos casos de aspergilose pulmonar da Policlínica Cardoso Fontes Manaus/AM 2012-2014

Todos os pacientes iniciaram tratamento com Itraconazol 400mg/dia (13), sendo que três pacientes, posteriormente, fizeram a ressecção cirúrgica do aspergiloma, os demais pacientes não tinham indicação de tratamento cirúrgico ou se recusaram a realizar cirurgia.

Houve cura em quatro pacientes, três após ressecção cirurgia da bola fúngica pulmonar e apresentaram negatificação da sorologia por IDD, e um paciente após 1 ano de tratamento clínico. Dos cinco óbitos, um teve co-morbidade com neoplasia de estômago (Gráfico 1), os outros casos foram a óbito por problemas respiratórios graves e/ou hemoptise, como foi o caso de uma paciente com 19 anos, do gênero feminino, que realizou seu primeiro tratamento para TB com 14 anos, e posteriormente mais 3 tratamentos para TB, com diagnóstico de aspergilose pulmonar tardiamente a tomografia computadorizada do tórax revelou lesão bilateral com cavitação contendo material com densidade em partes moles (bola fúngica) (Figura 1), não apresentou outras co-morbidades, como diabetes ou HIV, foi à óbito.

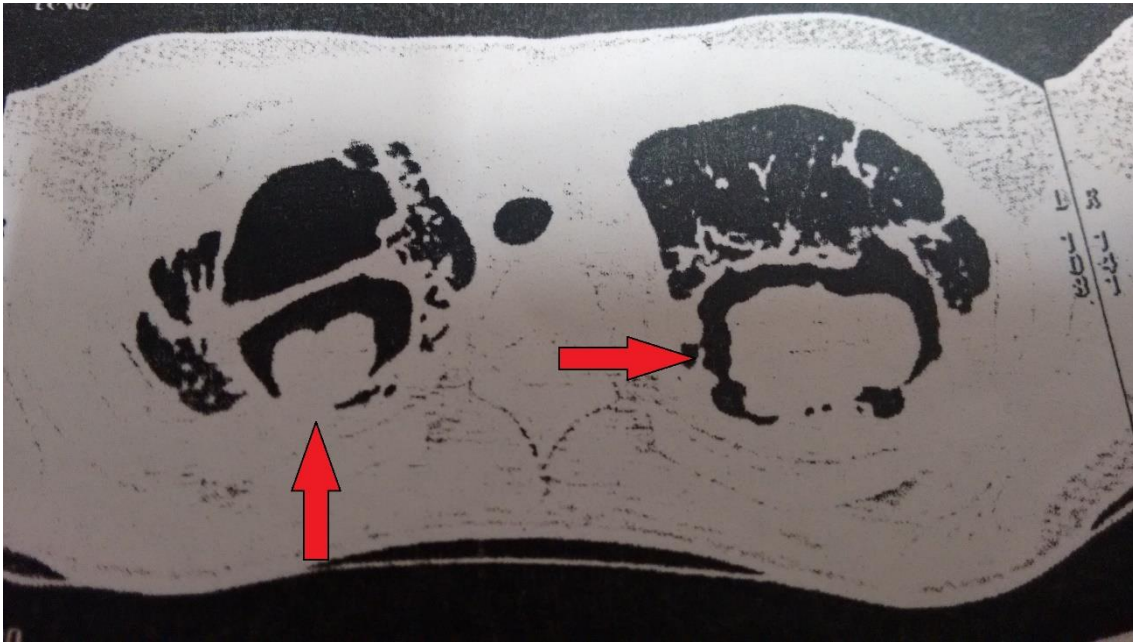


Figura 1- Aspergilose pulmonar cavitária crônica: corte tomográfico do pulmão revela lesão bilateral com cavitação contendo material com densidade em partes moles, bola fúngica (setas), com ar ao seu redor, formando o sinal do crescente aéreo. Paciente com 19 anos, 4 tratamentos anteriores para TB, óbito.

Discussão

Descrevemos 36 casos de aspergilose pulmonar diagnosticados em pacientes de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa na Policlínica Cardoso Fontes em Manaus/AM, no período de dois anos.

A aspergilose pulmonar, independentemente de uma associação com TB, ainda permanece negligenciada na Amazônia brasileira. Em regiões com alta prevalência de tuberculose, como o Estado do Amazonas, os casos de aspergilose pulmonar podem passar despercebidos porque as manifestações pulmonares frequentemente assemelham-se clínica e radiologicamente à tuberculose pulmonar crônica (14).

