

CD DE RESUMOS

IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA E I ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA APLICADA



**DE 17/11 A 20/11/2010
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE / RS - BRASIL**

APOIO



COMISSÃO ORGANIZADORA

Carolina De Marco Veríssimo

Luciana Senter

Michele Mann

Francielle Bucker

Ismael Pretto Sauter

Éder Moraes Soucedo

Ana Maris Carlesso

Simone Pieniz

Priscila Pauly Ribas

Manuela Bruxel

Raquel Damasceno

Martha Oliveira

Tiane Martin de Moura

SUMÁRIO

1. Microbiologia Agrícola

ANÁLISE DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE URÉIA EM *AZOSPIRILLUM AMAZONENS*. Tiago Ebert Fritsch; Ricardo Cecagno; Irene Silveira Schrank

ATIVIDADE DAS ENZIMAS ARILSULFATASE, β -GLICOSIDASE E FOSFATASE ÁCIDA EM COMPOSTO DE RESÍDUOS DE FRIGORÍFICO, CASCA DE ARROZ NATURAL E CARBONIZADA. Deisy Sharelene Arruda Morales; Marta Eliane Doumer; Zaida Inês Antonioli; Sandro José Giacomini; Manoeli Lupatini

BIOCONTROLE DA ESCALDADURA EM ARROZ A PARTIR DE SEMENTES MICROBIOLIZADAS COM RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS OU COMBINADAS. Jaqueline Tavares Schafer, Lauren Fonseca Anacker, Stefânia de Amorim Bernal Moreno, Paulo Ricardo Benedeti, Marcio Wissmann da Costa, Andréa Bittencourt Moura

BIOCONTROLE DA QUEIMA DAS BAINHAS EM ARROZ PELA UTILIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS E COMBINADAS. Jaqueline Tavares Schafer, Lauren Fonseca Anacker, Marcio Wissmann da Costa, Aline Garske dos Santos, Dediel Junior Amaral Rocha; Rafael Barcellos Nunes, Andréa Bittencourt Moura

BIOCONTROLE DE *Bipolaris oryzae* PELA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ COM RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS E EM COMBINAÇÃO. Jaqueline Tavares Schafer, Lauren Fonseca Anacker, Paulo Ricardo Benedeti, Marcio Wissmann da Costa, Stefânia de Amorim Bernal Moreno, Andréa Bittencourt Moura

BIOMASSA E ATIVIDADE MICROBIANA EM POMAR DE CÍTRUS CONDUZIDOS SOB SISTEMA ORGÂNICO E CONVENCIONAL. Dione Dinael Roehrs, Douglas Vicente Francesquett, Débora Elizabeth Barbosa de Medeiros, Andressa de Oliveira Silveira, Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

CARACTERIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. UTILIZADOS NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Daiana Bortoluzzi Baldoni; Carolina de Oliveira Fialho; Rute Terezinha da Silva Ribeiro; Manoeli Lupatini; Edicarla Trentin; Zaida Inês Antonioli

CARCTERIZAÇÃO MOLECULAR (ITS rDNA) DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* DE DIFERENTES RAÇAS E ORIGENS GEOGRÁFICAS. Manoeli Lupatini; Carolina de Oliveira Fialho; Rute Terezinha da Silva Ribeiro; Edicarla Trentin; Zaida Inês Antonioli; Deisy Sharelene Arruda Morales

CONTROLE BIOLÓGICO DA MURCHA DO CURTOBACTERIUM PELA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO. Márcio Wissmann da Costa; Bianca Obes Corrêa, Jaqueline Tavares Schafer, Paulo Ricardo Benedeti, Andréa Bittencourt Moura

CONTROLE DE QUALIDADE, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO SEMIA AUTORIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE INOCULANTES. Bettina Marks; Simone Hirakata; Eliane Bangel; Gilmário Silva; Silviane Ferreira; Larissa Pingret; André Barata; Roberta; Rafael Vargas

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS AUTORIZADAS PARA A COMERCIALIZAÇÃO EM INOCULANTES NO BRASIL. Manuela Bruxel, Thaís de Lima Cabral, Marcos Roberto Stroichen, Neemias da Silva, Raquel Garibaldi Damasceno, Enilson Luiz Saccol de Sá

EFEITO DE *Trichoderma* spp. NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DAS SEMENTES DE *Gochnatia polymorpha* (ASTERACEAE). Daniele Franco Martins Machado; Francini Requia Parzianello; Antonio Carlos Ferreira da Silva

EFEITO DO PRINCÍPIO ATIVO CAPTANA NA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR *Trichoderma* spp. Priscila Pauly Ribas; Isabel Cristina Padula Paz; Aida Terezinha Santos Matsumura

EFEITO DO PRINCÍPIO ATIVO CAPTANA NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR *Trichoderma* spp. Priscila Pauly Ribas; Isabel Cristina Padula Paz; Aida Terezinha Santos Matsumura

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À MANCHA PARDA DO ARROZ POR RIZOBACTÉRIAS, ISOLADAS E EM COMBINAÇÃO. Jaqueline Tavares Schafer, Lauren Fonseca Anacker, Paulo Ricardo Benedeti, Bianca Obes Corrêa, Ismail Teodoro de Souza Júnior, Marcos Antonio Bacarin, Andréa Bittencourt Moura

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS AQUOSOS SOBRE PATÓGENOS DE VIDEIRA (*Vitis* spp.). Sheila Montipó; Renata Gava; Lucas da Ressurreição Garrido; Francine Tramontina

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ATIVOS CONTRA *Monilinia fructicola*. Lauren Fonseca Anacker; Jaqueline Tavares Schafer; Andréa Bittencourt Moura

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UREASE NATIVA DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*. Marcela Proença Borba; Mônica de Medeiros Silva; Joseph Carmine Polacco; Célia Regina Carlini

2. Microbiologia do Ambiente

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE LEVEDURAS PRESENTES EM VINHOS TINTOS ARMAZENADOS EM BARRICAS DE CARVALHO. Magali Stival Berlesi; Carla Zanelatto; Taís Letícia Bernardi; Patrícia Valente

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA NAS ÁGUAS DO ARROIO DILÚVIO E ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS. Daniele Vargas de Oliveira; Tiele da Silva Carvalho; Sueli Van Der Sand

ATIVIDADE DA UREASE SOB A INFLUÊNCIA DO XISTO RETORTADO EM CULTIVO DO FEIJOEIRO. Marta Eliane Doumer; Douglas Adams Weiler; Luana Liberalesso de Freitas; Raquel Schmatz; Isaías Binotto; Sandro José Giacomini; Carlos Augusto Posser Silveira

ATIVIDADE DA ARILSULFATASE SOB O EFEITO DO XISTO RETORTADO EM CULTIVO DE FEIJOEIRO. Marta Eliane Doumer; Douglas Adams Weiler; Luana Liberalesso de Freitas; Raquel Schmatz; Guilherme Dietrich; Sandro José Giacomini; Carlos Augusto Posser Silveira

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *ENTEROCOCCUS SP.* ISOLADOS DE FRANGOS DE CORTE. Cassenego, A.P.V.; Spadari, C.; D'azevedo, P.A.; Frazzon, J.; Van Der Sand, S. T.; Frazzon, A.P.G.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS POLISPÓRICOS E MONOSPÓRICOS DE *BIPOLARIS SOROKINIANA* EM DISTINTOS MEIOS DE CULTURA. Thaís Feltrin; Michele Bertoni Mann; Elisandra Minotto; Cristina Spadari, Sueli T. Van Der Sand

BACTÉRIAS ISOLADAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA PRODUZEM COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME E ANTIBIÓTICA. Susana de Oliveira Elias; Igor Stelmach Pessi; Alexandre José Macedo

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS E BIODIESEL. Naiara Aguiar Santestevan; Francielle Bucker; Cristiane Barbosa; Fatima Menezes Bento

BIORREDUÇÃO E BIORSORÇÃO DO COBRE PELO EXTRATO DE CÉLULAS LIVRES E CÉLULAS INTACTAS. Robson Andrezza; Simone Pieniz; Benedict Okeke; Flávio Anastácio de Oliveira Camargo; Márcio Rodrigues Lambais

COPPER SPECIATION AFTER GROWTH OF OATMEAL RHIZOSPHERE BACTERIA. Robson Andrezza; Simone Pieniz; Benedict Okeke; Flávio Anastácio de Oliveira Camargo; Márcio Rodrigues Lambais

DESENVOLVIMENTO MICELIAL DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Pleurotus spp.* EM RESÍDUOS DA CULTURA DO ARROZ. Elisandra Minotto; Caroline Neugebauer Wille; José Soares do Nascimento

DIVERSIDADE DE ORGANISMOS PROCARIÓTICOS PRESENTES EM FITOTELMOS DE BROMÉLIAS EM UMA ÁREA DE MATA ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL. Catieli Gobetti Lindholz; Anelise Baptista da Silva; Renata Medina da Silva

ESTUDO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE PROCESSO DE COMPOSTAGEM. Anne Grazielle da Silva; Sueli T. Van Der Sand

INFLUÊNCIA NUTRICIONAL DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces sp.*

Themis Collares Antunes; Sabrina Pinto Salamoni; Ana Paula Guedes Frazzon, Sueli T. Van Der Sand

INVESTIGAÇÃO DE LEVEDURAS DE OCORRÊNCIA AMBIENTAL DEGRADADORAS DE GLICERINA BRUTA DERIVADA DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL. Anelise Baptista da Silva; Audrey Proença; Renata Medina-Silva

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO LAGO GUAÍBA VISANDO A PROSPECÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE DO MEXILHÃO DOURADO, *LIMNOPERNA FORTUNEI* (DUNKER, 1857). Isabel Cristina Padula Paz; Daniel Pereira; Marcia Eloisa da Silva; Andressa Moraes Sofia de Souza; Marinei Vilar Nehrke; Maria Cristina Dreher Mansu¹; Maria Teresa Raya Rodriguez, Paulo Sérgio Formagio

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *ACANTHAMOEBA* DE EQUIPAMENTOS LAVA-OLHOS. Lua Panatieri; Ana Maris Carlesso; Marilise Brittes Rott

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Acanthamoeba* sp. (SARCOMASTIGOPHORA: SARCODINA) DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE). Dayane Andriotti Otta; Marilise Brittes Rott; Éder Moraes Saucedo; Ana Maris Carlesso; Onilda Santos da Silva

POPULAÇÃO FÚNGICA ASSOCIADAS A SUBSTRATOS DE CULTIVO DE CHAMPIGNON (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach). Elisandra Minotto; Eduardo Bernardi; José Soares do Nascimento

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO CONTINENTE ANTÁRTICO. Igor Stelmach Pessi; Susana de Oliveira Elias; Alexandre José Macedo

SELEÇÃO DE ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA *BIPOLARIS SOROKINIANA*. Cristina de Castro Spadari; Sueli T. Van Der Sand

SUSCETIBILIDADE DE BIODIESEL DE SEBO A CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS. Juciana Cazarolli; Francielle Bucker; Fernando Viscardi; Laiza Canielas; Gabriela Pereira da Silva Maciel; Bruna Onorevoli; Márcia Cardoso Manique; Gerônimo Rodrigues Prado; Tatiana Simonetto Colla; Fátima Menezes Bento

3. Microbiologia Industrial

BIOACCUMULATION AND BIOREMOVAL OF SELENITE BY *Enterococcus* SPECIES. Simone Pieniz; Robson Andrezza; Benedict C. Okeke; and Adriano Brandelli

DIVERSIDADE DE MICROORGANISMOS QUERATINOLÍTICOS CULTIVÁVEIS DO CONTINENTE ANTÁRTICO COM POTENCIAL UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL. Jamile Queiroz Pereira; Michele Utpott; Fernanda Cortez Lopes; Luis Fernando da Costa Medina; Adriano Brandelli

IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Bacillus* sp. ISOLADOS DE PUBA, UM PRODUTO FERMENTADO DE MANDIOCA. Karla Joseane Perez

Fernanda Cortez Lopes; Silvia Malta Crispim; Adriano Brandelli; Regina Maria Nardi Drummond

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE PIGMENTOS. Fernanda Cortez Lopes; Deise Michele Tichota; Renata Voltolini Velho; Jamile Queiroz Pereira; Alessandro de Oliveira Rios; Adriano Brandelli

PRODUÇÃO DE AMILASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SEDIMENTO MARINHO. Fernanda Brocca de Matos; Diego Antonio Viana Gomes; Walter de Nisa e Castro Neto; José Carlos Germani

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPASE E ESTERASE E BIOSURFACTANTES POR BACTÉRIAS E LEVEDURAS ISOLADAS DE BORRA OLEOSA. Cristiane Santos Barbosa; Francielle Bucker; Naiara Santestevan; Marcela Moreira; Fátima Menezes Bento

PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Aspergillus Níger*. Deise Michele Tichota; Fernanda Cortez Lopes; Lucas André Dedavid e Silva; Adriano Brandelli

4. Microbiologia Clínica

ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS CASOS DE DERMATOFIToses ATENDIDOS PELA SEÇÃO DE MICOLOGIA DO IPB/LACEN-RS NO PERÍODO DE 2005-2010. Vanessa Da Silva Fay; Aideê Dourado Laporta; Ilana Hendira Neumann Boeira; Diana Mara Garcia Rodrigues; Stela Maris Bottin Gonçalves

ANÁLISE FILOGENÉTICA PRELIMINAR DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Pythium insidiosum* PELO GENE DA COXII. Camila Donato Mahl; Maria Isabel de Azevedo; Carla Weiblen; Letícia Menussi; Lucas Thomas; Francielli Pantella Kunz de Jesus, Daniela Isabel Brayer Pereira, Janio Morais Santurio; Sydney Hartz Alves, Sônia de Ávila Botton

ATIVIDADE ANTI-*TRICHOMONAS VAGINALIS* DO EXTRATO DE *HYPERICUM POLYANTHEMUM* OBTIDO POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO E DE SEUS COMPOSTOS ISOLADOS. Simone Tasca Cargnin; Patrícia Brum Vieira; Samuel Cibulski; Jarbas Montanha; Paulo Roehe; Eduardo Cassel; Rubem Vargas; Geraldo A. De Carli; Gilsane Lino von Poser; Tiana Tasca

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE SAPONINAS DE *CHENOPODIUM QUINOA* SOBRE *TRICHOPHYTON RUBRUM*. Simone Gasparin Verza; Roberta Stefanello de Jesus; Alexandre Meneghello Fuentesfria; George González Ortega

AValiação DA SENSIBILIDADE DE *Duddingtonia flagrans*, FRENTE A RESÍDUOS DE FUNGICIDAS AGRÍCOLAS, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR. Deise Luiza Mahl; Francielli Pantella Kunz de Jesus ; Maria Isabel de Azevedo; Régis Adriel Zanette; Sydney Hartz Alves; Janio Morais Santurio

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DETECÇÃO DO GENE *mecA* DE *Staphylococcus* spp. OBTIDOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA. MATTIELLO, S. P.; JARDIM, W. M.; RARO, O. H. F.; GALLO, S. W.; ALCÂNTARA, L.R.; SANDRI, A.M.; OLIVEIRA, S. D.

PADRONIZAÇÃO DO ANTIFUNGIograma PELO MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO PARA ISOLADOS DE *Malassezia pachydermatis*. Francielli Pantella Kunz de Jesus; Deise Luiza Mahl; Maria Isabel de Azevedo; Cláudia Lautert; Sydney Hartz Alves; Sônia A. Botton; Janio Morais Santurio

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-ITS PARA ISOLADOS DE *Malassezia* spp. Francielli Pantella Kunz de Jesus; Deise Luiza Mahl; Maria Isabel de Azevedo; Cláudia Lautert; Sonia A. Botton; Sydney Hartz Alves; Janio Morais Santurio

PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix schenckii* ORIUNDOS DE QUATRO ESTADOS BRASILEIROS. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia; Daiane Heidrich; Fabiane Jamono Vieira; Cibele Massotti Magagnin; Julia Medeiros Sorrentino; Maria Lúcia Scroferneker

PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE DERMATÓFITOS ISOLADOS DE PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia; Cibele Massotti Magagnin; Fabiane Jamono Vieira; Daiane Heidrich e Maria Lúcia Scroferneker

PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO URINÁRIA EM ACADÊMICAS DO CURSO DE ENFERMAGEM DA UNOESC, CAMPUS DE SÃO MIGUEL DO OESTE (SC). Juniara Bonora; Andressa Schmid Basso; Diane Scapin; Everton Boff

PREVALÊNCIA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO. Carla Rossana Silva de Moura; Franciane Rios Senger; Letícia Beatriz Matter

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE CANDIDA NA SALIVA DE USUÁRIOS DE APARELHO ORTODÔNTICO FIXO. Amanda Gomes Faria; Dariane de Castro Pereira; Igor Oliveira Palagi de Souza; Julyana Pezzi de Oliveira; Rosana Fernanda Fogaça; Alexandre Meneghello Fuentesfria

PROTEASES EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR ISOLADOS AMBIENTAIS E CEPAS PADRÃO DE *ACANTHAMOEBA*. Carolina De Marco Veríssimo; Ana Paula Folmer Correa; Marilise Brittes Rott

VERIFICAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Duddingtoni flagrans* A FUNGICIDAS, PELA TÉCNICA DE MICRDILUIÇÃO EM CALDO. Deise Luiza Mahl; Francielli Pantella Kunz de Jesus; Maria Isabel de Azevedo; Cláudia Lautert; Sydney Hartz Alves; Janio Morais Santurio

5. Microbiologia dos Alimentos

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA “*in vitro*” DE AÇAFRÃO-DA-TERRA (*Curcuma longa* L.). Marcelo Pinto Paim; Mônica Jachetti Maciel; Heloisa Helena Chaves Carvalho; José Maria Wiest

ATIVIDADE ANTI-SALMONELLA DE DIFERENTES PARTES DE *HIBISCUS SABDARIFFA* L. Marcelo Pinto Paim; Mônica Jachetti Maciel; José Maria Wiest; Heloisa Helena Chaves Carvalho

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NA REGIÃO EXTREMO OESTE DE SANTA CATARINA. Diane Scapin; Mônica Lourdes Rosanelli; Eliandra Mirlei Rossi

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* EM PRESUNTOS. Claudir Bazzotti; Diane Scapin; Deomir Mario Gheno, Débora Oro; Eliandra Mirlei Rossi

DETECÇÃO DE *Archaea* EM LEITE UHT ATRAVÉS DE PCR. Valdir Cristóvão Barth Junior; Fernanda Cattani; Carlos Alexandre Sanchez Ferreira; Sílvia Dias de Oliveira

PESQUISA DE *Staphylococcus aureus* E COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM MANIPULADORES DE ALIMENTOS. Diane Scapin; Marcelo Rubin; Eliandra Mirlei Rossi

PROPRIEDADES DE AUTOAGREGAÇÃO E HIDROFOBICIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE LEITE E QUEIJO DE OVELHA. Stela Maris Meister Meira; Virginia Etges Helfer; Renata Voltolini Velho; Adriano Brandelli

1. Microbiología Agrícola

ANÁLISE DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE URÉIA EM *AZOSPIRILLUM AMAZONENSE*

Tiago Ebert Fritsch¹; Ricardo Cecagno²; Irene Silveira Schrank^{2,3}

¹Estudante do Curso de Biomedicina/UFRGS. E-mail: tefritsch@msn.com; ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM/UFRGS; ³Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, UFRGS.

Resumo - O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas que estão associadas com gramíneas como arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar. Espécies deste gênero têm sido estudadas devido a uma série de características que as tornam importante para os seres humanos como a capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de fitormônios e fixação biológica do nitrogênio. *A. Amazonense* demonstrou a capacidade de utilizar uréia como fonte de nitrogênio, apesar disso os genes codificantes para urease e proteínas acessórias nunca foram estudadas. Este trabalho tem como objetivo a caracterização do cluster da urease de *A. amazonense* e a atividade da enzima em diferentes condições de crescimento.

Palavras chaves: *Azospirillum*, fixação de nitrogênio, urease.

Introdução

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas que estão associadas com gramíneas de importância econômica como arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar. Espécies deste gênero têm sido estudadas devido a uma série de características que as tornam importante para os seres humanos como a capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de fitormônios como ácido indol acético e giberelinas, síntese da enzima ACC desaminase, que fornece ao microrganismo a capacidade de utilizar o ácido aminociclopropano carboxílico como fonte de nitrogênio (gene *acdS*), diminuindo os efeitos do etileno e pela fixação biológica do nitrogênio. Estudos de regulação da expressão gênica demonstraram que a fixação do nitrogênio ocorre apenas em condições especiais devido ao grande gasto energético por parte do microrganismo. Uma das condições necessárias para a expressão da nitrogenase é a baixa disponibilidade de nitrogênio intracelular, portanto a utilização de fertilizantes nitrogenados como a uréia, inibe a fixação biológica além de possuir altos custos financeiros e causar danos ambientais. O sequenciamento dos genomas de *A. brasilense* e *A. B510* ocorridos no ano de 2010 demonstrou que esse gênero possui a capacidade de utilizar uréia como fonte de nitrogênio, diferente de *Rhodospirillum* que é conhecido por possuir um genoma bastante parecido com *Azospirillum* e não possui a enzima urease, apesar disso os genes codificantes para urease e proteínas acessórias nunca foram estudadas neste gênero. Este trabalho tem como objetivo a caracterização do cluster da urease de *A. amazonense* além de estudos de transcrição e atividade da enzima na presença do herbicida Gramoxone(paraquat).

Metodologia

A sequência dos genes das espécies estudadas foram obtidas no NCBI, com exceção de *Azospirillum amazonense* que foi sequenciado em nosso laboratório. A construção dos oligonucleotídeos para o RT-PCR foi realizada utilizando o site *primer3*.

A construção do cluster da urease nas diferentes bactérias foi realizada com o auxílio do programa *Artemis*. **Figura 1**.

Para o crescimento de *Azospirillum amazonense* foi utilizado o meio definido AAM descrito por *Fabiano E.* e colaboradores em 1985, modificando a fonte de nitrogênio que era de cloreto de amônio por uréia. Foram realizados testes com diferentes concentrações de uréia que variavam entre 100mM e 1mM para definir a melhor condição de crescimento quando comparado com cloreto de amônio. A purificação do RNA para a realização do RT-PCR foi realizada utilizando reagente TRIZOL em diferentes tempos de indução.

Resultados

A análise do cluster da urease mostra diferença na organização dos genes nas diferentes espécies de bactérias analisadas - **Figura 1**. *A. amazonense* possui uma proteína de membrana denominada *HupE/UreJ* (**Tabela 1**) que não ocorre no mesmo contexto gênico nas outras espécies, além de não possuir genes para outras proteínas dentro do cluster, semelhante ao que ocorre em *Klebsiella*. Em *A. brasilense* e *A. B510* diferentemente, possuem um gene codificante para glutamato racemase entre os genes *ureC* e *ureE* o que não é encontrado em *A. amazonense*. A padronização do PCR para os oligos sintetizados foi realizado e demonstraram especificidade.

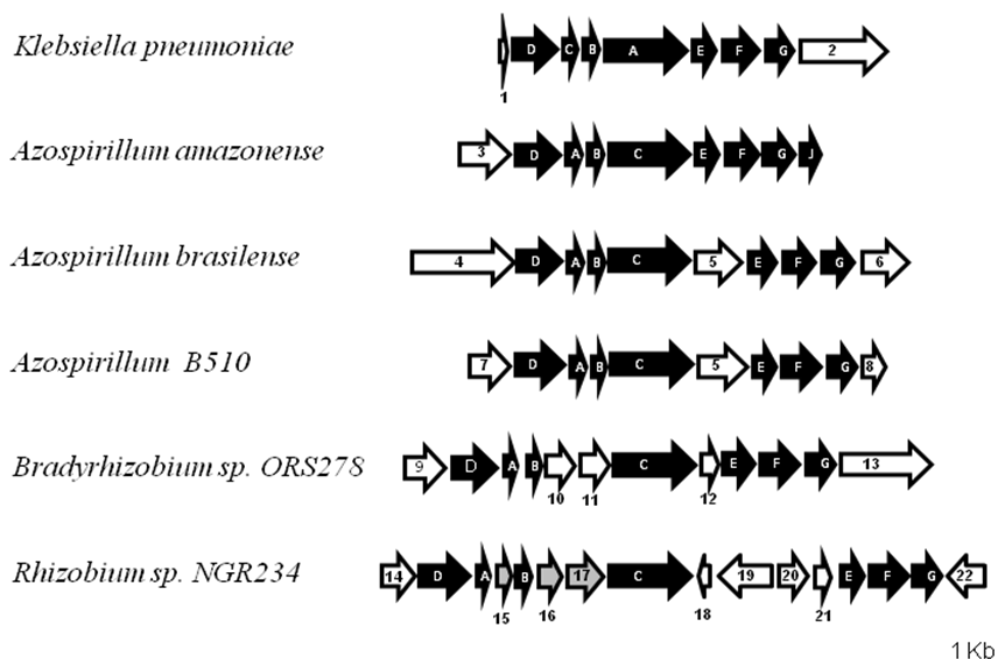


Figura 1- Organização do cluster de urease em diferentes bactérias. As setas pretas referem-se aos genes que estão envolvidos na expressão da urease, sendo que cada letra se refere a proteína da tabela acima. As setas brancas representam as proteínas que não estão envolvidos com a urease mas se encontram inseridas neste cluster, e são elas: **1-** proteína hipotética; **2-** sistema de dois componentes histidina quinase; **3-** regulador transcricional *gstR*; **4-** xantina desidrogenase; **5-** glutamato racemase; **6-** proteína hipotética; **7-** regulador *LuxR*; **8-** proteína hipotética; **9-** transportador ABC; **10-** fosfohidrolase; **11-** conservada hipotética; **12-** conservada hipotética; **13-** histidina quinase; **14-** cloroperoxidase; **15, 16, 17-** proteínas acessórias de urease; **18-** proteína hipotética; **19-** transposase; **20-** peroxiredoxina; **21-** proteína hipotética; **22-** regulador transcricional família *Crp*.

Tabela 1. Análise da similaridade entre os genes relacionados à expressão de urease de *Azospirillum amazonense* e os dados depositados no Genbank

Gene	Tamanho (pb)	Produto	Maior Similaridade (organismo)	Score	E-value
ureD	813	Urease accessory protein UreD	Methylobacterium sp. 4-46	208.00	2,00E-52
ureA	303	Urease, gamma subunit	Rhizobium leguminosarum bv. trifolii	178.00	5,00E-43
ureB	327	Urease, beta subunit	Labrenzia alexandrii DFL-11	170.00	5,00E-41
ureC	1713	Urease, subunit alpha	Sinorhizobium meliloti 1021	914.00	0
ureE	483	UreE urease accessory-like protein	Roseomonas cervicalis ATCC 49957	128.00	2,00E-28
ureF	611	Urease accessory protein	Starkeya novella DSM 506	102.00	1,00E-20
ureG	591	Urease accessory protein	Beijerinckia indica subsp. indica	330.00	3,00E-89
hupE/ureJ	455	HupE/UreJ protein	Acidovorax avenae subsp. avenae	53.5	9,00E-06

Para os estudos de transcrição o RNA foi purificado após a indução em 2, 4 e 24 horas na presença de 10mM de uréia e a síntese de cDNA será realizada utilizando *primers* aleatórios e a enzima transcriptase reversa Impron-II. Com o objetivo de estudar o efeito do herbicida Gramoxone na atividade da urease de *Azospirillum* será realizado ensaio segundo M. W. Weatherburn, 1967.

Conclusões

Os resultados obtidos demonstraram que a organização dos genes da urease e proteínas acessórias diferem entre as espécies do gênero. *A. amazonense* possui uma proteína de membrana denominada *HupE/UreJ* que não ocorre no mesmo contexto gênico nas outras espécies além de não possuir genes para outras proteínas dentro do cluster da urease, semelhante ao que ocorre em *Klebsiella*. *A. brasilense* e *A. B510* diferentemente, possuem um gene codificante para glutamato racemase entre os genes *ureC* e *ureE* o que não é encontrado em *A. amazonense*.

Apoio

CNPq; CAPES; FAPERGS.

Referências

- Martinez-Drets**, G., E. Fabiano, and A. Cardona. 1985. Carbohydrate catabolism in *Azospirillum amazonense*. *Applied Environmental Microbiology*. 50:183–185.
- Toffanin**, A., E. Cadahia, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, and J. M. Palacios. 2002. Characterization of the urease gene cluster from *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *Archives of Microbiology*. 177:290–298.
- M. W. Weatherburn. 1967 Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Analytical Chemistry*. vol 39, n°. 8.
- Artemis**: DNA Sequence Viewer and Annotation Tool acessado no site <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis>.
- Primer3**.acessado no site www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.

ATIVIDADE DAS ENZIMAS ARILSULFATASE, β -GLICOSIDASE E FOSFATASE ÁCIDA EM COMPOSTO DE RESÍDUOS DE FRIGORÍFICO, CASCA DE ARROZ NATURAL E CARBONIZADA.

Deisy Sharelene Arruda Morales¹; Marta Eliane Doumer¹; Zaida Inês Antonioli²; Sandro José Giacomini²; Manoeli Lupatini¹

¹Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Bolsista CAPES; E-mail: deisy-morales@hotmail.com; martaelianedoumer@gmail.com; mlupatini@gmail.com; ²Professor(a) do Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Bolsista de Produtividade CNPq; E-mail: zantoniolli@gmail.com; sjgiacomini@smail.ufsm.br

Resumo - Objetivo do trabalho foi avaliar a atividade enzimática da arilsulfatase, β -glicosidase e fosfatase ácida durante o processo de vermicompostagem em resíduos de frigorífico denominados de linha verde (LVD) e linha vermelha (LVM) adicionados de casca de arroz “in natura” (CAN) e carbonizada (CAC). Para análise da atividade das enzimas foi retirado 10g de cada tratamento, constituídos de: T1-100% LVD, T2-100% LVM, T3-50% LVM e 50% CAC, T4-50% LVD e 50% CAN, T5-50% LVM e 50% CAC, T6-50% LVD e 50% CAC, T7-50% de LVM e 50% LVD, T8-75% LVD e 25% CAN, T9-75% LVM e 25% CAC e T10-esterco bovino (testemunha). Nos tratamentos T1, T4, T6 e T8, os quais continham LVD e CAN, a atividade das enzimas arilsulfatase e β -glicosidase foi favorecida. Nos tratamentos T2, T3, T5 e T9, os quais eram compostos de LVM e CAC, ocorreu decréscimo na atividade enzimática.

Palavras-chave: enzimas; metais pesados; resíduos.

Introdução

A disposição de resíduos domésticos e industriais no meio ambiente pode se tornar um grande problema ambiental em função de sua composição, das doses aplicadas e das condições ambientais. A atividade enzimática (AE) é um componente crítico de todos os ecossistemas naturais ou manipulados pelo homem, sendo um agente regulador da taxa de decomposição da matéria orgânica e da ciclagem dos elementos nos solos, constituindo-se como um indicador sensível para avaliar a qualidade (DICK, 1994) e o efeito negativo dos contaminantes sobre a atividade microbiana do solo (MALLEY et al., 2006). Dentre as enzimas utilizadas no monitoramento da qualidade do solo pode-se citar a arilsulfatase, β -glicosidase e a fosfatase ácida. A arilsulfatase é uma enzima de atividade hidrolítica, responsável pela mineralização do S orgânico, a β -glicosidase é responsável pela clivagem da celobiose à glicose e as fosfatases são responsáveis pela mineralização do fósforo (TABATABAI, 1994). O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade enzimática da arilsulfatase, β -glicosidase e fosfatase ácida em resíduos de frigorífico estabilizado, casca de arroz natural e carbonizada.

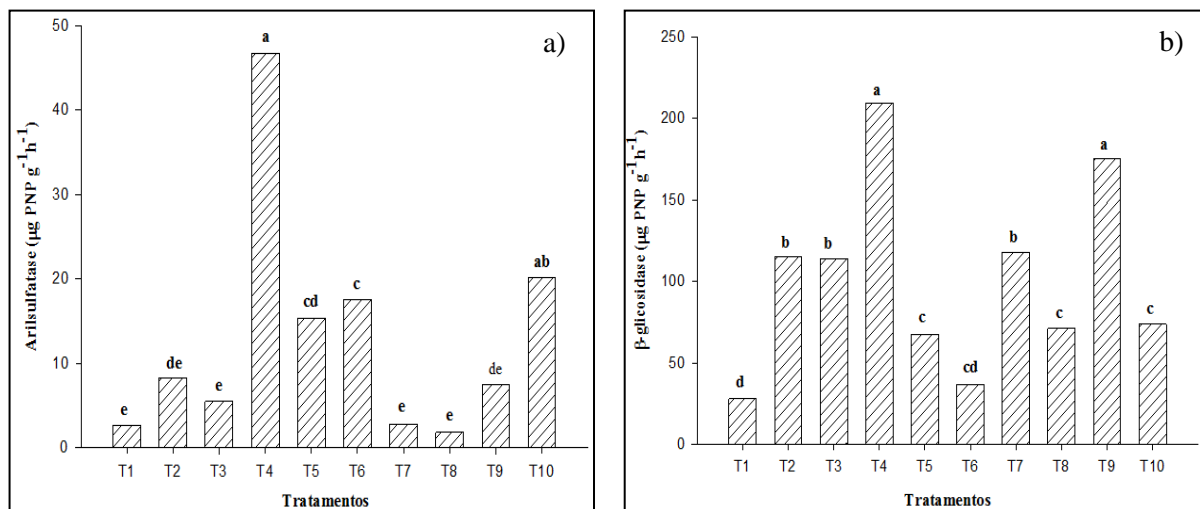
Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria, RS. Os resíduos são provenientes da Estação

de Tratamento de Efluentes (ETE) do Frigorífico Silva e denominados de linha verde (LVD) e linha vermelha (LVM). O resíduo da linha verde é composto de resto ruminal e da linha vermelha é composto de sangue, gorduras, resto ruminal, vísceras e outros materiais resultantes da lavagem interna dos bovinos após o abate. Para a composição dos tratamentos, foram utilizadas casca de arroz “in natura” (CAN) e casca de arroz carbonizada (CAC). Os tratamentos consistiram de: T1-100% LVD, T2-100% LVM, T3-50% LVM e 50% CAN, T4-50% LVD e 50% CAN, T5-50% LVM e 50% CAC, T6-50% LVD e 50% CAC, T7-50% de LVM e 50% LVD, T8-75% LVD e 25% CAN, T9-75% LVM e 25% CAC e T10-esterco bovino (testemunha). Após 110 dias foi retirada uma amostra de 10g de substrato para a determinação enzimática (TABATABAI, 1994) e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Nos tratamentos compostos de LVD (T1, T4, T6 e T8), a arilsulfatase (Figura 1a) foi estimulada pela adição de CAN (50%), sendo que o T4 apresentou o maior índice, seguido do T6. Entretanto para os tratamentos com LVM (T2, T3, T5 e T9), apenas o aumento do teor de CAC estimulou a atividade enzimática. Considerando a relação C/N, o CAC apresenta 63/1 e o CAN 39/1, sendo que uma menor relação C/N apresenta um substrato mais facilmente decomponível, favorecendo a atividade enzimática. Assim, provavelmente o estágio avançado de maturação do resíduo ocasionou um ataque microbiano a compostos mais recalcitrantes como as cascas de arroz, que apresentam uma composição de aproximada de 95% de SiO_2 .

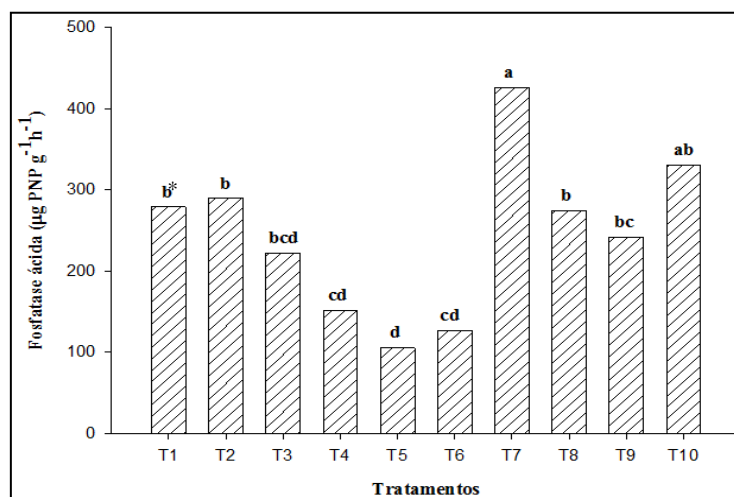


* Valores seguidos por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 1. Atividade da Arilsulfatase (a), β-glicosidase (b) sob a influência dos diferentes tratamentos: T1-LVD 100%, T2-LVM 100%, T3-LVM 50% e CAN 50%, T4-LVD 50% e CAN 50%, T5-LVM 50% e CAC 50%, T6-LVD 50% e CAC 50%, T7-LVD 50% e LVM 50%, T8-LVD 50% e CAN 25%, T9-LVM 75% e CAC 25%, e T10-Testemunha. LVM: resíduo da linha vermelha, LVD: resíduo da linha verde, CAN: casca de arroz “in natura” e CAC: casca de arroz carbonizada.

Para a β-glicosidase (Figura 1b) os tratamentos compostos de LVD (T1, T4, T6 e T8), a maior adição de CAN favoreceu a AE, enquanto que com maiores de teores de CAC há um decréscimo da AE, esta mesma tendência segue para os tratamentos compostos de LVM (T2, T3, T5 e T9) com destaque para o T9, composto apenas de 25% de CAC. Entretanto, a CAN quando aplicada aos tratamentos não apresentou diferenças significativas. Para a

fosfatase (Figura 2) os tratamentos com LVD, a adição de CAN e CAC, numa taxa de 50% (T4 e T6) apresentou quedas na AE e a adição de 25% de CAN (T9) não diferiu do T1. No entanto, para o LVM o composto mais recalcitrante (CAC) proporcionou menor AE quando comparado aos demais tratamentos. Para esta enzima, houve destaque para o T7, composto de 50% LVM e 50% LVD. Em relação aos metais pesados (Cr^{+3}), podemos observar o T1 e T2 isoladamente. Para a β -glicosidade e a arilsulfatase foram melhores indicadoras, apresentando inibição com o LVD composto de maiores teores de Cr^{+3} (29 mg/kg). Entretanto de acordo com a legislação do CONAMA 375, os valores mencionados nos resíduos estão dentro dos parâmetros estabelecidos (1000mg/kg).



* Valores seguidos por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 2. Atividade da fosfatase ácida sob a influência dos diferentes tratamentos: T1-LVD 100%, T2-LVM 100%, T3-LVM 50% e CAN 50%, T4-LVD 50% e CAN 50%, T5-LVM 50% e CAC 50%, T6-LVD 50% e CAC 50%, T7-LVD 50% e LVM 50%, T8-LVD 50% e CAN 25%, T9-LVM 75% e CAC 25%, e T10-Testemunha. LVM: resíduo da linha vermelha, LVD: resíduo da linha verde, CAN: casca de arroz “in natura” e CAC: casca de arroz carbonizada.

Conclusão

Os tratamentos com adição de CAN e linha LVD favoreceram a AE para as enzimas Arilsulfatase e β -glicosidade. A adição de compostos recalcitrantes diminuiu a atividade enzimática.

Referências

- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N 375/06. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>> Acesso em julho de 2010.
- DICK, R. P. Soil enzyme assays as indicators of soil quality. In: Soil Science Society of America. **Defining soil quality for a sustainable environment**. Special Publication n. 35, p.107-124. 1994.
- TABATABAI, M. Soil enzymes. In: Soil Science Society of America. **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America. Special Publication, n. 5, p. 778-835. 1994.
- MALLEY, C. et al. Impact of heavy metals on enzymatic activity of substrate and on composting worms *Eisenia foetida*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1498-1502. 2006.

BIOCONTROLE DA ESCALDADURA EM ARROZ A PARTIR DE SEMENTES MICROBIOLIZADAS COM RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS OU COMBINADAS

Jaqueline Tavares Schafer¹, Lauren Fonseca Anacker², Stefânia de Amorim Bernal Moreno³, Paulo Ricardo Benedeti⁴, Marcio Wissmann da Costa⁵, Andréa Bittencourt Moura⁶

¹Mestranda em Fitossanidade Bolsista CAPES; ²Bacharel em Química Ambiental Bolsista CNPq AT-NS; ³Graduanda em Agronomia Bolsista PROBIC FAPAERGS; ⁴Graduando em Agronomia Bolsista PIBIC CNPq; ⁵Graduando em Agronomia Bolsista CNPq ITI A ⁶Professora Departamento de Fitossanidade Bolsista CNPq Produtividade em Pesquisa. Departamento de Fitossanidade, FAEM, UFPel, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: jaquelinets@gmail.com

Resumo – Objetivou-se com este trabalho, avaliar o potencial de diferentes rizobactérias, individualmente e em combinações, visando ao controle escaldadura. Sementes da cv. El Passo 144 foram microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos, e como testemunha foi utilizado somente salina ou salina + fungicida. O semeio foi realizado em vasos de 7Kg em solo não esterilizado. No estágio de emborrachamento, o fungo foi inoculado, na concentração de 10^4 conídios.mL⁻¹ e as avaliações ocorreram 7, 14 e 21 dias após a inoculação, atribuindo-se notas de 1 a 9, em função da evolução da lesão. As plantas foram mantidas até a produção, onde avaliaram-se número de panículas, peso seco de grãos, grãos chochos e cheios e, número de grãos. Estes também foram avaliados quanto à incidência de manchas. Dos tratamentos avaliados, os isolados de *Pseudomonas* DFs185 e DFs223 apresentaram maior controle com 53% e 50% respectivamente. Para o número de panículas (DFs223, DFs306 e DFs416) e, para peso seco de grãos chochos (DFs185, DFs223, DFs306 e DFs416) houve redução em relação à testemunha, sendo a diferença estatisticamente significativa. As outras variáveis avaliadas foram iguais à testemunha.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, *Gerlachia oryzae*, controle biológico, PGPR

Introdução

A escaldadura do arroz, causada pelo fungo *Gerlachia oryzae* (Hashioka & Yokogi) W. Gams [(teleomorfo: *Monographella albescens* (Thumen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth) (sinonímia: *Rhynchosporium oryzae*, *Microdochium oryzae*)], reduz significativamente a produção de arroz, pois a doença afeta folhas, colmo e panículas, manifestando-se também nas fases de perfilhamento e emborrachamento (PRABHU, FILIPPI, 1997).