As formas crônicas de aspergilose pulmonar são pouco reconhecidas nos países em desenvolvimento, não só por causa da presença dominante da tuberculose, mas também devido à falta de consciência médica e à escassez de recursos laboratoriais para o seu diagnóstico de rotina. No Estado do Amazonas, a incidência de tuberculose em 2013 foi de 70,6 casos por 100.000 habitantes (SINAN), a maior do Brasil. A partir destes dados estima-se a ocorrência 192 novos casos de aspergilose por ano no estado do Amazonas. Infelizmente, a maioria destes pacientes é negligenciada ou são tratados repetida e empiricamente como TB (7).

Em todo o mundo ocorrem anualmente cerca de 9,6 milhões de casos novos e 1,5 milhões de mortes por TB. O tabagismo é um fator de risco independente causando cerca de um duplo aumento não só na tuberculose ativa, mas também na TB multirresistente (15, 16). No presente estudo, tabagismo apresentou uma associação de risco aumentado para ($p=0,01$) a forma APCC, forma mais grave da aspergilose pulmonar.

Os diagnósticos por imagem, em especial a radiologia, desempenham um papel importante no reconhecimento, tratamento e acompanhamento de enfermidades pulmonares (14). No presente estudo a presença de lesão cavitária bilateral estava associada aos casos de APCC (aspergilose complexa). Parau et al. (2011) observaram que, a forma cavitária crônica é encontrada em 55% dos casos de aspergilose e Luo et al. (2011) demonstraram que imagens de condensação na radiografia do tórax são encontradas em 76,5% desses pacientes. Imagens de condensação precedem cavitação e podem ser utilizadas como informação para diagnóstico precoce das infecções fúngicas pulmonares (17, 18).

A IDD é um teste simples e de fácil execução, de elevada sensibilidade e especificidade (de 80 a 95%) (19). Porém, o resultado é apenas qualitativo, indicando a necessidade de investigar mais acuradamente o agente quando a reação for positiva (9, 20). Outra limitação é que este teste é espécie-específico e indicativo apenas para *Aspergillus fumigatus* e atualmente observa-se um aumento progressivo de aspergilose causada por outras espécies, como *A. flavus*, *A. Níger*, *A. terreus*, entre outras (3). Importante ressaltar que o teste da IDD mostrou-se muito útil no acompanhamento do tratamento, negatizando em alguns meses após a cura, como foi observado no presente estudo, tornando-a exame de escolha para esta finalidade (19).

Conclusões / Recomendações

Os resultados obtidos nesta pesquisa reforçam a necessidade de criação e implementação de um protocolo de acompanhamento clínico e laboratorial, em parceria com o programa de controle da tuberculose, com o objetivo de identificar a aspergilose pulmonar crônica precocemente, principalmente nos pacientes de tuberculose pulmonar prévia, com baciloscopia do escarro negativa, imagem cavitária residual, lesão pulmonar bilateral, e/ou hemoptise.

Sugerimos que todos estes pacientes suspeitos se submetam a investigação continua, com exames micológicos de secreções respiratórias e a realização de sorologia IDD para detecção de anticorpos anti-*Aspergillus fumigatus*.

Agradecimentos

Estudo apresentado como parte da tese de doutorado de JSM do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas / Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Gostaríamos de agradecer a todos os funcionários da Policlínica Cardoso Fontes/AM/Brasil, pela colaboração e assistência na realização deste estudo.

Financiamento: Este trabalho foi apoiado por “Innovative approaches for tuberculosis control in Brazil”, number 1 U2R TW006883-09, Program ICOHRTA AIDS/TB, sponsored by Fogarty International Center/National Institutes of Health, USA.

FAPEAM Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, Edital • CHAMADA N.001/2013 – PPSUS, Nº Processo: 062.00649/2014. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta de dados e análise, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

Referências

Tirar números e citar as referências no texto do trabalho

1. Dujardin JC, Herrera S, do Rosario V, Arevalo J, Boelaert M, Carrasco HJ, et al. Research priorities for neglected infectious diseases in Latin America and the Caribbean region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(10):e780.
2. Smith JA, Kauffman CA. Pulmonary fungal infections. *Respirology*. 2012;17(6):913-26.
3. Zanjani LS, Bakhtiari A, Sabokbar A, Khosravi AR, Bahonar A, Memarnejadian A. Sensibilisation of asthmatic patients to extracted antigens from strains of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *J Mycol Med*. 2012;22(1):58-63.
4. Jhun BW, Jeon K, Eom JS, Lee JH, Suh GY, Kwon OJ, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2013;51(8):811-7.
5. Desoubeaux G, Bailly E, Chandenier J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Updates and recommendations. *Med Mal Infect*. 2014.
6. Volz PA. Transmission of fungal spores in space and their conditions for survival: a review. *Microbios*. 1997;91(368-369):145-51.
7. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bulletin of the World Health Organization*. 2012;89(12):864-72.
8. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ*. 2011;89(12):864-72.
9. Xavier MO, Oliveira Fde M, Severo LC. Chapter 1: laboratory diagnosis of pulmonary mycoses. *J Bras Pneumol*. 2009;35(9):907-19.

10. Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. *Prog Allergy*. 1962;6:30-154.
11. Coleman RM, Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. *Appl Microbiol*. 1972;23(2):301-8.
12. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20(3):545-61, vi.
13. Maturu VN, Agarwal R. Itraconazole in chronic pulmonary aspergillosis: In whom, for how long, and at what dose? *Lung India : official organ of Indian Chest Society*. 2015;32(4):309-
14. Ginzburg MA, Krut'ko VS, Rozhkova ER. [X-ray diagnosis of aspergillosis and its differential diagnosis from pulmonary tuberculosis]. *Vestnik rentgenologii i radiologii*. 1973;48(1):38-42.
15. Loddenkemper R, Bronnecke M, Castell S, Diel R. [Tuberculosis and Tobacco Smoking]. *Pneumologie*. 2016;70(1):17-22.
16. Marahatta SB, Adhikari B, Mishra SR, Raut S, Ramasoota P, Malla P, et al. Association of Previous Smoking Habit and Perceived Social Discrimination with the Risk of Multi-Drug Resistant Tuberculosis in Central Nepal. *Journal of Nepal Health Research Council*. 2015;13(29):95-101.
17. Parau A, Homorodean D, Jodal A, Cristina D. [Respiratory features of Aspergillus infection in eight years of pulmonology practice]. *Pneumologia*. 2011;59(4):204-7, 9-10.
18. Luo BL, Zhang LM, Hu CP, Xiong Z. Clinical analysis of 68 patients with pulmonary mycosis in China. *Multidiscip Respir Med*. 2011;6(5):278-83.
19. de Azevedo PZ, Sylvestre TF, Cavalcante Rde S, de Carvalho LR, Moris DV, de Oliveira ML, et al. Evaluation of the Double Agar Gel Immunodiffusion Test and of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis and Follow-Up of Patients with Chronic Pulmonary Aspergillosis. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134841.
20. Limper AH. The changing spectrum of fungal infections in pulmonary and critical care practice: clinical approach to diagnosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2010;7(3):163-8.

Perfil de citocinas T_{H1} e T_{H2} em pacientes com *Leishmania (Viannia) guyanensis* no Norte do Brasil

Melo E.D.¹, Espir T.T.^{1,2}, Guerreiro T.S.B.², Figureira L.², Naiff M.², Costa A.G.¹, Malheiro A.¹, Franco A.M.R.²

¹ Universidade Federal do Amazonas; ² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Email: afranco@inpa.gov.br

Resumo

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. O principal mecanismo de defesa do hospedeiro humano contra esta infecção é seu sistema imune e a resposta mediada por células que exerce papel fundamental por ser o microrganismo um agente intracelular obrigatório. O sistema imune atua numa rede de cooperação envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. O IFN- γ é uma citocina essencial no perfil da resposta T_{H1} devido a sua capacidade de aumentar o efeito microbicida dos fagócitos que levam a morte do parasita. A IL-10 é uma citocina que possui como uma de suas principais funções inibir as células de perfil T_{H1}, já a IL-4 induz a diferenciação das células para um perfil T_{H2}, direcionando assim para uma resposta imune humoral. Na infecção por *Leishmania* as citocinas desempenham importante papel na resolução e controle da doença, assim IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram quantificados no soro de 15 indivíduos infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* antes e após o tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime[®]) e este mesmo número amostral de indivíduos (1:1) não infectados utilizando análise por citometria de fluxo (Kit CBA (BD) - "Cytometric Beads Array"). Os resultados demonstram maior produção das citocinas em indivíduos infectados ($p < 0,0001$) tanto antes quanto após o tratamento, revelando a presença de resposta T_{H1} e T_{H2} na infecção por *L. (V.) guyanensis*. Ao comparar os níveis séricos das citocinas na infecção por *L. (V.) guyanensis* com o de outras espécies de *Leishmania* observa-se importante variação, o que sugere uma possível relação entre a espécie do agente etiológico e os mediadores da resposta imune.

Palavras Chaves: Leishmaniose Tegumentar Americana; *Leishmania (Viannia) guyanensis*; resposta imune; citocinas.

Introdução

A leishmaniose corresponde a um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (Gontijo e Carvalho, 2003; Brasil, 2007). O parasita é transmitido ao hospedeiro mamífero quando as fêmeas hematófagas de insetos conhecidos popularmente como flebotomíneos realizam seu repasto sanguíneo (Ryan *et al.*, 1987). Nas Américas, o gênero de flebotomíneos de maior importância é *Lutzomyia*, o qual possui aproximadamente 30 espécies com comprovada capacidade de transmitir *Leishmania* spp. (Arias e Naiff, 1981; Lainson e Shaw, 1998).

Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção no mundo e que ocorram cerca de 2 milhões de novos casos de leishmaniose por ano, sendo 200 a 400 mil leishmaniose visceral e 700 mil a 1,2 milhões leishmaniose tegumentar americana (LTA). Desses 2 milhões de casos estimados, apenas cerca de 600 mil são notificados (Alvar *et al.*, 2012). Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2014), no ano de 2012 foram notificados 25.647 casos de LTA no Brasil e 2.394 no estado do Amazonas.

As doenças pertencentes a esse grupo são consideradas crônicas e possuem apresentação bastante heterogênea, variando desde lesões de pele com evolução autolimitada até a forma visceral fatal (Murray *et al.*, 2005).

No Brasil existem sete espécies de *Leishmania* causadoras de LTA e destas, quatro são encontradas no estado do Amazonas: *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Brasil, 2007; Teixeira *et al.*, 2013). A LTA possui quatro principais formas de apresentação clínica: forma cutânea localizada, cutânea disseminada ou cutaneomucosa, mucosa e difusa, as quais possuem características morfológicas, resposta imune do hospedeiro e agente etiológico variáveis para cada expressão (Veronesi e Focaccia, 2009).

O período de incubação da doença varia de uma a quatro semanas e inicia com o surgimento de pápula eritematosa, única ou múltipla, no local de inoculação. As lesões evoluem formando úlceras com bordos altos, irregulares e infiltrados, com fundo granuloso de coloração vermelho-vivo, coberta ou não por exsudato seroso ou sero-purulento. Posteriormente, elas podem cicatrizar espontaneamente ou dar origem a placas vegetantes verrucosas. Segundo Sampaio e Rivitti (2001), a maioria dos casos de lesões mucosas é secundária a lesões cutâneas por disseminação hematogênica, tendo como principais sítios as cavidades nasais, faringe, laringe e cavidade oral.

Há três principais fatores que interferem na apresentação dessas lesões: características do protozoário, do vetor e do hospedeiro. Quanto ao protozoário, sabe-se que a espécie *L. (V.) guyanensis*, a de maior incidência no estado do Amazonas, possui alta capacidade de disseminação

linfática resultando em lesões cutâneas múltiplas (Azulay, 2008; Veronesi e Focaccia, 2009). Quanto ao vetor, a saliva representa importante papel na transmissão devido às suas características de vasodilatação, anti-agregação plaquetária, anti-hemostasia, imunossupressão, exacerbação da infecção e indução de infecciosidade de *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado (Kamhawi, 2000; Soares e Turco, 2003; Oliveira, 2008). E quanto ao hospedeiro, o estado do seu sistema imune e o perfil predominante de resposta são cruciais para o estabelecimento, permanência e resolução da lesão.

No primeiro momento da infecção formas promastigotas de *Leishmania* são inoculadas no hospedeiro, onde serão submetidas a mecanismos de defesa não específicos da resposta imune natural. Alguns promastigotas possuem a capacidade de evadir tal defesa, possibilitando sua ligação e entrada em fagócitos, como macrófagos e neutrófilos, mediadas por receptores, onde rapidamente se transformam em sua forma amastigota (Brittingham, 1996; Teixeira, 2013). Os macrófagos secretam então citocinas como TNF- α e IL-1, recrutando linfócitos T_H1. Estes ativados aumentam a secreção de citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos para a área.

O sistema imune atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. A geração de uma resposta imune adequada durante o processo infeccioso é o ponto crucial para direcionar a progressão ou cura da doença (Carvalho *et al.*, 2012).