O controle por meio de fungicidas aumenta os custos de produção e os riscos de contaminação ambiental. Uma das alternativas é o controle biológico pelo uso de rizobactérias, que podem atuar por diversos mecanismos de ação, com potencial na redução de fitopatógenos (BETTIOL, 1991).

Os tratamentos utilizados neste trabalho foram selecionados para o controle da escaldadura em arroz (LUDWIG et al., 2009), utilizados também de forma combinada (SOUZA JÚNIOR, 2010). Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de diferentes rizobactérias, individualmente e em combinações, visando ao controle da escaldadura do arroz.

Material e Métodos

Os isolados bacterianos foram incubados a 28°C/24h, e suspensos em solução salina (NaCl 0,85%) ($A_{540}=0,5$). As sementes da cv. El Paso 144L foram microbiolizadas por 30 minutos a 10°C.

Os tratamentos utilizados foram: DFs185 (*Pseudomonas synxatha* (Ehrenberg) Holland), DFs223 (*P. fluorescens* Migula), DFs306 (não identificado), DFs416 e DFs418 (*Bacillus* sp. Cohn), e as combinações DFs185/416, DFs185/418, DFs185/306/416, Testemunha + fungicida Vitavax Thiram 200SC (3mL.Kg⁻¹ de sementes) e Testemunha + salina (com e sem inoculação). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em vasos contendo 7 Kg de solo não esterilizado, com quatro repetições, de forma casualizada.

Esporos de *G. oryzae* foram obtidos a partir de colônias com cerca de 15 dias, sendo inoculados por aspersão da suspensão nas plantas (10⁴conídios.mL⁻¹), em estágio de emborrachamento. Após 7, 14 e 21 dias, foram realizadas as avaliações, atribuindo-se notas em função da severidade (IRRI, 1975). Os valores das áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram submetidos ao teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Após o estágio de maturação, avaliaram-se número de panículas (NP), peso seco de grãos (PSG), peso seco de grãos chochos (PSGCo) e cheios (PSGCo) e número de grãos cheios (NGCe). Estes grãos foram avaliados quanto à incidência de manchas, atribuindo notas de 1 a 9, segundo a escala proposta por IRRI (1975).

Resultados e Discussão

Todos os tratamentos bacterianos resultaram em controle significativo. Dos tratamentos avaliados, os isolados de *Pseudomonas* DFs185 e DFs223 apresentaram maior controle com 53% e 50% respectivamente (Figura 1). O desempenho superior da bactéria DFs185 foi observado por Ludwig e colaboradores (2009), quando estes autores utilizaram somente biocontroladores individualmente. Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que, pelo menos neste caso, as bactérias individualmente apresentaram comportamento superior ao das combinações, divergindo parcialmente de Souza-Júnior (2010) onde as mesmas combinações foram tão efetivas quanto as bactérias individualmente.

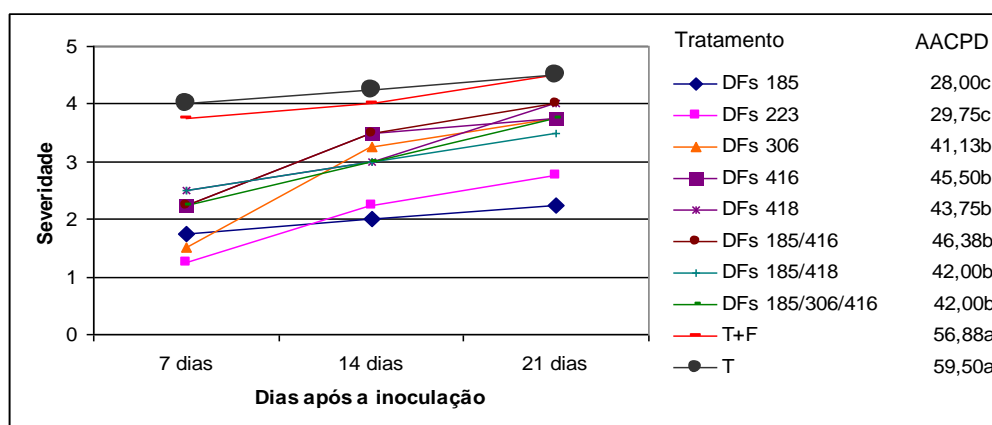


Figura 1: Curva de progresso da escaldadura do arroz em plantas originadas de sementes microbiolizadas, em avaliações realizadas 7, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância. T+F corresponde à testemunha com fungicida; T corresponde à testemunha com salina.

Tabela 1: Número de panículas (NP), peso seco de grãos (PSG), peso seco de grãos chochos (PSGCo), peso seco de grãos cheios (PSGce), número de grãos cheios (NGCe) e severidade de manchas em grãos provenientes de plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados e combinações de rizobactérias, inoculadas com *Gerlachia oryzae*, conduzidas em casa de vegetação

Tratamento	NP		PSG (g) ^{ns}	PSGCo (g)		PSGce (g) ^{ns}	NGCe ^{ns}	Nota ^{ns}
DFs185	14,25	a	5,20	2,70	b	2,94	132,75	7,50
DFs223	9,75	b	3,80	2,53	b	1,64	68,75	7,00
DFs306	13,00	b	3,42	2,45	b	1,26	56,25	6,00
DFs416	11,50	b	3,72	2,79	b	1,25	61,25	6,50
DFs418	17,50	a	5,64	3,36	a	2,70	98,50	9,00
DFs185/306	16,00	a	5,61	3,73	a	2,29	104,50	8,00
DFs185/416	15,25	a	4,53	3,23	a	1,67	78,00	7,50
DFs185/306/416	17,00	a	6,13	3,68	a	2,90	135,25	6,00
T+F	15,25	a	7,30	3,93	a	1,27	59,00	6,00
T+I	17,25	a	4,10	3,70	a	0,82	38,75	7,50
C.V. (%)	22,45		44,44	22,87		82,43	82,96	19,92

Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância, em quatro repetições; * – valores de médias não significativos; T+F - tratamento com o fungicida Carboxin + Thiram na concentração de 3mL.Kg⁻¹ de sementes; T+I – testemunha com inoculação do patógeno; T – testemunha tratada com solução salina

Os isolados DFs185, DFs223, DFs306 e DFs416 reduziram o peso de grãos chochos e, para o número de panículas, a maioria dos isolados bacterianos mostraram-se iguais estatisticamente à testemunha. Para outras variáveis avaliadas, todos os tratamentos foram significativamente iguais à testemunha (Tabela 1). Resultados parcialmente distintos foram encontrados por Ludwig et al., (2009), onde DFs185, DFs223 e DFs306 proporcionaram incrementos significativamente superiores à testemunha, mas DFs416 e DFs418 reduziram a produção e, isto pode ser explicado pelo possível deslocamento de energia para a proteção da planta contra o patógeno (STADNIK, BUCHENAUER, 1999).

Conclusão

Todos os tratamentos bacterianos utilizados reduziram a severidade da doença, apresentando capacidade de controlar a escaaldadura.

Referências

- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA. 1991. p.1-5.
- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. Sistema de Evaluación Stándart para Arroz. Los Baños, 1975. 64p.
- LUDWIG, J.; MOURA, A.B.; SANTOS, A.S.; RIBEIRO, A.S. Biocontrole da mancha parda e da escaaldadura em arroz irrigado, pela microbiolização de sementes. *Tropical Plant Pathology*, v.34, n.5, p.322-328, 2009.
- PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. Arroz (*Oryza sativa* L.) controle de doenças. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. Controle de doenças de plantas. Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1997
- SOUZA-JÚNIOR, I.T. Controle biológico de doenças do arroz: ampliação do espectro de ação e promoção de crescimento pelo uso de combinações de rizobactérias eficientes. 68f. 2010. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2010.
- STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Control of wheat diseases by a benzothiadiazole-derivate and modern fungicides. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, v.106, p.476-489, 1999.

BIOCONTROLE DA QUEIMA DAS BAINHAS EM ARROZ PELA UTILIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS E COMBINADAS

Jaqueline Tavares Schafer¹, Lauren Fonseca Anacker², Marcio Wissmann da Costa³, Aline Garske dos Santos⁴, Dediel Junior Amaral Rocha¹; Rafael Barcellos Nunes³, Andréa Bittencourt Moura⁵

¹Mestranda em Fitossanidade Bolsista CAPES; ²Bacharel em Química Ambiental Bolsista CNPq AT-NS; ³Graduando em Agronomia Bolsista CNPq ITI A; ⁴Graduanda em Ciências Biológicas Bolsista CNPq ITI A; ⁵Professora Departamento de Fitossanidade Bolsista CNPq Produtividade em Pesquisa. Departamento de Fitossanidade, FAEM, UFPel, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: jaquelinets@gmail.com

Resumo - A cultura do arroz tem sua produtividade reduzida pela incidência de diversas doenças, dentre elas a queima das bainhas, e o controle biológico surge como alternativa. Objetivou-se testar vários tratamentos bacterianos, isolados e combinados, visando ao biocontrole de *Rhizoctonia solani* e à promoção de crescimento. Sementes cv. El Passo 144 foram microbiolizadas com as rizobactérias por 30'/10°C e semeadas em solo não esterilizado. Inoculou-se o fungo a partir do estágio V3 a cada dez dias, totalizando três inoculações. A avaliação deu-se aos sete dias da última inoculação atribuindo-se notas de 1 a 9 segundo a severidade da doença. As plantas foram mantidas até a maturação, quando foram determinados o peso seco de raízes, número de panículas, peso seco de grãos, grãos chochos e cheios e, número de grãos. Estes também foram avaliados quanto à incidência de manchas. O tratamento DFs418 (*Bacillus* sp.) mostrou melhor desempenho com 60% de controle, seguido de DFs185/306 e DFs185 com 50% e 40% de controle, respectivamente, sem haver diferença estatística ente eles. Para peso seco de raízes, DFs185, DFs416 e DFs223 se destacaram, diferindo estatisticamente da testemunha. Já para o restante das variáveis, todos os tratamentos foram iguais estatisticamente.

Palavras-chave: controle biológico, *Oryza sativa*, *Rhizoctonia solani*, PGPR, microbiolização de sementes

Introdução

A cultura do arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) está sujeita ao ataque de várias doenças, dentre elas, a queima-das-bainhas do arroz, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* J.G. Kuhn [teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]. Maiores danos ocorrem dentro de áreas com utilização de altas quantidades de fertilizantes nitrogenados, e cultivares com alto índice de perfilhamento ou suscetibilidade (EIZENGA et al., 2002).

O controle químico pode contaminar o solo e o ambiente, e também facilitar o surgimento de populações resistentes do patógeno. O controle biológico surge como uma alternativa viável, podendo atuar por diferentes mecanismos em um mesmo biocontrolador, ou em diferentes biocontroladores combinados, o que se torna uma característica favorável para o biocontrole (MELO, AZEVEDO, 1998). Bactérias eficientes foram selecionadas para o controle da queima das bainhas (LUDWIG, MOURA, 2007) e utilizadas combinadas (SOUZA JÚNIOR, 2010). Assim, testaram-se diferentes tratamentos bacterianos eficientes, isolados ou em combinação, para o controle da doença e a promoção de crescimento em plantas de arroz.

Material e Métodos

Os tratamentos utilizados foram: DFs185 (*Pseudomonas synxatha* (Ehrenberg) Holland), DFs223 (*P. fluorescens* Migula), DFs306 (não identificado), DFs416 e DFs418 (*Bacillus* sp. Cohn), e as combinações DFs185/306, DFs185/416, DFs185/306/416. As bactérias foram cultivadas a 28°C/24h. Após, foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) ($A_{540}=0,5$). Sementes de arroz da cv. El Passo 144L foram microbiolizadas em suspensão bacteriana, a 30'/10°C. Como testemunha, sementes foram imersas em solução salina (com ou sem inoculação) ou em salina mais o fungicida Vitavax Thiram® 200SC (Carboxin + Thiram) (3mL.Kg⁻¹ de sementes). As sementes tratadas foram depositadas em vasos com 7Kg de solo não esterilizado, em quatro repetições, inteiramente casualizado.

O preparo do inóculo e a inoculação do patógeno seguiram metodologia descrita por Ludwig, Moura (2007). As plantas foram avaliadas sete dias após a última infestação do solo segundo a severidade da doença, com notas, segundo IRRI (1975).

Após o estágio de maturação, avaliaram-se o número de panículas (NP), peso seco de grãos (PSG), peso seco de grãos chochos (PSGCo) e cheios (PSGCo) e número de grãos cheios (NGCe). Estes grãos foram avaliados quanto à incidência de manchas, atribuindo notas (1, 3, 5, 7 e 9) (IRRI, 1975). As raízes foram destacadas, lavadas em água corrente, e secas a 60°C/4 dias, para determinação do peso seco de raízes (PSR).

Resultados e Discussão

De todos os tratamentos avaliados, DFs418 (*Bacillus* sp.) proporcionou maior controle da doença em relação à testemunha (60%), não diferindo de DFs185/306 e DFs185 (*Pseudomonas synxatha*) com 50% e 40% de controle, respectivamente (Figura 1). Estes resultados concordam parcialmente com Souza-Júnior (2010), quando o autor verificou que as combinações foram mais eficientes (43 a 50% de controle), do que os isolados utilizados individualmente.

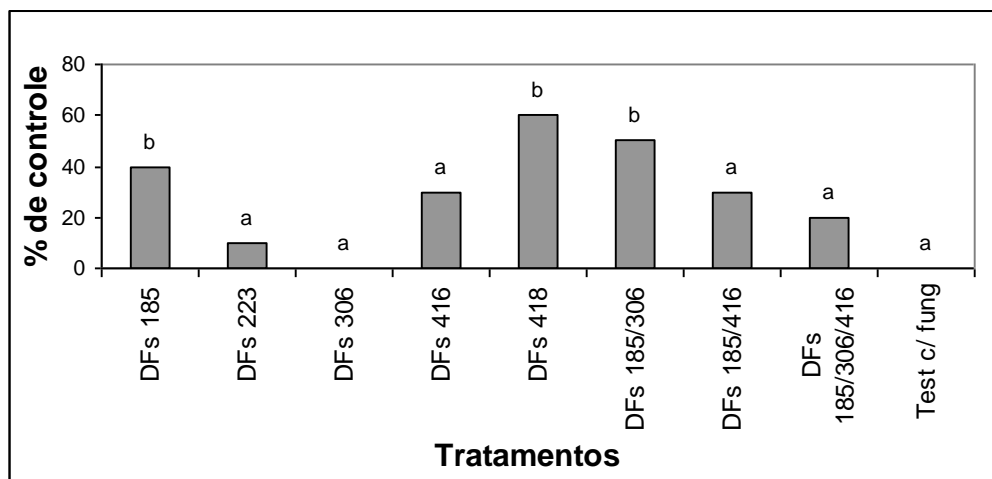


Figura 1: Porcentagem de controle da queima das bainhas proporcionada pela microbiolização de sementes com rizobactérias, isoladas ou em combinação, após inoculação de *Rhizoctonia solani* três vezes com intervalos de 10 dias em plantas conduzidas em solo não esterilizado em casa de vegetação.

Para os valores do peso seco de raízes (PSR), as bactérias DFs185, DFs416 e DFs223 se destacaram, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, inclusive das plantas não inoculadas. Já para o restante das variáveis de produção avaliadas, todos os tratamentos foram iguais, mostrando que a incidência do patógeno e também seu controle neste caso, não

interferiram significativamente na produção (Tabela 1). Entretanto, em trabalho utilizando somente bactérias individualmente, os isolados DFs185, DFs223 e DFs306 reduziram a severidade da queima das bainhas e proporcionaram aumento do peso da matéria seca de raízes e parte aérea em níveis iguais ou até mesmo superiores aos do tratamento com fungicida (LUDWIG, MOURA, 2007), o que não se repetiu no presente trabalho.

Tabela 1: Peso seco de raízes (PSR), número de panículas (NP), peso seco de grãos (PSG), peso seco de grãos chochos (PSGCo), peso seco de grãos cheios (PSGCe), número de grãos cheios (NGCe) e severidade de manchas em grãos provenientes de plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados e combinações de rizobactérias, inoculadas com *Rhizoctonia solani* por três vezes com intervalos de 10 dias em plantas conduzidas em solo não esterilizado em casa de vegetação.

Tratamento	PSR (g)	NP ^{ns}	PSG (g) ^{ns}	PSGCo (g) ^{ns}	PSGCe (g) ^{ns}	NGCe ^{ns}	Nota	
DFs185	88,66	a	16,25	11,52	3,38	8,70	372,00	8,50
DFs223	74,41	a	20,25	12,04	3,95	8,63	371,25	8,50
DFs306	58,86	b	16,00	9,27	3,49	6,33	270,00	8,50
DFs416	78,37	a	18,50	11,65	3,46	8,73	418,25	8,00
DFs418	50,68	b	18,00	7,66	2,85	5,17	227,00	7,50
DFs 185/306	48,98	b	18,25	13,14	3,91	9,84	429,00	9,00
DFs185/416	58,45	b	20,50	14,32	3,89	11,13	484,00	8,50
DFs185/306/416	40,82	b	16,25	14,14	3,10	11,74	522,25	7,50
T+F	40,01	b	18,00	10,83	3,17	8,18	366,00	7,00
T+I	35,40	b	18,75	9,30	3,21	6,54	279,50	8,00
T	34,84	b	21,00	10,73	3,34	9,40	412,94	7,75
C.V. (%)	38,48		22,66	29,41	22,46	40,74	40,37	12,69

Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância, em quatro repetições; ^{ns} – valores de médias não significativos; T+F - tratamento com o fungicida Carboxin + Thiram; T+I – testemunha com inoculação do patógeno; T – testemunha tratada com solução salina

Conclusão

O uso de alguns tratamentos bacterianos permite o controle da queima das bainhas.

Referências

- EIZENGA, G.C., LEE, F.N., RUTGER, J.N. Screening *Oryza* species plants for rice sheath blight resistance. **Plant Disease** v.86, p.808-812, 2002.
- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Sistema de Evaluación Stándart para Arroz**. Los Baños, 1975. 64p.
- LUDWIG, J.; MOURA, A.B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.5, p.381-386. 2007.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1998. 262p.
- SOUZA JUNIOR, I.T.; **Controle biológico de doenças do arroz: ampliação do espectro de ação e promoção de crescimento pelo uso de combinações de rizobactérias eficientes**. 68f. 2010. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2010.

BIOCONTROLE DE *Bipolaris oryzae* PELA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ COM RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS E EM COMBINAÇÃO

Jaqueline Tavares Schafer¹, Lauren Fonseca Anacker², Paulo Ricardo Benedeti³, Marcio Wissmann da Costa⁴, Stefânia de Amorim Bernal Moreno⁵, Andréa Bittencourt Moura⁶

¹Mestranda em Fitossanidade Bolsista CAPES; ²Bacharel em Química Ambiental Bolsista CNPq AT-NS; ³Graduando em Agronomia Bolsista CNPq PIBIC; ⁴Graduando em Agronomia Bolsista CNPq ITI A; ⁵Graduanda em Agronomia Bolsista PROBIC FAPERGS ⁶Professora Departamento de Fitossanidade Bolsista CNPq Produtividade em Pesquisa. Departamento de Fitossanidade, FAEM, UFPel, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: jaquelinets@gmail.com

Resumo – Testaram-se diferentes rizobactérias, isoladas ou em combinação, para o controle da mancha parda. Sementes da cv. El Passo 144 foram microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos e semeadas em vasos com 7Kg de solo não esterilizado, em casa de vegetação. No estágio de emborrachamento, esporos de *Bipolaris oryzae* foram inoculados com 10^5 conídios.mL⁻¹. A avaliação ocorreu aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, através de notas em função da evolução da lesão. Foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), sendo os valores submetidos ao teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. As plantas foram mantidas até a maturação, quando foram obtidos número de panículas, número de grãos cheios, peso seco de grãos, grãos chochos e cheios. Estes foram avaliados também quanto à incidência de manchas. Todos os tratamentos reduziram significativamente a severidade da mancha parda, exceto DFs306, sendo DFs416 (*Bacillus* sp.) o que apresentou maior porcentagem de controle (68%). Não houve diferença estatística para nenhum dos parâmetros de produção avaliados.

Palavras-chave: Controle biológico, mancha parda, *Oryza sativa*, PGPR

Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das espécies mais importantes em termos de valor econômico, sendo considerado o principal cultivo alimentar em muitos países. É uma cultura que está sujeita à ocorrência de várias doenças que provocam perdas na produtividade.

O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem (teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi)), agente etiológico da mancha parda, causa grandes danos durante a germinação das sementes de arroz, resultando em redução no estande de plantas (RIBEIRO, 1988). A doença também causa lesões foliares em plantas adultas, podendo aumentar a esterilidade de flores, reduzindo o número de grãos por panículas (OU, 1985).

O uso de fungicidas aumenta o custo de produção, pode levar ao surgimento de populações resistentes e implica na contaminação do meio ambiente. Para superar esta limitação, uma das alternativas é o controle biológico pelo uso de rizobactérias, que vem mostrando potencial na redução de fitopatógenos em arroz (LUDWIG et al., 2009). Utilizaram-se rizobactérias selecionadas para o controle da mancha parda em arroz (LUDWIG et al., 2009), isoladas e combinadas (SOUZA JÚNIOR, 2010).

Objetivou-se com este trabalho, testar diferentes rizobactérias pré-selecionadas para o controle da mancha parda, isoladas ou em combinação, visando o controle da doença e promoção de crescimento em plantas de arroz.

Material e Métodos

Os isolados bacterianos foram incubados a 28°C/24h, e suspensos em solução salina (NaCl 0,85%) ($A_{540}=0,5$). As sementes da cv. El Passo 144L foram microbiolizadas por 30 minutos a 10°C. Como testemunha, sementes foram imersas em solução salina (com ou sem inoculação), ou em salina mais o fungicida Vitavax Thiram® 200SC. Os tratamentos utilizados foram: DFs185 (*Pseudomonas synxatha* (Ehrenberg) Holland), DFs223 (*P. fluorescens* Migula), DFs306 (não identificado), DFs416 e DFs418 (*Bacillus* sp. Cohn), e as combinações DFs185/306/416, DFs185/416/418 e DFs306/416/418.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, onde se depositaram seis sementes microbiolizadas em cada vaso contendo 7 Kg de solo não esterilizado, com quatro repetições, de forma casualizada.

A obtenção de esporos do patógeno e sua inoculação foram executadas conforme descrito por Ludwig e colaboradores (2009). As avaliações ocorreram 7, 14 e 21 dias após a inoculação, com notas em função da evolução da lesão (IRRI, 1975). Os valores das áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram submetidos ao teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Após o estágio de maturação, contou-se o número de panículas (NP), os grãos foram colhidos, secos e pesados (PSG). Avaliaram-se também peso seco de grãos chochos (PSGCo) e cheios (PSGCE) e número de grãos cheios (NGCe). Estes grãos foram avaliados quanto à incidência de manchas, atribuindo notas de 1 a 9, segundo a escala proposta por IRRI (1975).

Resultados e Discussão

Todos os tratamentos reduziram significativamente a severidade da mancha parda, exceto DFs306 (Figura 1). O isolado de *Bacillus* DFs416 foi o que apresentou maior porcentagem de controle (68%), seguido dos isolados de *Pseudomonas* DFs185 (57%) e DFs223 e a combinação DFs306/416/418 (45%). Estudos com bactérias, isoladas e combinadas entre si, mostraram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, onde o isolado DFs416 destacou-se como melhor tratamento no controle da mancha parda (SOUZA-JÚNIOR, 2010). Por outro lado, Ludwig e colaboradores (2009) utilizando individualmente as mesmas bactérias verificaram que dentre os tratamentos avaliados, os isolados DFs185 e DFs223 exibiram menor severidade desta doença. Variações de desempenho por parte dos biocontroladores não é incomum, sendo que o uso de combinação dos isolados visa reduzir estas variações, mas não necessariamente são mais eficientes, embora se espera que sejam mais estáveis.

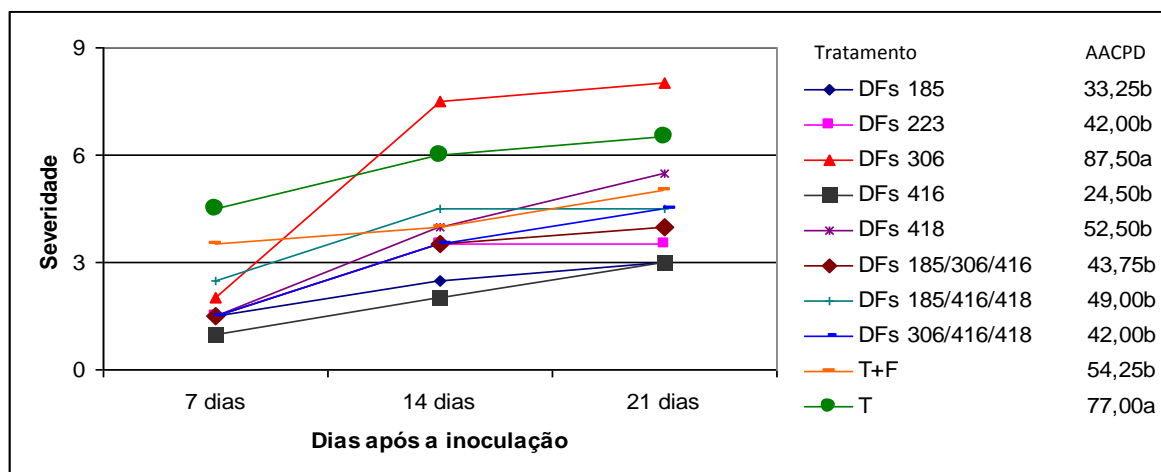


Figura 1: Curvas de progresso da mancha parda, de acordo com a evolução do tipo de lesão em avaliações realizadas 7, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno, em plantas originadas de sementes microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos e inoculadas com *Bipolaris oryzae*, conduzidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância. AACPD – Área abaixo a curva de progresso da doença; T+F – Testemunha com fungicida; T – Testemunha com salina.

Quando se avaliaram os parâmetros de produção, todos os tratamentos foram estatisticamente iguais (Tabela 1). Estes resultados são similares aos obtidos por Ludwig e colaboradores (2009), com as mesmas bactérias individualmente, porém estes autores observaram que as bactérias proporcionaram aumentos significativos na massa de grãos.

Tabela 1: Número de panículas (NP), peso seco de grãos (PSG), peso seco de grãos chochos (PSGCo), peso seco de grãos cheios (PSGCe), número de grãos cheios (NGCe) e severidade de manchas em grãos provenientes de plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados e combinações de rizobactérias, inoculadas com *Bipolaris oryzae*, conduzidas em casa de vegetação

Tratamento	NP ^{ns}	PSG (g) ^{ns}	PSGCo (g) _{ns}	PSGCe (g) _{ns}	NGCe ^{ns}	Nota ^{ns}
DFs185	12,50	3,13	2,87	0,46	23,50	6,50
DFs223	16,50	4,55	3,20	1,57	74,50	7,00
DFs306	15,25	4,88	3,31	1,82	87,50	6,50
DFs416	13,25	3,24	2,33	1,11	52,00	5,00
DFs418	17,50	4,22	3,54	0,86	41,75	7,50
DFs185/306/416	12,50	2,37	2,31	0,21	11,25	6,00
DFs185/416/418	17,50	5,33	3,91	1,67	78,00	7,00
DFs306/416/418	18,75	5,28	3,53	1,99	97,00	6,00
T+F	17,25	4,12	3,39	0,93	45,50	5,50
T	14,50	5,50	3,62	2,12	91,00	7,00
C.V. (%)	32,94	45,55	38,47	84,57	86,56	29,65

Letras iguais não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância, em quatro repetições; ^{ns} – valores de médias não significativos; T+F - tratamento com o fungicida Carboxin + Thiram na concentração de 3mL.Kg⁻¹ de sementes; T+I – testemunha com salina.

Conclusão

Alguns tratamentos bacterianos utilizados mostraram maior capacidade de controlar mancha parda em casa de vegetação.

Referências

- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Sistema de Evaluación Stándart para Arroz**. Los Baños, 1975. 64p.
- LUDWIG, J.; MOURA, A.B.; SANTOS, A.S.; RIBEIRO, A.S. Biocontrole da mancha parda e da escaldadura em arroz irrigado, pela microbiolização de sementes. *Tropical Plant Pathology*, v.34, n.5, p.322-328, 2009.
- OU, S.H. **Rice disease**. 2 ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985. 308p.
- RIBEIRO, A.S. **Doenças do arroz irrigado**. Pelotas: Embrapa-CPATB, 1988. 56p.
- SOUZA-JÚNIOR, I.T.; Controle biológico de doenças do arroz: ampliação do espectro de ação e promoção de crescimento pelo uso de combinações de rizobactérias eficientes. 68f. 2010. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2010.

BIOMASSA E ATIVIDADE MICROBIANA EM POMAR DE CÍTRUS CONDUZIDOS SOB SISTEMA ORGÂNICO E CONVENCIONAL

Dione Dinael Roehrs¹, Douglas Vicente Francesquett¹, Débora Elizabeth Barbosa de Medeiros², Andressa de Oliveira Silveira¹, Flávio Anastácio de Oliveira Camargo³

¹Estudantes do Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo da UFRGS; E-mail: dioneroehrs@yahoo.com.br, douglas_vf@yahoo.com.br, aosilveira@hotmail.com;

²Estudante de graduação do curso de Agronomia da UFRGS; E-mail: dekinha.bm@hotmail.com; ³Professor do Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo da UFRGS. E-mail: fcamargo@ufrgs.br

Resumo - Os parâmetros de atividade e biomassa microbiana são de fundamental importância para avaliação de bioindicadores de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. Este trabalho objetiva avaliar a biomassa microbiana, atividade microbiana por meio de respiração basal e qCO_2 em áreas de pomar de cítrus conduzido sob sistema convencional e orgânico e mata nativa. As amostras foram, obtidas em março de 2010 no município de Montenegro-RS, retiradas de uma profundidade de 0-10 cm, tamisadas e encaminhadas para análise química, de biomassa e atividade microbiana. Os resultados indicam que a atividade da microbiota foi superior na área de mata com relação ao pomar orgânico que foi maior que o pomar convencional e, apesar de não haver diferença significativa entre o qCO_2 das áreas analisadas, a biomassa microbiana da área de mata e do pomar orgânico diferiram do pomar convencional.

Palavras-chave: qCO_2 , respiração basal, indicadores de qualidade do solo

Introdução

As atividades agrícolas e as diferentes formas de sistemas de cultivos podem agravar ou amenizar alterações em solos. Uma das estratégias para avaliar alterações em solos cultivados é a sua comparação com solos sob vegetação nativa.

A atividade microbiana pode ser avaliada por meio da respiração basal, que consiste na medida da produção de CO_2 resultante da atividade metabólica de microrganismos, no solo (Parkin et al., 1996). No entanto, de acordo com Totola & Chaer (2002), a interpretação de seus valores deve ser realizada com cautela. Altas taxas de respiração podem indicar tanto um distúrbio ecológico, como a adição de uma grande quantidade de matéria orgânica. Para uma melhor interpretação desses resultados é calculado o quociente metabólico (qCO_2), que é a relação entre a taxa de respiração basal por unidades de biomassa microbiana (Anderson & Domsch, 1985).

O objetivo deste trabalho foi de avaliar a biomassa microbiana e atividade microbiana por meio de respiração basal e qCO_2 em áreas de pomar de cítrus conduzido sob sistema convencional e orgânico e mata nativa.

Materiais e métodos

O experimento está localizado no Município de Montenegro-RS e datava nove anos de cultivo no momento da coleta. A amostragem foi realizada em março de 2010, procedendo-se a retirada de três sub amostras de campo em cada local, com profundidade de amostragem de 0-10 cm. Além dessas, foram verificadas três repetições de laboratório para cada amostra

devido à variabilidade considerada neste procedimento analítico (Totola & Chaer, 2002). As amostras foram encaminhadas imediatamente para o laboratório, onde foram tamisadas em peneiras de 2 mm e mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento das análises. Para a realização das avaliações microbiológicas a umidade foi uniformizada para 60% da capacidade de retenção de água. O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi determinado segundo o método proposto por Jenkinson & Powlson (1976) de Fumigação-Incubação, e o cálculo para determinação do carbono da biomassa foi feito utilizando-se a fórmula matemática proposta por Horwath et al. (1996). A avaliação da respiração basal microbiana foi realizada juntamente com a avaliação do CBM, sendo estimada pela quantidade de CO₂ liberado do solo não fumigado durante 20 dias de incubação sendo todos valores corrigidos para solo seco, enquanto que o qCO_2 foi calculado de acordo com a fórmula proposta por (Anderson & Domsch, 1985). As determinações químicas (Quadro 1) das áreas amostrais foram feitas seguindo a metodologia Tedesco et al. (1995) e os resultados apresentados são relativos à média de duas repetições segundo análise de rotina praticada no Laboratório de Análise de Solo e Água da UFRGS.

Quadro 1. Análise química das amostras de solo referentes às áreas amostrais

Solo	Argila mg.kg ⁻¹	M.O. H ₂ O	pH SMP	P mg.dm ⁻³	K	Ca troc cmol _c .dm ⁻³	Mg troc	CTC	Al + H	
Mata	100,00	3,30	4,90	6,00	34,00	70,00	1,80	0,50	6,90	4,40
Pomar Orgânico	60,00	4,20	6,90	7,00	100,00	65,00	10,00	1,10	12,60	1,40
Pomar Convencional	80,00	3,30	5,80	6,20	42,00	49,00	2,60	1,20	7,40	3,50

Resultados e discussões

Verificou-se que as médias dos valores de respiração diminuíram de acordo com o grau de manejo das áreas, indicando que as comunidades microbianas presentes em área nativa possuem uma atividade maior que em pomar sob manejo orgânico, que por sua vez, possuem uma atividade maior do que em área de pomar convencional (Quadro 2). Resultados semelhantes a média obtida já foram mencionados por outros autores (Bandick & Dick, 1999) na comparação entre área nativa e cultivada, salientando que diversos fatores contribuem para uma maior atividade microbiana nas áreas nativas, como a ausência de preparo de solo, adição contínua de resíduos, melhor distribuição do sistema radicular e a maior diversidade florística.

A biomassa microbiana verificada foi maior na área de Mata e no pomar de cultivo orgânico co relação ao pomar convencional. A consolidação do manejo orgânico há nove anos com aporte de resíduos vegetais no solo sem manejo químico da área é, possivelmente, o principal contribuinte para tal parâmetro.

O qCO_2 não se mostrou sensível entre as áreas amostrais devido ao alto coeficiente de variação dos resultados encontrados.

Quadro 2. Resultados de análises microbiológicas obtidas em amostras de solo (0 – 10 cm de profundidade). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa para o $\alpha=5\%$ em teste Tukey.

	Mata	Pomar Orgânico	Pomar Convencional
Respiração basal (mg C-CO ₂ . Kg ⁻¹ .h ⁻¹)	311,53 a	186,11 b	101,46 c
Biomassa microbiana (mg.kg ⁻¹)	494,92 a	490,17 a	213,07 b
qCO_2	0,88 a	0,79 a	0,94 a

Conclusões

A atividade microbiana diminuiu de acordo com o maior grau de manejo das áreas indicando que as comunidades microbianas presentes em área de mata nativa possuem uma atividade maior do que pomar sob manejo orgânico, que por sua vez, possuem biomassa e atividade maior do que em área de pomar convencional avaliadas.

Referências

- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.1, p.81-89, 1985.
- HORWATH, W.R.; PAUL, E.A.; HARRIS, D.; NORTON, J.; JAGGER, L.; HORTON, K.A. Defining a realistic control for the chloroform fumigation-incubation method using microscopic counting and ¹⁴C-substrates. *Canadian journal of soil science*, Ottawa, v.76, p.459-467, 1996.
- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil - I. Fumigation with cloroform. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.8, n. 3, p.167-177, 1976.
- PARKIN, T.B.; DORAN, J.W.; FRANCO-VIZCAINO, E. Field and laboratory tests of soil respiration. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (eds.) **Methods for assessing soil quality**. Madison: SSSA, 1996. p.231-246.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; et al. Análise de solo, plantas e outros materiais, 2 ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim técnico, 5).
- TOTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos com indicadores da qualidade do solo. In: ALVAREZ, V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: SBCS, 2002. v. 2, p.195-276.

CARACTERIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. UTILIZADOS NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Daiana Bortoluzzi Baldoni¹; Carolina de Oliveira Fialho²; Rute Terezinha da Silva Ribeiro³; Manoeli Lupatini¹; Edicarla Trentin⁴; Zaida Inês Antonioli⁵

¹Estudante do Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo do Departamento de Solos do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Bolsistas CAPES; E-mail: daianabio@hotmail.com; mlupatini@gmail.com; ²Bióloga, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Caxias do Sul; E-mail: monagoo@gmail.com; ³Professora Dra. do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul; E-mail: rute.bio@gmail.com ⁴Aluna do Curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, Bolsista FAPERGS; E-mail: edicarla_15@yahoo.com.br; ⁵Professora Dra. do Departamento de Solos do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Bolsista de Produtividade CNPq; E-mail: zantonioli@gmail.com

Resumo - Espécies de *Trichoderma* spp. podem atuar como antagonistas aos fungos do gênero *Fusarium*, os quais causam a fusariose, doença que ataca diversas culturas, entre elas o tomateiro. Este trabalho teve como objetivo a seleção e caracterização molecular de isolados de *Trichoderma* spp. que possuem capacidade antagonista à espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Os isolados de *Trichoderma* spp. foram coletados em diferentes plantas, avaliados pelo Teste de Confrontação Direta e caracterizados através da região ITS do rDNA. Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram distinta reação antagonista aos isolados de Fol e foram separados em grupos através da região ITS. Porém, para algumas espécies, a região ITS não apresentou sítios informativos suficientes.

Palavras-chave: fusariose; antagonismo; ITS rDNA.

Introdução

Os fungos fitopatogênicos pertencentes ao gênero *Fusarium* são causadores de doenças de plantas em diversos hospedeiros, dentre os quais se destaca o tomateiro, atacado pela espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), causadora da murcha vascular. Para o controle desta doença, o emprego de microrganismos, como fungos antagonistas de *Trichoderma* spp. pode ser uma alternativa ao emprego de agroquímicos. *Trichoderma* é um fungo pertencente ao Filo Ascomycota (AGRIOS, 2005) e possui uma vasta gama de espécies, sendo que sua identificação é geralmente baseada em características morfológicas. Entretanto, as descrições são baseadas em um número limitado de isolados, o que pode dificultar a caracterização das espécies (FUJIMORI e OKUDA, 1994). Uma técnica que tem sido usada para auxiliar na identificação e caracterização destas espécies é o sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA (DNA ribossômico), a qual pode variar na sequência de bases e no comprimento (GERBI, 1985). O presente trabalho objetivou a seleção e caracterização molecular de isolados de *Trichoderma* spp. que possuem capacidade antagonista ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Materiais e métodos

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram coletados no Rio Grande do Sul em diferentes culturas: T1 e T4 (videira), T2 (gérbera), T3 (pepino), T6 (amor-perfeito), T15, T17 e T19

(macieira) e, T8 e T5A, os quais não têm seus locais de origem identificados. O antagonismo destes isolados em relação à espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* foi avaliado de acordo com Bell et al. (1982) e Abdell-Fattah et al. (2007). A manutenção dos isolados foi feito em meio BDA (DHINGRA e SINCLAIR, 1995). Para o estudo molecular, o DNA dos isolados de *Trichoderma* spp. foi extraído (DOYLE e DOYLE, 1991) e a reação de PCR foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e as condições de acordo com Lupatini et al. (2008). Para a construção da árvore filogenética, as sequências foram alinhadas pelo ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e a análise filogenética foi conduzida utilizando o método *Neighbour-joining* (MEGA versão 4) (TAMURA, 2006). Para a identificação e caracterização dos isolados, as sequências obtidas foram comparadas com sequências que pertencem ao GenBank (ALTSCHUL et al., 1997).

Resultados e Discussão

No teste de Confronto Direto, os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram capacidade inibitória variável contra os isolados de Fol. Todos os isolados avaliados foram similares quanto ao tamanho da região ITS em gel de agarose, apresentando aproximadamente 600 pb. Os isolados de *Trichoderma* spp., quando comparados com sequências pertencentes ao GenBank, formaram agrupamentos distintos (Figura 1).

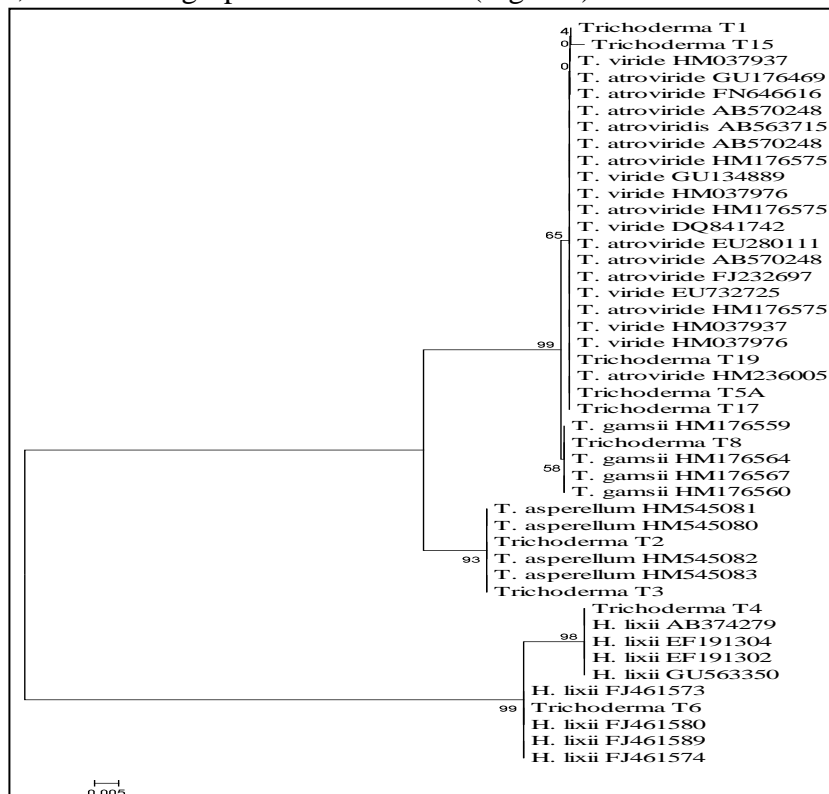


Figura 1. Dendrograma derivado das sequências das regiões ITS do rDNA dos isolados de *Trichoderma* spp. estudados e de isolados pertencentes ao GenBank com base em 5000 réplicas no teste *bootstrap*.

Os isolados T2 e T3 formaram um grupamento com isolados que pertencem às espécies *T. asperellum*. Os isolados T4 e T6 foram muito similares com a espécie *Hypocrea lixii*, porém, apresentaram diferenças suficientes para formarem dois subgrupos. Os isolados T1, T8, T15, T17, T19 e T5A ficaram agrupados juntamente com isolados de *T. atroviride* e *T. viride*. Esse agrupamento se formou pela elevada similaridade que as espécies *T. atroviride* e *T. viride* (Complexo *Trichoderma viride/atroviride/koningii*) apresentam em relação à sua

filogenia (morfologia e ITS rDNA), sendo que a região ITS não apresentou sítios informativos suficientes para a distinção destas espécies

Conclusões

Os isolados de *Trichoderma* spp. de diferentes origens apresentaram reação antagonista aos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). A região ITS, apesar de ser uma ferramenta útil na identificação e caracterização de espécies de *Trichoderma*, não apresenta sítios informativos suficientes para a distinção de algumas espécies.

Apoio

À UFSM, ao PPGCS, ao PPGBio da UCS, à CAPES, ao CNPq e à FAPERGS os nossos agradecimentos pela apoio para a realização deste trabalho.

Referências

- ABDELL-FATTAH, G.M. et al. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. **Mycopathologia**, v. 164, p. 81-89. 2007.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Elsevier Academic Press, USA, 2005. 950 p.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 73, n. 17, p. 3389-3402. 1997.
- BELL, D. K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 370-382. 1982.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-18. 1990.
- FUJIMORI, F.; OKUDA, T. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening fungi. **Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 173-182. 1994.
- GERBI, S.A. Evolution of ribosomal DNA. In: MCINTYRE, R.E. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Plenum, p. 419-517.1985.
- LUPATINI, M. et al. Mycorrhizal morphotyping and molecular characterization of *Chondrogaster angustisporus* Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira, an ectomycorrhizal fungus from *Eucalyptus*. **Mycorrhiza**, v. 27, p. 325–331. 2008.
- THOMPSON, J.D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680. 1994.
- TAMURA, K. et al. Mega: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p.150-163. 2006.
- WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, p. 315–322. 1990.

CARCTERIZAÇÃO MOLECULAR (ITS rDNA) DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* DE DIFERENTES RAÇAS E ORIGENS GEOGRÁFICAS

Manoeli Lupatini¹; Carolina de Oliveira Fialho²; Rute Terezinha da Silva Ribeiro³; Edicarla Trentin⁵; Zaida Inês Antonioli⁴; Deisy Sharelene Arruda Morales¹

¹Estudante do Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo do Departamento de Solos do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Bolsista CAPES; E-mail: mlupatini@gmail.com; deisy-morales@hotmail.com; ²Bióloga, Mestre em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul; E-mail: monagoo@gmail.com; ³Professora Dra. do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul; E-mail: rute.bio@gmail.com; ⁴Professora Dra. do Departamento de Solos do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Bolsista de Produtividade CNPq; E-mail: zantonioli@gmail.com; ⁵Aluna do Curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, Bolsista FAPERGS; E-mail: edicarla_15@yahoo.com.br

Resumo – A espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* é subdivida em três raças de acordo com a sua virulência. Por exibir uma elevada variabilidade genética, a identificação apenas por caracteres morfológicos pode ser de difícil execução, sendo então necessário a complementação com ferramentas moleculares. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a região ITS do rDNA de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* de diferentes raças e regiões geográficas. Realizou-se o teste de patogenicidade e análise filogenética da região ITS do rDNA. Os isolados foram diferenciados quanto à raça pelo teste de patogenicidade, mas não foi possível a diferenciação das raças dos isolados através da região ITS do rDNA.

Palavras-chave: raças; *Fusarium oxysporum*; *formae speciales*.

Introdução

Os fungos do gênero *Fusarium* são conhecidos por causarem doenças em uma ampla variedade de plantas, entre elas o tomateiro, o qual é hospedeiro da espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H. N. Hans., que é subdivida em raças, tendo como base a sua virulência em diferentes cultivares do hospedeiro (ARMSTRONG e ARMSTRONG, 1981). Devido à sua alta variabilidade genética, é necessário a aplicação de ferramentas que possam auxiliar as técnicas já existentes para possibilitar a diferenciação entre isolados e raças. Uma técnica que tem sido usada é o sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA (DNA ribossômico), a qual pode variar de modo intraespecífico (GERBI, 1985).

O objetivo deste trabalho foi auxiliar na identificação e caracterização da região ITS do rDNA de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de diferentes raças e origens geográficas.

Materiais e Métodos

Foram avaliados isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) obtidos de diferentes origens geográficas. Os isolados de *Fusarium* 589, 859, 921, 921/2, 1205/1 e 1205/2 (Rio Grande do Sul) não possuíam identificação de espécie e raça. Os isolados *Fusarium* 23 e

Fusarium 27 (Espírito Santo) pertencem às raças 2 e 1, respectivamente, e os isolados TO11 e TO245 (São Paulo) pertencem à raça 2. As linhagens 26380, 34970, OSU451 e MM66 (EUA) pertencem às raças 3, 2, 2 e 2, respectivamente e foram previamente identificadas como *Fol*, e são linhagens padrão dos grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) desta *formae speciales*. O teste de patogenicidade e identificação das raças foi realizado com as cultivares de tomate diferenciadoras de raças de acordo com Reis et al. (2004). Para o estudo molecular, os isolados de *Fusarium* 1205/2, *Fusarium* 23 e 27, TO11, TO254, 26380, 34970, MM66 e OSU451 foram multiplicados em meio batata-dextrose (BD) (DHINGRA e SINCLAIR, 1995). O DNA dos isolados foi extraído do micélio (DOYLE e DOLYLE, 1991). A reação de PCR foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e as condições de acordo com Lupatini et al. (2008). As sequências obtidas foram comparadas com sequências do GenBank, alinhadas pelo algoritmo ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e a análise filogenética foi conduzida utilizando-se o método *Neighbour-joining* pelo programa MEGA (TAMURA, 2006).

Resultados e Discussão

Entre os isolados do Rio Grande do Sul, apenas o isolado 1205/2 de *Fol* ocasionou sintomas da doença, sendo classificado como *Fol* Raça 2. Pode haver isolados de *Fol* oriundos de plantas diferentes, com sintomas de doença que não ocasionam sintomas em cultivares suscetíveis (CAI et al., 2003). Devido à este comportamento, somente o isolado 1205/2 foi sequenciado. Foi confirmada a raça dos isolados TO11, TO245, *Fusarium* 23 e 27, os quais foram utilizados como controle. Todos os isolados estudados foram similares quanto ao tamanho da região ITS em gel de agarose, apresentando aproximadamente 600 pares de bases. Foram incluídas, para a análise filogenética (Figura 1), sete sequências de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

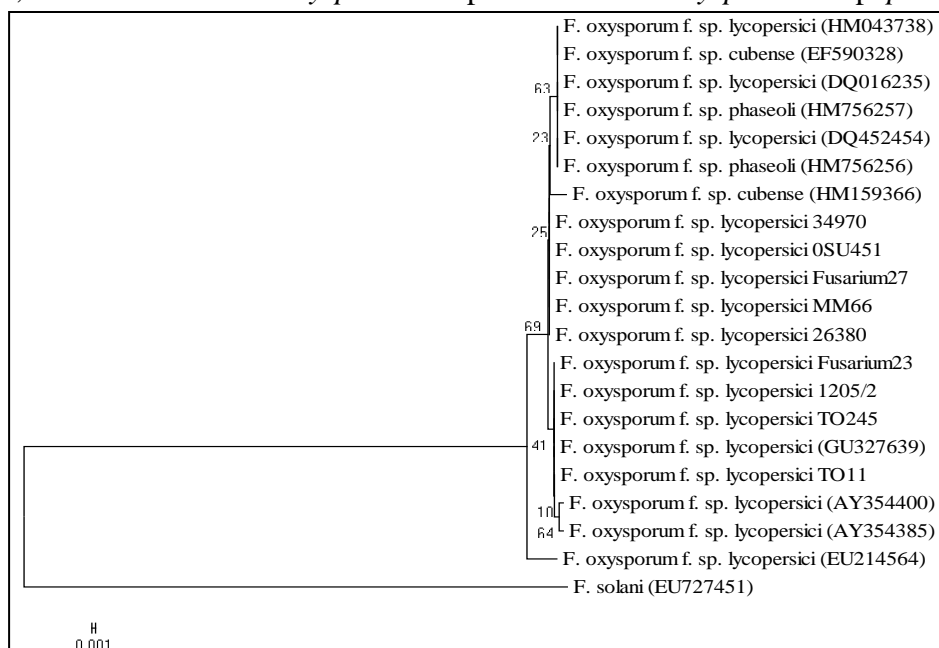


Figura 1. Dendrograma derivado das sequências das regiões ITS do rDNA, com base em 5000 réplicas no teste *bootstrap* de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* de diferentes raças e origens geográficas. (): código de acesso ao GenBank. O fungo *F. solani* foi usado como *outgroup*.

Cabe ressaltar que no GenBank só existem sete isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identificados e com suas sequências das regiões ITS inseridas neste banco. Pela análise realizada através da região ITS do rDNA não foi possível a diferenciação das raças

dos isolados de Fol avaliados. A região ITS, apesar da pouca variabilidade, pode ser utilizada como marcador filogenético para relações dentro do gênero *Fusarium*, embora não apresente informação suficiente para comparações entre as f. sp. (MONTEIRO, 2004). Por isso, os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, f. sp. *cubense* e f. sp. *phaseoli* não apresentaram distâncias filogenéticas suficientes para formarem grupos diferenciados (Figura 1).

Conclusões

A região ITS do rDNA apresentou baixa variabilidade entre as raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* originárias de diferentes regiões geográficas, não sendo suficiente para distinção destas raças, porém apresenta variabilidade suficiente para a distinção entre espécies do gênero *Fusarium*.

Apoio

À UFSM, ao PPGCS, ao PPGBio da UCS, à CAPES, ao CNPq e à FAPERGS.

Referências

- ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Nelson, P.E. et al. ***Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy***. Pennsylvania: University Press, 1981. p. 391-399.
- CAI, G. et al. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. ***Phytopathology***, v. 93, p. 1014-1022. 2003.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. ***Focus***, v. 12, p. 13-18. 1990.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. ***Basic Plant Pathology Methods***. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.
- GERBI, S.A. Evolution of ribosomal DNA. In: MCINTYRE, R.E. ***Molecular evolutionary genetics***. New York: Plenum, 1985. p. 419-517.
- LUPATINI, M. et al. Mycorrhizal morphotyping and molecular characterization of *Chondrogaster angustisporus* Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira, an ectomycorrhizal fungus from *Eucalyptus*. ***Mycorrhiza***, v. 27, p. 325-331, 2008.
- MONTEIRO, A. S. **Análise genômica e sequenciamento automático de rDNA em populações de *Fusarium oxysporum***. 2004. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal do Alagoas, Maceió.
- REIS, A. et al. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomate no Brasil e seleção de novas fontes de resistência ao patógeno. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa Hortaliças**. 2004
- THOMPSON, J.D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. ***Nucleic Acids Research***, v. 22, p. 4673-4680. 1994.
- TAMURA, K. et al. Mega: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. ***Briefings in Bioinformatics***, v. 5, p.150-163. 2006.
- WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. ***PCR protocols: a guide to methods and applications***. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

CONTROLE BIOLÓGICO DA MURCHA DO CURTOBACTERIUM PELA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO

Márcio Wissmann da Costa¹; Bianca Obes Corrêa², Jaqueline Tavares Schafer³, Paulo Ricardo Benedeti⁴, Andréa Bittencourt Moura⁵

¹Graduando em Agronomia Bolsista CNPq ITI A; ²Doutoranda em Fitossanidade, ³Mestranda em Fitossanidade Bolsista CAPES, ⁴Graduando em Agronomia Bolsista PIBIC CNPq, ⁵Professora Departamento de Fitossanidade Bolsista CNPq Produtividade em Pesquisa. E-mail: marcio84costa@hotmail.com

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de controle da murcha do *Curtobacterium* a partir da microbiolização de sementes de feijão com rizobactérias, frente a cinco diferentes isolados de *Curtobacterium flaccumfacens* pv. *flaccumfacens*. Os tratamentos foram: DFs093, DFs513, DFs769, DFs831, DFs842, DFs843, DFs912, isoladamente e em combinações. As sementes foram microbiolizadas a 10°C/5h, e como testemunha, foram imersas em solução salina. Após, as sementes foram semeadas em vasos em dois plantios diferentes. Com surgimento do primeiro trifólio, foi realizada a inoculação de 10µL da suspensão dos diferentes isolados. As avaliações da severidade da doença foram realizadas após 15 dias a partir de uma escala de notas de 0-9. Os valores foram submetidos ao teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os menores valores de severidade foram observados no primeiro plantio quando se inocularam os isolados Cff GO e Cff SP. No segundo, o menor foi Cff SP. As rizobactérias apresentam potencial no controle da murcha do *Curtobacterium* e a combinação das mesmas diversifica e intensifica o efeito individual das bactérias.

Palavras chave – biocontrole, *Curtobacterium flaccumfacens* pv. *flaccumfacens*, *Phaseolus vulgaris*, co-inoculação, PGPR

Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). No entanto, a cultura apresenta baixo rendimento, fato decorrente principalmente da incidência de doenças, com potencial de danos de até 60%, principalmente quando o manejo não é adequado e medidas de controle não são adotadas (NETO e FANCELLI, 2000).

Dentre os agentes fitopatogênicos, incidentes no feijão, fungos e bactérias se constituem importantes agentes etiológicos, principalmente pela facilidade com que se disseminam, bem como pelas dificuldades encontradas no seu controle.

Entre as doenças bacterianas que incidem sobre a cultura, destaca-se a murcha do *Curtobacterium* (*Curtobacterium flaccumfacens* pv. *flaccumfacens* (Hedges) Collins & Jones) (Cff) constatada no Distrito Federal, Goiás, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (HERBES et al., 2008). Para o controle dessa doença, tem-se utilizado de sementes sadias e cultivares resistentes, no entanto, muitas vezes torna-se inviável devido à variabilidade dos patógenos. Desta forma, dentro de um contexto de manejo integrado de doenças, o controle biológico tem ganhado destaque, complementando as medidas já empregadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de controle da murcha do *Curtobacterium* a partir da microbiolização de sementes de feijão com rizobactérias, isoladas ou em combinação, frente a cinco diferentes isolados de *C. flaccumfacens* pv. *flaccumfacens*.

Material e Métodos

Os isolados bacterianos DFs093 e DFs769 (*Bacillus cereus* Frank.), DFs348 (*Bacillus* sp. Conh.), DFs513 (*Pseudomonas veronii* Elomari), DFs831 e DFs842 (*P. fluorescens* Migula), DFs843 e DFs912 (*Rhodococcus fascians* (Tilford)Goodfellow) foram cultivados por 24 horas, e suspensos solução salina (NaCl 0,85%) ($A_{540}=0,50$).

As combinações de alguns dos isolados foram constituídas por partes iguais da suspensão de cada isolado (DFs093+769+831; DFs093+769+842 e DFs769+348+831) ($A_{540}=0,50$), constituindo respectivamente as combinações C01, C02 e C03.

As sementes da cultivar BRS Valente foram microbiolizadas a 10°C/5h e como testemunha, sementes foram imersas em solução salina. Após a microbiolização, as sementes foram depositadas em vasos contendo 1 Kg de solo não esterilizado, com quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado, em dois plantios.

Após o surgimento do primeiro trifólio, inocularam-se 10µL da suspensão dos diferentes isolados de Cff obtidos de diferentes localidades (Cff GO, Cff SP, Cff MG, Cff DF e Cff SC) que foram crescidos por 48h/28°C e suspensos em solução salina ($A_{540}=0,20$). As avaliações da severidade da doença foram realizadas após 15 dias utilizando-se escala de notas de 0-9 (MARINGONI, 2000). Os valores obtidos foram submetidos ao teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados

Observou-se que os tratamentos bacterianos testados apresentaram interação biocontrolador/isolado patogênico de Cff (Tabela 1). Os menores valores de severidade foram observados no primeiro plantio (Cff GO e Cff SP), tanto para as plantas tratadas com as bactérias quanto para as testemunhas, e no segundo plantio, para Cff SP. Os maiores percentuais de controle no primeiro (48,4%) e segundo (59,4%) plantios foram resultantes de plantas inoculadas com o isolado Cff GO. Por outro lado, as combinações se destacaram, pois, resultaram em estabilidade de biocontrole, controlando o patógeno nos dois plantios. O percentual médio de controle alcançado pelas combinações foi de 38,9 (C02) a 48,7% (C01), em contraste com a média dos outros tratamentos bacterianos que foi de 26,6%.

A combinação C01 apresentou amplo espectro de ação, reduzindo a severidade da doença independentemente do isolado de Cff. Em trabalho anterior, os mesmos tratamentos controlaram eficientemente a maioria dos 16 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ou quando utilizados para microbiolizar 23 diferentes cultivares de feijão (CORRÊA, 2007).

A combinação C01 é composta por *B. cereus* (DFs093 e DFs769) e *P. fluorescens* (DFs831), espécies conhecidas por sua capacidade de biocontrole, que apresentam atividade quitinolítica (DFs769), lipolítica, proteolítica, produzem amônia e antibióticos efetivos contra patógenos da cultura do feijão (CORRÊA et al., 2007).

Não se pode descartar a possibilidade destes isolados atuarem por indução de resistência, pois apresentam algumas características associadas a este mecanismo: intervalo de tempo entre a aplicação e a manifestação do biocontrole; separação espacial entre o biocontrolador e o patógeno; inespecificidade de proteção (STEINER e SHONBECK, 1995).

Os resultados obtidos reafirmam que o uso de combinações de microrganismos potencializa a efetividade do controle biológico sobre várias estirpes do mesmo patógeno, bem como outros agentes fitopatogênicos, por haver a expressão de diferentes mecanismos de ação.

Tabela 1 - Severidade de cinco isolados de *Curtobacterium flaccumfacens* pv. *flaccumfacens* em plantas de feijão oriundas de sementes microbiolizadas com tratamentos bacterianos, em dois plantios

Trat	Primeiro plantio					Segundo plantio				
	Cff GO	Cff SP	Cff MG	Cff DF	Cff SC	Cff GO	Cff SP	Cff MG	Cff DF	Cff SC
DFs093	1,0bB	1,0aB	5,0cdA	5,0dA	5,0bA	2,0dC	5,0bcB	4,5cdeB	7,0abA	4,5cdeB
DFs513	1,2bC	2,0aC	8,0aA	5,0dB	5,0bB	4,5bcB	3,5cdB	7,0bA	7,0abA	4,0cdeB
DFs769	2,0abC	1,5aC	4,5dB	5,0dB	7,0aA	5,0bB	6,0abB	5,0cdB	5,5bcB	8,0aA
DFs831	1,0bC	2,0aC	5,5cdB	5,5dB	7,0aA	5,0bA	2,0dB	4,5cdeA	5,0cA	5,5bcA
DFs842	1,5bC	1,7aC	8,5aA	9,0aA	5,5bB	3,0cdC	5,0bcB	6,0bcB	8,5aA	5,0cdB
DFs843	1,0bC	1,0aC	2,5eB	5,0dA	5,0bA	3,0cdC	6,0abAB	5,0cdB	5,0cB	7,0abA
DFs912	1,2bC	1,7aC	6,0cB	8,0bA	6,0abB	3,0cdD	7,0aB	9,0aA	7,0abB	5,0cdC
*C01	1,2bC	2,0aC	3,0eAB	3,0dAB	3,5cA	4,5bcA	2,0dB	2,7eAB	4,0cA	3,0eAB
*C02	1,0bC	2,0aC	5,0cdA	5,0dA	3,5cB	3,0cdB	2,0dC	5,0cdA	5,0cA	4,5cdeAB
*C03	2,0abBC	1,2aC	3,0eB	5,0dA	3,0cB	3,5bcdA	1,7dB	4,0deA	5,0cA	3,5deA
T	2,5aB	2,0aB	7,0bA	7,0cA	6,0abA	9,0aA	4,2bcC	7,5abAB	7,5aAB	7,0abB
CV	18,5					23,4				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade *C01 (DFs093+DFs769+DFs831); C02 (DFs093+DFs769+DFs842); C03 (DFs348+DFs769+DFs831). Trat = Tratamento; T = Testemunha.

Conclusões

As rizobactérias testadas apresentam potencial de uso no controle da murcha do *Curtobacterium* e a combinação das mesmas diversifica e intensifica o efeito que as bactérias produzem individualmente.

Referências

- CORRÊA, B.O. Microbiolização com bactérias no controle do crestamento bacteriano comum e da antracnose na cultura do feijão. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- HERBES, D. H.; THEODORO, G.F.; MARINGONI, A.C.; PIVA, C. A.; ABREU, L. Detecção de *Curtobacterium flaccumfacens* pv. *flaccumfacens* em sementes de feijoeiro produzidas em Santa Catarina. *Tropical Plant Pathology*, v.33, n.2, p. 153-156, 2008.
- MARINGONI, A. C. Caracterização de isolados de *Curtobacterium flaccumfacens* pv. *flaccumfacens* e avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. 2000. 73 f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- NETO, D. D.; FANCELLI, A. L. Produção de feijão. Guaíba: Agropecuária, 2000. 385p.
- STEINER, U. SCHONBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, R. Induced Resistance to Disease in Plants – Developments in plant pathology, v. 4, 1995. 182p.

CONTROLE DE QUALIDADE, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO SEMIA AUTORIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE INOCULANTES

Bettina Marks^{1,3}; Simone Hirakata^{1,5}; Eliane Bangel^{1,2}; Gilmário Silva^{1,4}; Silviane Ferreira^{1,6}; Larissa Pingret^{1,5}; André Barata^{1,5}; Roberta^{1,5}; Rafael Vargas^{1,3}

¹ Laboratório de Fixação Biológica do Nitrogênio (LFBN) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) – Rua Gonçalves Dias, 570, CEP: 90130-060, Porto Alegre/RS. E-mail: microbiologia@fepagro.rs.gov.br; ² Pesquisador/Responsável técnico do LFBN; ³ Bolsista DTI/CNPq do LFBN; ⁴ Colaborador em pesquisa do LFBN; ⁵ Estagiário do LFBN, acadêmico de ciências biológicas; ⁶ Bióloga, docente de biologia cedida à FEPAGRO

Resumo – A Coleção de Culturas de Rizóbio SEMIA é o banco de germoplasma oficial para rizóbios no Brasil, a qual fornece as estirpes para a indústria fabricante de produtos inoculantes. Nesta coleção é feito anualmente, um rigoroso processo de controle de qualidade das estirpes liofilizadas e preservadas em óleo mineral. Foram recuperados 16 lotes liofilizados e 10 tubos contendo culturas preservadas em óleo de estirpes de rizóbio SEMIA noduladoras de feijão, soja e feijão caupi e realizadas avaliações de pureza, caracterização morfofisiológica e testes de eficiência agronômica em casa de vegetação. Com base nos resultados das caracterizações morfofisiológicas das estirpes analisadas, pode-se concluir que as mesmas estavam puras e mantiveram suas características originais. Nos testes de eficiência agronômica, todas as estirpes comprovaram a efetividade da nodulação, para os dois métodos de preservação. Apenas a estirpe SEMIA 6461 lote 0704, (feijão caupi) não comprovou eficiência em FBN. As estirpes autorizadas para o cultivo de feijão não comprovaram eficiência, excetuando-se a estirpe SEMIA 4077 lote 0908.

Palavras-chave: rizóbio, fixação biológica do nitrogênio, liofilização, preservação em óleo, caracterização morfofisiológica.

Introdução

Com o aumento do conhecimento dos mecanismos que regem a fixação biológica do nitrogênio (FBN), e aceleração da tecnologia de isolamento e caracterização dos microrganismos fixadores de N₂ em leguminosas, houve o surgimento do inoculante, um produto que contém estirpes de rizóbios que, adicionados às sementes de leguminosas, diminuem ou excluem a necessidade de adubação nitrogenada.

A Coleção de Culturas de Rizóbio SEMIA (Seção de Microbiologia Agrícola) do Laboratório de Fixação Biológica do Nitrogênio (LFBN) da FEPAGRO é o banco de germoplasma oficial para rizóbio no país, o qual fornece estirpes para a indústria, pesquisa e ensino. Nesta Coleção, os microrganismos encontram-se preservados sob a forma liofilizada e em tubos com cobertura de óleo mineral esterilizado. Anualmente é realizado um rigoroso processo de controle de qualidade destas bactérias a fim de garantir a distribuição de estirpes autênticas. O objetivo do presente trabalho foi verificar a pureza, a manutenção das características morfofisiológicas e testar a eficiência da FBN de estirpes de rizóbio autorizadas para a produção de inoculantes comerciais para os cultivos de feijão, soja e feijão caupi nos dois métodos de preservação utilizados na Coleção SEMIA.

Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado com 16 lotes liofilizados e 10 tubos com cobertura de óleo mineral armazenadas na Coleção SEMIA, no período de março a dezembro de 2009. As avaliações de pureza e das características morfofisiológicas foram realizadas no LFBN, e os testes do potencial fixador de nitrogênio das estirpes foram realizados na casa de vegetação da Faculdade de Agronomia da UFRGS. As estirpes utilizadas pertenciam a rizóbios para os cultivos de feijão, soja e feijão caupi.

Caracterização morfofisiológica das estirpes

As estirpes foram recuperadas e inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura CRYMA pelo método de esgotamento por estrias. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à temperatura de 28°C até a manifestação das colônias e verificação da pureza dos cultivos. Para caracterização, foram realizados repiques, a partir das placas originais, para placas contendo CRYMA e meios diferenciais (Ágar Nutriente; Batata Dextrose Ágar; Glicose-Peptona com Púrpura de Bromocresol; Tryptic Soy Agar; YMA com indicador azul de bromotimol). Após o tempo necessário de incubação para manifestação de colônias isoladas, procedeu-se a avaliação morfofisiológica das seguintes características: manifestação do crescimento (em dias); alteração do pH no meio YMA-ABT; forma, elevação, borda, e superfície da colônia; produção de muco; consistência da massa de crescimento; detalhes ópticos; cromogênese e absorção de corante em meio YMA-ABT e CRYMA; coloração de Gram e manifestação do crescimento em meios diferenciais.

Testes do potencial fixador de nitrogênio das estirpes

Os testes de eficiência agronômica foram realizados em blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento. Após a emergência das plântulas, estas foram inoculadas com a suspensão bacteriana da estirpe indicada para o respectivo tratamento. Todos os vasos do experimento receberam 10 ml de solução a 0,486% de nitrato de amônio (NH_4NO_3) aos 4-5 dias após a inoculação para garantir o pleno desenvolvimento das plantas em substrato esterilizado. Os tratamentos do controle nitrogenado (C/N) receberam doses periódicas de nitrogênio (10 ml de solução a 1,15% de nitrato de amônio). No período do florescimento de cada cultivo foi realizada a colheita, separando a parte aérea para avaliação da matéria seca total e as raízes para contagem e peso da massa seca de nódulos. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa ASSISTAT, através do teste de Tukey a 5%.

Resultados e Discussão

As estirpes de rizóbio analisadas neste estudo, independente do método de preservação, apresentaram coloração Gram negativa e características morfofisiológicas de colônia compatíveis com os resultados obtidos em anos anteriores. A comparação destas características fornece parâmetros que auxiliam no controle de qualidade das estirpes, garantindo assim, a pureza dos rizóbios armazenados no banco de germoplasma.

Com relação aos testes de eficiência agronômica, todos os tratamentos inoculados para os três cultivos tiveram nodulação eficiente, localizada em sua maior parte na coroa da raiz, com nódulos apresentando coloração avermelhada (complexo enzimático da nitrogenase ativo). Os resultados da análise estatística dos dados dos testes de eficiência agronômica podem ser visualizados na Tabela 1.

Pode-se evidenciar que em relação à média do número de nódulos, não houve diferença significativa entre estirpes recuperadas de preservação em óleo e liofilizadas. A mesma observação foi constatada para a variável massa de nódulos secos, com exceção da SEMIA 6461 recuperada de liofilização. Esta relativa igualdade entre os tratamentos quanto ao número e massa de nódulos foi também relatada por SOARES *et al.* (2006), utilizando estirpes de feijão isoladas e nativas, com testes a campo. Quanto à média da matéria seca da

parte aérea a mesma uniformidade entre as estirpes foi evidenciada, tendo também como exceção a SEMIA 6461 recuperada de liofilização, o que talvez possa ser evidência de baixa eficiência.

As culturas conservadas em óleo mineral utilizadas neste trabalho tiveram bom desempenho em casa de vegetação, apresentando nodulação eficiente. Segundo sugerem SOMASEGARAN & HOBEN (1994), o método de liofilização mantém as culturas viáveis por, no mínimo, 15-20 anos, o que pode ser evidenciado com as caracterizações morfofisiológicas e testes de eficiência agrônômica com resultados positivos e nodulação satisfatória realizados com as ampolas recuperadas neste trabalho.

Tabela 1: Análise comparativa das médias do n° de nódulos, massa de nódulos secos e matéria seca total da parte aérea dos tratamentos para os cultivos de feijão, soja e feijão caupi (análise estatística – Programa ASSISTAT).

	TRATAMENTO	n° nódulos	Massa de nódulos secos (g)	Matéria seca total (g)
FEIJÃO	T1 – 4088 L.0208 ¹	168,50 ab ⁵	0,13480 ab	1,80 b
	T2 – 4080 L.0908	158,75 ab	0,08310 b	1,40 b
	T3 – 4077 L.0908	235,25 ab	0,16345 a	2,21 ab
	T4 – 4077 L.0407	159,00 ab	0,13808 ab	1,79 b
	T5 – 4077 COL ²	142,00 ab	0,13713 ab	1,80 b
	T6 – 4080 COL	273,00 a	0,14955 ab	1,72 b
	T7 – 4088 COL	131,00 bc	0,11730 ab	1,75 b
	T8 – C/N ³	0 c	0 c	2,77 a
	T9 – S/ INOC ⁴	0 c	0 c	1,63 b
SOJA	T1 – 5079 L.0208	156,50 ab	0,66340 abc	12,89 ab
	T2 – 5080 L.0608	155,25 ab	0,60903 c	13,70 a
	T3 – 5019 L.0608	175,00 ab	0,83648 ab	12,55 ab
	T4 – 587 L.0708	108,25 b	0,67438 abc	12,47 ab
	T5 – 5079 L.0409	165,75 ab	0,61300 c	13,46 a
	T6 – 5079 L.0809	165,00 ab	0,59338 c	12,73 ab
	T7 – 5080 L.0809	138,75 ab	0,64465 bc	13,16 a
	T8 – 5019 L.0909	186,00 a	0,83630 ab	12,36 ab
	T9 – 587 L.0909	139,50 ab	0,75413 abc	11,81 ab
	T10 – 587 COL	138,75 ab	0,78068 abc	13,53 a
	T11 – 5019 COL	157,50 ab	0,87858 a	11,42 ab
	T12 – 5079 COL	199,50 a	0,67760 abc	12,06 ab
	T13 – 5080 COL	163,50 ab	0,66285 abc	12,66 ab
	T14 – C/N	0 c	0 d	08,95 bc
	T15 – S/ INOC	0 c	0 d	06,10 c
FEIJÃO CAUPI	T1 – 6461 L.0704	91,75 a	0,08358 c	6,30 b
	T2 – 6462 L.0804	141,00 a	0,48668 ab	11,81 a
	T3 – 6463 L.0804	99,25 a	0,38168 b	11,56 a
	T4 – 6461 COL	106,75 a	0,56563 a	9,69 a
	T5 – 6462 COL	141,50 a	0,50868 ab	12,87 a
	T6 – 6463 COL	104,25 a	0,38230 b	11,24 a
	T7 – C/N	0 b	0 c	10,07 a
	T8 – S/ INOC	0 b	0 c	5,96 b

¹ Número do lote recuperado de liofilização. ² Estirpes recuperadas de preservação em óleo. ³ Tratamento com aplicação de nitrogênio. ⁴ Tratamento que não recebeu inoculação. ⁵ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Conclusões

A caracterização morfológica de estirpes fixadoras de nitrogênio para as culturas de feijão, soja e feijão caupi, apresentam as mesmas características de registro da estirpe na Coleção SEMIA (independente do método de preservação), evidenciando a manutenção das características originais e pureza da estirpe. Já nos testes de eficiência agrônômica, todos os tratamentos inoculados apresentam infectividade e eficiência, excetuando-se a estirpe SEMIA 6461 liofilizada do feijão caupi, que apresenta nodulação sem comprovação de eficiência da FBN. Os testes de eficiência agrônômica devem ser repetidos para validar o potencial de FBN da estirpe liofilizada. Para o cultivo do feijão, todas as estirpes testadas são efetivas em nodular, e apenas a estirpe SEMIA 4077 L.0908 mostra eficiência na FBN. Não há diferença significativa entre os resultados de eficiência agrônômica das estirpes recuperadas de liofilização daquelas conservadas em óleo mineral, portanto, os dois métodos mostram-se adequados para a preservação destas estirpes no banco de germoplasma.

Referências

SOARES, A.L.L. et al. **Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG).II – Feijoeiro** Revista Brasileira de Ciência do Solo, 30:803-811, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832006000500006](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832006000500006&lng=pt&nrm=iso)&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 18 mai. 2010. doi: 10.1590/S0100-06832006000500006.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J.**Handbook for Rhizobia**. New York: Springer,1994.450p.

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS AUTORIZADAS PARA A COMERCIALIZAÇÃO EM INOCULANTES NO BRASIL

Manuela Bruxel¹, Thaís de Lima Cabral², Marcos Roberto Stroichen², Neemias da Silva³,
Raquel Garibaldi Damasceno¹, Enilson Luiz Saccol de Sá⁴

¹Estudante de mestrado do PPG em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; ²Estudante de pós-graduação do PPG em Ciências do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; ³Estudante de graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; ⁴Professor adjunto do Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. E-mail: enilson.sá@gmail.com

Resumo - Os inoculantes se caracterizam por conter bactérias fixadoras de nitrogênio comercialização e o controle de qualidade. Este trabalho visa analisar o perfil molecular das estirpes comerciais de inoculantes com a metodologia de rep-PCR, prevista na legislação de controle de qualidade de inoculantes (Instrução Normativa nº 14, de 6 de maio de 2008, Anexo I – MAPA). As amostras foram fornecidas pela Coleção Cultura de Rizóbios – SEMIA, da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO. Os resultados indicam uma grande diversidade genética quando se compara estirpes para diferentes plantas. Entretanto, estirpes que inoculam a mesma planta são fortemente relacionadas, de maneira que as estirpes de feijão possuem 100% de similaridade.

Palavras-chave: Rizóbios, perfil molecular, rep-PCR.

Introdução

A produção de inoculantes, no Brasil, teve início nos anos 50, com uma indústria em Pelotas-RS. Os primeiros inoculantes não continham concentração nem composição normatizada por lei. No início dos anos 80, foi elaborada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a primeira legislação exigindo que as empresas tivessem uma série de normatizações na produção do insumo, de maneira que os mesmos deveriam conter somente estirpes recomendadas por instituições públicas de pesquisa. Desde então, a manutenção das estirpes recomendadas é realizada pela Coleção de Cultura de Rizóbios SEMIA (Seção de Microbiologia Agrícola) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO).

Há mais de 40 anos são realizados consideráveis esforços para seleção de estirpes para diversas leguminosas. A soja é a cultura que mais se aplica inoculantes no Brasil, conseqüentemente, possui o maior número de estudos relacionados à seleção e ao mecanismo de simbiose. Atualmente existem 142 estirpes oficialmente recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil (MAPA, 2006)

A caracterização genética das estirpes é um trabalho que vem sendo realizado com o advento das técnicas de biologia molecular baseadas na reação de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), variantes desta técnica como rep-PCR estão sendo utilizadas para análise e caracterização da diversidade genética das estirpes, todavia, muito trabalho ainda é necessário para a completa identificação e separação dos perfis moleculares dessas estirpes.

Este trabalho visa analisar o perfil molecular das diferentes estirpes utilizadas em inoculantes comerciais com a técnica de rep-PCR.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Biologia Molecular, Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Os isolados utilizados foram fornecidos pela Coleção de Cultura de Rizóbio – SEMIA, e são classificados conforme SEMIA e planta alvo. (tabela 1)

A extração de DNA foi realizada conforme especificações do kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, USA). A concentração de DNA foi verificada em gel de agarose 1%, com o padrão de peso molecular de 400pb (Ludwig Biotecnologia, POA, BR), eletroforese durante 40 min a 60V e coloração com Blue Green (LGC Biotecnologia).

A amplificação foi realizada conforme Versalovic et al. (1994), com modificações feitas por Giongo (2007). Os *primers* utilizados foram BOX (Versalovic et al., 1994) e ERIC (Versalovic et al., 1991). Foram realizados 33 ciclos (92°C por 1 min de desnaturação, 65°C por 1 min de anelamento, 72°C por 1 min de extensão), e um período final de extensão de 7min a 72°C. As amplificações foram visualizadas em gel de agarose 1,5%, eletroforese por 2,5 horas a 60V, coradas com Blue Green (LGC Biotecnologia).

Os tamanhos dos fragmentos foram normatizados (**Gel Pro Analyser® 3.1**) e os perfis foram agrupados com algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Após o agrupamento das amostras, uma matriz foi construída com os dois parâmetros – análise polifásica (BOX-PCR + ERIC-PCR - 1:1).