De acordo com dados da literatura, a imunidade celular representada pelo perfil T_H1 seria a resposta mais eficaz contra *Leishmania*, uma vez que este é um parasita intracelular obrigatório (Reis *et al.*, 2006; Owens *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 2013). O IFN- γ é uma citocina essencial neste perfil devido a sua capacidade de aumentar o efeito microbicida dos fagócitos que levam a morte do parasita (Abbas *et al.*, 2008). Entretanto, uma resposta exacerbada com liberação muito elevada de produtos microbicidas pelos macrófagos seria capaz de lesar o tecido normal. A IL-10 (interleucina-10) é uma citocina que possui como uma de suas principais funções inibir as células do perfil T_H1. Já a IL-4 induz a diferenciação das células para um perfil T_H2, direcionando assim para uma resposta imune humoral, que é ineficaz para a eliminação de patógenos intracelulares, como no caso das formas da LTA (Schwarz *et al.*, 2013).

Na infecção por *Leishmania* as citocinas desempenham importante papel na resolução e controle da doença (Carvalho *et al.*, 2012), por isso é de suma importância averiguar o nível sérico destas no curso clínico antes e após o tratamento com o antimonial pentavalente, medicamento de primeira escolha determinado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2007).

Material e Métodos

O estudo foi realizado no laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) com parceria da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INPA sob número 006/2010.

Foi realizado levantamento de dados clínico-epidemiológicos de 15 pacientes atendidos no município de Rio Preto da Eva/AM no período de 2010 a 2011 e que obtiveram diagnóstico positivo de LTA na forma cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*. Foi utilizado o soro dos 15 pacientes antes (AT) e após (PT) tratamento com antimonial pentavalente e de 15 indivíduos não infectados (controle negativo = CN) para determinar os níveis séricos das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10. Todos os indivíduos aceitaram participar da Pesquisa assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram considerados como critérios de inclusão: pacientes acima de 18 anos, com LTA forma cutânea e infectados por *L. (V.) guyanensis*; e de exclusão: sorologia positiva para HIV e Doença de Chagas.

Para identificação da espécie de *Leishmania* foi utilizada previamente a técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de agarose conforme protocolo descrito por Cupilillo *et al.* (1994), utilizando oito sistemas enzimáticos: Malato Desidrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), Isocitrato Desidrogenase (IDH, E.C.1.1.1.42) com substrato NAD e NADP, Enzima Málica (ME, E.C.1.1.1.40), Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.44), Aconitato Hidratase (ACON, E.C.4.2.1.3) e Hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1). A identificação das espécies foi obtida através da comparação dos perfis isoenzimáticos das amostras com cepas de *L. (V.) braziliensis* (MHOMBR/1975/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOMBR/1975/M4147), *L. (V.) naiffi* (MDASBR/1979/M5533) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8).

Para dosagem das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 foi utilizada a técnica de citometria de fluxo CBA (“Cytometric Bead Array”) com o “Kit BDTM Human T_H1/T_H2 Cytokine” (Cat. N° 560484, Lot.: 29132, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) seguindo as orientações descritas pelo fabricante. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia. Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) da citocina foi utilizado o software FCAP-ArrayTM (v3.0.1).

A análise estatística foi realizada utilizando o software *Graphpad Prism*[®] 6. Quando foram comparadas duas variáveis utilizou-se o teste de *Mann-Whitney*, e quando três o teste de *Kruskal-Wallis*.

Resultados e Discussão

Os dados clínico-epidemiológicos dos 15 pacientes do estudo estão relacionados na tabela 1. Do total de pacientes, nove eram do sexo masculino (60%) e seis do sexo feminino (40%), a média de idade foi 30 anos (18 a 58 anos), número de lesões 1,7 (um a oito), tempo de evolução das lesões 54 dias (10 a 150 dias) e tamanho das lesões 25 mm (10x08 a 60x60 mm).

Tabela 1. Dados clínico-epidemiológicos dos 15 pacientes procedentes do município de Rio Preto da Eva/AM com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana na forma cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* nos anos de 2010 e 2011.

Código da Amostra	Sexo	Idade (anos)	Ocupação	Tempo de Infecção (dias)	Número de Lesões	Tamanho da Lesão (mm)
MHOM/BR/10/IM5637	F	31	Bióloga	60	1	17x18
MHOM/BR/10/IM5653	M	18	Estudante	90	1	30x20
MHOM/BR/10/IM5690	F	58	Agricultora	60	1	17x18
MHOM/BR/10/IM5692	F	30	Auxiliar administrativo	15	2	60x60
MHOM/BR/10/IM5694	M	29	Caseiro	14	1	20x23
MHOM/BR/11/IM5697	M	19	Estudante	14	1	13x16
MHOM/BR/11/IM5749	M	38	NR	30	1	17x14
MHOM/BR/11/IM5772	M	26	Agricultor, caseiro	120	1	10x08
MHOM/BR/11/IM5773	M	30	Agricultor	10	1	32x21
MHOM/BR/11/IM5775	M	24	Piscicultor	21	4	08x50
MHOM/BR/11/IM5828	F	43	Agricultora	150	1	11x08
MHOM/BR/11/IM5869	M	24	Agricultor, caseiro	60	8	60x60
MHOM/BR/11/IM5874	F	23	Dona de casa	120	1	80x14
MHOM/BR/11/IM5875	M	49	Policial militar	30	1	11x07
MHOM/BR/11/IM5976	F	18	Dona de casa	21	1	17x13