Tabela 1. Relação da cultura agrícola com as estirpes selecionadas

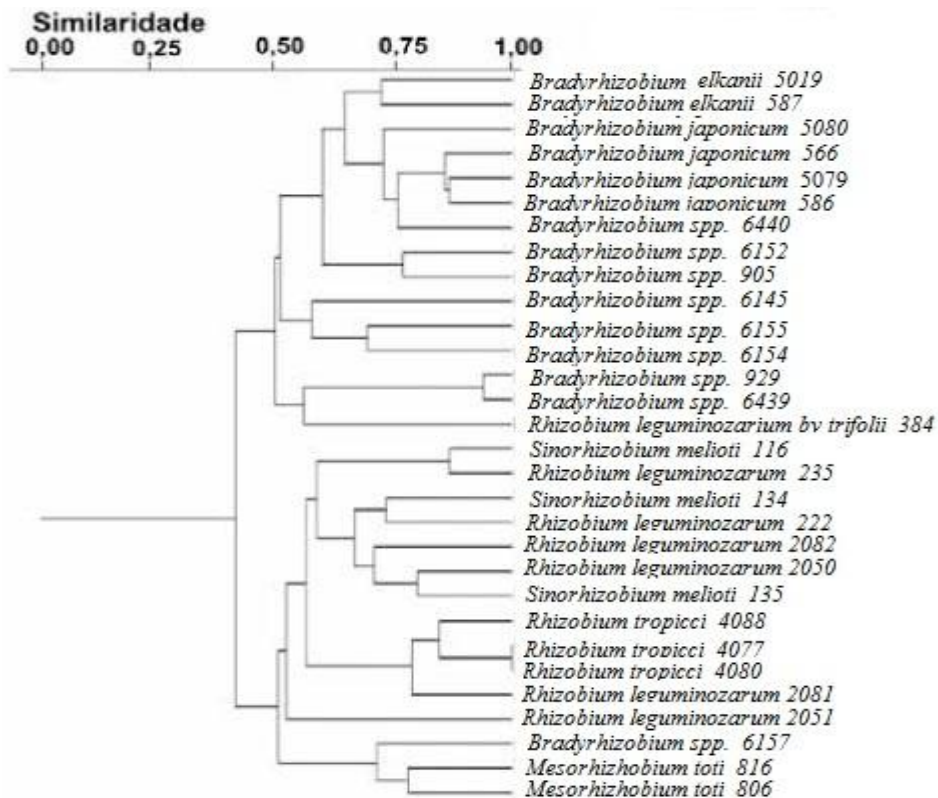
Cultura Agrícola	Espécie de Rizóbios	SEMIA
Soja	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	587, 5019
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	5079, 5080, 568, 566
Alfafa	<i>Sinorhizobium melioli</i>	116, 134, 135
Amendoim	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	6439, 6440
Colopogonio	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	6152
Cornichão	<i>Mesorhizobium toti</i>	806, 816
Crotalaria	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	6145, 6156
Ervilhaca	<i>Rhizobium leguminosarium</i> <i>bv trifolii</i>	384
Estilozante	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	6154, 6155
Feijão	<i>Rhizobium tropici</i>	4077, 4080, 4088
Guandu	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	6156, 6157
Serradela	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	905, 929
Trevo Branco	<i>Rhizobium leguminosarium</i>	222, 235, 2082
Trevo Vermelho	<i>Rhizobium leguminosarium</i>	222, 235, 2081, 2082
Trevo Vesiculoso	<i>Rhizobium leguminosarium</i>	2050, 2051
Trevo Sub	<i>Rhizobium leguminosarium</i>	222

Resultados e discussão

Perfis complexos com múltiplas bandas foram obtidos, o menor número de bandas encontrado foi na SEMIA 235 de *Rhizobium leguminosarium*, para o *primer* ERIC, enquanto que a média foi de 20 bandas em ambos os *primers*.

As trinta estirpes foram agrupadas com um nível pequeno de similaridade 45% (figura 1). Visualiza-se uma boa separação entre gêneros de *Bradyrhizobium* e os demais, embora a estirpe de *Bradyrhizobium spp.* (SEMIA 6157) e a estirpe de *R. Leguminosarium bv trifolli* (SEMIA 384) não seguiram o padrão de diferenciação de gênero. Já a nível de espécie, se encontra algumas separações, entretanto não se verifica um bom resultado. Resultados semelhantes foram encontrados por Menna et al (2008) e Binde et al. (2009).

Figura 1. Agrupamento polifásico (1:1) BOX-PCR+ERIC-PCR.



Conclusão

O BOX-PCR +ERIC-PCR se confirma como uma técnica boa para identificar uma alta diversidade genética entre as estirpes de rizóbios. Entretanto, os resultados encontrados demonstram que a técnica possui dificuldades de agrupar as espécies.

Apoio

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e CNPq.

Referências

- GIONGO, A. (2007) Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul. (Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular), UFRGS, 2007. 168p.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUJIN, F. J. D.; LUPSKI, J. R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* v. 5, p. 25-40
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Disponível em www.agricultura.gov.br, pesquisado 18 de abril de 2010.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTINEZ-ROMERO, E. (2006) Molecular phylogeny based on 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Sist. Apply. Microbiol.* v.24, p. 315-332

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. (2003) Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para a cultura de soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** v.27, p. 833-840

BINDE, D. R.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. (2009) rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.83, p.897-908

EFEITO DE *Trichoderma* spp. NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DAS SEMENTES DE *Gochnatia polymorpha* (ASTERACEAE)

Daniele Franco Martins Machado¹; Francini Requia Parzianello¹;
Antonio Carlos Ferreira da Silva²

¹Estudantes do Curso de Agrobiologia (Mestrado) do Departamento de Biologia do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM. E-mail: danifmartins@gmail.com; frarp@yahoo.com.br

²Professor do Departamento de Biologia do Centro de Ciências Naturais e Exatas - UFSM. E-mail: acfsilva2@uol.com.br

Resumo – Uma alternativa sustentável para a redução de fungos contaminantes e o aumento do poder germinativo de sementes é a aplicação de agentes de biocontrole. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de fungos contaminantes e na promoção de germinação das sementes *in vitro* de *Gochnatia polymorpha*. O experimento foi realizado utilizando-se a técnica do papel celofane, onde foram avaliados quatro isolados de *Trichoderma* spp. Sementes foram inoculadas em placas de Petri com meio de cultura contendo metabólitos liberados pelos isolados. A avaliação constou do número de sementes contaminadas e germinadas. Todos os isolados testados mostraram potencial para controlar os fungos contaminantes e promover a germinação das sementes de *G. polymorpha*.

Palavras-chave: germinação; fungos; controle biológico, *Trichoderma* spp.

Introdução

Trichoderma spp. são fungos antagonistas que agem no controle de fitopatógenos através do parasitismo, antibiose e competição; além da sua ação como indutores de resistência de plantas contra doenças e como promotores de crescimento vegetal. *Trichoderma* spp. têm levado a aumentos significativos na porcentagem e na precocidade de germinação. Poucos estudos envolvem a interação entre microrganismos e as plantas medicinais nativas, sendo que a exploração extrativista e o crescimento da população humana vêm aumentando a pressão destrutiva sobre esta flora (ROSA; FERREIRA; 2001).

Gochnatia polymorpha (cambará) é nativa de alguns estados brasileiros, é recomendada para reconstituição de ecossistemas degradados, para arborização, a madeira pode ser utilizada para diversos fins, suas flores são melíferas e as folhas são utilizadas na medicina popular. As sementes, principal forma de propagação, estão presas na parede do fruto do tipo cipsela (CARVALHO, 2003). Os patógenos afetam a qualidade e reduzem a capacidade germinativa das sementes (KRUPPA; RUSSOMANNO, 2008).

A necessidade de plantas para a crescente demanda de matéria-prima de fitoterápicos e a necessidade de reposição desses indivíduos na natureza, torna fundamental o desenvolvimento de metodologias que tenham como propósito a produção de mudas de qualidade, reduzindo o extrativismo, a fim de conservar o germoplasma e garantir a manutenção da biodiversidade vegetal. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de fungos contaminantes e na promoção de germinação das sementes *in vitro* de *G. polymorpha*.

Materiais e Métodos

Desenvolvido no Laboratório de Interação Planta-Microrganismos/CCNE/UFSM, Santa Maria, RS, o experimento utilizou a técnica do papel celofane (ETHUR, 2002). Utilizou-se 4 isolados, TSM1 e TSM2 de *T. viride* e 2B2 e 2B22 de *T. harzianum*. Utilizou-se meio de cultura água-ágar (15 g.L⁻¹) + BD (batata-dextrose) 30% em placas de Petri. O meio foi coberto com um disco de papel celofane semipermeável, esterilizado (120° C/30 min.). Discos de meio de cultura contendo micélios e esporos dos isolados, foram transferidos para o centro das placas e as culturas mantidas em temperatura ambiente (21,1° C) e fotoperíodo de 12 h por 5 dias. Após, o papel celofane foi retirado das placas juntamente com micélios e esporos dos isolados, permanecendo apenas os metabólitos liberados pelos isolados. Foram inoculadas 25 sementes (cipselas) em cada placa e as culturas mantidas em temperatura ambiente (20,46° C) e fotoperíodo de 16 h. A avaliação constou do número de sementes contaminadas e germinadas. O delineamento foi inteiramente casualizado num fatorial (4x2 – isolados x sementes com e sem desinfestação + 4 controles: 2 controles com meio de cultura água-ágar e 2 controles com meio de cultura água-ágar + BD 30%, na ausência de isolados). Foram avaliados 12 tratamentos, com quatro repetições por tratamento, cada repetição com 25 sementes. A desinfestação das sementes foi realizada deixando-as imersas por 1 min. em álcool 70%, 15 min. em NaClO (1,5%) e 3 lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada. As sementes sem desinfestação foram lavadas em água destilada e autoclavada.

Resultados e Discussão

As médias de porcentagem de sementes contaminadas entre os isolados não apresentaram grandes diferenças, nos tratamentos com desinfestação. Entretanto, nos tratamentos sem desinfestação, percebe-se que o isolado TSM1 apresentou maior potencial no controle de fungos contaminantes. O celofane semipermeável permite a nutrição e crescimento de *Trichoderma* spp. e difusão de metabólitos para o meio de cultura (ETHUR, 2002), os quais podem ter influenciado a contaminação das sementes desta espécie, pois a produção de metabólitos antibióticos voláteis e não voláteis por *Trichoderma* spp. inibem o crescimento de patógenos (TABELA 1).

TABELA 1 – Porcentagem de sementes de *G. polymorpha* contaminadas por fungos

TRATAMENTOS	Porcentagem (%)	
	COM DESINFESTAÇÃO	SEM DESINFESTAÇÃO
TSM1	3	1
TSM2	6	5
2B2	5	7
2B22	2	8
Controle 1 (Água-ágar + BD)	100	100
Controle 2 (Água-ágar)	85	92

Os isolados TSM1 e TSM2 contribuíram para o aumento na porcentagem de germinação das sementes com desinfestação. Os tratamentos sem desinfestação com estes isolados mostram que os fungos contaminantes reduzem a capacidade germinativa das sementes, conforme Kruppa e Russomanno (2008). O isolado 2B2 inibiu a germinação das sementes em relação ao tratamento sem desinfestação. Ousley et al. (1993), também observaram que alguns isolados de *T. harzianum* auxiliaram e outros inibiram a germinação de sementes de alface. No entanto, comparando com o controle 1, o isolado 2B2 contribuiu na germinação das sementes, uma vez que, no controle 1 o percentual de germinação foi zero. O isolado 2B22 promoveu a germinação nos tratamentos com e sem desinfestação comparado com o controle 1. Os controles 1, com meio de cultura água-ágar + BD 30%, tanto com

sementes desinfestadas quanto sem desinfestação, não tiveram germinação, pois houve 100% de sementes contaminadas nos dois tratamentos. O controle 2, com meio de cultura água-ágar com desinfestação não obteve nenhuma semente germinada. Entretanto, o controle 2, sem desinfestação, teve 3% de germinação. Esse resultado não era esperado, portanto, infere-se que ocorreu a germinação neste tratamento, em função de que, o meio de cultura foi somente água-ágar o que pode ter dificultado o crescimento de fungos contaminantes (FIGURA 1).

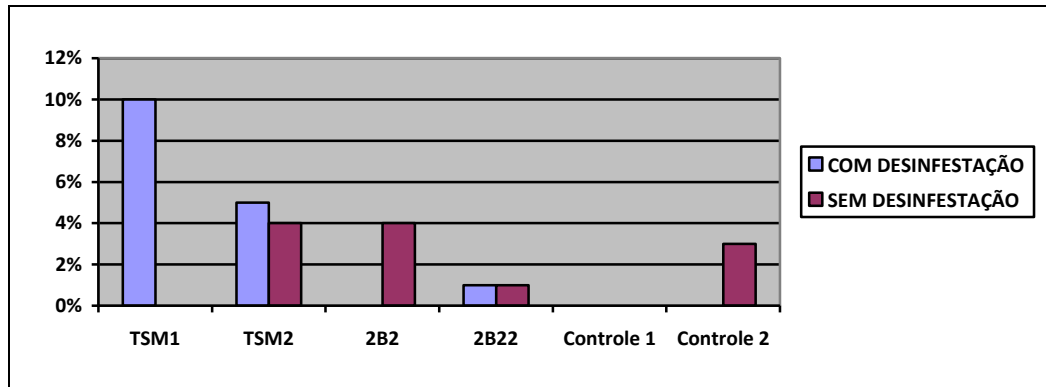


Figura 1 – Germinação das sementes de *G. polymorpha* em interação com *Trichoderma* spp.

Conclusões

Nas condições em que o experimento foi realizado, os isolados TSM1 e TSM2 de *T. viride* e os isolados 2B2 e 2B22 de *T. harzianum* reduzem o número de sementes contaminadas por fungos comparados com os controles. Infere-se que os isolados TSM1 e TSM2 promovem a germinação das sementes de *G. polymorpha*.

Apoio

CAPES – Demanda Social; Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Referências

- CARVALHO, P. E. R. Cambará: *Gochnatia polymorpha*. In: CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. v. 1. Brasília: Embrapa, 2003. p. 274-280.
- ETHUR, L. Z. **Avaliação de fungos como antagonistas para o biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em pepineiro cultivado em estufa**. 2002. 100 p. Dissertação. (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.
- KRUPPA, P. C.; RUSSOMANNO, O. M. R. **Fungos em plantas medicinais, aromáticas e condimentares – solo e semente**. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. n. 93. 2008. Instituto Biológico de São Paulo. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=93>. Acesso em 31 mai 2010.
- OUSLEY, M. A.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. **Microbial Ecology**. v. 26, p. 277-285, 1996.
- ROSA, S. G. T. da; FERREIRA, A. G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta Botanica Brasilica**. 15(2): 147 – 154, 2001.

EFEITO DO PRINCÍPIO ATIVO CAPTANA NA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR *Trichoderma* spp.

Priscila Pauly Ribas¹; Isabel Cristina Padula Paz²; Aida Terezinha Santos Matsumura³

¹ Estudante de doutorado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. E-mail: prirbs@yahoo.com.br; ² Pesquisadora da Fundação Luiz Englert, Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. E-mail: isapaz@gmail.com; ³ Professora colaboradora do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. E-mail: aida@ufrgs.br

Resumo - O uso de produtos químicos é uma das formas mais utilizadas para o controle de fitopatógenos. Entretanto, a conscientização dos riscos que o uso desses produtos implica, novas formas de controle vem sendo desenvolvidas, como o controle integrado. A utilização dessa forma de controle deve ser avaliada já que o princípio ativo pode afetar os microrganismos empregados como agentes de controle biológico. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do princípio ativo captana sobre a produção de sideróforos dos isolados de *Trichoderma* spp. (*Trichoderma harzianum* TH11, *Trichoderma viride* TV21 e *Trichoderma* sp. T04, T16 e T20) isolados de solo da cultura do feijão. Para isso, os isolados foram testados em meio de cultura suplementado com a concentração recomendada de um produto comercial com o princípio ativo captana e os metabólitos e foram avaliados através de uma reação colorimétrica. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. produziram sideróforos. O princípio ativo captana inibiu a produção de sideróforos.

Palavras-chave: *Trichoderma* spp., controle integrado, sideróforos.

Introdução

O controle químico de fitopatógenos é feito através de vários tipos de produtos, que são comumente denominados agroquímicos, incluindo fertilizantes e pesticidas. O grupo mais importante de pesticidas utilizados para a erradicação de doenças de plantas é o dos fungicidas (Kimati, 1995; Souza & Dutra, 2003). Com o uso generalizado dos defensivos agrícolas nas mais diferentes condições ambientais, muitos problemas começaram a ser percebidos, tais como a ocorrência de resíduos em alimentos, contaminação de solo e água, efeito em organismos não visados e a intoxicação de trabalhadores rurais. Com a crescente conscientização sobre o risco do uso desses produtos, houve significativos avanços nas legislações de registro e uso desses químicos em muitos países (Campanhola & Bettiol, 2003). Uma alternativa é o uso do controle integrado, empregando o controle químico concomitantemente com o controle biológico. Entretanto, essa prática necessita de estudos, já que o princípio ativo pode interferir nos mecanismos de ação dos agentes de controle biológico, como na competição por nutrientes, antibiose, micoparasitismo (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004). Nesse sentido, este trabalho objetivou verificar a interferência do princípio ativo captana na produção de sideróforos em diferentes isolados do agente de controle biológico *Trichoderma* spp.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (LMF), Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizado em Porto Alegre, RS. Os isolados de *Trichoderma* spp. (*Trichoderma harzianum* TH11, *Trichoderma viride* TV21 e *Trichoderma* sp. T04, T16 e T20) foram previamente isolados de solo, planta infectada e escleródios provenientes da cultura do feijão e identificados pelo grupo de pesquisa do LMF. O princípio ativo captana tem recomendação para a cultura do feijão e foi adicionado ao meio de cultura na concentração recomendada pelo fabricante (480 g/L).

Para determinação da produção de sideróforos pelos isolados de *Trichoderma* spp. empregou-se a técnica universal proposta por Schwyn & Neilands (1987). Inicialmente, todos os materiais utilizados para o desenvolvimento dos ensaios foram lavados com HCl 6M e, após, imersos em água deionizada por período de 8 horas e enxaguados em água deionizada. O antagonista foi cultivado em meio de cultura BD, suplementado com captana na concentração do produto comercial. Os isolados foram incubados por cinco dias sob agitação constante a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após o período de incubação, foram retirados 0,5 mL do sobrenadante do antagonista e que foram centrifugados por 10 minutos, a 14000 rpm, em tubo Eppendorf. Em seguida, acrescentou-se 0,5 mL da solução indicadora de cromo azurol S (CAS). O mesmo foi realizado sem a presença do fungicida para verificar se há mudança na detecção da produção de sideróforos. A mudança de cor da mistura de sobrenadante-indicador de azulada para amarelo-avermelhado, em um prazo de 15 minutos, indica a produção de sideróforos pelo antagonista.

Resultados e Discussão

Os isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21 produziram sideróforos *in vitro*. A produção de sideróforos é indicada pela mudança colorimétrica que ocorre no meio contendo CAS. Essa reação ocorreu também com o isolado T20, entretanto a coloração da amostra não correspondeu à coloração das demais, sendo cinza-azulado enquanto as demais são amarelo-avermelhado, indicando a possibilidade da produção de diferentes tipos de sideróforos pelos isolados de *Trichoderma* spp. Em relação ao experimento realizado em meio suplementado com o princípio ativo captana, não foi possível observar mudança na coloração da amostra em relação ao controle (Figura 1). Esse fato indica que o fungicida, embora não seja considerado tóxico inibe a produção de sideróforos nos isolados de *Trichoderma* spp.

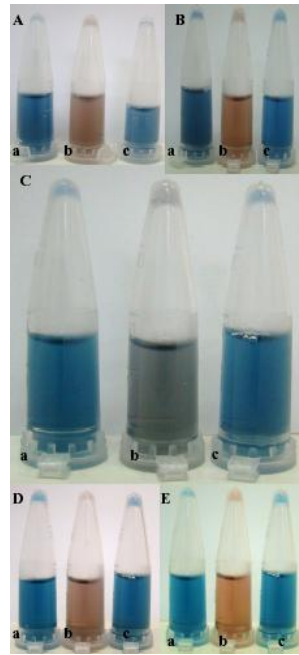


Figura 1. Detecção de sideróforos em filtrados de cultura dos isolados T04 (A), T16 (B), T20 (C), TH11 (D) e TV21 (E). a – meio contendo captana, b – isolado de *Trichoderma*, c – controle.

Conclusões

O princípio ativo captana inibiu a produção de sideróforos dos isolados T04, T16, T20, TH11 e TV21.

Apoio

Os autores agradecem o apoio da Capes e ICB BIOAGRITEC LTDA. durante a realização desse trabalho.

Referências

- KIMATI, H. **Doenças do feijoeiro** (*Phaseolus vulgaris* L.). In: GALLI, F. (Coord). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 3.ed. São Paulo: Ceres, v.1, p.761-785, 1995.
- SOUZA, P.E.; DUTRA, M.R. **Fungicidas no Controle e Manejo de Doenças de Plantas**. Lavras: UFLA, 2003.
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA, p.13-50, 2003.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CÓDON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.
- HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evaluation of current concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1, p.4-10, 2003.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

EFEITO DO PRINCÍPIO ATIVO CAPTANA NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR *Trichoderma* spp.

Priscila Pauly Ribas¹; Isabel Cristina Padula Paz²; Aida Terezinha Santos Matsumura³

¹ Estudante de doutorado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. E-mail: prirbs@yahoo.com.br; ² Pesquisadora da Fundação Luiz Englert, Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. E-mail: isapaz@gmail.com; ³ Professora colaboradora do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. E-mail: aida@ufrgs.br

Resumo - A produção de enzimas hidrolíticas caracteriza um dos principais mecanismos de ação de microrganismos utilizados como agentes de controle biológico. Entretanto, no campo, a utilização desses agentes concomitantemente com os produtos químicos, como fungicidas, pode reduzir a eficiência na produção desses metabólitos. Nesse sentido, esse trabalho objetivou avaliar o efeito do princípio ativo captana sobre a produção de enzimas hidrolíticas (quitinase, protease e glucanase) dos isolados de *Trichoderma* spp. (*Trichoderma harzianum* TH11, *Trichoderma viride* TV21 e *Trichoderma* sp. T04, T16 e T20) isolados de solo da cultura do feijão. Para isso, os isolados foram testados em meio de cultura suplementado com a concentração recomendada de um produto comercial com o princípio ativo captana e os metabólitos e foram avaliados através de espectrofotometria. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. produziram enzimas hidrolíticas. Na presença do princípio ativo, a metodologia utilizada não foi eficiente para a avaliação do efeito de captana na produção de enzimas hidrolíticas.

Palavras-chave: *Trichoderma* spp., captana, quitinase, glucanase, protease

Introdução

O mecanismo de produção de enzimas hidrolíticas faz parte de um processo chamado parasitismo, que é caracterizado como o fenômeno de um microrganismo parasitar o outro (Bettiol, 1991). Para fungos, o micoparasitismo apresenta-se como um processo complexo que envolve uma seqüência de eventos, incluindo o reconhecimento, ataque, penetração e posterior morte do hospedeiro (Harman *et al.*, 2004). Espécies de *Trichoderma* podem exercer o biocontrole parasitando vários fungos fitopatogênicos. Esse mecanismo é realizado pela presença de enzimas hidrolíticas como as quitinases, glucanases e proteases que degradam a parede celular (Harman *et al.*, 2004). Considerando a importância desse mecanismo e a possibilidade de alteração no mesmo devido a aplicação concomitante de fungicidas e *Trichoderma* sp., este trabalho buscou verificar a interferência do princípio ativo captana na produção de enzimas hidrolíticas pelo agente de controle biológico *Trichoderma* spp..

Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (LMF), Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizado em Porto Alegre, RS. Os isolados de *Trichoderma* spp. (*Trichoderma harzianum* TH11, *Trichoderma viride* TV21 e *Trichoderma* sp. T04, T16 e

T20) pertencem a micoteca do LMF. O princípio ativo captana tem recomendação para a cultura do feijão e foi adicionado ao meio de cultura na concentração recomendada pelo fabricante (480 g/L).

A avaliação da interferência de captana na produção de enzimas hidrolíticas foi realizada em meio líquido, com o objetivo de detectar e quantificar a produção de quitinases, proteases e glucanases produzidas pelos isolados de *Trichoderma* spp. A análise da atividade quitinásica e glucanásica foi baseada no método de Miller (1959), medindo a liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de quitina coloidal e da laminarina, respectivamente, pelo ácido dinitrosalicílico. Primeiramente os isolados foram crescidos em meio de cultura Mandel & Reese (1960) modificado suplementado com a concentração recomendada do princípio ativo, durante 5 dias, sob agitação orbital (150 rpm) em câmara de crescimento a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Para a análise da atividade quitinásica e glucanásica 2 mL do meio de cultura foram centrifugados durante 10 minutos a 14000 rpm. Posteriormente, foram colocados em tubos de ensaio, 100 μL de amostra (sobrenadante) e 550 μL de tampão citrato de sódio 50 mg/mL pH 4,8 e, após homogeneização, colocados em banho-maria a 50°C . Em seguida, 250 μL de quitina coloidal 0,5% foram adicionados para a avaliação da atividade quitinásica e 250 μL de laminarina 0,5% para a avaliação da atividade glucanásica, também a 50°C , e incubados por 1 hora. Após esse período, adicionou-se 1 mL de DNS ainda no banho-maria, seguido da adição de 100 μL de glicose 0,5 mg/mL. Em seguida, a solução foi fervida por 5 minutos e, após resfriar, foram acrescentados 2 mL de água destilada e a leitura foi feita em espectrofotômetro ($\lambda=545\text{nm}$). A determinação da atividade proteásica foi baseada no método de Sarath *et al.* (1989) utilizando azocaseína 2% como substrato. Os isolados foram crescidos nas mesmas condições nutricionais e ambientais descritas para quitinase e glucanase. Após 5 dias de inoculação, o substrato foi dissolvido em água destilada e centrifugado a 1400 rpm, por 10 minutos. Em seguida, foram colocados em tubos Eppendorf, 150 μL da amostra (sobrenadante) juntamente com 250 μL de azocaseína. A mistura foi agitada e incubada em banho-maria a 25°C por 30 minutos. O ácido tricloroacético 10% foi adicionado para cessar a reação, deixando descansar por 15 minutos. Decorrido esse período, os tubos foram centrifugados a 1400 rpm por 5 minutos. Depois o sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf contendo 1,4 mL de NaOH 1M. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro ($\lambda=440\text{ nm}$). Os controles consistiram da realização da leitura de amostras contendo apenas o meio de cultura suplementado com o fungicida e apenas o meio de cultura. Para a determinação da atividade enzimática foi preparada uma curva de calibração com glicose nas concentrações 0; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,350 mg/mL. Os valores médios foram analisados usando uma análise de variância (ANOVA), seguidos pelo pós-teste de Tukey (5%) para a comparação das médias.

Resultados e Discussão

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. produziram enzimas hidrolíticas relacionadas ao micoparasitismo (Tabela 1). Alguns fatores podem influenciar a produção de enzimas em microrganismos antagonistas. A composição do meio de cultura, o pH, a temperatura e agitação são alguns desses fatores (Fleuri & Sato, 2008). Os resultados das amostras dos isolados de *Trichoderma* spp. com a suplementação do meio com o princípio ativo captana não puderam ser interpretados pela falta de confiabilidade do método da hidrólise da glicose.

Tabela 1. Atividade enzimática (U) de quitinases, glucanases e proteases nas culturas de *Trichoderma* spp.

Isolados	Atividade Enzimática (U)		
	Quitinase*	Glucanase*	Protease**
T04	868,6b	3407,2ns	0,66a
TH11	1152,6a	1312,3	0,46ab
T16	985,0ab	1326,4	0,24b
T20	996,6ab	1413,7	0,37ab
TV21	1047,9ab	1441,3	0,30ab

CV(quitinase)=10,182; CV(glucanase)= 110,339; CV(protease)=53,518. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si e ns= não houve diferença significativa entre os isolados para o teste de Tukey (5%)

Como o método selecionado para a produção de quitinases e glucanases usa a mensuração da liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise da quitina coloidal e da laminarina, respectivamente, a adição dos princípios ativos no meio de cultura pode ter inibido a produção das enzimas pelo isolado, ou mesmo, a presença de outros compostos químicos no meio pode ter provocado diferentes reações com o uso de ácido dinitrosalicílico (DNS). Não existem testes de interferência de princípios ativos na produção de enzimas hidrolíticas de *Trichoderma* spp. que pudessem confirmar a ineficiência do método ou que sugerissem outras metodologias para a detecção das enzimas.

Conclusões

O método comumente utilizado para a detecção de enzimas hidrolíticas é alterado pela presença do princípio ativo, impedindo a leitura dos resultados.

Apoio

Os autores agradecem o apoio da Capes e ICB BIOAGRITEC LTDA.

Referências

- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças do filoplano.** In: BETTIOL, W. (Ed.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 33-52. 1991.
- FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.2, p.299-310, 2008.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v.2, p. 3-56, 2004.
- MANDEL, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriological**, v.79, p. 816, 1960.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n. 3, p. 426 - 429, 1959.
- SARATH, G.; DE LA MOTTE, R.; WAGNER, F. W. **Protease assay methods.** In: BEYNON, R. J.; Bond, I. S. Proteolytic assay: a practical approach, Oxford: IRC Press, 1989.

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À MANCHA PARDA DO ARROZ POR RIZOBACTÉRIAS, ISOLADAS E EM COMBINAÇÃO

Jaqueline Tavares Schafer¹, Lauren Fonseca Anacker², Paulo Ricardo Benedeti³, Bianca Obes Corrêa⁴, Ismail Teodoro de Souza Júnior¹, Marcos Antonio Bacarin⁵, Andréa Bittencourt Moura⁵

¹Mestranda em Fitossanidade Bolsista CAPES; ²Bacharel em Química Ambiental Bolsista CNPq AT-NS; ³Graduando em Agronomia Bolsista PIBIC CNPq; ⁴Doutora em Fitossanidade, ⁵Professores UFPel Bolsista CNPq Produtividade em Pesquisa. E-mail: jaquelinets@gmail.com

Resumo – Objetivou-se avaliar rizobactérias, isoladas e em combinação para controle da mancha parda, e o envolvimento destas com a indução de resistência. Os tratamentos foram: DFs185, DFs223, DFs306, DFs416 e DFs418, isoladamente e em combinações. Sementes de arroz foram microbiolizadas ou foram imersas em salina ou em fungicida vitavax-thiram (testemunhas). O semeio foi realizado em solo não esterilizado, a inoculação do fungo no estádio V4 (10^5 conídios.mL⁻¹) e a avaliação da severidade após 7, 14 e 21 dias. As médias foram agrupadas por Scott-Knott (5%). Folhas foram coletadas a 0h, 24h e 7 dias após a inoculação e determinadas as atividades de catalases e peroxidases. Os melhores tratamentos resultaram em 27 a 58% de controle. Os tratamentos DFs185 e DFs306 expressaram maior atividade das enzimas nas primeiras 24 horas após inoculação do patógeno.

Palavras-chave: ISR, *Bipolaris oryzae*, *Oryza sativa*, PGPR

Introdução

A cultura do arroz irrigado está sujeita ao ataque de várias doenças cujos danos provocam perdas na produtividade das lavouras, dentre elas a mancha parda, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* é considerada a de maior frequência nas lavouras gaúchas.

Na maioria das vezes, o controle químico torna-se necessário, mas além do alto custo, seu uso implica no risco de contaminação do ambiente e do agricultor. O controle biológico apresenta como aspectos positivos o baixo custo econômico e ambiental. O biocontrole pode ser alcançado por diferentes mecanismos de ação, entre eles a indução de resistência de plantas a patógenos. Esta ocorre através do tratamento com microrganismos ou seus produtos ou ainda, através de compostos orgânicos ou inorgânicos, ativando mecanismos de defesa da planta (VAN LOON *et al.*, 1998).

Objetivou-se avaliar rizobactérias utilizadas anteriormente isoladamente (LUDWIG *et al.*, 2009) e em combinação (SOUZA JÚNIOR, 2010) para controle da mancha parda, e o envolvimento destas na indução de resistência como mecanismo de ação.

Material e Métodos

Os isolados bacterianos foram crescidas a 28°C/24h, e suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) ($A_{540}=0,5$). As sementes da cv. El Paso 144L foram microbiolizadas, por 30 minutos a 10°C. Como testemunha, sementes foram imersas em solução salina.

Os tratamentos bacterianos utilizados foram: DFs185 (*Pseudomonas synxatha* (Ehrenberg) Holland), DFs223 (*P. fluorescens* Migula), DFs306 (não identificado), DFs416 e DFs418 (*Bacillus* sp. Cohn), e algumas combinações destas.

O semeio foi em vasos contendo 1 Kg de solo não esterilizado, com cinco repetições, de forma casualizada. Quando as plantas atingiram o estágio de emborrachamento, foram inoculadas por aspersão de 10^5 conídios.mL⁻¹. As avaliações ocorreram 7, 14 e 21 dias após a inoculação do patógeno, atribuindo-se notas (1, 3, 5, 7 e 9) em função da evolução da lesão (IRRI, 1975). Os valores da severidade e das áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram submetidos ao teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para a obtenção do extrato enzimático bruto, 250 mg da folha foram maceradas em tampão Tris-HCl 0,5 mol.L⁻¹ e centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos/4°C. A atividade da catalase foi determinada pelo desaparecimento do peróxido de hidrogênio a 240 nm e da peroxidase, pela oxidação do guaiacol a tetraguaiacol a 470 nm (BEERS & SIZER, 1952).

Resultados

Houve variação quanto à eficiência de controle ao longo do tempo, no entanto o efeito cumulativo resultou em controle significativo entre 29 a 58% (Tabela 1). Todos os tratamentos foram efetivos, exceto o isolado DFs223. Não foi possível observar diferenças de eficiência entre o uso de bactérias individualmente e de combinações destas.

Tabela 1: Notas da severidade da mancha parda após 7, 14 e 21 dias após a inoculação de *Bipolaris oryzae*, em plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos, respectiva área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e percentual de controle da doença.

Tratamentos	Dias após a inoculação						AACPD	% controle	
	7 dias		14 dias		21 dias				
DFs185	0,63	b	0,88	b	2,25	a	16,19	b	48
DFs223	1,00	a	1,25	b	3,00	a	22,75	a	27
DFs306	0,75	a	1,13	b	3,25	a	21,88	b	29
DFs416	0,25	b	0,63	b	2,25	a	13,13	b	58
DFs418	0,50	b	1,13	b	2,50	a	18,38	b	41
DFs185/306/416	0,75	a	1,00	b	2,50	a	18,88	b	39
DFs185/416/418	0,13	b	0,25	b	3,25	a	13,56	b	56
DFs306/416/418	0,25	b	0,38	b	3,50	a	15,75	b	49
T	1,25	a	2,00	a	3,50	a	30,63	a	0
T+F	1,00	a	1,75	a	3,25	a	28,88	a	6
C.V. (%)	63,16		50,29		27,83		30,99		

Valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de significância. T= testemunha tratada com salina; T+F= testemunha tratada com salina mais o fungicida Carboxin+Thiran.

Entre as rizobactérias utilizadas neste trabalho, duas são espécies de *Pseudomonas* (DFs185 e DFs223) e duas são de *Bacillus* (DFs416 e DFs418). Há relatos que estes dois gêneros são produtoras de antibióticos, sideróforos e enzimas líticas envolvidas no biocontrole (BANO & MUSARRAT, 2003), além de induzirem resistência sistêmica (CHOUDHARY & JOHRI, 2009).

No presente trabalho, foi possível associar a participação das enzimas avaliadas ao controle proporcionado por alguns tratamentos. A combinação DFs185/306/416 permitiu aumento relativo intenso nas primeiras 24 horas para ambas as enzimas, sem que houvesse redução muito abaixo do nível inicial (0h) (Figura 1). Por outro lado, o isolado DFs416 permitiu que plantas apresentassem elevada atividade de peroxidases, que foi mantidas nas primeiras 24 horas, à qual pode ser atribuída, pelo menos em parte, o controle alcançado por esta bactéria. A ativação de enzimas relacionadas à resistência nas primeiras 24 horas

geralmente associada ao eficiente controle de patógenos, como observado por Macagnan e colaboradores (2008) em plantas de cacau elicidadas por bactérias de filoplano para o controle do fungo causador da vassoura de bruxa.

No entanto, não se descarta a possibilidade do envolvimento de outras enzimas associadas à indução de resistência que não foram avaliadas neste trabalho.

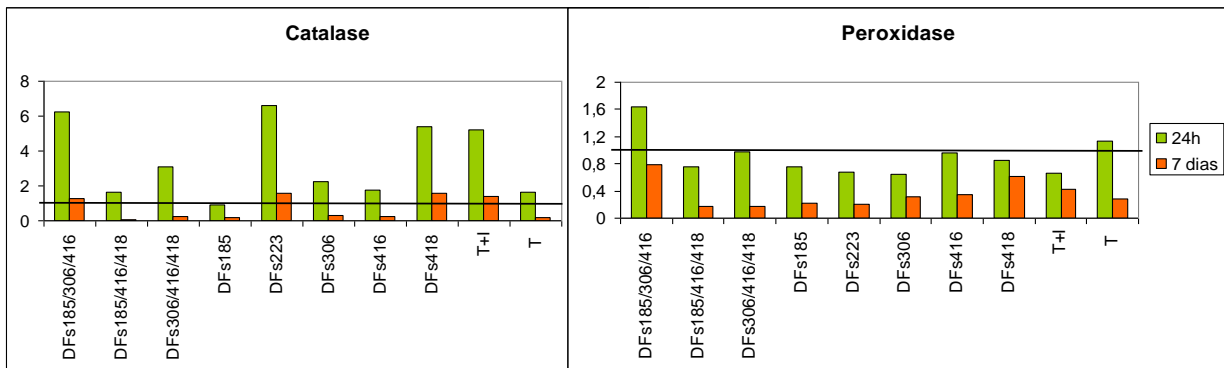


Figura 1: Avaliação da atividade relativa ao tempo 0h de catalases e peroxidases, a partir de folhas de arroz, provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactérias, coletadas após 0h, 24h e 7 dias a inoculação de *Bipolaris oryzae*.

Conclusões

A utilização de rizobactérias por meio da microbiolização de sementes de arroz permite o controle de doenças do arroz e parece estarem envolvidas na indução de resistência.

Referências

- BANO, N.; MUSARRAT, J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. **Current Microbiology**, v. 46, p.324–328, 2003.
- BEERS, Jr, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biology Chemistry**, v.195, p.133-140, 1952.
- CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v.164, n. 5, p.493-513, 2009.
- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Sistema de Evaluación Stándart para Arroz**. Los Baños, 1975. 64p.
- LUDWIG, J.; MOURA, A.B.; SANTOS, A.S.; RIBEIRO, A.S. Biocontrole da mancha parda e da escaldadura em arroz irrigado, pela microbiolização de sementes. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.5, p.322-328, 2009.
- MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.S.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, A.W.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacauero expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.34-37, 2008.
- SOUZA JUNIOR, I.T.; **Controle biológico de doenças do arroz: ampliação do espectro de ação e promoção de crescimento pelo uso de combinações de rizobactérias eficientes**. 68f. 2010. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2010.
- VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. H. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998.

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS AQUOSOS SOBRE PATÓGENOS DE VIDEIRA (*Vitis* spp.)

Sheila Montipó¹; Renata Gava²; Lucas da Ressurreição Garrido²; Francine Tramontina¹

¹Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS; E-mail: sheilamontipo@gmail.com; francine-tramontina@uergs.edu.br; ²Laboratório de Fitopatologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Uva e Vinho; E-mail: renata@cnpuv.embrapa.br; garrido@cnpuv.embrapa.br

Resumo – Produtos naturais e seus derivados estão sendo alvo de pesquisas direcionadas à aplicação dos mesmos no combate de doenças fitopatogênicas, apresentando uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissoras. Visando a importância do desenvolvimento de novos produtos antifúngicos na viticultura, o presente trabalho teve o intuito de analisar o potencial antifúngico, *in vitro*, de diferentes concentrações de extratos aquosos sobre *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*, causadores da podridão cinzenta da uva e da podridão da uva madura, respectivamente. Os extratos foram adicionados em meio BDA, autoclavados e distribuídos em placas de Petri. Discos dos isolados foram repicados para o centro das placas e o efeito fungitóxico foi avaliado medindo-se o diâmetro das colônias, quando na testemunha os fitopatógenos atingiram a borda da placa. O extrato de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) apresentou maior eficácia, inibindo totalmente o crescimento micelial dos mesmos a partir da concentração de 5%. O extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) proporcionou supressão total do crescimento micelial de ambos os fungos a partir das concentrações de 20 e 10%, respectivamente. A inibição total ou parcial do crescimento micelial de *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*, observada *in vitro*, pelos extratos aquosos, indica a existência de compostos com ação fungitóxica que possibilitam o emprego destes no controle alternativo da podridão cinzenta da uva e da podridão da uva madura.

Palavras-chave: *B. cinerea*; *C. gloeosporioides*; atividade antifúngica; extrato aquoso.

Introdução

No Brasil, o Estado do Rio Grande do Sul é responsável pela maior produção de uvas, possuindo 54% da área total plantada (BRASIL, 2007). As doenças e as pragas representam séria ameaça à viticultura, constituindo-se em fator limitante à sua exploração econômica. Os métodos de controle adotados no país apresentam limitações, sendo empregados, tradicionalmente, produtos químicos, com pouca utilização de outras estratégias.

Produtos naturais e seus derivados estão sendo alvo de pesquisas direcionadas à aplicação dos mesmos no combate de doenças fitopatogênicas, apresentando uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissoras. Adicionalmente, devido ao aumento da resistência aos agroquímicos disponíveis, é imperativo que se pesquise novas alternativas efetivas para doenças de plantas à base de compostos com potente atividade e baixa toxicidade. O Brasil possui uma medicina popular rica e original, na qual o uso de plantas ocupa lugar de destaque. A produção de substâncias bioativas pelas plantas ocorre através de diferentes vias metabólicas, gerando grande número de compostos, muitos dos quais somente identificados em determinados grupos de plantas e em concentrações variáveis (MARCANO *et al.*, 2005). Assim, os vegetais são uma fonte inesgotável de moléculas, muitas desconhecidas, podendo servir de modelo à síntese química (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Com base na importância do desenvolvimento de novos produtos antifúngicos na viticultura, o presente trabalho teve o intuito de analisar *in vitro* o potencial antifúngico de extratos aquosos sobre *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*, causadores da podridão cinzenta da uva e da podridão da uva madura, respectivamente, os quais têm significativo impacto na qualidade dos frutos.

Material e Métodos

Os extratos aquosos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), anis-estrelado (*Illicium verum* L.), camomila (*Chamomilla recutita* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), gengibre (*Zingiber officinale*), hortelã (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) foram preparados pelo método de decocção (SIMÕES *et al.*, 2000). Preparou-se 1 L do meio de cultura BDA, sendo o volume de 200 mL depositado em frascos de Erlenmeyer e, em seguida, adicionado as partes recomendadas das plantas secas, obtendo-se o meio de cultivo nas concentrações de 5, 10 e 20% (como testemunha, utilizou-se somente BDA). Os frascos foram tampados com gaze (para posterior filtragem) e autoclavados durante 20 min a 120°C e 1 atm de pressão. Após, os mesmos foram vertidos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Os isolados de *B. cinerea* CNPUV 145 e *C. gloeosporioides* CNPUV 378 foram cultivados em BDA, a 25°C, com fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. Discos de 5 mm contendo micélio dos fungos foram inoculados no centro das placas e incubados por 9 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

Após 3, 5, 7 e 9 dias realizaram-se medições do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais, descartando-se o disco repicado da colônia pura, sendo posteriormente calculada uma média por placa. A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) da colônia foi mensurada por meio da fórmula: $PIC = [diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento] / diâmetro da testemunha \times 100$. Os dados de crescimento obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (SAS INSTITUTE, 1985).

Resultados e Discussão

Os dados revelaram interações significativas entre os fatores *extratos aquosos x concentrações*, sendo observado que o efeito dos extratos sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos foi dependente das concentrações utilizadas (Tabela 1).

Extratos de alecrim, gengibre, hortelã e orégano não apresentaram efeito inibitório sobre *B. cinerea*, sendo que o extrato de camomila, na concentração de 10%, proporcionou uma redução de 32,35% no crescimento do fungo. O isolado de *C. gloeosporioides* foi sensível a todos os extratos utilizados, porém, constataram-se reduções significativas no diâmetro das colônias apenas quando foram empregadas as maiores concentrações. Extratos de camomila e orégano na concentração de 10% proporcionaram uma paralisação do crescimento das colônias de *C. gloeosporioides* a partir do quinto e do sétimo dias de incubação, respectivamente. O extrato de cravo mostrou-se altamente efetivo contra *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*, inibindo em 100% o crescimento micelial dos fungos para todas as concentrações testadas, tornando-se o melhor tratamento utilizado no experimento. O extrato de tomilho proporcionou supressão total do crescimento micelial de *B. cinerea* e *C. gloeosporioides* a partir das concentrações de 20 e 10%, respectivamente. O extrato de anis-estrelado não pôde ser avaliado, pois não permitiu a solidificação dos meios de cultura.

Para a maioria dos extratos utilizados, os resultados indicaram a existência de compostos secundários biologicamente ativos capazes de exercer atividade antifúngica sobre os patógenos *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*. Conforme Morandi & Bettiol (2009), os

extratos aquosos empregados provocaram ação fungitóxica direta, pela inibição do crescimento micelial através dos produtos naturais empregados; ou indireta, pela indução de produção de fitoalexinas ou outros compostos de defesa da planta.

Tabela 1. Crescimento micelial e PIC de *B. cinerea* e *C. gloeosporioides* em meio BDA, contendo extratos aquosos de plantas medicinais e aromáticas, aos 9 dias de incubação.

Tratamentos	Concentrações (%)	<i>B. cinerea</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
		Crescimento micelial (cm)	PIC (%)	Crescimento micelial (cm)	PIC (%)
Testemunha (BDA)	0	8,5	0	7,17	0
	5	8,5	0	3,17	55,79
Alecrim	10	8,5	0	3,87	46,02
	20	8,5	0	3,15	56,07
Camomila	5	8,5	0	6,45	10,04
	10	5,75	32,35	3,2	55,37
	20	ND	ND	ND	ND
Cravo-da-índia	5	0	100	0	100
	10	0	100	0	100
	20	0	100	0	100
Gengibre	5	8,5	0	4,1	42,82
	10	8,33	2	3,77	47,42
	20	ND	ND	ND	ND
Hortelã	5	7,97	6,23	6,63	7,53
	10	8,5	0	5,95	17,01
	20	8,5	0	5,1	28,87
Orégano	5	8,5	0	3,4	52,58
	10	8,5	0	2,5	65,13
	20	ND	ND	ND	ND
Tomilho	5	5,92	30,35	1,0	86,05
	10	2	76,47	0	100
	20	0	100	0	100

ND: não determinado. Extratos aquosos de camomila, gengibre e orégano a 20% não puderam ser obtidos pelo fato dos mesmos estarem demasiadamente concentrados na solução, apresentando-se consistentes.

Conclusões

A inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*, *in vitro*, pelos extratos aquosos indica a existência de compostos com ação fungitóxica que possibilitam o emprego destes no controle alternativo da podridão cinzenta da uva e da podridão da uva madura.

Apoio

Embrapa Uva e Vinho.

Referências

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 21 abr. 2010.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS / UFSC, 2000. 1104 p.

MARCANO, D. A. *et al.* Efecto de extratos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento *in vitro* de *S. rolfsii* y *T. basicola*. Caracas, **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, v. 22, n. 4, p. 315-323, 2005.

MORANDI, M. A. B & BETTIOL, W. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa meio Ambiente, 2009. 334 p.

SAS Institute Inc. *SAS User's guide: statistic, version 5 edition*. Cary, 1985. 956 p.

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ATIVOS CONTRA *Monilinia fructicola*

Lauren Fonseca Anacker¹; Jaqueline Tavares Schafer²; Andréa Bittencourt Moura³

¹Bel em Química Ambiental, bolsista CNPq AT-NS; ²Mestranda em Fitossanidade, bolsista Capes; ³ Professora Departamento Fitossanidade bolsista produtividade CNPq. Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. - E-mail: lauren_anacker@hotmail.com

Resumo - A podridão parda do pêssego é a doença de maior importância, podendo causar danos às flores, aos ramos e frutos na pré e pós-colheita. Está disseminada por regiões de clima temperado constituindo-se limitação para a produção, fato agravado pela falta de estratégias de controle com produtos alternativos aos agrotóxicos. Dessa forma o controle biológico vem sendo estudado como uma alternativa, entretanto é necessário o conhecimento da capacidade de síntese de compostos bioativos, por parte de isolados antagonistas. Objetivou-se testar isolados bacterianos previamente selecionados como produtores de compostos antimicrobianos, quanto à capacidade de produzir metabólitos voláteis *in vitro* que inibam o crescimento micelial do patógeno, através do método de placas sobrepostas. Dos 53 isolados bacterianos avaliados, 19 inibiram o crescimento micelial do fungo, gerando halos de crescimento de diversos diâmetros. Destacam-se os isolados DFs 465, DFs 628 e DFs 1020 com resultado positivo nas três repetições.

Palavras-chave: prospecção; *Prunus persica*; podridão parda; controle biológico; antibiose.

Introdução

O fungo *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey, causador da podridão parda em pessegueiros, é o patógeno mais importante entre os causadores de doenças nas fruteiras de caroço. As perdas na produção resultam da infecção das flores e do apodrecimento dos frutos nas fases de colheita e pós-colheita (MOREIRA; MIO, 2007).

Considerando o elevado custo de produção pela carga de produtos químicos utilizados, muitos produtores passaram a optar por técnicas alternativas, que possibilitam tirar vantagem dos processos naturais e das interações biológicas benéficas para o solo e plantas (NEGRI, 2007). Desta forma, a estratégia do controle biológico, vem sendo estudada como uma alternativa. Neste sentido, o trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade *in vitro* de produção de compostos voláteis por isolados bacterianos, no controle da podridão parda em pessegueiros.

Materiais e Métodos

Utilizaram-se 53 isolados bacterianos pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade da FAEM. Estes isolados foram previamente selecionados em teste de antibiose por Mota et al. (2010), onde apresentaram resultados positivos com halos de inibição de maior intensidade.

Neste ensaio, foram utilizadas placas de Petri de poliestireno descartáveis. Em placas contendo meio 523, foram espalhados 100 µL de cada suspensão bacteriana preparada em água peptonada a partir de colônias com 48 horas de crescimento. Em placas contendo meio BDA, transferiu-se assepticamente um disco do micélio do fungo ($\phi = 0,5$ cm), posicionando-

o na região central da placa. As tampas das placas foram removidas e os fundos de placas com o antagonista foram justapostos com os fundos de placas contendo o fungo em teste, e o conjunto vedado com fita adesiva. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado. Como testemunha, utilizou-se o mesmo conjunto, mantendo-se estéril o meio destinado ao cultivo das bactérias e adicionando o disco micelial no seu respectivo meio.

As placas foram incubadas a $22 \pm 2^\circ \text{C}$, por tempo suficiente até que o micélio do fungo da testemunha atingisse o bordo da placa (cerca de sete dias). As avaliações foram feitas com base na ausência (0) e presença (1) de halo de inibição do fungo, sendo medido o diâmetro do crescimento micelial com paquímetro digital.

Resultados e Discussão

O teste visando à detecção de compostos antifúngicos voláteis evidenciou a produção de compostos bioativos. Dos 53 isolados bacterianos avaliados, 19 inibiram o crescimento micelial de *M. fructicola*, gerando halos de crescimento micelial de diferentes dimensões. Os isolados que produziram compostos voláteis ativos contra este fitopatógeno não o fizeram em 100% das repetições: 15,80% mostraram resultado positivo nas três repetições, 21,05% em duas e 63,15% em uma. Os isolados DFs 465, DFs 628 e DFs 1020 (tabela 1) inibiram o crescimento do fitopatógeno nas três repetições executadas, apresentando média do diâmetro do halo de 30,61 mm; 25,99 mm e 25,78mm respectivamente (tabela 2), considerando a testemunha com aproximadamente 40,36 mm.

Tabela 1. Identificação e habitat dos isolados bacterianos que inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno nas três repetições.

Isolado	Habitat
DFs 465	túnicas de alho
DFs 628	solo sob cultivo de alho
DFs 1020	solo

Tabela 2. Medidas em milímetros do diâmetro do crescimento micelial de *Monilinia fructila*.

Isolado	repetições (mm)			média(mm)
	R1	R2	R2	
DFs 465	23,05	32,79	36,00	30,61
DFs 628	23,66	26,39	27,93	25,99
DFs 1020	16,91	21,98	38,45	25,78
Testemunha	-	-	-	40,36

Ladeira (2004), avaliando a produção *in vitro* de compostos voláteis por 11 rizobactérias diferentes observou que todos os isolados bacterianos testados inibiram o crescimento micelial de *Quambalaria eucalypti*. O crescimento micelial variou de 2,6 a 7,5 cm, com grau de inibição variando de 54,5 % a 84,5 %, concluindo que os isolados testados produziram substâncias antifúngicas voláteis tóxicas ao patógeno, resultando na inibição de seu crescimento micelial.

Teste similar visando à detecção de compostos antifúngicos voláteis por bactérias de filoplano de macieira evidenciou a produção deste tipo de composto por todos os antagonistas sendo os fungos fitopatogênicos testados: *Colletotrichum gloeosporioides*; *C. acutatum* e *Glomerella cingulata* sensíveis a estes compostos apresentando diferença significativa em relação à testemunha (ROLLEMBERG, 2008).

O percentual elevado de bactérias produtores de voláteis com atividade antimicrobiana nos trabalhos citados pode ser associada a uma seleção prévia para biocontrole e/ou isolamento a partir de hospedeiro do patógeno alvo, o que não ocorreu no presente trabalho, onde as bactérias avaliadas foram, na maioria, provenientes de solo, rizosfera de/ou filoplano de outras plantas que não o pessegueiro, como arroz, feijão, milho e tomate.

Marcuzzo (2002) avaliando antibiose por difusão em gel contra patógenos do alho, verificou que o isolado DFs465 controlou o crescimento de *Embellisia allii*, *Aspergillus niger* e *Pseudomonas marginalis*. Em outros trabalhos de antagonismo, o isolado DFs628 inibiu o crescimento de patógenos do arroz como *Curvularia* sp., *Bipolaris*, *Gerlachia* e *Pyricularia oryzae*, ao passo que DFs465 e DFs1020 não inibiram nenhum destes fungos (SOARES et al., 2006).

Conclusões

Resultados positivos para os isolados bacterianos em teste mostraram a capacidade em produzir algum tipo de composto volátil tóxico *in vitro*, capaz de inibir o crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, especialmente DFs465, DFs628 e DFs1020.

Referências

- LADEIRA, M. C. G. **Biocontrole de *Quambalaria eucalypti* por meio de rizobactérias.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- MARCUZZO, L.L. **Seleção e caracterização de bactérias com potencial para controle biológico da queima bacteriana do alho.** Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.
- MOREIRA, L. M.; MIO, L. L. M. Metodologia para detecção de infecções latentes de *Monilinia fructicola* em frutas de caroço. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.628-633, mai-jun 2007.
- MOTA, M. S.; SILVA, F. S. P.; NUNES, R. B.; ROCHA, D. A.; MOURA, A. B. Seleção de bactérias com capacidade de inibição do fungo da podridão parda em pessegueiro. In: XII Encontro da Pós Graduação da Universidade Federal de Pelotas. **Anais...Pelotas:UFPel**, 2010.
- NEGRI, G. **Controle da podridão parda em pessegueiro conduzido em sistema orgânico e produção do antagonista *Trichothecium roseum*.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- ROLLEMBERG, C. L. **Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- SOARES, V. N.; MOURA, A. B.; GONÇALVES, V.P. Prospecção por bactérias produtoras de antibióticos ativos contra fungos causadores de manchas foliares em arroz. In: Congresso de Iniciação Científica, 15., 2006, Pelotas. **Anais... Pelotas: UFPel**, 2006.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UREASE NATIVA DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Marcela Proença Borba¹; Mônica de Medeiros Silva²; Joseph Carmine Polacco³; Célia Regina Carlini⁴

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas, UFRGS; ²Estudante de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS; ³Professor Emérito, Universidade de Missouri; ⁴Professora Titular, Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Laboratório de Proteínas Tóxicas, UFRGS, e-mail: ccarlini@ufrgs.br

Resumo – Ureases são enzimas multifuncionais que desempenham diversas funções em plantas e microrganismos. Essas enzimas são abundantes no solo, podendo ser encontradas em microrganismos e plantas, ou no solo como enzimas extracelulares adsorvidas em argila. *Bradyrhizobium japonicum* é uma bactéria de solo que forma nódulos fixadores de N₂ na soja. Esta bactéria sintetiza uma urease e seu papel na comunicação hospedeiro-simbionte não foi investigado. Assim, purificamos e caracterizamos parcialmente a urease de *B. japonicum*. *B. japonicum* USDA110 foi crescida por 15 dias em meio YM a 28°C, sob agitação. Extratos bacterianos foram submetidos à cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, recuperando-se a atividade ureásica na eluição com 0,3M de NaCl. Esta fração foi aplicada na resina Source 15-Q, sendo que a atividade foi recuperada na fração eluída com 0,25M de NaCl. Estes passos levaram a um índice de purificação de 731X, com 35% de recuperação enzimática. A caracterização da enzima está em andamento. Testes preliminares sugerem que a urease *B. japonicum* ativa processos secretórios em células, o que poderia ser relevante na comunicação bactéria-planta.

Palavras-chave: Soja, comunicação hospedeiro-simbionte, rizosfera.

Introdução

Ureases (EC 3.5.1.5.) são metaloenzimas (Dixon et al., 1975) que catalisam a hidrólise de uréia em NH₃ e CO₂ (Zerner, 1991). Em plantas, as ureases atuam na reciclagem de nitrogênio (Stebbins et al., 1991) e na defesa contra patógenos (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Becker-Ritt et al., 2007). Em microrganismos, a urease está envolvida na utilização de uréia como fonte de nitrogênio e na virulência de organismos patogênicos (Mobley et al., 1995). Em plantas e fungos, as ureases consistem em trímeros ou hexâmeros formados por uma subunidade de 90 kDa, enquanto que enzimas bacterianas são complexos com 2 ou 3 subunidades. No solo, as ureases podem ser encontradas em microrganismos, raízes de plantas (Mobley e Hausinger, 1989) e como uma enzima extracelular imobilizada em componentes orgânicos e inorgânicos do solo (Burns et al., 1972). Resultados do nosso grupo indicam que tanto ureases vegetais quanto bacterianas induzem secreção em diversos tipos celulares, tendo plaquetas como um dos modelos em estudo (Follmer et al. 2004; Olivera-Severo et al., 2006), e sendo esta, provavelmente, uma característica geral entre ureases. Deste modo, postula-se que ureases presentes na rizosfera sejam ativas sobre as células da proximidade, induzindo ou potencializando a secreção de mucilagem por raízes de plantas, que traria benefícios para os microrganismos ao redor. *Bradyrhizobium japonicum* é uma bactéria do solo que forma nódulos nas raízes de soja para fixação de N₂. Esse microrganismo produz uma urease, e seu papel na sinalização ainda não foi investigado. Assim, este estudo tem como objetivo purificar e caracterizar a urease de *B. japonicum*.

Materiais e Métodos

B. japonicum USDA110 (cedido pelo Dr. Gary Stacey, Universidade de Missouri) foi mantida por quinze dias em meio extrato de levedura-manitol a 28 °C, sob agitação de 125 rpm. Para obtenção do extrato bruto, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão PEB pH 7,5 (NaPB 20mM, EDTA 1mM, β -mercaptoetanol 5mM) e lisadas por ultrassom. Para verificação da quantidade de proteína durante a purificação, foi utilizado o método de Bradford. A quantificação de urease foi estimada por método colorimétrico fenol-nitroprussiato que detecta a amônia liberada (Weatherburn, 1967). Estipulou-se que uma unidade é a quantidade necessária de enzima para liberar um μ mol de amônia por minuto. Na cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, com a resina equilibrada em 0,15M de NaCl, as proteínas foram eluídas com gradiente descontínuo de NaCl (0,2, 0,3 e 0,5M). A fração com maior atividade foi aplicada na coluna Source 15-Q, montada em um aparelho FPLC, sendo as proteínas eluídas em gradiente contínuo de NaCl (0-0,5M). Para o ensaio de agregação plaquetária, sangue de coelho foi coletado em uma solução de citrato de sódio 0,313% (v/v). O sangue foi centrifugado a 200 x g por 20 min, gerando de plasma rico em plaquetas. A agregação plaquetária foi monitorada por turbidimetria (Francischetti et al., 2000), usando um Lumi-Agregômetro (Chrono-Log Co.)

Resultados e Discussão

Na troca iônica com a resina Q-Sepharose, a urease foi eluída na fração com 0,3 M de NaCl (Figura 1). Essa fração foi aplicada na resina Source 15-Q, também de troca aniônica, sendo a atividade encontrada nas frações eluídas entre 0,2 e 0,3 M de NaCl (Figura 2). Amostras da purificação foram visualizadas por SDS-PAGE (Figura 3). Estima-se que a urease de *B. japonicum* tenha três subunidades totalizando 90 kDa. A fração proveniente da Source 15-Q ainda não está pura, indicando que o processo de purificação deve ser otimizado.

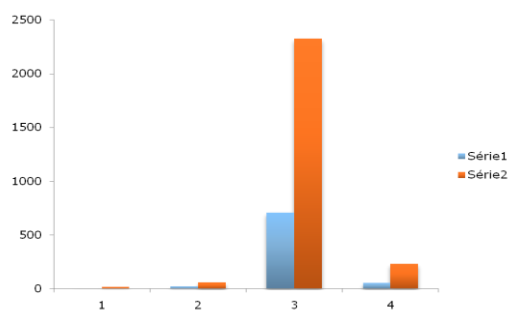


Figura 1: Atividade específica (série 1) e atividade total (série 2) das frações eluídas na primeira etapa de cromatografia, na resina Q-Sepharose. 1: Não retido; 2: 0,2M NaCl; 3: 0,3M NaCl; 4: 0,5M NaCl

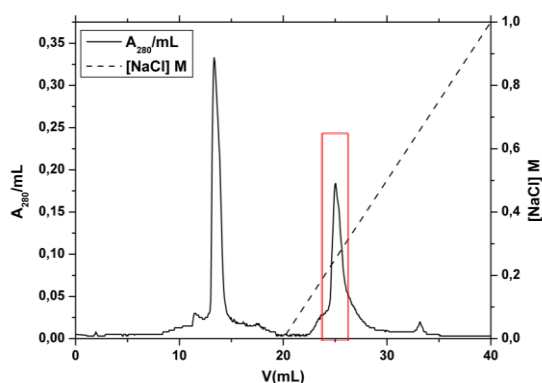


Figura 2: Perfil da cromatografia de troca iônica em Source 15-Q. O retângulo vermelho destaca o pico com maior atividade ureásica.

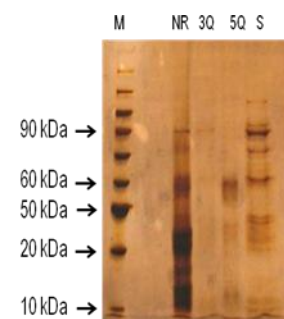


Figura 3: SDS-PAGE. M: marcador, NR: não retido, 3Q: fração 0,3M da Q-Sepharose, 5Q: fração 0,5M da Q-Sepharose, S: fração eluída na Source-Q.

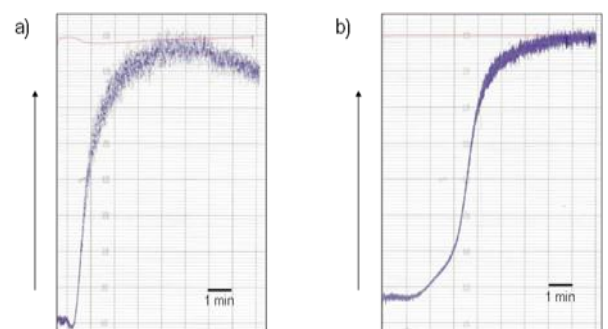


Figura 4: Agregação plaquetária induzida por (a) colágeno (controle positivo), e por (b) urease de *B. japonicum*.

Tabela 1: Tabela de purificação.

Frações	Proteína (mg/mL)	Volume (mL)	Proteína total	Enzimas totais	Atividade específica (U)	Rendimento (%)	Índice de purificação
Extrato bruto	22,4	20	336	2586	0,005	100	1
Q-Sepharose	0,067	30	2,013	2327	0,708	89	142
Source-Q	0,103	4	0,103	899	3,658	35	731

Ureases agem em plaquetas pela indução da secreção de grânulos densos plaquetários, ricos em serotonina e ADP, que desencadeiam o fenômeno de agregação plaquetária. A urease de *B. japonicum* (57 µg) demonstrou capacidade de agregar plaquetas, como pode ser observado na figura 5. Esse resultado está de acordo com nossa hipótese de um papel dessa enzima na rizosfera.

Conclusões

O protocolo de purificação apresentado resultou em um índice de purificação de 731 vezes com 35% de recuperação da atividade enzimática. Urease de *B. japonicum* induz secreção em plaquetas, desencadeando o processo de agregação plaquetária.

Apoio

UFRGS-PIBIT, CAPES, CNPq e FINEP.

Referências

- Becker-Ritt A.B., Martinelli A.H., Mitidieri S., et al. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**. 50: 971-983, 2007.
- Burns R.G., El-Sayed M.H. and McLaren A.D. Extraction of a urease-active organo-complex from soil. **Soil Biology Biochemistry**, 4: 107-108, 1972.
- Carlini, C. R., Grossi-de-Sá, M. F.; Plant Toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, 40, 1515-1539, 2002
- Dixon N.E., Gazzola C., Blakeley R.L. et al. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? **Journal of the American Chemical Society**, 97: 4131-4133, 1975.
- Follmer C., Real-Guerra R., Wasserman G.E., et al. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. **Europe Journal of Biochemistry**, 271: 1357-1363, 2004.
- Francischetti, I.M.B., Ribeiro, J.M.C., Champagne, D. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Journal of Biological Chemistry**. 275:12639-50, 2000.
- Mobley H.L. and Hausinger R.P. Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, 53: 85-108, 1989.
- Olivera-Severo D., Wassermann G., Carlini C.R. *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 452: 149-155, 2006.
- Stebbins N., Holland M.A, Cianzio S.R. et al. Genetic tests of the roles of the embryonic ureases of soybean. **Plant Physiology**., 97: 1004-1010, 1991.
- Weatherburn, M.W. (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**. 39, 971-974.
- Zerner, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. **Bioorganic Chemistry**, 19: 116-131, 1991.

2. Microbiologia do Ambiente

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE LEVEDURAS PRESENTES EM VINHOS TINTOS ARMAZENADOS EM BARRICAS DE CARVALHO

Magali Stival Berlesi¹; Carla Zanelatto²; Taís Letícia Bernardi³; Patrícia Valente⁴

¹ Estudante do curso de Ciências Biológicas da UFRGS. Bolsista de Iniciação Científica do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde. E-mail: magali.stival@gmail.com; ² Biomédica. E-mail: carlazanelatto@feevale.br; ³ Doutoranda do PPGMAA/UFRGS. E-mail: tisetlicia@gmail.com; ⁴ Professora do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde. E-mail: patricia.valente@ufrgs.br

Resumo - O grande desenvolvimento da indústria vinícola brasileira ocorreu na década de 70, quando empresas internacionais se instalaram na Serra Gaúcha. Desde então, as vinícolas brasileiras têm investido na busca da qualidade do produto, procurando competir com os vinhos importados e alcançar o mercado externo. A fim de contribuir com a pureza e autenticidade dos vinhos brasileiros e tendo em vista que muitos aspectos da contaminação microbiana de vinhos precisam ser esclarecidos, evidencia-se a necessidade de distinguir as diferentes cepas de leveduras envolvidas no processo enológico – tanto responsáveis pela fermentação alcoólica quanto as contaminantes. Sabendo que a principal fonte de contaminação são as barricas de envelhecimento da bebida, buscamos identificar leveduras em vinhos tinto (cabernet sauvignon e merlot) envelhecidos em barris em duas vinícolas do Estado do Rio Grande do Sul. Para tanto, foram semeadas amostras do vinho diretamente em ágar YEPG com cloranfenicol, nos volumes de 0,1mL e 1,0mL, sempre em triplicatas. Após, os meios foram incubados a 28°C por uma semana e colônias de leveduras de cada tipo morfológico foram selecionadas, purificadas e armazenadas para posterior identificação. Na primeira vinícola abordada, a média colonial encontrada nas amostras foi de 9×10^1 UFC.mL⁻¹, das quais foram selecionadas 100 leveduras. A identificação dos micro-organismos está em andamento, bem como o isolamento de leveduras de uma segunda vinícola, da qual já há 20 micro-organismos selecionados. Com os resultados finais deste estudo pretende-se identificar as leveduras presentes no processo enológico e orientar medidas para evitar sua contaminação no caso de leveduras indesejáveis serem encontradas.

Palavras-chave: identificação; leveduras; vinho.

Introdução

O grande desenvolvimento da indústria vinícola brasileira ocorreu na década de 70, quando empresas internacionais (Chandon, Martini & Rossi e Heublein) se instalaram na Serra Gaúcha. Desde então, as vinícolas brasileiras têm investido na busca da qualidade do produto, procurando competir com os vinhos importados e alcançar o mercado externo.

A maturação de alguns vinhos é realizada em barricas de carvalho, tanto francês quanto americano. Esta etapa é a principal responsável pela contaminação microbiana, especialmente por *Dekkera bruxellensis*, hoje considerada como a maior causadora da deterioração de vinhos (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* são produtoras de fenóis voláteis que conferem sabores desagradáveis (off-flavour) ao vinho (Chatonnet et al., 1992), conhecidos como “estábulo”, “suor de cavalo”, “couro”. Segundo Chatonnet et al. (1992), as barricas de carvalho são nicho ecológico para espécies *Dekkera/Brettanomyces*, o que torna a reutilização das barricas perigosa, já que muitos processos de higienização (queima de enxofre em barris vazios) não são suficientes para

eliminação dessas espécies. Outros trabalhos relataram que o tratamento com água quente e vapor d'água também não são suficientes para eliminar leveduras e bolores aprisionados nas madeiras dos barris.

Na elaboração de vinho, a fermentação alcoólica ocorre na presença de diversas espécies de leveduras e bactérias (principalmente lácticas e acéticas), tornando difícil traçar uma linha entre a atividade fermentativa benéfica e a atividade deteriorante (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Por isso, leveduras deteriorantes são procuradas somente na estocagem ou envelhecimento e durante o processo de engarrafamento. No entanto, muitos efeitos deteriorantes ocorrem antes da fermentação, como a produção de acetato de etila por *Pichia anomala* (Plata et al., 2003), ou no início do processo fermentativo, como a produção de acetato por *Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum* (Romano et al., 1992).

Com o objetivo de contribuir com a qualidade dos vinhos brasileiros e observando os aspectos práticos de elaboração e envelhecimento, evidencia-se a necessidade de conhecer as diferentes espécies de leveduras envolvidas em ambos os processos. O presente trabalho objetiva identificar leveduras presentes em vinhos tintos (cabernet sauvignon e merlot) provenientes de duas vinícolas do Rio Grande do Sul envelhecidos em barris de madeira.

Material e Métodos

Alíquotas de 0,1mL e 1,0mL de cada uma das amostras de vinho foram plaqueadas em placas de petri contendo ágar YEPG acrescido de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 28°C por uma semana. O plaqueamento foi realizado em triplicata. De cada placa, as colônias morfológicamente distintas foram selecionadas, purificadas e armazenadas em ágar GYMP inclinado e cobertas por óleo mineral para posterior identificação.

Testes de identificação fenotípico, baseado na fermentação e assimilação de fontes de carbono (replica plate), crescimento à 37°C e crescimento em etanol estão sendo realizados com 25 dos isolados provenientes da primeira vinícola.

Para o teste de fermentação de glicose e crescimento à 37°C, as leveduras foram diluídas em água destilada estéril, em seguida, 100µL da suspensão foi inoculado nos tubos contendo os meios específicos para cada experimento. O teste de fermentação teve duração de 21 dias com leituras realizadas nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21, através da produção de dióxido de carbono dentro dos tubos de Durhan. O teste de crescimento à 37°C teve duração de quatro dias, com leitura realizada diariamente analisando a turbidez com o cartão de Wickerham.

O teste de assimilação de fontes de carbono foi realizado com a utilização do replicador (método replica plate). As leveduras foram suspensas em água destilada estéril por 24h, posteriormente 400µL da solução foi inoculado em cada um dos poços do replicador e as placas com as fontes testadas (maltose, xilose, glucitol e galactose) foram “carimbadas” e incubadas à 25°C. O experimento teve duração de três semanas, com leitura feita em cada uma delas.

O teste de crescimento em etanol foi realizado em solução contendo 0,67% YNB e 0,5% etanol, incubado à 25°C.

Resultados e Discussão

A média colonial encontrada nas amostras da primeira vinícola abordada foi de 9×10^1 UFC.mL⁻¹, das quais foram selecionadas 100 leveduras. A seleção de micro-organismos da segunda vinícola ainda está sendo realizada, no entanto, já há 20 isolados armazenados.

O teste de fermentação de glicose demonstrou que 100% das leveduras foram capazes de fermentar esse açúcar, sendo assim, novos testes com outros açúcares (galactose, maltose,

xilose) foram testados. Destes, um isolado foi capaz de fermentar galactose e xilose e outros dois isolados fermentaram a maltose.

No teste de crescimento à 37°C, 32% das leveduras testadas foram capazes de crescer à essa temperatura, apresentando diferentes graus de turbidez. No teste de crescimento em etanol, 64% dos isolados testados conseguiram se desenvolver em diferentes graus. Estes isolados serão submetidos a testes de crescimento em concentrações mais elevadas de álcool etílico.

Através da análise da capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono, juntamente com morfologia celular e colonial, serão criados critérios para agrupar as leveduras isoladas como pertencentes ou não ao grupo das leveduras *Saccharomyces*. No caso de serem identificadas linhagens de espécies responsáveis pela deterioração do vinho, medidas para prevenir a contaminação da bebida deverão ser adotadas.

Conclusões

Como resultado obtido dos testes de fermentação realizados, destaca-se a levedura fermentadora de xilose e sua importância como potencial biotecnológico para produção de xilitol ou bioetanol de segunda geração. Em termos de identificação, pelos poucos testes realizados, não se pode chegar a uma conclusão de gênero e espécie dos isolados.

Apoio

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq

Referências

- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165-178.
- Loureiro, V. & Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. Review. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23-50.
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C., Ortega, J. M., 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20, 217-224.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 126-130.

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA NAS ÁGUAS DO ARROIO DILÚVIO E ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Daniele Vargas de Oliveira¹; Tiele da Silva Carvalho²; Sueli Van Der Sand³

¹Estudante do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde- UFRGS; danioliveira82@gmail.com; ²Estudante de Graduação, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde- UFRGS; tielecarvalho@hotmail.com; ³Professora do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde- UFRGS; svands@ufrgs.br

Resumo - O Arroio Dilúvio é a bacia hidrográfica mais importante da capital gaúcha possuindo 17.605m de extensão sendo a nascente em Viamão e deságue no Lago Guaíba. O Arroio recebe vários tipos de dejetos oriundos de esgoto pluvial, doméstico e hospitalar. Sendo assim, o Arroio recebe uma população microbiana diversificada podendo alguns destes microrganismos apresentar resistência a diferentes antimicrobianos e, portanto possíveis disseminadores de genes de resistência. O objetivo do presente estudo é avaliar a diversidade bacteriana presente nas águas do Arroio Dilúvio, no decorrer de seu curso, buscando identificar e caracterizar esta população de acordo com o seu perfil de resistência a antimicrobianos. As amostras foram coletadas em cinco pontos, desde a nascente até a foz e submetidas à etapa de isolamento e esgotamento da população bacteriana através do processo de semeadura em placas contendo diferentes meios de cultura seletivos e não seletivos. Após foi realizada a identificação bioquímica dos isolados, utilizando alguns testes como: catalase, oxidase, SIM, VMVP, OF entre outros. Com isso foi possível observar uma prevalência de bactérias da família das Enterobacteriaceae, 70% (59) dos isolados. Para a caracterização do perfil de resistência foi utilizado o método de difusão em disco utilizando os seguintes antibióticos: AMC, AMP, CFL, CFO, CIP, CLO, CRO, EST, GEN, IMP, NIT, NOR, SUT e TET. Nas coletas 1 e 3 observou-se que 66,66% (16) das amostras foram resistentes a 2 ou mais antibióticos; na coleta 2, 58% (14); e na coleta 4, 95,45% (21) apresentou este perfil de resistência para 2 ou mais antibióticos.

Palavras-chave: diversidade microbiana, Arroio Dilúvio, resistência.

Introdução

Estima-se que, no mundo existam 1400 milhões de Km³ de água, dos quais cerca de 97% correspondem aos oceanos e os 3% restantes é água potencialmente utilizável para a maioria das atividades humanas, sendo que apenas 0,02% da água do planeta são acessíveis para aproveitamento pelo homem.

Mesmo uma água de aparência clara e limpa, pode estar contaminada por microrganismos que podem ser provenientes do ar, do solo e de despejos de resíduos contendo dejetos de humanos e animais, o que representa um sério risco à saúde, já que podem conter microrganismos patogênicos.

O curso principal do Arroio Dilúvio possui 17,6Km de extensão, nasce nas serranias de Viamão e recebe o aporte das águas dos arroios Marianos, Moinho, São Vicente e Cascatinha (Menegat, 1998), indo desaguar no Lago Guaíba.

No decorrer de seu curso o Arroio sofre todo o tipo de agressão, pois ele corta o município de Porto Alegre passando por 36 bairros e carrega o esgoto cloacal, sem nenhum tratamento, de 3 bairros até o Lago Guaíba. Ainda recebe os efluentes de 37 unidades de saúde ao longo de seu trajeto o que agrava ainda mais a preocupação com a saúde pública.

O uso indiscriminado de antimicrobianos coloca em risco tratamento de doenças causadas por bactérias, pois essas podem carregar informação de resistência à uma ou mais classes de antimicrobianos levando muitas vezes além dos problemas ambientais a sérios problemas de saúde pública. Desta forma o presente trabalho busca avaliar a diversidade microbiológica nas águas do Arroio Dilúvio no decorrer de seu curso identificando e caracterizando a população bacteriana de acordo com o seu perfil de resistência.

Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia –ICBS/UFRGS. Amostras de água do Arroio Dilúvio foram coletadas no período de março de 2009 a dezembro 2009 em cinco pontos de coleta desde a sua nascente na Lomba do Sabão até seu deságüe no Lago Guaíba, sendo eles: no Parque Saint' Hilaire; Av. Antônio de Carvalho; Rua Guilherme Alves; Av. Ramiro Barcelos e Av. Borges de Medeiros. Após as coletas, as amostras foram encaminhadas, sob refrigeração, até o laboratório de Microbiologia para a realização das análises microbiológicas.

Os isolamentos bacterianos foram realizados em diferentes meios de cultura tais como: ágar Salmonella-Shigella (SS), ágar Cetrimide, ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), ágar Trypticaseína de soja (TSA) para posterior identificação das bactérias. As placas foram incubadas a temperatura de 37⁰ C por 24-48h.

Após o isolamento e posterior coloração pelo método de Gram, para verificação da pureza da colônia, foram realizados diferentes testes bioquímicos para a identificação das amostras de bactérias Gram-negativas: oxidase, catalase, ágar tríplice açúcar ferro (TSI), Citrato, Oxidação-Fermentação (OF), SIM, Citrato, Fenilalanina, Glicose, Lactose e Uréia. Com base nos resultados obtidos, foi realizada a identificação utilizando Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1994).

Para a análise do perfil de resistência, foi utilizado o método de difusão em disco, onde a cultura pura foi crescida em caldo TSB (Caldo Triptona de Soja) até a turbidez adequada. Após o crescimento essa cultura foi inoculada, com um suabe estéril, em uma placa contendo o meio de cultura ágar Muller Hinton, onde foram dispostos os seguintes antibióticos: AMC (10µg), AMP (30µg), CFL (30µg) CFO (30µg), CIP (5µg), CLO (30µg), CRO (30µg), EST (10µg), GEN (10µg), IMP (10µg), NIT (300µg), NOR (10µg), SUT (25µg) e TET (30µg). Após um período de incubação de 16-18 horas, mediu-se o tamanho dos halos e comparou-se com uma tabela específica para a interpretação dos resultados.

Resultados e Discussão

No decorrer do trabalho foram isoladas 84 colônias dos diferentes meios de cultura, destas 59 foram identificadas através de provas bioquímicas, as demais necessitam de mais testes para se alcançar a identificação. Os 59 isolados (70% do total) são da Família das Enterobacteriaceae e diferentes gêneros foram identificados. *Escherichia coli* foi a espécie predominante com 22 isolados, *Klebsiella pneumoniae* (6), *Escherichia adcerboxilata* (5), *Citrobacter diversus* (5), *Shigella sonnei* (4), *Enterobacter intermedium* (3), *Yersinia pseudotuberculosis* (2), *Providencia rettgeri* (1), *Serratia liquefanciens* (1), *Enterobacter aerogenes* (1), *Klebsiella oxytoca* (1), *Enterobacter gergoviae* (1), *Citrobacter amalonaticus*

(1), *Escherichia blattae* (1), *Enterobacter agglomerans* (1), *Shigella dysenteriae* (1), *Proteus mirabilis* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Serratia plymuthica* (1).

Considerando o grande descaso sofrido pelo Arroio Dilúvio uma grande diversidade bacteriana é esperada. Diariamente são liberados no arroio 600Kg de resíduo provenientes de diversas fontes. A presença de bactérias do grupo das Enterobacteriaceae condiz com o fato que o Arroio Dilúvio recebe uma descarga grande de esgoto doméstico *in natura*. É importante identificarmos as espécies microbianas presentes nesse ambiente, pois a determinação das espécies bacterianas produz informações valiosas a respeito das fontes poluidoras das águas superficiais. Vilanova *et al.*,(2002).

A população microbiana no ambiente está exposta a condições de sobrevivência estressante, isto deve determinar a prevalência de algumas espécies mais adaptadas, como é o caso da *E. coli*. Neste estudo, portanto as características das águas podem inevitavelmente influenciar a sobrevivência da população bacteriana nesse ambiente.