Legenda: Isolados: M mamífero, HOM *Homo sapiens*, BR país de origem (Brasil)/ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA; Sexo: M masculino, F feminino, NR não relatado. Pacientes que apresentaram mais de uma lesão foi incluído o valor da lesão de maior tamanho (baseado em Naiff *et al.*, 2009).

Os hábitos dos pacientes foram classificados em dois grupos: (i) atividades na floresta: biólogo, agricultor, caseiro, piscicultor, policial militar e estudantes que auxiliam na agricultura; (ii) atividades sem relação com floresta: auxiliar administrativo e dona de casa. As ocupações referentes ao primeiro grupo corresponderam a 79% dos casos, reafirmando a associação de hábitos em locais de mata fechada e alto risco de adquirir a infecção (Alvar *et al.*, 2012).

Os níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10 no soro dos 15 pacientes antes (AT) e após (PT) tratamento foram mais elevados quando comparados ao CN (tabela 2). As diferenças foram estatisticamente

significativas, com $p < 0,0001$ em todas as análises (figura 1). Ao comparar AT e PT, não se observa uma grande variação nos níveis séricos das citocinas, mostrando que estas estão presentes nos períodos aqui estudados.

Tabela 2. Níveis séricos das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 antes (AT) e após (PT) tratamento com antimonial pentavalente dos 15 pacientes procedentes do município de Rio Preto da Eva/AM com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana na forma cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* nos anos de 2010 e 2011.

Código da Amostra	IFN- γ / T _H 1		IL-4 / T _H 2		IL-10	
	AT	PT	AT	PT	AT	PT
MHOM/BR/10/IM5637	77,22	70,07	181,61	170,17	101,53	101,53
MHOM/BR/10/IM5653	80,08	72,93	164,45	208,78	101,53	110,11
MHOM/BR/10/IM5690	82,94	80,08	195,91	204,49	77,22	87,23
MHOM/BR/10/IM5692	100,1	85,80	193,05	177,32	94,38	90,09
MHOM/BR/10/IM5694	72,93	92,95	193,05	183,04	90,09	75,79
MHOM/BR/11/IM5697	87,23	71,50	187,33	195,91	95,81	87,23
MHOM/BR/11/IM5749	117,26	67,21	185,90	197,34	112,97	95,81
MHOM/BR/11/IM5772	82,94	94,38	205,92	198,77	134,42	132,99
MHOM/BR/11/IM5773	85,8	84,37	187,33	188,76	95,81	97,24
MHOM/BR/11/IM5775	78,65	68,64	195,91	188,76	104,39	95,81
MHOM/BR/11/IM5828	68,64	65,78	187,33	180,18	101,53	82,94
MHOM/BR/11/IM5869	87,23	70,07	204,49	185,90	101,53	102,96
MHOM/BR/11/IM5874	82,94	82,94	185,90	184,47	91,52	88,66
MHOM/BR/11/IM5875	77,22	92,95	210,21	218,79	87,23	111,54
MHOM/BR/11/IM5976	64,35	82,94	175,89	184,47	82,94	92,95

Legenda: Isolados: M mamífero, HOM *Homo sapiens*, BR país de origem (Brasil)/ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA. Níveis quantificados em pg/mL.

Estudos vêm demonstrando que IFN- γ possui um importante papel na leishmaniose (Reis *et al.*, 2006; Carvalho, 2012). Kima e Soong (2013) afirmam a importância desta citocina no desenvolvimento e subsequente controle da infecção por *Leishmania*. Matta *et al.* (2009) demonstraram aumento da produção de IFN- γ em pacientes com *L. (V.) guyanensis* quando comparados com o controle negativo, entretanto inferior àqueles com infecção por *L. (V.) braziliensis*. Estes autores sugerem uma provável correlação entre os níveis séricos de IFN- γ e as diferentes manifestações clínicas e resposta ao tratamento.