Quanto ao perfil de resistência podemos observar um maior nível de resistência à antimicrobianos na 4ª coleta onde obtivemos 95,45% dos isolados resistentes a 2 ou mais antimicrobianos, para 1ª e 3ª coletas foi observado 66,66% e na 2ª, 58%. A porcentagem mais elevada pode estar relacionada às diferentes estações do ano, onde o período chuvoso pode causar o aumento da incidência de resistência a antimicrobianos, de acordo com Peak *et al.*, (2007).

A resistência a antimicrobianos pode também estar relacionada com a contaminação que o arroio sofre das unidades de saúde do município e também o uso de antibióticos sem controle pela população, com isso o ele pode se tornar um potencial veículo transmissor de doenças.

Conclusões

Como o Arroio Dilúvio deságua no Lago Guaíba, o qual serve para o abastecimento de água potável para a população, é importante que medidas sejam tomadas para tratar esse resíduo antes do seu despejo e o monitoramento do mesmo.

Referências

- COMITÊ GESTOR DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL DA PMPA (CGEA). **Cartilha de educação ambiental**. Porto Alegre, 2007
- HOLT, J. G., *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.408-516.
- MENEGAT, Rualdo (Coord.). **Atlas Ambiental de Porto Alegre**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2006. 256p.
- Vasconcelos F. R., *et al.*. Perfil de resistência antimicrobiana de *escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.405-410, jul./set., 2010.
- VILANOVA X., *et al.* The effect of a sewage treatment plant effluent on the faecal coliforms and enterococci populations of the reception river waters. **Journal of Applied Microbiology**. v.92, 210–214, 2002.

ATIVIDADE DA UREASE SOB A INFLUÊNCIA DO XISTO RETORTADO EM CULTIVO DO FEIJOEIRO

Marta Eliane Doumer¹; Douglas Adams Weiler¹; Luana Liberalesso de Freitas²; Raquel Schmatz²; Isaías Binotto²; Sandro José Giacomini³; Carlos Augusto Posser Silveira⁴.

¹Estudantes do Curso de Pós-graduação em Ciência do solo do Centro de Ciências Rurais - UFSM; E-mail: martaelianedoumer@gmail.com; douglasweiler@yahoo.com.br; ²Estudantes do Curso de Agronomia do Centro de Ciências Rurais - UFSM; E-mail: luh_liberalesso@hotmail.com; raquelschmatz@hotmail.com; isaiasbinotto@hotmail.com; ³Professor do Departamento de Solos do Centro de Ciências Rurais – UFSM Líder do Grupo de Pesquisa; E-mail: sjgiacomini@gmail.com; ⁴Pesquisador da Embrapa Clima Temperado – Gestor do Projeto Xisto Agrícola; E-mail: augusto.posser@cpact.embrapa.br

Resumo – O objetivo foi monitorar a qualidade do solo, através da atividade enzimática da urease, devido à aplicação de Xisto Retortado sob cultivo do feijoeiro. O experimento foi conduzido na área experimental da UFSM Santa Maria - RS. Delineou-se os seguintes tratamentos: T1- Adubação NPK; T2- XR 750 kg ha⁻¹ + NPK; T3- XR 1500 kg ha⁻¹ + NPK; T4- XR 3000 kg ha⁻¹ + NPK; T5- Testemunha absoluta; e T6- XR 1500 kg ha⁻¹. Por tratar-se de fonte de liberação lenta de nutrientes houve acréscimo na atividade da enzima avaliada, Assim, com avaliação da atividade enzimática da urease não encontrou-se efeito adverso frente a aplicação do xisto retortado.

Palavras-chave: xisto retortado, urease, feijoeiro.

Introdução

O componente microbiano e a atividade enzimática do solo são atraentes, como indicadores para o monitoramento a perturbação ou a poluição dos solos por causa de seu papel central e crucial no funcionamento do ecossistema do solo. Questões importantes são o que constitui um significativo impacto ambiental em solos e quando a recuperação é completa. Os indicadores são necessários, não só como substitutos para refletir a funcionalidade dos solos, mas também para orientar a recuperação (Hinojosa *et al*, 2004). O Xisto Retortado (XR), subproduto da extração de óleo combustível do folhelho pirobetuminoso, compõem-se basicamente de hidrocarbonetos em maiores frações, menores quantidades de Ca, Mg, K, P, S e metais pesados na ordem de mg/kg. A presença de elementos essenciais para as plantas nestes resíduos, mostra a possibilidade de uso agrícola. No entanto, os metais pesados presentes indicam o potencial poluente deste material (Gonçalves *et al*, 2004). O objetivo deste trabalho foi monitorar a qualidade do solo através da atividade enzimática da urease tratado com xisto retortado em cultivo de feijoeiro.

Material e Métodos

O experimento foi implantado em janeiro de 2010 na área experimental do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, localizada a 29° 45' Latitude Sul, Longitude 53° 42' W GrW e altitude de 95 m. O clima da região, segundo Köppen, é classificado como subtropical úmido, tipo Cfa2.

O solo da área pertence à unidade de mapeamento São Pedro, e é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico arênico (Hapludalf). A planta teste usada foi o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com

quatro repetições em parcelas de 25 m² (5 m x 5 m). A adubação consistiu de 150 kg ha⁻¹ de NPK na formulação 00-25-20 e 45 kg ha⁻¹ de uréia que foram aplicados juntos a sementeira. Avaliou-se o efeito da aplicação de xisto retornado no solo sobre a atividade da urease nos seguintes tratamentos: **T1**- Adubação NPK; **T2**- XR 750 Kg ha⁻¹ + NPK; **T3**- XR 1500 Kg ha⁻¹ + NPK; **T4**- XR 3000 Kg ha⁻¹ + NPK; **T5**- Testemunha absoluta; e **T6**- XR 1500 Kg ha⁻¹.

A amostragem foi realizada com uma semana de implantação do experimento e na diagnose foliar (44 dias após o plantio), na profundidade de 0-5 cm da camada superior do solo. A atividade da urease, realizada no Laboratório de Microbiologia do Solo e Ambiente da UFSM, é determinada com uréia como substrato, incubando em pH 9.0 (tampão THAM 0,05M) por 2h a 37°C e medido como N-NH⁴⁺ por destilação (TABATABAI, M., 1994; Tedesco et al, 1995). A atividade enzimática (AE) é expressa em mg Kg⁻¹ h⁻¹. Para comparação de médias, utilizou-se o teste de Duncan a 5 %.

Resultados e discussão

De acordo com Hinojosa *et al* (2004) a enzima urease é uma das mais eficientes na discriminação dos níveis de poluição por elementos traços e pode ser usado no monitoramento de áreas impactadas por estes elementos. Este comportamento é dado pela combinação entre o metal pesado e o sítio ativo desta enzima, inativando a mesma, assim um decréscimo na atividade desta hidrolase representa maior grau de poluição.

Pode-se observar através da Fig. 1 que no início do experimento a testemunha absoluta (T5) alcançou maiores índices para a AE da urease, diferindo apenas do T6 (XR 1500 kg ha⁻¹), porém este tratamento não diferiu dos demais constituídos de adubação mineral. Ressaltando-se ainda que o XR na dosagem mais elevada tendenciou a índices mais próximos ao tratamento controle (T5).

Este comportamento deve-se provavelmente a uma fase de adaptação da microbiota do solo ao aporte de uma nova fonte de nutrientes (fase lag) e isto pode ser comprovado pelo maior índice de atividade apresentados na diagnose foliar, decorridos 44 dias do plantio e florescimento pleno, pelo T6, o qual se destacou em relação aos demais tratamentos. Este resultados correlacionam-se com os estudos de Gonçalves *et al* (2004) onde a adição de 20 t ha⁻¹ de xisto retornado não alterou a concentração de metais pesados no solo.

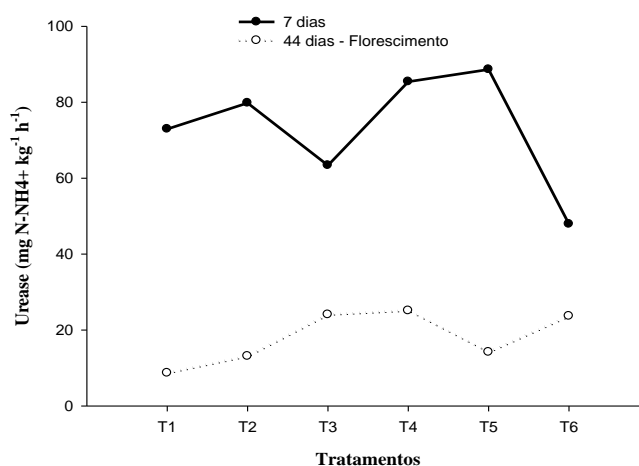


Figura 2. Velocidade de hidrólise da uréia nas duas datas avaliadas nos diferentes tratamentos: T1- Adubação (NPK); T2- XR 750 kg ha⁻¹ + NPK; T3- XR 1500 kg ha⁻¹ + NPK; T4- XR 3000 kg ha⁻¹ + NPK; T5- Testemunha absoluta; e T6- XR 1500 kg ha⁻¹ S/NPK.

Na fig. 2 foi analisado o comportamento da AE da urease, na diagnose foliar, com doses crescentes do xisto retornado (0, 750, 1500 e 3000 kg ha⁻¹) acrescido da adubação

mineral, onde se observa que há uma melhora na qualidade do solo com adição de XR. Isto se deve possivelmente a liberação gradual de nutrientes por parte deste subproduto, o que é uma característica desejável quando se considera o efeito fertilizante mais duradouro e o menor risco de perdas, comparativamente aos adubos de alta solubilidade.

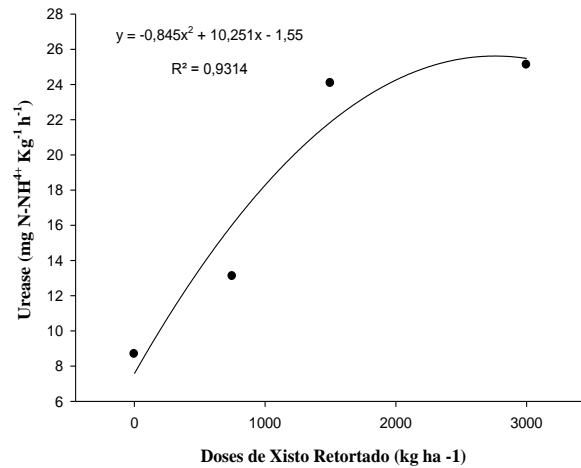


Figura 2. Velocidade de hidrólise da uréia com diferentes doses de xisto retornado.

Conclusões

Através da atividade enzimática da urease não encontrou-se efeito adverso frente a aplicação do xisto retornado ao solo.

Apoio

Parceria FAPEG/Embrapa Clima Temperado/Petrobrás.

Referências

- GONÇALVES, P. B.; MIYAZAWA, M.; OLIVEIRA, E. L.; PAVAN, M. Disponibilidade de metais pesados em solos tratados com resíduos de xisto pirotumino para o feijoeiro. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Anais. Águas de Lindóia, SP, 2009. CD-ROM.
- HINOJOSA, M.B.; CARREIRA, J.A.; GARCÍA-RUIZ, R.; DICK, R.P. Soil moisture pre-treatments effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soil. **Soil Biology & Biochemistry**, 36: 1559-1568, 2004.
- TABATABAI, M. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; SCOTT, A.; BOTTOMELEY, P. J., (eds) Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties. Madison: **Soil Science Society of America**, Part 2; 778-835, 1994. (Special Publication, 5).
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, J. S. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1995.

ATIVIDADE DA ARILSULFATASE SOB O EFEITO DO XISTO RETORTADO EM CULTIVO DE FEIJOEIRO

Marta Eliane Doumer¹; Douglas Adams Weiler¹; Luana Liberalesso de Freitas²; Raquel Schmatz²; Guilherme Dietrich²; Sandro José Giacomini³; Carlos Augusto Posser Silveira⁴.

¹Estudantes do Curso de Pós-graduação em Ciência do solo do Centro de Ciências Rurais UFSM; E-mail: martaelianedoumer@gmail.com; douglasweiler@yahoo.com.br; ²Estudantes do Curso de Agronomia do Centro de Ciências Rurais - UFSM; E-mail: luh_liberalesso@hotmail.com; raquelschmatz@hotmail.com; guilhermedietrich@hotmail.com; ³Professor do Departamento de Solos do Centro de Ciências Rurais – UFSM Líder do Grupo de Pesquisa; E-mail: sjgiacomini@gmail.com; ⁴Pesquisador da Embrapa Clima Temperado – Gestor do Projeto Xisto Agrícola; E-mail: augusto.posser@cpact.embrapa.br

Resumo – O objetivo do trabalho é monitorar a qualidade do solo, usando como indicador a atividade enzimática da arilsulfatase, sob a influência do Xisto Retortado em cultivo do feijoeiro. O experimento foi implantado na área experimental da UFSM Santa Maria – RS e consistiu dos seguintes tratamentos: T1- Adubação NPK; T2- XR 750 Kg ha⁻¹ + NPK; T3- XR 1500 Kg ha⁻¹ + NPK; T4- XR 3000 Kg ha⁻¹ + NPK; T5- Testemunha absoluta; e T6- XR 1500 Kg ha⁻¹. Foram realizadas duas amostragens que revelaram um aumento na atividade enzimática da arilsulfatase, devido a um possível aumento na disponibilidade do S. Desta forma, através da avaliação da atividade enzimática da arilsulfatase não foi verificado efeito adverso na qualidade do solo sob a aplicação do xisto retortado.

Palavras-chave: xisto retortado, arilsulfatase, feijoeiro.

Introdução

As enzimas têm participação essencial nos processos relacionados à qualidade do solo e por serem muito sensíveis a mudanças no solo, são considerados bons indicadores na avaliação do impacto da contaminação do solo (Moreira & Siqueira, 2006).

O xisto retortado, subproduto oriundo da industrialização do xisto, tem potencial para uso na agricultura, apresentando em sua composição elevado teor de silício (57%) dentre outros elementos, como fósforo, cálcio, magnésio e enxofre. Ele é rico em micronutrientes e possui cadeias carbônicas fossilizadas, tratando-se de um material quelatizado naturalmente (Chaves & Vasconcelos, 2006). Nesse sentido, objetivou-se monitorar a qualidade do solo através da atividade da arilsulfatase sob a influência do Xisto Retortado no cultivo do feijoeiro.

Material e Métodos

O experimento foi implantado em janeiro de 2010 na área experimental do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, localizada a 29° 45' Latitude Sul, Longitude 53° 42' W GrW e altitude de 95 m. O clima da região, segundo Köppen, é classificado como subtropical úmido, tipo Cfa2. O solo da área pertence à unidade de mapeamento São Pedro, e é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico arênico (Hapludalf).

A planta teste usada foi o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições em parcelas de 25 m²

(5 m x 5 m). A adubação consistiu de 150 kg ha⁻¹ de NPK na formulação 00-25-20 e 45 kg ha⁻¹ de uréia que foram aplicados juntos a sementeira. Avaliou-se o efeito da aplicação de xisto retornado no solo nos seguintes tratamentos: **T1**- Adubação NPK; **T2**- XR 750 Kg ha⁻¹ + NPK; **T3**- XR 1500 Kg ha⁻¹ + NPK; **T4**- XR 3000 Kg ha⁻¹ + NPK; **T5**- Testemunha absoluta; e **T6**- XR 1500 Kg ha⁻¹.

A amostragem foi realizada com uma semana de implantação do experimento e na diagnose foliar (44 dias após o plantio), na profundidade de 0-5 cm da camada superior do solo. A atividade da arilsulfatase, realizada no Laboratório de Microbiologia do Solo e Ambiente da UFSM, é determinada de acordo com TABATABAI, M. (1994). Para comparação de médias, utilizou-se o teste de Duncan a 5 %.

Resultados e Discussão

A atividade enzimática (AE) da arilsulfatase aumentou da primeira para a segunda amostragem (Fig. 1), isto deve-se à baixa umidade na época do florescimento (4%) em relação ao início do experimento (11%), sendo que esta enzima, envolvida na ciclagem do S, aumenta com a secagem ao ar.

Reações enzimáticas são inibidas por metais que podem complexar com o substrato, combinar com o grupo proteína-ativa, ou reagir com o complexo enzima-substrato. Embora o XR contenha elementos traços na ordem de mg kg⁻¹, não foram encontrados efeitos adversos por parte do subproduto, como demonstrado na Fig. 1, onde observa-se um aumento vultoso na AE por parte do T6 (composto apenas do XR sem adubação mineral) na segunda amostragem, mostrando-se superior ao tratamento controle.

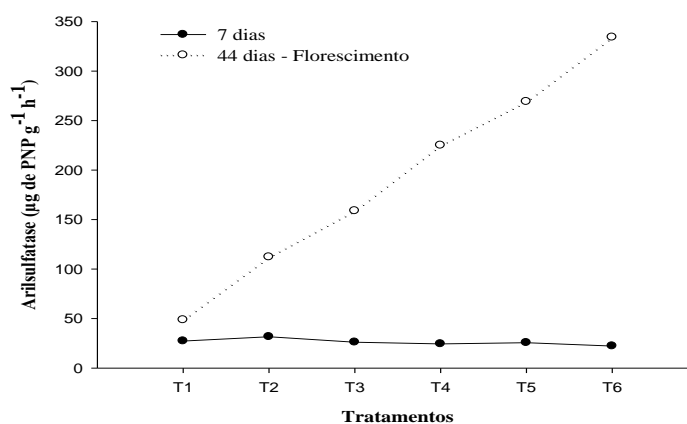


Figura 1. Atividade da arilsulfatase nas duas datas avaliadas nos diferentes tratamentos: T1- Adubação (NPK); T2- XR 750 kg ha⁻¹ + NPK; T3- XR 1500 kg ha⁻¹ + NPK; T4- XR 3000 kg ha⁻¹ + NPK; T5- Testemunha absoluta; e T6- XR 1500 kg ha⁻¹ S/NPK.

Conforme a Fig. 2 (análise de regressão) podemos observar uma alta correlação entre a dose de XR e a atividade da arilsulfatase ($R^2 = 0,99$), isto se deve possivelmente à elevada concentração de S na forma elementar e de sulfetos presente no XR, além da elevada disponibilidade (Chaves & Vasconcelos, 2006). De acordo com Moreira & Siqueira (2006) o S se une a MOS (matéria orgânica do solo) por ligações com oxigênio ou N, formando ésteres sulfatados (30 a 75% do S orgânico total) ou com C, formando principalmente aminoácidos (em torno de 30% do S do solo). Quando o S-orgânico está na forma de ésteres, a mineralização a SO₄⁻² é feita pela arilsulfatase.

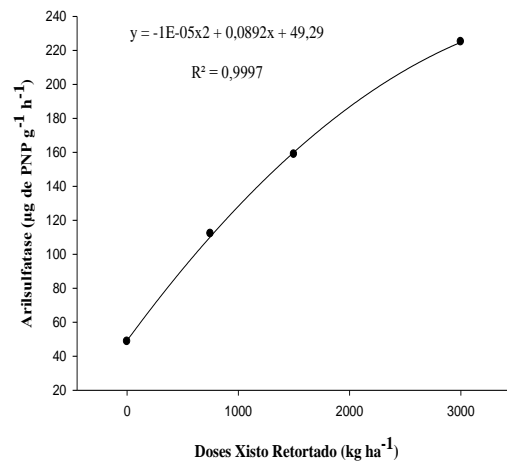


Figura 2. Atividade da arilsulfatase com doses crescentes de XR.

Conclusão

Com a avaliação da atividade enzimática da arilsulfatase não foi verificado efeito adverso na qualidade do solo sob a aplicação do xisto retornado.

Apoio

Parceria FAPEG/Embrapa Clima Temperado/Petrobrás.

Referências

CHAVES, L. H.; VASCONCELOS, A. C. F. Alterações de atributos químicos do solo e do crescimento de plantas de milho pela aplicação de xisto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 10: 84-88, 2006.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2ª edição. 2006. 729p.

TABATABAI, M. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; SCOTT, A.; BOTTOMELEY, P. J., (eds) *Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties*. Madison: **Soil Science Society of America**, Part 2; 778-835, 1994. (Special Publication, 5).

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *ENTEROCOCCUS* SP. ISOLADOS DE FRANGOS DE CORTE

Casseneo, A.P.V.¹; Spadari, C.²; D'azevedo, P.A.³; Frazzon, J.⁴; Van Der Sand, S. T.⁵; Frazzon, A.P.G.⁵

¹Estudante do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- UFRGS; E-mail: ana.casseneo@ufrgs.br; ²Estudante de Iniciação Científica do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia- UFRGS; ³Professor do Departamento de Microbiologia- UFCSPA; ⁴Professor do Instituto de Ciências e Tecnologia dos Alimentos- UFRGS; ⁵Professor do Departamento de Microbiologia- UFRGS

Resumo- Bactérias comensais do intestino de frangos tornaram-se objeto de estudos, pois a alta taxa de exportação desses produtos tem aumentado a preocupação com a qualidade e a sanidade de granjas quanto à nutrição animal, ganho de peso e doenças infecciosas. O objetivo do estudo foi verificar fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana em isolados de *Enterococcus* sp.. Suabes cloacais de frangos de corte foram utilizados para isolamento de *Enterococcus* sp.. Os frangos foram submetidos a diferentes dietas contendo promotores de crescimento e coccidiostáticos ionóforos e divididos em grupos conforme tratamento empregado. Foram utilizados 240 isolados de *Enterococcus* sp. determinantes dos perfis de susceptibilidade a diversos antimicrobianos e testados para a presença de genes de resistência à tetraciclina e macrolídeos. Do total de isolados, 98% apresentaram-se resistentes à bacitracina, 92,5% foram resistentes à tetraciclina, 48,75% à penicilina, 42,6% à eritromicina, 38,3% à rifampicina, 19,2% à estreptomina, 4,6% à ciprofloxacina, 4,6% à vancomicina, 3,6% à nitrofurantoina e 2,9% ao cloranfenicol. Do total de isolados resistentes à tetraciclina, 94% e 30%, continham os genes *tetM* e *tetL*, respectivamente. Dos isolados resistentes a eritromicina, 97,9% possuíam o gene de resistência *ermB*. Não houve correlação das diferentes dietas para frangos de corte no fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana de isolados de *Enterococcus*.

Palavras-chave: *Enterococcus* sp.; frangos de corte; dietas; resistência antimicrobiana.

Introdução

Por seu potencial patogênico, *Enterococcus* sp. pode se tornar um reservatório de genes de resistência que podem ser disseminados ou transferidos a diferentes ecossistemas, e conseqüentemente, uma possível rota de transmissão de bactérias resistentes através da cadeia alimentar (Shepard & Gilmore, 2002). O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal foi universal, tendo como objetivo a prevenção de doenças e o aumento da produtividade em aves confinadas (Garcia et al., 2002).

Uma ampla diversidade de antimicrobianos pode ser administrada oralmente em vários níveis subterapêuticos (Schwarz et al., 2001). Conseqüentemente, a presença de microrganismos resistentes em animais produtores de alimentos e a possível contaminação de sua carcaça tornaram-se aspectos importantes em termos de sanidade animal e de saúde pública (Moreno et al., 2006). Para tanto, restrições no uso de antimicrobianos como promotores de crescimento nos últimos anos têm levado a busca de alternativas como a seleção de microrganismos probióticos, prebióticos, óleos essenciais e imunostimuladores. O objetivo do estudo foi avaliar a influência de diferentes dietas para frangos de corte no perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Enterococcus* sp..

Materiais e Métodos

Frangos de corte foram submetidos a dietas contendo promotores de crescimento e coccidiostático ionóforo e divididos em grupos conforme o tratamento empregado. Amostras de suabes cloacais foram realizadas e utilizadas para o isolamento de *Enterococcus* sp.

Os isolados foram confirmados fenotípica e genotipicamente por PCR para amplificação do gene *tuf* para o gênero *Enterococcus* sp. e submetidos à identificação bioquímica para determinação de espécie. O perfil de resistência das cepas isoladas foi determinado pelo método de difusão de disco antimicrobiano em Ágar Muller Hinton testados para os seguintes antimicrobianos: ampicilina, penicilina, eritromicina, cloranfenicol, nitrofurantoína, ciprofloxacina, bacitracina, vancomicina, rifampicina e tetraciclina. Em seguida, o DNA genômico de *Enterococcus* sp. foi extraído utilizando-se o método de lise térmica e PCR foram realizadas para verificar a presença dos genes *tetM*, *tetL* e *ermB*.

Resultados e Discussão

Ao todo 240 *Enterococcus* sp. foram isolados, identificados bioquimicamente e confirmados para gênero por PCR para gene *tuf*. Todos os 240 isolados utilizados no ensaio de antibiograma foram susceptíveis à ampicilina, 98% apresentaram-se resistentes à bacitracina, 92,5% isolados foram à tetraciclina, 48,75% à penicilina, 42,6% à eritromicina, 38,3% à rifampicina, 19,2% à estreptomicina, 4,6% à ciprofloxacina, 4,6% à vancomicina, 3,6% à nitrofurantoina e 2,9% ao cloranfenicol. Entre as espécies resistentes, observou-se que *E. faecalis* teve maior prevalência, com índices de resistência de 97,9%, 75,8% e 32,6%, à tetraciclina, bacitracina e eritromicina, respectivamente. Seguido por *E. faecium*, com resistência de 72,4%, 65,5% e 44,8% a esses antimicrobianos. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. mundtii*, juntamente com *E. faecalis* demonstraram índice elevado de resistência à penicilina, variando entre 50% e 59,2%.

A distribuição das resistências entre as espécies observadas nas amostras isoladas de cloaca de frangos está de acordo com dados publicados por Hayes et al. (2003), onde a prevalência de resistência a antimicrobianos tem sido relatada frequentemente entre isolados de *E. faecalis* do que entre *E. faecium*, tanto do ambiente de produção quanto de produtos de carne crua. Observou-se nos grupos que não receberam antimicrobiano suplementado na ração, uma elevada prevalência de *Enterococcus* sp. resistentes. Graham et al. (2009) isolaram nos EUA *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes a antimicrobianos de amostras de camas de três aviários com 120 dias de utilização. Além disso, a eliminação do uso de antimicrobianos pode não ter um resultado imediato na redução de resistência antimicrobiana. O curto ciclo de crescimento dos frangos pode não fornecer tempo suficiente para que determinantes de resistência sejam perdidos de uma só vez em tratamentos sem antimicrobianos (Costa et al., 2009).

Dos 97 isolados que apresentaram fenótipo de resistência à eritromicina, 97,9% apresentavam o gene *ermB*. Este gene é frequentemente observado entre isolados resistentes à macrolídeos, sendo relatado por ser o mais comum gene codificador de resistência a essa classe de antimicrobianos em *Enterococcus* sp. (Aarestrup et al., 2000). O gene *tetM* foi encontrado em 94% dos 217 isolados que foram resistentes à tetraciclina, e o gene *tetL* foi detectado em 30% dos *Enterococcus* sp. isolados resistentes ao mesmo antimicrobiano. Dos isolados positivos para o gene *tetM*, 41,17% continham também o gene *ermB*. A alta ocorrência de *Enterococcus* sp. resistentes a antimicrobianos sugere uma manutenção da pressão seletiva por uso de diferentes antimicrobianos ou outras substâncias na indústria avícola, e uso terapêutico em humanos e animais.

Conclusões

Observou-se elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos bacitracina, tetraciclina e penicilina nos isolados de *Enterococcus* sp. e nos grupos onde os frangos receberam coccidiostático ionóforo suplementados na ração, a prevalência de *Enterococcus* sp. resistentes foi menor quando comparada aos grupos que não receberam essa substância. Os genes *tetM*, *ermB* e *tetL* foram detectados entre os isolados, no entanto, não houve correlação entre o perfil de resistência e a presença dos genes *tetM*, *ermB* e *tetL* nos isolados de *Enterococcus* sp. com as diferentes dietas empregadas nos frangos de corte.

Apoio

CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Referências

- AARESTRUP, F.M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L.B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 37, 127-137, 2000.
- COSTA, P.M.; BELO, A.; GONÇALVES, J.; BERNARDO, F. Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. **Veterinary Microbiology**. v. 139, p. 284-292, 2009.
- GARCIA, R.G.; CALDARA, F.R.; ABREU, A.P.N. Perspectivas de mercado do frango certificado alternativo no estado de São Paulo. Projeto da disciplina de Tópicos em sistemas de gestão agroalimentar. **Botucatu: FMVZ-UNESP**, 2002.
- GRAHAM, J.P.; PRICE, L.B.; EVANS, S.L.; GRACZYK, T.K.; SILBERGELD, E.K. Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. **Science Total Environmental**. v. 407, n. 8, p. 2701-2710, 2009.
- HAYES, J.R., ENGLISH, L.L., CARTER, P.J., PROESCHOLDT, T., LEE, K.Y., WAGNER, D.D., WHITE, D.G. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Retail Meats. **Applied and Environmental Microbiology**. 69, 7153-7160, 2003.
- MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DEVUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**. 106,1-24, 2006.
- SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 17, 431-437, 2001.
- SHEPARD, B.D.; GILMORE, M.S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes Infections**. 4, 215-224, 2002.

AValiação DO Crescimento Micelial E Esporulação DE Isolados Polispóricos E Monospóricos DE *BIPOLARIS SOROKINIANA* EM Distintos Meios De Cultura

Thaísa Feltrin¹; Michele Bertoni Mann²; Elisandra Minotto²; Cristina Spadari³, Sueli T. Van Der Sand⁴

¹Estudante do curso de Biomedicina da Feevale E-mail: thaifeltrin@gmail.com; <mailto:elisminotto@yahoo.com.br> ²Estudante de doutorado do PPGMAA do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde UFRGS; E-mail: michele.mann@ufrgs.br, elisminotto@yahoo.com.br; ³Estudante do curso de Ciências Biológicas da UFRGS. E-mail: cris_spadari@hotmail.com; <mailto:elisminotto@yahoo.com.br> ⁴Prof. Assistente III, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Ciências Básicas da Saúde UFRGS. Coordenadora do Grupo de Pesquisa. E-mail: svands@ufrgs.br

Resumo – *Bipolaris sorokiniana* é um fungo fitopatogênico responsável por perdas mundiais na cultura de trigo. Este fungo possui uma alta variabilidade fisiológica, morfológica e genética. O presente estudo teve por objetivo avaliar a cinética micelial e de isolados polispóricos e monospóricos de *B. sorokiniana* em diferentes meios de cultura. Foram utilizados 10 isolados polispóricos e 10 isolados monospóricos do fitopatógeno. Discos de 10 mm de diâmetro contendo micélio dos fitopatógenos foram transferidos para o centro de cada placa contendo os meios de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) e V8. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. A taxa de crescimento dos isolados foi avaliada a cada 24 horas. A contagem de esporos foi realizada em câmara de Neubauer. Na análise dos resultados observou-se que os isolados monospóricos, oriundos da mesma cepa polispóricas, apresentaram uma grande diversidade intra-específica, em relação ao crescimento micelial comparando os dois meios de cultura utilizados.

Introdução

O trigo (*Triticum* spp.) é um dos cereais mais comercializados do mundo, com uma grande importância para a produção de produtos alimentícios, bem como na elaboração de bebidas. No Brasil, o cereal é amplamente produzido, porém não o suficiente para suprir sua demanda interna. Instabilidades climáticas associadas ao aparecimento de doenças fúngicas podem resultar em uma diminuição da produção nacional, ocasionando perdas que podem chegar a 44,61% (PICININI; FERNANDES, 2000; PRATES; FERNANDES, 2001).

No Brasil e em outros países de clima quente e úmido a incidência da helmitosporiose, cujo agente causal é o fungo *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok) Shoemaker, 1959, é um grande problema. Este fungo é responsável por causar moléstias denominadas podridão comum da raiz, mancha marrom e ponta preta do grão (KUMAR et al., 2002). O seu controle é dificultado por apresentar uma grande variabilidade morfológica e fisiológica (POLONI et al., 2008). Técnicas moleculares como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), (OLIVEIRA et al., 2002; JAISWAL et al., 2007), PCR-RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) das regiões ITS (NASCIMENTO e VAN DER SAND, 2008) mostraram uma grande variabilidade inter e intra-específica na caracterização deste fitopatógeno.

O objetivo deste estudo foi avaliar a cinética micelial de isolados polispóricos e monospóricos de *B. sorokiniana* em diferentes meios de cultivo.

Materiais e Métodos

Neste trabalho foram utilizados 10 isolados polispóricos e 10 isolados monospóricos de *B. sorokiniana* estes últimos oriundos dos mesmos isolados polispóricos, de diversas regiões do Brasil e do México, pertencentes à coleção do laboratório.

Para a realização dos experimentos de crescimento micelial *in vitro*, foram utilizados dois meios de cultivo distintos: BDA (ágar batata dextrose) e V8 (200 mL de suco de vegetais V8 "Campbell Soup Co."; 16 g de ágar; 3,2 g de CaCO₃ e 800 mL de água destilada). Os meios foram vertidos em placas de petri (90 x 15 mm) e para cada placa foi transferido um disco de cultura, com 10 mm de diâmetro contendo o fitopatógeno, o qual foi depositado no centro da placa.

O crescimento foi mensurado com o auxílio de paquímetro, em oito direções ortogonais, a cada 24 horas, durante o período de incubação que encerrava quando uma colônia atingia a proximidade da borda da placa em um dos tratamentos ou após cinco dias (120 horas) de incubação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, compreendendo 20 tratamentos. A unidade experimental constou de uma placa, sendo que foram realizadas três repetições/tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância e ao teste de Tukey ($\alpha=0,05$) para comparação das médias, utilizando-se o programa estatístico SASM - Agri (CANTERI et al., 2001)

Resultados e Discussão

Através da análise dos dados obtidos, verificou-se que os isolados polispóricos quando submetidos às mesmas condições de crescimento que isolados monospóricos apresentaram grande diversidade de crescimento micelial (Tabela 1). De modo geral, os isolados polispóricos apresentaram maior desenvolvimento do micélio fúngico quando comparados aos isolados monospóricos, nos dois meios de cultivo testados. A exceção a regra, foi observada na avaliação do crescimento micelial do isolado monospórico 98031C, no meio V8, o qual apresentou médias de crescimento iguais às dos isolados polispóricos 98032P, 98010P, 98034P, 98007P, 98012P e 98042P.

Tabela 1: Crescimento micelial (cm) de diferentes isolados monospóricos e polispóricos de *B. sorokiniana*, cultivados em BDA e V8, após 120 horas de incubação.

Crescimento Micelial (cm)							
Meio de cultivo BDA				Meio de cultivo V8			
Isolados	Médias	Isolados	Médias	Isolados	Médias	Isolados	Médias
98007P	4,47 a	98013P	2,57 abcd	98032P	7,55 a	98025C	5,41 bc
98032P	4,33 a	98031P	2,44 abcd	98010P	7,37 a	BS52M2P	5,07 bcd
98023P	3,76 ab	98010P	2,26 bcd	98031C	7,15 a	"98013C	4,75 cd
98042P	3,33 abc	98013C	2,08 bcd	98034P	7,14 a	98013P	3,98 cd
98034P	3,31 abc	98034C	2,07 bcd	98007P	7,06 a	98042C	3,88 cde
BS52M2P	3,28 abc	98023C	1,95 bcd	98012P	7,03 a	98032C	3,33 cde
98007C	3,05 abcd	98032C	1,90 bcd	98042P	6,90 a	98023C	2,48 d
98012P	2,93 abcd	98012C	1,87 bcd	98031P	6,65 ab	98034C	2,25 d
98031C	2,87 abcd	98042C	1,83 bcd	98023P	6,59 ab	98012C	1,72 de
98025P	2,83 abcd	98010C	1,61 cd	98007C	5,65 b	BS52M2C	1,38 de
98025C	2,72 abcd	BS52M2C	1,12 d	98025P	5,60 b	98010C	0,91 e
C.V. 14,42 %				C.V. 12,42 %			

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem pelo teste de Tuckey ($\alpha= 0,05$). A letra P refere-se a isolados polispóricos e M a isolados monospóricos.

Os isolados polispóricos 98007P e 98032P demonstraram crescimento micelial significativamente superior quando comparados aos demais, no meio de cultivo BDA, não diferindo estatisticamente do isolado 90823P. Por outro lado, o isolado BS52M2 apresentou as menores médias de desenvolvimento nos dois meios de cultivos, não diferindo significativamente das médias observadas para 98010C no meio V8.

Quando os isolados são analisados em diferentes meios de cultivo ou até mesmo em um mesmo substrato, como relatado neste estudo, observa-se uma grande variabilidade de comportamento em relação ao crescimento micelial. Artigiani Filho e Bendo (1996) relatam que o comportamento dos isolados pode estar relacionado aos componentes de cada meio de cultivo. Segundo Poloni et al. (2008) ao considerar a origem geográfica dos isolados, observa-se que o crescimento micelial foi também variável, mesmo entre aqueles provenientes de uma mesma região.

Conclusão

Os isolados monospóricos oriundos da mesma cepa polispórica apresentaram uma grande diversidade intra-específica, em relação ao crescimento micelial comparando os dois meios de cultura utilizados.

Referências

- ARTIGIANI FILHO, V. H.; BEDENDO, I. P. Variabilidade de *Helminthosporium oryzae* detectada através da ocorrência de setores na colônia, sensibilidade a fungicidas, crescimento em diferentes meios de cultura e temperatura de incubação. **Summa Phytopathologica**, v.22, p. 217-221, 1996.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V.; SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.
- JAIWAL, S.K.; SWETA, L.C.; PRASAD, S.; SHARMA, S.; KUMAR, S.; PRASAD, R.; PANDLEY, S. P.; CHAND, A.K.; JOSHI, A.K. Identification of molecular marker and aggressiveness for different groups of *B. sorokiniana* isolates causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Current Microbiology**, v. 55, 135-141, 2007.
- KUMAR, J. SCHAFER, P.; HOCKELHOVEN, R.; LANGEN, G.; BALTRUSCHAT, H.; STEIN, E.; NAGARAJAN, S.; KOGEL, K.H. . *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches toward better control. **Molecular Plant Pathology**, v. 3(4), p. 185-195, 2002.
- NASCIMENTO, E.J.M.; VAN DER SAND, S.T. Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana*. **World Journal of Medical Microbiology**, v.24, p. 647-652, 2008.
- OLIVEIRA, A. M.; PRESTE, A.; MATSUMURA, A.T.; SAND, S. V.D.T.; MATTOS, G.S. Study of intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* by random polymorphic DNA. **Genetics and Molecular Research**, v.1(4), p.350-358, 2002.
- PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Controle químico de mancha angular e da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 25, p. 92-94, 2000.
- POLONI, A.,MULLER, M.V. PESSI, I., VAN DER SAND, S.T. Analysis of morphological and growth rate variability of conidial and monoconidial cultures of *Bipolaris sorokiniana*. **Revista de Biociências**, v.16 n. 1, 2008.
- PRATES, L. G.; FERNANDES, J. M. C. Avaliando a taxa de expansão de lesões de *Bipolaris sorokiniana* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**. v.26(2), p.185-191, 2001.

BACTÉRIAS ISOLADAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA PRODUZEM COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME E ANTIBIÓTICA

Susana de Oliveira Elias¹; Igor Stelmach Pessi²; Alexandre José Macedo³

¹Estudante do curso de Biomedicina (UFRGS); E-mail: susanaelias@gmail.com; ²Estudante de mestrado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia (UFRGS); ³Professor Adjunto do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia (UFRGS); E-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br

Resumo - O ambiente Antártico é caracterizado por condições desafiadoras para a sobrevivência de microrganismos nativos. Assim, para que esses organismos possam crescer, todo metabolismo deve estar adaptado. Devido à pronunciada competição nesse ambiente, é provável que os microrganismos produzam moléculas com atividade antibiofilme e antimicrobiana como forma de defesa. Esses compostos têm uma ampla aplicação na área médica, devido à dificuldade da erradicação de biofilmes já formados. O objetivo deste trabalho é prospectar moléculas antibiofilme e antimicrobiana em microrganismos isolados da Antártica. Isolados pertencentes à coleção do laboratório foram testados para capacidade de inibir o crescimento e formação de biofilme por diferentes linhagens de *Staphylococcus epidermidis*. Para obtenção dos extratos, os isolados foram cultivados em meio líquido por quatro dias a 25 °C e 150 rpm, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por uma hora, esterilizadas por filtração em membrana de 0,2 µm e utilizadas em nossos ensaios. A atividade antibiofilme foi verificada pelo ensaio de cristal violeta e a atividade antimicrobiana por diferença no crescimento verificada por absorbância a 600 nm. Os resultados demonstraram que até o momento quatro extratos foram capazes de inibir mais de 70% da formação de biofilme e outros três extratos apresentaram alta atividade antimicrobiana. Esses resultados apontam para a grande relevância de estudos envolvendo a prospecção de ambientes extremos. Novos ensaios estão sendo realizados para o rastreamento total da coleção e posterior purificação dos compostos bioativos.

Palavras-chave: biofilme, antibiofilme, Antártica, antimicrobiano

Introdução

O ambiente Antártico é caracterizado por condições desafiadoras para a sobrevivência de microrganismos nativos, tais como as mais baixas temperaturas, as maiores médias de altitude, os maiores índices de ventos, baixos níveis de nutrientes e umidade. Dessa forma, para que esses microrganismos possam crescer, todo o metabolismo deve estar adaptado. Ainda, devido à adversidade do clima, esses microrganismos desenvolvem diversas estratégias de sobrevivência, como, por exemplo, interações antagonistas interespecíficas que podem acarretar na liberação de compostos com atividade antimicrobiana e antibiofilme (MOJIB *et al.*, 2010).

Biofilme é um estilo de vida microbiano – adotado por cerca de 80% das bactérias do ambiente – no qual populações de microrganismos aderem-se a superfícies bióticas ou abióticas, produzindo uma matriz exopolissacarídica que reveste as colônias aderidas. Os nutrientes difundem-se na matriz por meio de canais e, devido à proximidade das células, há uma facilitação na troca de sinais moleculares que regulam o comportamento das populações microbianas residentes (sistema *quorum sensing*). O biofilme é um sistema estratificado, com gradientes químicos que criam microambientes para diferentes espécies microbianas ou níveis

de atividade. Desse modo, mesmo que haja danos nas camadas mais externas, a comunidade do biofilme sobrevive. Dessa forma, os biofilmes são capazes de colonizar todos os ambientes acessíveis aos seres vivos, proporcionando maior proteção e estabilidade a esses microrganismos (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

Na literatura há relatos de bactérias isoladas da Antártica com efeito antibiótico frente a microrganismos de origem alimentar em baixas temperaturas (O'BRIEN *et al.*, 2004). Entretanto, bactérias que produzam compostos com atividade antibiofilme ainda não foram relatadas. Considerando a competição entre os microrganismos e a adversidade do clima, é possível que microrganismos psicrófilos e psicrotróficos sejam potenciais fontes de compostos antibiofilme, que poderiam ser utilizados para diversos processos industriais e médicos, tais como: impregnação de moléculas em dispositivos médicos para evitar a formação de biofilme e utilização de moléculas para erradicação de biofilmes já estabelecidos em implantes de pacientes, evitando a resistência a antimicrobianos. Assim, o objetivo deste trabalho é prospectar moléculas antibiofilme e antibióticas em microrganismos isolados da península Antártica.

Materiais e Métodos

Os isolados da coleção do nosso laboratório provenientes de amostras de água, neve e solo da ilha Rei George (Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica) foram cultivados em meio líquido (LB, PCB, R2A, TSB ou caldo nutriente) por quatro dias a 25 °C e 150 rpm. Após, as culturas foram centrifugadas por uma hora a 4 °C e 10.000 rpm e esterilizadas por filtração em membrana de 0,2 µm, sendo posteriormente utilizadas para análise da capacidade de produzir compostos com efeito antibiótico ou de inibição e erradicação de biofilmes contra *Staphylococcus epidermidis* (ATCC35984) e seis linhagens desse mesmo microrganismo isoladas de cateter venoso central. A atividade antibiofilme foi verificada pelo ensaio de cristal violeta (STEPANOVIC *et al.*, 2007) e a atividade antimicrobiana por diferença no crescimento verificada por absorbância a 600 nm.

Resultados e Discussão

Até o momento, o ensaio do cristal violeta para inibição da formação de biofilme por *S. epidermidis* (ATCC35984) foi realizado para um total de 36 amostras. Dessas, 13 apresentaram ação antibiofilme e três apresentaram ação antibiótica (Figura 1). O ensaio do cristal violeta para erradicação de biofilme foi realizado para 10 amostras, dentre as quais apenas uma apresentou efeito antibiofilme de 26% (dados não mostrados). Como é possível observar na Figura 1, os três primeiros extratos – S22N2, S22N4 e N12N1 – tiveram ação antibiótica e os demais extratos ação antibiofilme.

Como a ação antibiótica pode levar ao desenvolvimento de mecanismos de resistência em bactérias, é de suma importância para a inibição e erradicação de biofilmes que os compostos utilizados não apresentem esse tipo de atividade. Nesse sentido, o extrato do isolado S22L2 foi selecionado para testes contra linhagens de *S. epidermidis* isoladas de cateter venoso central, pois teve alta atividade antibiofilme e nenhum efeito antibiótico. Foi obtida uma grande variação na inibição da formação de biofilme pelos seis isolados clínicos testados, sendo que apenas dois foram inibidos na mesma intensidade que a linhagem ATCC35984 (dados não mostrados). Esses dados sugerem a existência de uma grande variabilidade nas linhagens de um mesmo microrganismo obtidas do mesmo ambiente hospitalar.

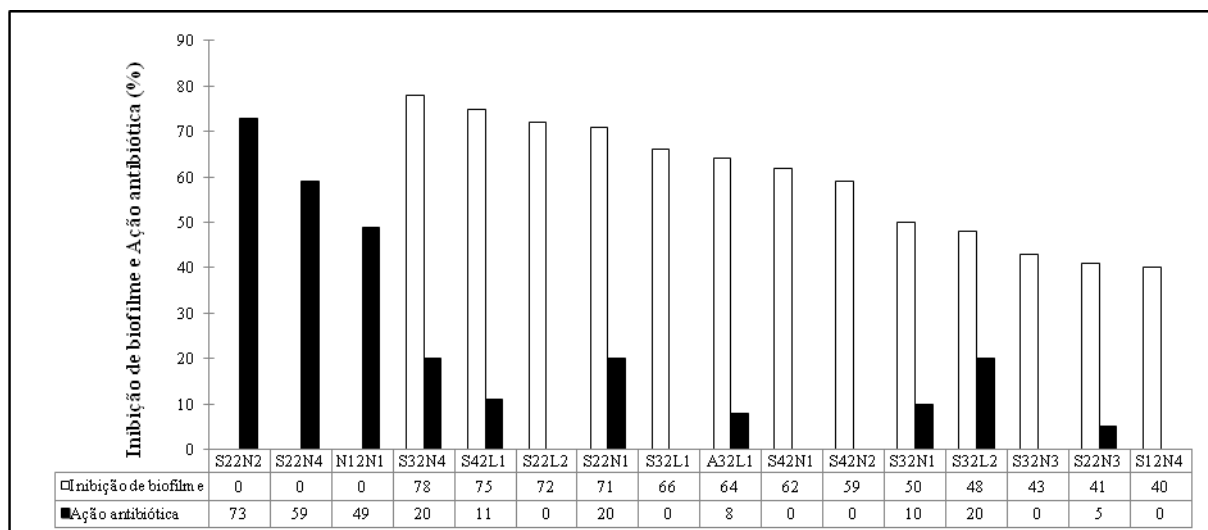


Figura 1. Porcentagem de inibição de biofilme e ação antibiótica pelos extratos testados.

Conclusões

Esses resultados apontam para a grande relevância de estudos envolvendo a prospecção de ambientes extremos, pois quase a totalidade dos isolados testados apresentaram alguma bioatividade. Além disso, é crescente a necessidade de compostos naturais bioativos que atuem na inibição dos biofilmes, visto que o uso de antibióticos propicia o desenvolvimento de resistência. Novos ensaios estão sendo realizados para o rastreamento total da coleção, também visando testes com outras espécies de bactérias e outros isolados clínicos de *S. epidermidis* e posterior purificação dos compostos bioativos.

Apoio

CAPES, CNPq, Centro Polar e Climático (UFRGS) e Laboratório de Análises Clínicas (FACFAR/UFRGS).

Referências

- MOJIB, N.; PHILPOTT, R.; HUANG, J. P.; NIEDERWEIS, M.; BEJ, A. K. Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 4, p. 531-540, 2010.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews microbiology**, v.2, p. 95-108, 2004.
- O'BRIEN, A.; SHARP, R.; RUSSELL, N. J.; ROLLER, S. Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, p. 157-167, 2004.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation APMIS**, v. 115, p. 891-899, 2007.

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS E BIOSURFACTANTE ISOLADAS DURANTE O ARMAZENAMENTO DE DIESEL E BIODIESEL

Naiara Aguiar Santestevan¹; Francielle Bucker²; Cristiane Barbosa³; Fatima Menezes Bento⁴

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas da UFRGS, Bolsista de Iniciação Científica do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS; naiara.santestevan@gmail.com; ²Mestre pelo PPGMAA-UFRGS; Pesquisadora do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS; franbucker@gmail.com; ³Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS; crisbbarbosa@gmail.com; ⁴Professora Adjunta do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS; fatimabento@yahoo.com

Resumo – Durante o armazenamento, o combustível está sujeito a bioteterioração por microrganismos. A biodegradação do combustível envolve enzimas e subprodutos que apresentam uma alternativa para a obtenção de moléculas orgânicas com potencial de uso na indústria e na recuperação de ambientes através da estratégia de bioprospecção. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial de produção de enzimas, de biossurfactantes, e a capacidade degradadora de óleo diesel por bactérias isoladas durante o armazenamento simulado de combustível. Bactérias isoladas no primeiro e aos 30 dias de armazenamento simulado de amostras de diesel (B0), biodiesel (B100) e misturas contendo 95% de diesel e 5% de biodiesel (B5) ou 80% de diesel e 20% de biodiesel (B20), foram submetidas a testes em placa quanto à produção de lipase, esterase e biossurfactante. A capacidade dos isolados em utilizar o óleo diesel como única fonte de carbono foi avaliada através do teste de degradação de hidrocarbonetos e também pelo crescimento em placa contendo óleo diesel em sua composição. Das 26 bactérias isoladas, 10 cresceram em meio seletivo para o gênero *Pseudomonas*. Quanto à atividade enzimática, 38% apresentaram atividade lipídica e 42% atividade esterásica. A produção de biossurfactante foi detectada em 2 isolados do gênero *Pseudomonas*. A capacidade em degradar hidrocarbonetos foi observada em 13 isolados; e a capacidade de crescer em meio contendo óleo diesel foi demonstrada por 19 isolados. Foi possível detectar a produção de enzimas lipase e esterase, a produção de biossurfactantes e a capacidade em degradar diesel por alguns dos isolados.

Palavras-chave: diesel; biodiesel; bactérias; enzimas; biossurfactante.

Introdução

Durante o armazenamento, o combustível está sujeito à contaminação por impurezas, à degradação microbiológica, oxidativa e, conseqüentemente à formação de borra (ANP). A contaminação microbiana, na presença de água, leva ao desenvolvimento de microrganismos que utilizam o diesel e o biodiesel como fonte de carbono e energia. A biodegradação do combustível envolve enzimas e subprodutos que podem apresentar potencial de uso na indústria e em processos de recuperação de ambientes contaminados, como a biorremediação. Neste sentido, a bioprospecção é uma estratégia extremamente útil para a obtenção de moléculas orgânicas com alto potencial de aplicação nestes setores.

O objetivo do estudo foi avaliar o potencial de produção de enzimas lipases e esterases, e de biossurfactantes por bactérias isoladas durante o armazenamento simulado de

diesel e biodiesel. Além disso, investigar a capacidade destes microorganismos em degradar óleo diesel.

Materiais e Métodos

As bactérias foram isoladas durante o armazenamento simulado de diesel (B0), mistura de 95% de diesel e 5% de biodiesel (B5), mistura de 80% de diesel e 20% de biodiesel (B20), e de biodiesel (B100), em tanques de aço-carbono, com capacidade para um litro. As coletas das amostras foram realizadas no primeiro e aos 30 dias de armazenamento. O isolamento baseou-se na morfologia colonial. Assim, aquelas que apresentavam diferenças visuais em uma mesma placa, para os diferentes tempos e tratamentos, foram isoladas.

A produção de lipase foi determinada pelo método de hidrólise de triacilglicerol na presença de Rodamina B (Shelley *et al.*, 1987). A produção de esterase foi determinada pelo meio de cultura descrito por Sierra (1957). A produção de biossurfactantes foi determinada de acordo com Bodour & Maier (2002). Esta técnica foi originalmente desenvolvida para selecionar ramnolípidios, biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, mas pode ser utilizada para selecionar qualquer biossurfactante aniônico de baixo peso molecular.

A capacidade dos isolados bacterianos em utilizar o óleo diesel como única fonte de carbono foi testada. Utilizou-se o teste de degradação de hidrocarbonetos (óleo diesel), descrito por Bradock *et al.* (1999); e, também, os isolados foram crescidos em placas contendo Meio Mínimo Mineral (Richard & Vogel, 1999), ágar e óleo diesel.

Resultados e Discussão

A partir do armazenamento simulado de combustível B0, B5, B20 e B100 isolou-se 26 bactérias, morfologicamente distintas. No primeiro dia de avaliação isolou-se três bactérias do tratamento B0; 2 do tratamento B5; 5 do tratamento B20; e, 1 do tratamento B100. Aos 30 dias de armazenamento isolou-se 3 bactérias do tratamento B0; 4 do tratamento B5; 3 do tratamento B20; e, 4 do tratamento B100.

Avaliou-se a produção de enzimas lipase e esterase pelo fato de serem enzimas que são responsáveis pela degradação inicial dos ésteres de ácidos graxos, presentes no biodiesel, assim, verificou-se que 38% dos isolados apresentou atividade enzimática lipolítica, sendo que nenhum destes foi isolado no primeiro dia de armazenamento (T0). A atividade enzimática para esterase foi detectada em 11 (42%) dos 26 isolados.

A produção de biossurfactantes pode ser uma característica de bactérias que tem a capacidade de se desenvolver utilizando substratos como petróleo ou derivados, como o diesel (Desai&Banat, 1997). São compostos que aumentam a disponibilidade do hidrocarboneto ao microorganismo (Nitche & Pastore, 2002). Assim, verificou-se duas bactérias produtoras de biossurfactante, do tipo ramnolípideo, isoladas do tratamento B0 (apenas diesel).

Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. são encontradas em sistemas de armazenamento de combustíveis (Bento *et al.*, 2001). A partir do meio seletivo para o gênero *Pseudomonas*, denominado cetrimide, verificou-se que 38% das bactérias isoladas pertencem ao gênero. Além disso, a presença deste gênero foi observada somente aos 30 dias de armazenamento, sugerindo uma provável sucessão microbiana nesse sistema.

Embora diversos microrganismos sejam isolados de tanques de armazenamento, nem todos possuem a capacidade em biodegradar o combustível, uma vez que os contaminantes biológicos estão presentes no ambiente. Desta maneira, é necessário testar a habilidade dos isolados em utilizar o hidrocarboneto, como fonte de carbono energia. Neste sentido, verificou-se que no teste sugerido por Bradock *et al.* (1999), 5 dos 11 isolados no primeiro dia de armazenamento degradaram o óleo diesel; e, aos 30 dias, 8 dos 15 isolados. Nas placas

contendo meio mínimo mineral, óleo diesel como fonte de carbono e ágar, todos os isolados do primeiro dia de armazenamento demonstraram crescimento. Em relação aos isolados do tempo 30 dias, 8 dos 15 isolados apresentaram crescimento em placa.

Conclusões

Foi possível detectar a produção de biossurfactantes por alguns isolados, bem como a produção de enzimas lipase e esterase.

Apoio

CNPQ, FINEP e Ipiranga.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Anuário Estatístico – 2007**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/conheca/anuario_2007.asp>. Acesso em: 06 jan. 2009.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 47, n. 2, p. 107-112, 2001.
- BRADDOCK, J. F., CATTERALL, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.3, p.81-84, 1999.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.1, p.47-64, 1997.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, Campinas, v. 25, n. 5, p.772-776, 2002.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.44, n.2-3, p.93-100, 1999.
- SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C. & MACRAE, I. C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **Journal of Microbiology Methods**, v. 6, p. 123-137, 1987.

BIORREDUÇÃO E BIOSORÇÃO DO COBRE PELO EXTRATO DE CÉLULAS LIVRES E CÉLULAS INTACTAS

Robson Andreazza¹⁴; Simone Pieniz²; Benedict Okeke³; Flávio Anastácio de Oliveira Camargo⁴; Márcio Rodrigues Lambais¹

¹Pós-Doutorando do Departamento de Solos – USP-ESALq; Bolsista CNPq; E-mail: robsonandreazza@yahoo.com.br / Professor USP-ESALq; E-mail: mlambais@esalq.usp.br;

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS; E-mail: nutrisimone@yahoo.com.br; ³Professor do Departamento de Biologia, Auburn University at Montgomery / AUM – USA; E-mail: bokeke@aum.edu; ⁴Professor do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia – UFRGS; Bolsista CNPq; E-mail: fcamargo@ufrgs.br

Resumo – A cobre redutase é produzida pelos micro-organismos para facilitar a absorção do cobre pelas ATPases para dentro das células aumentando a absorção deste elemento. Este estudo avaliou a redução do Cu(II) pelo extrato de células livres de uma bactéria (*Pseudomonas* sp. NA) altamente resistente ao cobre, isolada de um solo de vitivinicultura contaminado com cobre. As células intactas e o extrato de células livres apresentaram alta capacidade de redução do Cu(II). As células intactas reduziram mais de 80 mg L⁻¹ de Cu(II) do meio líquido contendo 200 mg L⁻¹ de Cu(II) após 24 h de incubação. O extrato de células livres do isolado reduziu mais de 65% do Cu(II) na concentração inicial de 200 mg L⁻¹ de Cu(II) após 24 h de incubação. Foi observado uma alta produção de proteína solúvel após 72 h de incubação em uma concentração de 100 mg L⁻¹ de cobre, com mais de 60 µg L⁻¹ de proteína no extrato de células livres. A redução do Cu(II) pelo isolado NA tanto pelo extrato de células livres quanto pelas células intactas foram aumentadas quando a concentração de cobre aumentou. Os resultados indicam que o isolado NA produz a enzima cobre redutase como ponto chave no mecanismo de biotransformação do cobre.

Palavras-chave: áreas contaminadas com cobre; cobre redutase; biorredução; biossorção.

Introdução

A poluição ambiental por metais pesados têm se tornado um problema mundial. A contaminação ambiental por metais pesados é um problema sério e necessita de técnicas de remediação destes locais. Normalmente, o cobre é encontrado no ambiente na forma de Cu(II), mas pode ser reduzido para Cu(I). A biorredução do Cu(II) à Cu(I) é catalisada pela cobre redutase. Esta redução aumenta a mobilidade do cobre e, conseqüentemente, a biodisponibilidade do cobre às ATPases da parede celular (WHITELEY & LEE 2006). O Cu(I) é rapidamente bombeado para dentro das células pelas ATPases (WHITELEY & LEE 2006), as quais regulam o bombeamento para dentro e para fora das células microbianas (SAITOH et al. 2009). Além do mais, a redução do Cu(II) a Cu(I) pode promover a sorção do cobre pela biomassa microbiana e biolixiviar o cobre de solos contaminados *in situ* e *ex situ*. Além disso, há uma deficiência de informações científicas na redução do cobre por enzimas de células livres de bactérias. Este trabalho teve como objetivo estudar a redução do Cu(II) por extrato de células livres e células intactas de *Pseudomonas* sp. NA, altamente resistente ao cobre, isolada de solo de vitivinicultura contaminado com cobre.

Materiais e Métodos

A bactéria resistente ao Cu(II) foi isolada e caracterizada como *Pseudomonas* sp. NA por ANDREAZZA et al. (2010). O isolado foi inoculado em tryptic soy broth (TSB) contendo 100 mg L^{-1} de cobre divalente e incubado à 35°C . O crescimento, a atividade da redução do cobre de extrato de células livres, a proteína solúvel e o cobre reduzido pelas células intactas foram avaliados em 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h. As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante foi analisado pela redução do cobre e proteína solúvel. A suspensão de células de *Pseudomonas* sp. NA foi obtida por rompimento ultra-sônico, seguido da centrifugação ($9500 \times g$ por 10 min à 4°C). O cobre monovalente foi quantificado de acordo com a metodologia descrita por ANDREAZZA et al. (2010). O crescimento microbiano foi determinado pela densidade ótica (DO_{600}). O tempo de redução do Cu(II) pelo extrato de células livres utilizando diferentes concentrações ($50, 100$ e 200 mg L^{-1}), foi avaliado em 0, 3, 6, 9, 12 e 24 h à 30°C .

A concentração de proteína solúvel foi avaliada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a análise do efeito de doadores de elétrons, foi utilizado o meio FTW (FOCHT 1994) na ausência do cobre. Os doadores de elétrons utilizados foram o acetado de sódio, extrato de leveduras, lactose, glicose, galactose, frutose e TSB à concentração de 10 g L^{-1} . Para a análise do efeito dos íons metálicos, foram utilizados HgCl_2 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KCl , Na_2SO_4 and ZnSO_2 à concentração de 1.0 mM . Após o crescimento do isolado NA, o extrato de células livres e as células intactas foram avaliadas.

Resultados e Discussão

A redução do Cu(II) pelo extrato de células livres do isolado de *Pseudomonas* sp. NA foi maior quando testado na maior concentração (200 mg L^{-1}) e reduziu mais de 65% do Cu(II) inicial da reação de mistura. A resistência ao Cu(II) foi máxima em 48 h de incubação, com leitura de 6,08 de DO_{600} (Figura 1B). A maior produção de proteína solúvel foi observada em 72 h de incubação com produção de $58 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já a redução do cobre pelas células intactas e extrato de células livres foi mostrado após 24 h de crescimento em meio contendo 100 mg L^{-1} de cobre à 35°C com redução maior de 94 e 84 mg L^{-1} de cobre, respectivamente (Figura 1B).

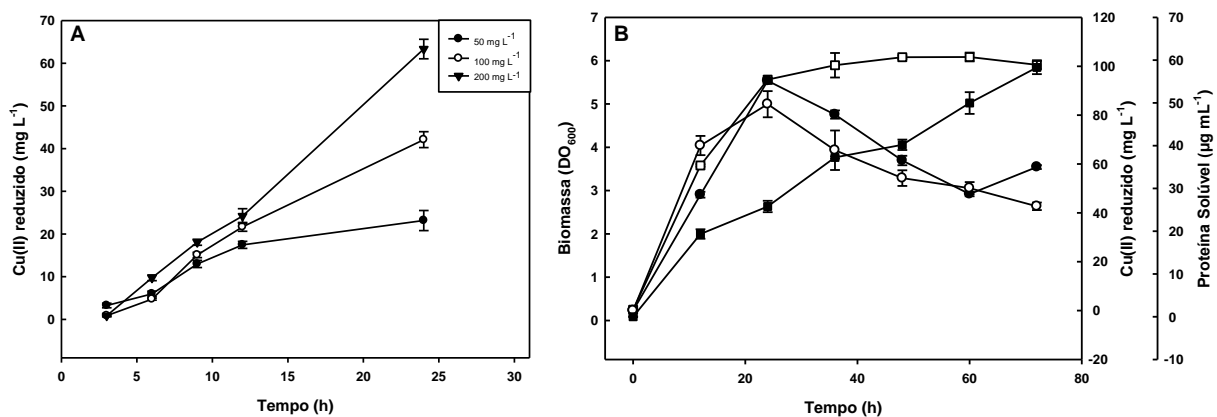


Figura 1 Tempo de redução do Cu(II) em diferentes concentrações de Cu(II) (A); e tempo de produção de biomassa (□); redução do cobre por células intactas (●) redução do cobre pelo extrato de células livres (○); e proteína solúvel (■) em meio de cultura TSB do isolado de *Pseudomonas* sp. NA contendo Cu(II) (100 mg L^{-1}) e incubado à 35°C por 72 h (B). As barras de erros representam o erro padrão das médias.

O melhor tratamento na produção de biomassa foi com a utilização de extrato de leveduras ($DO_{600}=0,20$), seguido dos tratamentos com frutose e glicose (Tabela 1). A frutose mostrou efeito positivo na redução do Cu(II) pelas células intactas (mais de 40 mg L^{-1} de Cu(II)) em comparação com os demais tratamentos. O extrato de células livres aumentou mais de 30% na atividade da cobre redutase no tratamento contendo glicose, comparado com o tratamento controle. A atividade enzimática pode ser afetada especificamente por ativadores e inibidores (SCOPE, 1994). Observou-se uma alta produção de proteína solúvel pelo isolado de *Pseudomonas* sp. NA. Esta produção de proteínas pode ser relacionada com as proteínas envolvidas no transporte de íons de cobre, as quais podem facilitar a mobilidade do cobre (SAITOH et al., 2009).

Tabela 1. Efeito dos diferentes aceptores de elétrons na produção de biomassa, cobre reduzido, atividade relativa e proteína solúvel no extrato de células livres, após a incubação do isolado *Pseudomonas* sp. NA em meio mineral contendo 100 mg L^{-1} de cobre e incubado por 24 h.

	Crescimento	Cu(II) reduzido	Atividade relativa	Proteína solúvel
	--- DO_{600} ---	----- mg L^{-1} -----	----- % -----	----- $\mu\text{g L}^{-1}$ -----
Água	ND*	ND	100.00±1.48	ND
Acetato	0.09±0.01**	17.46±0.48	101.54±2.36	7.06±0.28
Lactose	0.08±0.00	13.42±1.48	106.11±2.09	7.35±0.42
Frutose	0.18±0.01	40.18±4.67	110.12±1.45	13.73±1.60
Ex.Leveduras	0.20±0.01	25.35±2.58	90.07±4.13	14.12±1.00
TSB	0.05±0.01	20.09±2.39	95.41±8.33	17.35±0.69
Glucose	0.17±0.00	26.32±2.11	131.25±1.30	16.08±1.97
Galactose	0.08±0.00	14.82±0.76	94.68±3.75	23.14±4.37

*ND- não determinado. **valores representam a média±erro médio.

Conclusão

Este estudo demonstra que o isolado *Pseudomonas* sp. NA, uma bactéria altamente resistente ao cobre, produz cobre redutase como chave na biorremocão do cobre. A enzima cobre redutase livre de células pode ser utilizada para facilitar a biorremocão do cobre em sistemas de biorreatores. Além do mais, ela pode ser utilizada para desenvolver um biossensor de poluição de cobre no ambiente.

Referências

- ANDREAZZA, R. et al. Characterization of copper biosorption and bioreduction by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 408, p. 1501-1507, 2010.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyes binding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 72, p. 248-254, 1976.
- FOCHT D.D. (1994). **Microbiological procedures for biodegradation research**. In: WEAVER R.W. et al. (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI.
- SAITOH, Y. et al. Phylogenetic analysis of heavy-metal ATPases in fungi and characterization of the copper-transporting ATPase of *Cochliobolus heterostrophus*, **Mycological Research**, v. 113, p. 737-745, 2009.
- SCOPE, R.K. (1994) **Protein purification: principles and practices**. 3rd ed. New York: Springer-Verlag. 380p.
- WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme Microbial Technology**, Amsterdam, v. 38, p. 291-316, 2006.

COPPER SPECIATION AFTER GROWTH OF OATMEAL RHIZOSPHERE BACTERIA

Robson Andreazza^{1,4}; Simone Pieniz²; Benedict Okeke³; Flávio Anastácio de Oliveira Camargo⁴; Márcio Rodrigues Lambais¹

¹Pós-Doutorando do Departamento de Solos – USP/ESALq; Bolsista CNPq; E-mail: robsonandreazza@yahoo.com.br ; ²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente –UFRGS; E-mail: nutrisimone@yahoo.com.br; ³Professor da Universidade de Auburn at Montgomery do Departamento de Biologia – Auburn University at Montgomery - USA; E-mail: bokeke@aum.edu; ⁴Professor do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia – UFRGS; Bolsista CNPq; E-mail: fcamargo@ufrgs.br

Abstract – Copper is a heavy metal widely used to microbial control in sprays in agriculture as in vineyards. Continuous use of these sprays, soils has been become contaminated with high copper concentrations, selecting resistant organisms as plants and bacterial. The aim of this work was isolate bacterial from rhizosphere of two resistant plants growing in vineyard soils, and characterize the environment conditions to copper resistance and bioremoval as temperature, pH and copper concentrations. The rhizosphere soils were sampled from oatmeal plants (*Avena sativa* L.) and transagem plants (*Plantago lanceolata* L.) localized in vineyard sites, characterized as Inceptisol and Mollisol respectively. Both soils were collected in the Embrapa experimental station, Bento Gonçalves, south of Brazil. It was isolated 11 microorganisms from soils, six from Inceptisol and 5 from Mollisol. It was used the four high resistant bacteria to further copper resistance evaluation, identified as *Pseudomonas putida* (A1), *Stenotrophomonas maltophilia* (A2) and *Acinetobacter calcoaceticus* (A6) isolated from *Avena sativa* rhizosphere, and *Acinetobacter calcoaceticus* (T5) isolated from *Plantago lanceolata* rhizosphere. All isolates had the same behavior on copper removal from liquid medium, with bioremoval of 30% of the total copper added (500 mg L⁻¹) after 24 h of growth. The copper speciation shows that isolates have high copper biotransformation capacity, with high copper sorption and reduction.

Keywords: rhizosphere bacterial; *Avena sativa*; *Plantago lanceolata*; vineyards; copper resistance.

Introduction

In vineyard areas of South of Brazil, oatmeal crops are widely used as soil protection against erosion and also to improve the physical and chemical properties, although, this specie has symptoms of copper toxicity (SANTOS et al. 2004). However, it is known that in many cases, phytoremediation may not have high efficient to remove these heavy metals from contaminated environments. Furthermore, it has been studied the action of microorganisms in heavy metals removal from contaminated environments (ANDREAZZA et al. 2010). In addition, microorganisms isolated from the rhizosphere of plants located in contaminated areas may be more efficient in copper uptake, as occurred with the *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp., isolated from the rhizosphere of wheat plants (VOSS & THOMAS 2001). The microorganisms can participate in many ways to copper resistance and copper removal in the environment (ANDREAZZA et al. 2010).

Copper speciation has been increased studies interest in recent years (SANTOS-ECHEANDIA et al. 2008), because it can help to explain how copper behavior happens in the environment. Furthermore, copper speciation can produce much more information for copper bioavailability to organisms (CUPPETT et al. 2006). It probable is connected to the interaction with microorganisms located in the rhizosphere zone. Based on this, the aim of this study was isolate and characterizes copper resistant microorganisms from oatmeal rhizosphere soil (*Avena sativa*) and transagem rhizosphere soil (*Plantago lanceolata*) sampled from vineyard areas contaminated with high copper concentrations in South of Brazil. We also evaluated the environmental conditions for growth of resistant isolates as well as the sorption and speciation of this metal in liquid medium.

Material and Methods

The time course of divalent copper removal by biosorption and reduction in liquid medium with copper was examined as follows. Nutrient broth medium amended with 500 mg L⁻¹ of Cu(II) was used. The medium was inoculated with 100 µL of each isolate (OD₆₀₀=0.85). Cultures were incubated at 30°C with shaking (150 rpm) and analyzed at different time intervals (0, 6, 24, 30 and 48 h). Biomasses, copper divalent, copper reduced and copper removed were then analyzed.

Total copper was analyzed using an atomic absorption spectrometer. Aliquots of culture supernatant (200 µL aliquots) were diluted 20 times and injected into the atomic absorption spectrometer. Copper remaining was calculated as the difference in total copper added to the medium and total copper removed from the medium after different microbial treatments. Copper reduction was quantified by measuring monovalent copper complex with 1 mM neocuproine hydrochloride (SMITH & MCCURDY 1952). Cultures were centrifuged (2,500 rpm, 10 min). For copper reduction, 1 mL aliquot of the cell-free culture supernatant was mixed with 2 mL of 1 mM neocuproine to complex Cu(I) and incubated for 30 min at 30°C in a 13 x 100 mm glass culture tubes. Thereafter the absorbance was read using a spectrophotometer at λ₄₅₄ (SMITH & MCCURDY 1952). Copper remaining and copper reduction were calculated from copper (I or II) standard curve (25 - 500 mg L⁻¹ of copper) prepared in nutrient broth medium. Bacterial resistance was determined by bacterial biomass, analyzed by optical density at λ₆₀₀ (OD₆₀₀).

Results and Discussion

The isolate A6 (*Acinetobacter calcoaceticus*) had the high of biomass production at 6 h of incubation with almost 0.65 OD₆₀₀ units, and after that the isolate increase the biomass to 0.75 OD₆₀₀ units until 48 h. The copper removal was increased until 48 h of incubation, with more than 160 mg L⁻¹ of copper removal from liquid medium amended with 500 mg L⁻¹ of copper. Consequently, the copper remaining in the medium was 340 mg L⁻¹, and from this concentration, more then 160 mg L⁻¹ of this copper was reduced to Cu(I), remaining only 265 mg L⁻¹ of Cu(II) originally added after 48 h of incubation (Figure 1).

Time course effect on copper speciation by *Acinetobacter calcoaceticus* T5 isolated from *Plantago lanceolata* rhizosphere is presented (Figure 2). This isolate had the exponential biomass production at 6 h of incubation with almost 0.40 OD₆₀₀ units, and after that the isolate increased the biomass to 0.45 OD₆₀₀ units until 36 h. The copper removal was increased until 36 h of incubation, with more than 190 mg L⁻¹ of copper removal from liquid medium amended with 500 mg L⁻¹ of copper. Consequently, the copper remaining in the medium was less than 310 mg L⁻¹ at 36 h of incubation, and in this concentration, more then 190 mg L⁻¹ of this copper was reduced to Cu(I), remaining only 120 mg L⁻¹ of Cu(II)

originally added after 36 h of incubation. The isolate T5 showed high efficient on copper biotransformation and copper removal from liquid medium, and it is not necessary high biomass production to reach high copper biotransformation.

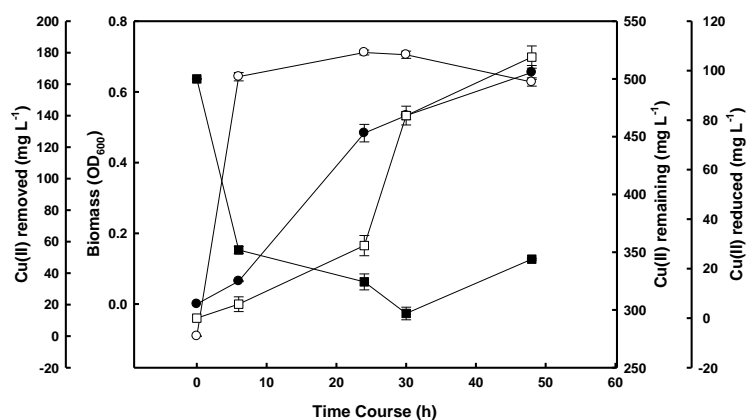


Figure 1 Time course of copper speciation after growth of isolate *Stenotrophomonas maltophilia* A2, isolated from *Avena sativa* rhizosphere, in nutrient broth medium amended with 500 mg L⁻¹ of copper (as CuSO₄), incubated for 48 h, at 30°C with shaking (150 rpm). Biomass (○), Cu(II) removed (●), Cu(II) remaining (■), and Cu(II) reduced (□) were evaluated. Error bars are standard errors of the mean.

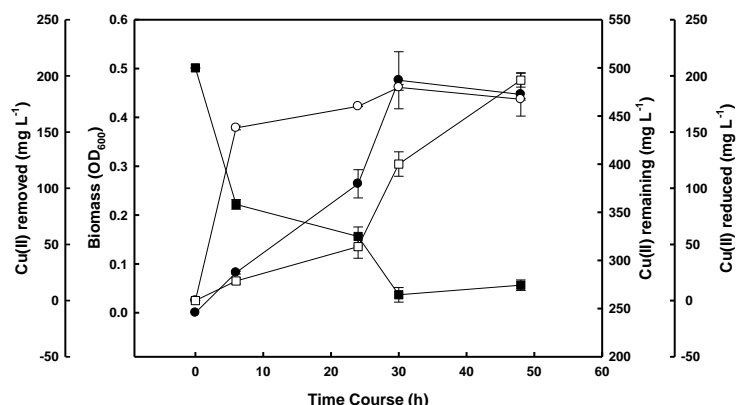


Figure 2 Time course of copper speciation after growth of isolate *Acinetobacter calcoaceticus* T5, isolated from *Plantago lanceolata* rhizosphere, in nutrient broth medium amended with 500 mg L⁻¹ of copper (as CuSO₄), incubated for 48 h, at 30°C with shaking (150 rpm). Biomass (○), Cu(II) removed (●), Cu(II) remaining (■), and Cu(II) reduced (□) were evaluated. Error bars are standard errors of the mean.

The highest sorption of copper by the isolates in this study was 190 mg L⁻¹ by isolate T5. The quantities removed in this work are higher than those removed from work done by other authors, such as 32 mg L⁻¹ by an isolate of *Pseudomonas putida* (CHEN et al. 2007) and 16 mg L⁻¹ copper by a single *Acinetobacter calcoaceticus* (CLAUSEN 2000). Although, the species of *Bacillus licheniformis* is highly efficient at removing 93% of the copper from medium (59 mg L⁻¹) (CLAUSEN 2000), but still our concentrations removed by our isolates 2.5 times higher, when compared with the strains studied by CLAUSEN (2000). This sorption capacity of copper may be an alternative for the copper removal from the environment by microorganisms, making the bacteria resistant to bioremediation a viable practice in environments contaminated with copper (ANDREAZZA et al. 2010). It is possible to say that resistant organisms can be effective in removing heavy metals such as copper, due to its ability for sorption the metal from environment.

Conclusions

Bacteria resistant to copper isolated from rhizospheric region of *Avena sativa* as *Stenotrophomonas maltophilia* (A2), *Pseudomonas putida* (A1) and *Acinetobacter calcoaceticus* (A6) and *Plantago lanceolata* plant as *Acinetobacter calcoaceticus* (T5) are resistant and effective in the copper removal from liquid medium with high copper concentrations. These isolates have high resistance to copper in various environmental conditions tested. In addition, concentrations of copper removed from the liquid medium by the isolates studied are high, showing high potential in using these isolates for bioremediation of copper contaminated areas.

References

- ANDREAZZA, R. et al. Characterization of copper biosorption and bioreduction by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 408, p. 1501-1507, 2010.
- CHEN, X. et al. Determination of copper binding in *Pseudomonas putida* CZ1 by chemical modifications and X-ray absorption spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 74, p. 881-889, 2007.
- CLAUSEN, C.A. Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. **Waste Management and Research**, Oxford, v. 18, p. 264-268, 2000.
- CUPPETT, J.D. et al. Evaluation of Copper Speciation and Water Quality Factors That Affect Aqueous Copper Tasting Response. **Chemistry Senses**, Amsterdam, v. 31, p. 689-697, 2006.
- SANTOS-ECHEANDIA, J. et al. Copper speciation in continental inputs to the Vigo Ria: Sewage discharges versus river fluxes. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 308-317, 2008.
- SANTOS, H.P. et al. **Comportamento fisiológico de plantas de aveia (*Avena strigosa*) em solos com excesso de cobre**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa, 2004. 10p. (Comunicado Técnico, 49).
- SMITH, C.F.; MCCURDY Jr., W.H. 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline – New specific in spectrophotometric determination of copper. **Analytical Chemistry**, New York, v. 24, p. 371-373, 1952.
- VOSS, M.; THOMAS, R.W.S.P. Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas do trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 947-951, 2001.

DESENVOLVIMENTO MICELIAL DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Pleurotus* spp. EM RESÍDUOS DA CULTURA DO ARROZ

Elisandra Minotto¹; Caroline Neugebauer Wille²; José Soares do Nascimento⁴

¹Estudante de doutorado do Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde/UFRGS; E-mail: elisminotto@yahoo.com.br; ²Estudante de doutorado do Curso de Fitossanidade do Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPel; E-mail: wille_carol@yahoo.com.br; ⁴Prof. Dr. do Departamento de Fisiologia e Parasitologia /UFPB, Coordenador do Grupo de Pesquisa. E-mail: jsnufpel@hotmail.com

Resumo - Cogumelos gênero *Pleurotus* possuem alto valor nutricional, são pouco exigentes em relação ao substrato e podem ser cultivados em diferentes resíduos lignocelulósicos, sendo sua produtividade diretamente relacionada a formulação do substrato. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar o crescimento micelial e colonização dos substratos palha e casca de arroz diferentes espécies de *Pleurotus* spp. Através de um ensaio *in vitro*, no qual discos de cultura das espécies fúngicas foram repicados para tubos contendo substrato casca ou palha de arroz, conforme o tratamento. As leituras do crescimento micelial foram realizadas a cada 24 horas. Os resultados demonstram um crescimento significativamente superior na casca de arroz do micélio fúngico de *P. ostreatus* (13,18 cm/dia) e também quando comparado a *P. ostreatoroseus* (12,615 cm/dia) e *P. citrinopilatus* (11,45 cm/dia). De modo geral, o desenvolvimento micelial das três espécies estudadas apresentou crescimento mais rápido no substrato casca de arroz em relação ao substrato palha, durante todo período de incubação.

Palavras chave: Cogumelos comestíveis, Shimeji, cogumelo ostra.

Introdução

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são encontrados naturalmente em florestas tropicais e subtropicais e são utilizados há muitas décadas, como alimento e/ou medicamento. As espécies desse gênero possuem alto valor nutricional, são pouco exigentes em relação ao substrato e podem ser cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos, sendo que conforme a formulação do substrato, maior produtividade poderá ser obtida (BERNARDI, 2007), assim como variações na composição química e nutricional do cogumelo.