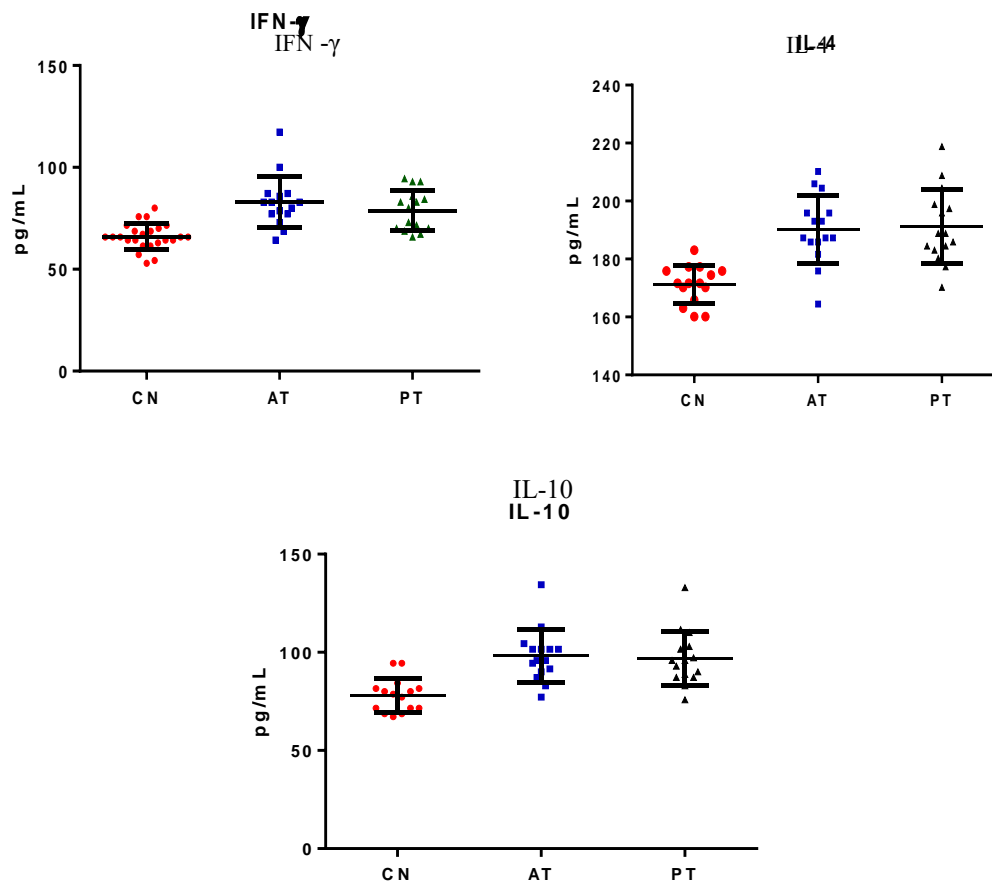


Figura 1. Níveis séricos das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 em 15 indivíduos sem infecção (CN) e pacientes procedentes do município de Rio Preto da Eva/AM (1:1), com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana na forma cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* nos anos de 2010 e 2011 antes (AT) e após (PT) tratamento com antimonial pentavalente.

O papel da IL-10 como reguladora de linfócitos T_H1 vem sendo confirmado na literatura (Owens *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 2013). Diversas células podem secretar esta citocina, dentre elas T_H2 , T regulatórias (Treg) e T_H1 . Schwarz *et al.* (2013) demonstraram recentemente que ao inibir a secreção de IL-10 por linfócitos T em camundongos BALB/c susceptíveis, estes se tornaram resistentes à infecção por *Leishmania*, demonstrando assim, a ação desta citocina no curso da infecção. Espir *et al.* (2014) analisaram os níveis séricos de IL-10 em pacientes infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, evidenciando níveis mais elevados na infecção por *L. (V.) guyanensis* em relação a *L. (L.) amazonensis*, sugerindo um perfil de resposta misto T_H1/T_H2 durante a infecção por *L. (V.) guyanensis*.

Em camundongos infectados por *L. (L.) major*, Kopf *et al.* (1996) demonstraram correlação entre IL-4 e a susceptibilidade a infecção. Recentemente, Hurdal e Brombacher (2014) sugeriram que esta citocina, dependendo da forma clínica da doença e do modelo de estudo experimental, pode atuar como mediador de resposta imune T_H1 , promovendo resistência à infecção. O presente

estudo demonstra a persistência de níveis de IL-4 superiores ao CN após a resolução clínica das lesões (PT).

Conclusões

A associação das atividades florestais com os casos da doença reforça a necessidade de esclarecimento a respeito da doença para a população sobre o risco de infecção ao adentrar os locais de floresta e mata fechada. É de suma importância implementar a medicina preventiva na população estudada, uma vez que a LTA é considerada como um agravo à saúde pública.

Os resultados do presente estudo demonstram que os níveis séricos das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 assim como o quadro clínico dos pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* diferem do que se tem na literatura sobre outras espécies de *Leishmania*, sugerindo uma possível relação entre a espécie do agente etiológico, os mediadores da resposta imune e as características clínicas das lesões. Conclui-se que na LTA causada por *L. (V.) guyanensis* há presença de perfil T_H1 e T_H2 antes e após o tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime[®]).

***Endereço para correspondência:** Dra. Antonia Maria Ramos Franco, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde. – CSAS, INPA, Av. André Araújo, 2.936, CEP 69060-001, Manaus, AM, Brasil. afranco@inpa.gov.br.

Referências

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2008) Imunologia celular e molecular. Elsevier, Rio de Janeiro.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS* 7(5):e35671.

Arias JR, Naiff RD (1981) The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 279-286.

Azulay RD, Azulay DR, Azulay-Abulafia L (2008) Dermatologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS (2014) Available at: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>. Accessed 02 Aug 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (2007) Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Brasília.

Brittingham A, Mosser DM (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today* 12: 44-47.

Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM (2012) Protective and pathologic immune responses in human tegumentar leishmaniasis. *Front Immunol* 3(301): 1-9.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H (1994) A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50: 296-311.

Espir TT, Figueira LP, Naiff MF, da Costa AG, Ramalho-Ortigão M, Malheiro A, Franco AMR (2014) The Role of Inflammatory, Anti-Inflammatory, and Regulatory Cytokines in Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. *J Immunol Res* 2014: 1-10.

Gontijo B, Carvalho MLR (2003) Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(1): 71-80.

Hurdayal R, Brombacher F (2014) The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett* 161(2):179-183.

Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D (2000) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*, 290: 1351-1354.

Kima PE, Soong L (2013) Interferon gamma in Leishmaniasis. *Front Immunol* 4: 1-5.

Kopf M, Brombacher F, Kohler G, Kienzle G, Widmann KH, Lefrang K, Humborg C, Ledermann B, Solbach W (1996) Il-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J Exp Med* 184(3): 1127-1136.

Lainson R, Shaw JJ (1998) New World leishmaniasis the neotropical *Leishmania* species. In: A Ballows, M Sussman (eds.). *Microbiology and microbial infections*, L Topley and Wilson's Collier, London, USA, 241-266.

Matta NE, Nogueira RS, Franco AMR, Souza IS, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Leon LL, Da-Cruz AM (2009) *Leishmania (Viannia) guyanensis* Induces Low Immunologic Responsiveness in Leishmaniasis Patients from an Endemic Area of the Brazilian Amazon Highland. *Am J Trop Med Hyg* 80(3): 339-344.

Murray HW, Flanders KC, Donaldson DD, Sypek JP, Gotwals PJ, Liu J, Ma X (2005) Antagonizing Deactivating Cytokines to Enhance Host Defense and Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Infect Immun* 73(7): 3903-3911.

Oliveira F, Lawyer PG, Kamhawi S, Valenzuela JG (2008) Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis* 16: 226.

Owens BMJ, Beattie L, Moore JWJ, Brown N, Mann JL, Dalton JE, Maroof A, Kaye PM (2012) IL-10-producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c⁺ cell population during Visceral Leishmaniasis. *PLoS Pathog* 8(7): 1-13.

Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Pereira VRA (2006) Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Patol Trop* 35(2): 103-115.

Ryan L, Lainson R, Shaw JJ (1987) Leishmaniasis in Brazil XXIV. Natural flagellate infections of sandfly (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania (Leishmania) brasiliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 353-359.

Sampaio SAP, Rivitti EA (2001) Dermatologia. Artes Médicas, São Paulo.

Schwarz T, Remer KA, Nahrendorf W, Masic A, Siewe L, Muller W, Roers A, Moll H (2013) T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLoS Pathog* 9(6): 1-11.

Soares RP, Turco SJ (2003) *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Ciênc* 75: 301-330.

Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, Souza W (2013) Atlas didático: ciclo de vida da *Leishmania*. Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, Rio de Janeiro.

Veronesi R, Focaccia R (2009) Tratado de infectologia. Atheneu, São Paulo.