Os fungos deste grupo são relatados como causadores da podridão branca da madeira (ROSADO et al., 2002; BONATTI et al., 2004), pela alta habilidade saprofítica e por degradar resíduos lignocelulósicos (RAGUNATHAN.; SWAMINATHAN, 2003). Isso se deve a presença de um complexo aparato enzimático capaz de degradar a lignina, celulose e a hemicelulose da madeira e de outros resíduos agroindustriais.

Vários resíduos lignocelulósicos são indicados para o cultivo de *Pleurotus* spp., tais como, palhas de vários cereais, resíduos de algodão, resíduos de cana-de-açúcar, polpa e casca de frutas, entre outros (EIRA, 2003; JOB, 2004). Sendo que o aproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais no cultivo de cogumelos torna-se importante pela agregação de valores e ao mesmo tempo, é uma alternativa inteligente para o descarte de resíduos.

O Rio Grande do Sul é um dos principais estados brasileiros produtor e beneficiador de cereais, especialmente de arroz, gerando uma considerável quantidade de resíduos, como grãos sem valor comercial, palha, casca de arroz e impurezas, todos com grande potencial

para a formulação de substratos a serem aproveitados na produção de *Pleurotus*. Além disso, a região apresenta condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de cogumelos comestíveis (DONINI, 2006). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética micelial de três espécies de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*, cultivadas em palha e casca de arroz (*Oryza sativa*), para se determinar a condição ótima de crescimento micelial.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Micologia – LEMICO - Departamento de Microbiologia e Parasitologia – DEMP - Instituto de Biologia – IB - Universidade Federal de Pelotas, RS. As espécies fúngicas utilizadas foram *P. ostreatus* (BF24), *P. ostreatoroseus* (POR01/06) e *P. citrinopiliatus* (PAM), pertencentes à micoteca do LEMICO/DEMP/IB/UFPel e preservadas em óleo mineral. As mesmas foram recuperadas em meio de cultivo CDA (capim-elefante+dextrose+Agar) e incubadas a 28 °C por 10 dias.

Para a realização do ensaio *in vitro* os substratos palha e casca de arroz secos foram previamente umedecidos por 24 horas. Após, a água foi escorrida e os substratos foram acondicionados em tubos de ensaio (2,5 x 20 cm). Na base de cada tubo foi colocada uma porção de algodão umedecido em água destilada. Estes foram fechados com papel alumínio e filme plástico, e posteriormente autoclavados à 121 °C por 60 minutos. Em seguida, discos de cultura com 10 mm de diâmetro foram repicados para os tubos de ensaio contendo o substrato. Os mesmos foram fechados com papel alumínio e incubados a 28 °C. Realizaram-se leituras de crescimento micelial em quatro direções paralelas, a cada 24 horas, a partir de 96 horas após a repicagem, até a completa colonização do substrato em uma das repetições.

A variável analisada foi velocidade de crescimento micelial. O delineamento experimental, constituiu-se de 5 repetições para cada um dos tratamentos, inteiramente casualizados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variação e ao teste de Tukey para comparação das médias, utilizando-se o programa estatístico SASM-Agri (CANTERI et al, 2001).

Resultados e Discussão

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que o substrato casca de arroz promoveu crescimento significativamente superior do micélio fúngico de *P. ostreatus* (13,18 cm/dia), quando comparado a *P. ostreatoroseus* (12,62 cm/dia) e *P. citrinopiliatus* (11,45 cm/dia) e ao substrato Palha de arroz (tabela 1). Regina (2004) avaliando o desenvolvimento do cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) também encontrou resultados bastante promissores nos cultivos realizados nesse substrato suplementado com farelos. Da mesma forma, na colonização da palha de arroz observou-se médias de desenvolvimento micelial estatisticamente superiores para *P. ostresatus* (BF24 - 12,92 cm/dia) em relação as demais espécies (PAM - 11,061 cm/dia e POR 9,95 cm/dia).

Tabela 1. Média de crescimento micelial dos cogumelos *P. ostreatus* (BF24), *P. ostreatoroseus* (POR01/06) e *P. citrinopiliatus* (PAM) nos substratos palha e casca de arroz.

Tratamento	Média de Crescimento
BF24 Casca	13,18 a
BF24 Palha	12,915 ab
POR Casca	12,615 ab
PAM Casca	11,45 bc
PAM Palha	11,061 c
POR Palha	9,95 c
C.V 6,58%	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de TuKey no intervalo de 5%

De modo geral, o desenvolvimento do micélio de cogumelo das três espécies apresentou desenvolvimento mais rápido no substrato casca de arroz em relação ao substrato palha. No entanto, isso não inviabiliza a utilização de palha de arroz no cultivo de cogumelos deste gênero. Ensaio realizado por Bernardi (2007) demonstram a viabilidade da produção de cogumelos do gênero *Pleurotus* em palha de arroz, como também, evidenciam excelentes resultados no rendimento da produtividade. Utilização de resíduos da cultura do arroz como substrato para fungicultura além de ser uma alternativa economicamente viável para o produtor, também pode beneficiar o meio ambiente, pois a ação enzimática dos fungos acelera sua decomposição que é muito lenta, cerca de 5 anos (MAYER et al., 2006).

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos pode-se inferir que o substrato casca de arroz proporcionou um maior crescimento para as três espécies fúngicas testadas, com destaque para a espécie *P. ostreatus*. No entanto, ensaios avaliando a produtividade destas espécies de cogumelos são necessários para que esses resultados sejam confirmados e para que se possam adequar as técnicas de cultivo ao substrato casca de arroz.

Referências

- BERNARDI, E. **Cultivo de *Pleurotus* spp. em substrato capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) pasteurizado.** 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M.; FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v.88, p.425-428, 2004.
- CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24. 2001
- DONINI, L.P. **Cultivo de shimeji [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr) Kummer] em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) suplementados com farelos.** 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas
- EIRA, A.F. **Cultivo do “cogumelo-do-sol” (*Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann.** Viçosa: Ed. Aprenda Fácil, 2003. 203p.
- JOB, D. La utilización de la borra del café como substrato de base para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr) Kummer. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.21, p.195-197, 2004.
- MAYER, F.D; HOFFMANN, R.; RUPPENTHAL, J.E. Gestão Energética, Econômica e Ambiental do Resíduo Casca de Arroz em Pequenas e Médias Agroindústrias de Arroz. XIII SIMPEP, **anais do...** Bauru, SP, Brasil, p.1-11, 2006
- RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**, Oxford, v. 80, n. 3, p. 371-375, Mar. 2003.
- REGINA, M. Atividade de enzimas lignocelulósicas na crescimento de *Lentinula edodes* em Subprodutos Energéticos. **Tese** (Doutorado). UNESP. Botucatu, 2004.
- ROSADO, F.R.; CARBONERO, E.R.; KEMMEL-MEIER, C.; TISCHER, C.A.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1C4)-linked K-D-galactan and K-D-mannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Microbiology Letters**, n.21, p.261-265, 2002.

DIVERSIDADE DE ORGANISMOS PROCARIÓTICOS PRESENTES EM FITOTELMOS DE BROMÉLIAS EM UMA ÁREA DE MATA ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL

Catieli Gobetti Lindholz¹; Anelise Baptista da Silva²; Renata Medina da Silva³

¹Graduanda da Faculdade de Biociências da PUCRS. E-mail: catieli.lindholz@acad.pucrs.br ;
²Estudante do Curso de Especialização em Gestão da Qualidade do Meio Ambiente do Instituto do Meio Ambiente, PUCRS. E-mail: baptistane@yahoo.com.br; ³Coordenadora do Departamento de Biodiversidade e Ecologia da Faculdade de Biociências da PUCRS e membro do Grupo de Pesquisa em Imunologia e Microbiologia da PUCRS. E-mail: renata.medina@pucrs.br

Resumo - A família Bromeliaceae apresenta distribuição neotropical, incluindo espécies epífitas, terrícolas e saxícolas, ocorrendo tanto em habitats florestais úmidos como também em ambientes xerofíticos. Uma das principais características da família é a absorção de água e nutrientes através de escamas peltadas presentes nas folhas. Muitas espécies acumulam água da chuva, formando reservatórios que servem de habitat a diversas formas de vida, sendo assim, a presente pesquisa tem como objetivo a identificação e investigação de microorganismos procarióticos presentes em fitotelmos de duas espécies de bromeliaceae, sendo estas *Vriesea platynema* e *Aechmaea gamosepala*, presentes em uma área de Mata Atlântica no sul do Brasil.

Introdução

A família Bromeliaceae possui distribuição neotropical, incluindo cerca de 60 gêneros e 3.000 espécies epífitas, terrícolas e saxícolas. Uma das principais características da família é a absorção de água e nutrientes através de escamas peltadas presentes nas folhas. Um grande número de espécies acumula água da chuva junto a um reservatório (cisterna) formado a partir da inserção de suas bainhas foliares distribuídas de forma espiralada em um caule extremamente curto. Esses reservatórios servem de habitat a diversas formas de vida, incluindo microorganismos procarióticos e eucarióticos, bem como diferentes grupos de invertebrados e vertebrados (REITZ, 1983; CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). Este ecossistema recebe o nome de fitotelmo e apresenta características próprias que podem influenciar de forma importante na ecologia e fisiologia da própria planta hospedeira. Na presente pesquisa, microorganismos procarióticos isolados de fitotelmos de duas espécies de bromeliaceae (*Vriesea platynema* e *Aechmaea gamosepala*), oriundas do Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza PRÓ-MATA – PUCRS, estão sendo identificados e investigados quanto a características metabólicas importantes na interação com a planta hospedeira.

Material e Métodos

Para a investigação dos microorganismos presentes nos fitotelmos, foram analisadas amostras de água presentes em cisternas de cinco bromélias do gênero *Vriesea* e cinco do gênero *Aechmea*, coletadas no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza PRÓ-MATA – PUCRS, localizado no município de São Francisco de Paula, interior do Rio Grande do Sul. As coletas foram sazonais (verão, outono e inverno, até o presente momento) com a finalidade de visualizar possíveis alterações na composição estrutural das comunidades ali

existentes. As amostras coletadas foram, inicialmente, inoculadas em caldo BHI (infusão cérebro-coração, peptona, dextrose, cloreto de sódio e fosfato dissódico) e incubadas à temperatura ambiente, até atingirem crescimento em fase exponencial. Para o isolamento das colônias presentes nas amostras e testes de características metabólicas interessantes, os inóculos foram semeados no meio sólido BHI (com ágar 2%). Após a caracterização das colônias morfológicamente diferentes, os isolados selecionados foram corados através do método de Gram e observados através de microscopia óptica (1000X). Alguns isolados foram semeados no meio Nitrato-ágar (Himedia) para verificar a presença de bactérias oxidantes de nitrato.

Resultados e Discussão

Em relação às leveduras, microrganismos eucarióticos fúngicos presentes nas cisternas amostradas, foram obtidos, no total das coletas realizadas até o momento, 14 isolados, dos quais dez são oriundos das cisternas de *V. platynema* e quatro de *A. gamosepala*, cujo aspecto morfológico varia em termos de tamanho do microrganismo, tipo de brotamento (simples ou bipolar) e forma (arredondadas ou hexagonais). Quanto à procariotos, obtivemos até o momento um total de 91 isolados, dos quais 48 são oriundos das cisternas de *V. platynema* e 43 de *A. gamosepala*, onde o aspecto morfológico também é variável em tamanho, bem como formato de arranjo, sendo que a maioria possui forma de bacilos Gram negativos, agrupados em strepto ou diplobacilos. O número de isolados obtidos é intrigante, já que apenas um tipo de meio de cultura foi utilizado para o isolamento, o que significa que a real biodiversidade procariótica destes ecossistemas deva ser extremamente rica. Além disso, dos 12 isolados semeados até então no meio nitrato-ágar, 6 foram capazes de formar colônias e, portanto, mostraram a capacidade metabólica de oxidar este composto nitrogenado, indicando que estes microrganismos devem contribuir para uma diminuição da sua disponibilidade no meio aquático para utilização por parte da planta hospedeira.

Conclusões

Estes resultados preliminares não apenas apontam para a ocorrência de uma rica biodiversidade procariótica em fitotelmos de ambas as espécies de bromélias investigadas como também indicam que estes microrganismos exercem uma importante influência nos nutrientes disponíveis neste ecossistema aquático, especialmente para a planta hospedeira. O presente projeto prevê uma análise de metagenômica para a identificação de toda a microbiota procariótica e também eucariótica presente nos fitotelmos investigados.

Apoio
CNPq

Referências

- JIANPING, X. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. 2006. **Molecular Ecology**. 15 1713–1731.
- REITZ, R. 1983. Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. Fl. Ilustr. Catarinense, Parte. **Fasc. Brom.** 518p.

Projeto: “Caracterização em múltiplos níveis da biodiversidade presente em fitotelmos de bromélias em uma área de Mata Atlântica no sul do Brasil”

ESTUDO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE PROCESSO DE COMPOSTAGEM

Anne Grazielle da Silva¹; Sueli T. Van Der Sand²

¹ Estudante do Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; e-mail: annegrazielle@gmail.com <mailto:themiscollares@yahoo.com.br>; ² Professora do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; e-mail: svands@ufrgs.br.

Resumo - Os actinomicetos são bactérias Gram positivas que apresentam potencial de produção de enzimas extracelulares e a formação de micélios aéreos. São amplamente distribuídos no ambiente e conhecidos pela produção de moléculas bioativas. A aplicação de enzimas, particularmente lipases vem se apresentando como uma alternativa atrativa para hidrólise de óleos e gorduras, principalmente quando consideradas vantagens na obtenção de produtos biodegradáveis e redução de resíduos. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade lipolítica de isolados de actinomicetos obtidos no processo de compostagem frente a óleos vegetais e diferentes temperaturas de incubação bem como selecionar potenciais produtores de lipases para posterior estudo de produção e caracterização. A atividade da enzima lipase foi avaliada pela hidrólise dos diferentes óleos a diferentes temperaturas e observada sob luz ultravioleta com 350nm de comprimento. A presença de rodamina B no meio e a emissão de fluorescência laranja indicam a produção da enzima e conseqüente degradação dos óleos. Os isolados que apresentaram atividade positiva foram cultivados em meio amido caseína agar (ACA) pela técnica de microcultivo e os gêneros identificados conforme a morfologia apresentada. Os resultados demonstram que a atividade da enzima lipase depende da temperatura de incubação e do tipo de substrato empregado. O gênero mais freqüente de actinomiceto na degradação dos óleos estudados foi *Nocardia sp* podendo seus metabolitos serem empregados em diferentes processos industriais.

Palavras-Chave: actinomicetos; atividade lipolítica; processos industriais.

Introdução

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas filamentosas que apresentam alto conteúdo de G+C em seu genoma. Sua morfologia assemelha-se a dos fungos filamentosos, porém seus filamentos são bem menores. Podem ser encontrados em diversos ambientes naturais, como a água, planta em decomposição, nódulos de raízes de plantas, sedimentos, fezes de animais, lodo ativado e produtos alimentícios, mas são encontrados principalmente no solo (McCarthy & Willians, 1992).

Uma característica marcante destes indivíduos é a produção de enzimas extracelulares que degradam macromoléculas complexas encontradas no solo além de sintetizar e excretar milhares de metabolitos, como antibióticos e geosmina, que dá o odor característico à terra molhada (Moreira & Siqueira, 2006). Este grupo de microrganismos produz diferentes enzimas como lipases, proteases, celulasas, xilanases, amilases, quitinases e pectinases que apresentam potencial para aplicação em diferentes processos na indústria têxtil, de alimentos, de detergentes, de papel e polpa, farmacêutica entre outras. As enzimas produzidas por estas bactérias apresentam uma grande estabilidade em diferentes faixas de pH e temperatura, o que as torna importantes em diferentes processos industriais. O gênero *Streptomyces* destaca-se

entre os actinomicetos pela capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas com aplicação industrial (Padilha, 1998).

A aplicação de enzimas, particularmente lipases (triacilglicerolacil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3), vem se apresentando como uma alternativa atrativa para hidrólise de óleos e gorduras, principalmente quando são consideradas algumas vantagens como obter produtos biodegradáveis e reduzir a quantidade de resíduos (Castro *et al.*, 2004). Lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos e glicerol na interface entre a fase aquosa e lipídica.

Este grupo de enzimas possui aplicações no processamento químico orgânico, na formulação de detergentes, na síntese de biosurfactantes, na indústria oleoquímica, agroquímica e de laticínios, na manufatura do papel, na nutrição, em cosméticos e na indústria farmacêutica (Liese *et al.*, 2000). As lipases aceleram a degradação de resíduos gordurosos (Masse *et al.*, 2001) além de apresentarem importância no processo de biorremediação (Hasan *et al.*, 2006).

Considerando o potencial biotecnológico dos actinomicetos e as aplicações das lipases em diferentes processos, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade lipolítica de isolados de actinomicetos provenientes de processo de compostagem sob diferentes temperaturas de incubação e diferentes óleos vegetais (óleo de oliva, biodiesel, etc.); identificar os isolados em nível de gênero, bem como selecionar potenciais produtores de lipases para posterior estudo de produção e caracterização.

Materiais e Métodos

Para a realização deste trabalho foram empregados 20 isolados de actinomicetos previamente isolados e conservados em glicerol originários de amostras de processo de compostagem. Alíquotas de 100 μ L dos isolados armazenados em glicerol foram semeadas em placas contendo o meio de cultivo ágar amido caseína (ACA) através da técnica de espalhamento de superfície com o auxílio de uma alça de Drigalsky. A incubação foi a 30° C por no mínimo sete dias, e posteriormente os as colônias foram isoladas pelo método de esgotamento, em placas contendo meio ACA. Os isolados foram mantidos em meio ACA inclinado à temperatura de 4°C para realização de estudos posteriores.

A atividade lipolítica foi observada após o crescimento dos isolados em meio de cultura contendo 0,5% de peptona, 0,1% de extrato de levedura, 0,4% de NaCl, 1% de agar, 2,5% óleo e solução de rodamina B 0,001% esterilizado em autoclave a 120°C. Os óleos foram esterilizados por filtração, com auxílios de uma bomba de vácuo, utilizando membranas de 0,22 μ m de diâmetro e conservados a temperatura ambiente para posterior distribuição no meio de cultura servindo como fonte de carbono. Os isolados foram inoculados na forma de picada, sendo as placas incubadas nas temperaturas de 30 e 40°C e com os tempos de incubação variando entre cinco e 21 dias conforme o substrato. A hidrólise dos diferentes óleos foi observada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 350nm. Foram observados halos de cor laranja ao redor dos actinomicetos que apresentam a enzima, devido à presença de rodamina B no meio de cultura, que emite fluorescência laranja na presença de ácidos graxos degradados.

A diferenciação dos gêneros foi realizada através da análise morfológica das colônias, a presença de micélio sob o substrato, micélio aéreo, arranjo e cadeia de esporos, superfície dos esporos, assim como presença de esporângio foram observados através do microcultivo conforme Holt et al. (1989).

Resultados e Discussão

Todos os isolados de actinomicetos empregados neste estudo apresentaram atividade lipolítica, variando conforme o substrato e a temperatura de incubação. Dos substratos testados, o biodiesel foi hidrolisado por 65% dos isolados nos ensaios a temperatura de 40 °C e por 45% no ensaio a 30 °C. Para o substrato óleo de gergelim, melhor atividade foi observada a temperatura de 40°C, onde 45% dos isolados apresentaram resultado positivo. Por sua vez, foi observado que nos ensaios com óleo de girassol os melhores resultados foram observados a temperatura de 30°C. Quando empregado o óleo de oliva, não foi observada diferença significativa em relação às temperaturas de incubação. Os resultados preliminares demonstram que a atividade lipolítica é dependente da temperatura de incubação e do tipo de substrato empregado. O gênero mais freqüente de actinomiceto na degradação dos óleos estudados até o presente momento foi *Nocardia sp* identificado pela técnica de microcultivo.

Conclusões

Os actinomicetos, especialmente pertencentes ao gênero *Nocardia* apresentam potencial biotecnológico podendo estes e/ou seus metabolitos serem empregados em diferentes processos industriais.

Referências

- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L.; **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. Química Nova, v. 27, p. 146-156, 2004.
- DUARTE, M.W.; DAMASCENO, R.G.; SALAMONI, S.P.; OLIVEIRA, M.F.; VAN DER SAND, S.T.; **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo**. Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- HASAN, F., SHAH, A. A. & HAMEED, A.; **Industrial applications of microbial lipases**. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235-251. 2006.
- KRIEG, N.R. & HOLT, J.G.; **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Volume 1: Gram-negatives of general, medical, or industrial importance. Baltimore: Williams & Wilkins, Co.1984
- LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. (editors). **Industrial biotransformation Weinheim: Wiley-VCH**, 2000.
- MASSE, L., KENNEDY, K. J. & CHOU, S. P.; **The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater**. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 76: 629-635. 2001.
- McCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T.; **Actinomycetes as agents of biodegradation in environment - a review**. Gene, Amsterdam, v. 115, p 189-192, 1990.
- PADILHA, G.; **Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais**. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: Embrapa CNPMA. 327-343. 1998.
- VIEIRA, F.C.V.; PIERRE, C.T.; CASTRO, H.F.; **Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática**. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, São Paulo, 2005.

INFLUÊNCIA NUTRICIONAL DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces* sp.

Themis Collares Antunes¹; Sabrina Pinto Salamoni²; Ana Paula Guedes Frazzon³, Sueli T. Van Der Sand³

¹Estudante do Curso de Biologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde; e-mail: themiscollares@yahoo.com.br; ²Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e-mail: sabrinapinto.salamoni@gmail.com; ³Professora do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde.. e-mail: svands@ufrgs.br; ana.frazzon@ufrgs.br.

Resumo: Os estreptomicetes são bactérias caracterizadas por sua habilidade em formar hifas. São amplamente distribuídos no ambiente e conhecidos pela produção de moléculas biologicamente ativas. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de seis isolados de *Streptomyces* frente a dezenove cepas de *Enterococcus* spp. Os estreptomicetos pertencem à bacterioteca do laboratório de microbiologia e foram identificados através de provas morfológicas, bioquímicas e molecular. O perfil de susceptibilidade dos *Enterococcus* foi avaliado para onze antibióticos, empregando a técnica de difusão de disco em ágar. A atividade antimicrobiana dos estreptomicetes foi avaliada pela técnica da dupla camada. Os isolados que apresentaram atividade foram cultivados em meio amido caseína (AC) à temperatura de 30°C por sete dias, em agitação constante. Após crescimento, a cultura foi filtrada para extração do extrato bruto teste. A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada através da técnica de difusão em poço. O isolado que apresentou maior espectro de atividade foi selecionado para crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Como perspectiva pretende-se realizar a separação dos compostos através de cromatografia em camada delgada e identificação molecular do isolado selecionado.

Palavras-Chave: actinomicetes; resistência a antibióticos; cocos gram positivas.

Introdução

Os actinomicetos correspondem a um grande grupo de bactérias gram-positivas que apresentam um crescimento de micélio aéreo e sobre o substrato ramificado. Tais bactérias são aeróbias, com alto teor de Guanina e Citosina em seu DNA, sendo encontradas em ambientes diversos, principalmente no solo. Os actinomicetos têm como propriedade mais notável a produção de compostos bioativos de relevância farmacêutica e agrícola. Estima-se que cada linhagem de actinomicetos tenha potencial genético para produzir de dez a vinte metabólitos secundários (Valan, 2009). Tais compostos se caracterizam por serem metabólitos secundários produzidos geralmente na fase tardia do seu desenvolvimento, dentre esses se encontram os antimicrobianos. Em alguns estudos, cerca de 50% de todos os *Streptomyces* isolados demonstraram serem produtores de tal substância (Madigan, 2004).

Considerando-se a grande importância médica e econômica dos antibióticos de estreptomicetos, esse trabalho tem como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de seis isolados de *Streptomyces* contra dezenove de *Enterococcus* multiresistentes de origem ambiental e clínica.

Material e Métodos

O perfil de susceptibilidade a antibióticos dos isolados de *Enterococcus* foi determinado através da técnica de difusão de discos em ágar, conforme determinado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - CLSI (2007). Os antibióticos empregados para a realização deste teste foram: ampicilina (AMP), cefoxitina (CFO), ciprofloxacino (CIP), clorofenicol (CLO), eritromicina (ERI), imipenem (IMP), nitrofurantoína (NIT), norfloxacin (NOR), penicilina (PEN), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN).

A atividade antimicrobiana dos seis isolados de *Streptomyces* foi realizada através da técnica de sobrecamada com inoculação em meio ágar amido caseína (ACA) onde os microorganismos cresceram por 10 dias a temperatura de 30°C. Posteriormente, 1 mL de uma suspensão de 10⁹ células/mL de *Enterococcus* foi adicionada a 9 mL de Müller Hinton e vertido sobre as placas seguindo uma incubação por 48h a temperatura de 37°C. A inibição microbiana foi observada determinando a formação de área de inibição de crescimento do antagonista.

Os isolados que apresentaram atividade efetiva foram cultivados em cultura submersa em meio amido caseína (AC) por 48h a 30°C, sob agitação constante. Após crescimento, a cultura foi filtrada para posterior ensaio de atividade antimicrobiana pela técnica da difusão em poço.

O isolado que apresentou maior atividade antimicrobiana em menor tempo foi crescido durante cinco dias sob diferentes fontes de carbono (amido, glicerol, sacarose e glicose). As amostragens de tempo utilizadas para a obtenção do extrato-bruto teste a ser usado na técnica de difusão em poço foram: P.I. (pré-inóculo), 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas. Determinada a melhor fonte de carbono, o mesmo isolado foi crescido sob diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de potássio, peptona, extrato de levedura e amônio sulfato). A metodologia empregada foi igual a utilizada para as fontes de carbono.

Resultados e Discussão

A maioria das amostras clínicas apresentou resistência a tetraciclina (60%), eritromicina (90%) e cefoxitina (80%). As amostras ambientais em sua grande parte tiveram resistência notável a eritromicina (55,56%) e cefoxitina (88,89%).

No ensaio de dupla camada os seis isolados de *Streptomyces* foram efetivos contra os *Enterococcus* spp. ambientais. Das amostras clínicas, apenas o isolado 155 de *Enterococcus* spp. não apresentou inibição por nenhum isolado de *Streptomyces*.

O extrato bruto do isolado 8S de *Streptomyces* mostrou maior atividade antimicrobiana contra *Enterococcus* spp., apresentando halos de inibição com valor mínimo e máximo de 23 cm e 37 cm.

Por ser preponderante sobre os outros isolados de *Streptomyces* sp., o isolado 8S foi selecionado para otimização do seu extrato bruto em diferentes fontes de carbono. A melhor atividade antibiótica ocorreu na presença do amido com formação de halos de 20-25 cm em 72 horas. A produção de metabólitos com atividade antimicrobiana foi notada a partir do pré-inóculo para sacarose e amido. O uso de sacarose apresentou dois picos máximos de atividade, 96 horas e 120 horas, sendo a atividade antimicrobiana maior no último pico. A produção sob glicerol foi presente apenas 48 horas pós-inoculação tendo maior atividade em 72 horas. Mesmo com crescimento celular presente, a formação de halos perante glicose como fonte de carbono. No ensaio sob diferentes fontes de nitrogênio, o nitrato de potássio mostrou melhor ação em menor tempo do que as outras fontes de nitrogênio utilizadas.

No pré-inóculo não houve formação de halos quando o nitrogênio era oriundo de extrato de levedura. Os extratos compostos por sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona apresentaram início de atividade apenas depois de 72 horas de crescimento. Tanto o extrato produzido com o uso de peptona quanto o produzido com extrato de levedura apresentaram atividade máxima após 120 horas.

Conclusões

No presente estudo, todos os isolados de *Streptomyces* apresentaram atividade contra *Enterococcus* sp., sendo o isolado 8S o microrganismo que mostrou maior espectro de atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana do isolado 8S foi melhor perante amido e nitrato de potássio como fontes de crescimento de carbono e nitrogênio respectivamente. Concluímos que a fonte de carbono e nitrogênio pode influenciar na capacidade de produção de metabólitos secundários.

Apoio

CAPES

Referências

M. Valan Arasu, V. Duraipandiyan, P. Agastian, S. Ignacimuthu. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* ssp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale* V. 19, p.22-28, 2009.

Madigan, Michael T. *Microbiologia de Brock*. 10ª edição. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2004. XIV.

INVESTIGAÇÃO DE LEVEDURAS DE OCORRÊNCIA AMBIENTAL DEGRADADORAS DE GLICERINA BRUTA DERIVADA DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Anelise Baptista da Silva¹; Audrey Proença²; Renata Medina-Silva³

¹Estudante do Curso de Especialização em Gestão da Qualidade do Meio Ambiente do Instituto do Meio Ambiente, PUC-RS E-mail: baptistane@yahoo.com.br; ²Graduanda da Faculdade de Biociências da PUC-RS E-mail: audrey.proenca@acad.pucrs.br; ³Coordenadora do Departamento de Biodiversidade e Ecologia da Faculdade de Biociências da PUC-RS e membro do Grupo de Pesquisa em Imunologia e Microbiologia da PUC-RS E-mail: renata.medina@pucrs.br

Resumo - A produção de biodiesel tem se mostrado uma interessante alternativa de renda nas propriedades rurais de pequeno e médio porte, entretanto o subproduto da reação de transesterificação que culmina no biodiesel, a glicerina bruta, não tem valor comercial na sua forma primária e apresenta elevados custos de purificação, sendo inviável para pequenos e médios produtores. Em função disso, a glicerina bruta é, comumente lançada no ambiente e apresenta significativo potencial de dano aos ecossistemas impactados. A biotransformação da glicerina bruta em produtos menos poluentes ou de maior valor agregado, mostra-se, portanto, como uma estratégia interessante para a resolução da questão do passivo ambiental gerado pela produção de biodiesel. A partir disso, foram isoladas e investigadas leveduras coletadas de diferentes ambientes, que mostraram-se capazes de utilizar, como única fonte de carbono, a glicerina bruta derivada da produção de biodiesel.

Palavras-chave: biodiesel; biotransformação; leveduras.

Introdução

O biodiesel tem se mostrado uma fonte alternativa de renda consideravelmente promissora, tanto no contexto doméstico, através de plantas de produção ativas em propriedades rurais de pequeno e médio porte, como no industrial (Carriquiry, 2007). A produção do biodiesel é caracterizada por uma reação de transesterificação de triglicerídeos em alquil-ésteres de ácidos graxos, tendo como subproduto a glicerina, que corresponde a 10% do volume final da reação (Meher et al. 2006) e apresenta uma pureza que oscila entre 55% e 90%. O processo de purificação da substância, a fim de torná-la aplicável na indústria, consiste na remoção dos seus álcoois constituintes, determinando o seu grau de pureza de acordo com a concentração restante dos mesmos. O processo de purificação, entretanto, apresenta elevados custos, sendo inviável, portanto para pequenos e médios produtores. Desse modo, o subproduto gerado nas pequenas e médias propriedades, em função de não apresentar valor comercial, é lançado no ambiente e apresenta significativo potencial de dano aos ecossistemas impactados (revisado por Silva et al. 2009). A diversidade de microorganismos procarióticos e eucarióticos ainda é muito pouco conhecida, em especial quando se trata de microorganismos existentes em ambientes naturais, tais como cisternas de Bromeliaceae, solo e alguns tipos de alimentos crus. Desta forma, tipos metabólicos desconhecidos são abundantes no contexto microbiano (Jianping, 2006) e podem apresentar aplicabilidade biotecnológica com o objetivo de biorremediação e biotransformação de moléculas de interesse. A biotransformação da glicerina bruta em produtos menos poluentes ou de maior valor agregado, mostra-se como uma estratégia interessante para a resolução da

questão do passivo ambiental gerado pela produção de biodiesel. A partir disso, buscou-se investigar, em diferentes amostras ambientais, a presença de leveduras capazes de utilizar a glicerina bruta derivada da produção de biodiesel como única fonte de carbono.

Materiais e Métodos

A glicerina bruta utilizada foi doada pela Faculdade de Química da PUC-RS, que apresenta uma planta-piloto de biodiesel ativa similar à de produtores rurais. Para a investigação de microrganismos com o tipo metabólico de interesse, foram analisadas amostras de água presentes em cisternas de cinco bromélias do gênero *Vriesea* e cinco do gênero *Aechmea*, oriundas do Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza PRÓ-MATA – PUCRS. As coletas foram sazonais (verão, outono e inverno, até o momento) a fim de visualizar possíveis alterações na estrutura das comunidades ali existentes. Amostras de contaminantes de mel de abelhas sem ferrão, provenientes do laboratório de Entomologia da PUCRS, também foram analisadas. As amostras coletadas foram, inicialmente, inoculadas em caldo YPD (extrato de levedura a 1% , peptona a 2% e glicose a 2%) contendo 0,5 % de cloranfenicol, para isolamento de leveduras, e, após, incubadas à temperatura ambiente, para crescimento até fase exponencial. Para o isolamento das colônias presentes nas amostras e testes de características metabólicas interessantes, o material foi semeado nos meios sólidos (com ágar 2%) YPD, YPgb (YP adicionado de glicerina bruta a 2%) e YNBgb (YNB adicionado de glicerina bruta a 2%). A fim de caracterizar morfológicamente os isolados selecionados, os mesmos foram corados através do método de Gram e observados através de microscopia óptica (1000X).

Resultados e Discussão

Em relação às leveduras, microrganismos eucarióticos fúngicos presentes nas cisternas das bromélias analisadas, foram obtidos, nas três coletas realizadas até o momento, 14 isolados, dos quais dez são oriundos das cisternas de *V. platynema* e quatro de *A. gamosepala*, cujo aspecto morfológico variava em termos de tamanho do microrganismo, tipo de brotamento (simples ou bipolar) forma (arredondadas ou hexagonais). Em relação à análise de contaminantes de mel foram obtidos dois isolados de leveduras. Do total de isolados testados, nove obtiveram crescimento em YNBgb, evidenciando um potencial metabólico interessante para aplicações de biotransformação de glicerina bruta.

Conclusões

A degradação de glicerina bruta por parte dos isolados obtidos mostra-se como uma interessante alternativa para a resolução do passivo ambiental além das potenciais aplicações dos produtos gerados a partir desse processo. A continuidade da pesquisa baseia-se na identificação molecular dos isolados obtidos, a partir da extração de DNA, seleção de *primers* que tenham como alvo a região codificadora da subunidade menor do rDNA (18S para Eukarya), e na caracterização química dos produtos gerados a partir da degradação da glicerina por parte dos isolados.

Apoio
CNPq

Referências

CARRIQUIRY, M.A. 2007. A comparative analysis of the development of the United States and European union biodiesel industries, *Briefing Paper 07- BP 51*.

MEHER, L.C., SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renew Sustain Energy Rev.** 10 248–268.

JIANPING, X. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. 2006. **Molecular Ecology.** 15 1713–1731.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances.** 27 30–39.

Projeto: “Caracterização em múltiplos níveis da biodiversidade presente em fitotelmos de bromélias em uma área de Mata Atlântica no sul do Brasil”.

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO LAGO GUAÍBA VISANDO A PROSPECÇÃO DE AGENTES DE BIOCONTROLE DO MEXILHÃO DOURADO, *LIMNOPERNA FORTUNEI* (DUNKER, 1857)

Isabel Cristina Padula Paz¹; Daniel Pereira¹; Marcia Eloisa da Silva¹; Andressa Moraes Sofia de Souza¹; Marinei Vilar Nehrke¹; Maria Cristina Dreher Mansur¹; Maria Teresa Raya Rodriguez^{1,2}, Paulo Sérgio Formagio³

¹Fundação Luiz Englert/ Centro de Ecologia, UFRGS. E-mail: isapaz@gmail.com; ²Líder do Grupo de Pesquisa Ecotoxicologia e Bioindicação. E-mail: raya.rodriguez@ufrgs.br; ³Furnas-Centrals Elétricas S/A, Departamento de Produção de Minas/ EHPF.

Resumo - O mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* é um molusco bivalve invasor de grande impacto econômico e ecológico, de difícil controle, não havendo nenhum método efetivo até o momento. O controle biológico de organismos-praga se baseia em interações ecológicas de predação, competição e parasitismo para redução das populações de pragas, e já se mostrou viável para o controle de algumas espécies de molusco-praga. Nesse sentido, este trabalho objetiva a busca dentro da diversidade do Lago Guaíba de isolados bacterianos que possam ser potenciais agentes de biocontrole de *L. fortunei*. Para tal, isolamentos de bactérias foram realizados a partir de água, sedimento, e tecidos de *Limnoperna fortunei*, em dois locais de amostragem no Lago Guaíba. A partir de água foram obtidos 134 isolados bacterianos, sendo 87 obtidos de amostras oriundas do porto e 47 do canal do Jacuí. A partir de sedimentos foram obtidos 82 isolados, sendo 46 do canal e 36 do porto. Já de parte mole de mexilhão dourado foram isoladas 41 bactérias, sendo 9 do canal e 32 do porto, enquanto de periostraco foram obtidos 66 isolados, sendo 31 do canal e 35 do porto. Esses isolados foram agrupados em 12 grupos morfológicos, sendo que o grupo 4 possui o maior número de isolados, com 21,05% dos isolados avaliados até o momento.

Palavras-chave: bactérias, controle biológico, mexilhão dourado, invasores

Introdução

O mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* é um molusco bivalve invasor de grande impacto econômico e ecológico. A introdução e estabelecimento desta espécie em uma área podem culminar com o deslocamento e extinção de espécies nativas, além de em locais de captação de água e/ ou geração de energia poderem causar grandes prejuízos, devido à formação de macroaglomerados em tubulações, turbinas e trocadores de calor, levando ao entupimento e quebra dos mesmos (Mansur *et al.*, 2004; Resende, 2008; Soares *et al.*, 2009). Esta praga foi relatada pela primeira vez no Lago Guaíba em 1998, por Mansur *et al.* (1999). O controle do mexilhão dourado é difícil, não havendo nenhum método efetivo até o momento. Pesquisas usando diferentes estratégias de controle estão sendo realizada como o uso de sulfato de cobre (Soares *et al.*, 2009), luz ultravioleta e uso de tintas anti-incrustantes (Caprari, 2006; Brooks & Waldock, 2009). O controle biológico de organismos-praga se baseia em interações ecológicas de predação, competição e parasitismo para redução das populações de pragas. O controle biológico de moluscos é viável, como reportado por Molloy & Mayer (2007), ao obter altos índices de mortalidade de larvas e adultos do mexilhão zebra, *Dreissena polymorpha*, com um isolado de *Pseudomonas fluorescens*. Nesse sentido, este trabalho objetiva a busca dentro da diversidade do Lago Guaíba de isolados bacterianos que possam ser potenciais agentes de biocontrole de *L. fortunei*.

Material e Métodos

Isolamento: Isolamentos de bactérias foram realizados a partir de água, sedimento, e da parte mole e periostraco de *Limnoperna fortunei*, em dois locais de amostragem no Lago Guaíba (cais do porto e canal do Jacuí).

Para isolamento a partir de água e sedimento foram realizadas diluições sucessivas (10^{-2} a 10^{-4} e 10^{-3} a 10^{-5}), respectivamente, e plaqueamento em meio de cultura ágar de soja tríptica. Para isolamento de tecidos do mexilhão foi feito uma desinfestação com hipoclorito de sódio (1 minutos), seguido de álcool (3 min), e tríplice lavagem em água destilada esterilizada. Após inoculação as placas foram incubadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. A visualização de crescimento bacteriano foi realizada diariamente durante um período de sete dias. Todos os isolados bacterianos obtidos, independente do substrato foram repicados para nova placa contendo Agar de soja tríptica e purificado por esgotamento.

Separação em grupos morfológicos: Após purificação, os isolados foram repicados em Agar King B e inspecionado quanto a presença de fluorescência sob luz ultravioleta, após incubação a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Além disso, foi determinada a morfologia da colônia (forma, margem, textura, coloração), gram e catalase. A determinação do gram foi obtida pelo método rápido usando KOH 3% (Buck, 1982), já a catalase foi determinada pela adição de peróxido de hidrogênio a cultura bacteriana. Isolados que apresentavam o mesmo perfil foram colocadas no mesmo grupo morfológico.

Resultados

A partir do isolamento usando água como substrato foi obtido 134 isolados bacterianos, sendo 87 obtidos de amostras oriundas do porto e 47 do canal do Jacuí. A partir de sedimentos foram obtidos 82 isolados, sendo 46 do canal e 36 do porto. Já de parte mole de mexilhão dourado foram isoladas 41 bactérias, sendo 9 do canal e 32 do porto, enquanto de periostraco foram obtidos 66 isolados, sendo 31 do canal e 35 do porto.

O maior número de isolados foi obtido de amostras coletadas no porto, exceto para o substrato sedimento. Essa maior densidade bacteriana pode estar relacionada a maior poluição deste local de amostragem, com conseqüente maior disponibilidade de nutrientes para bactérias heterotróficas.

Os isolados bacterianos obtidos (323) estão sendo separados em grupos morfológicos, de acordo com a Tabela 1, tendo sido processado até o momento 35,3 % dos isolados obtidos, que se enquadraram em 12 grupos morfológicos.

Tabela 1. Separação de isolados bacterianos obtidos de substratos oriundos do Lago Guaíba, baseada em características morfológicas e bioquímicas.

Grupo	Características da colônia
1	Circular, branca, margem inteira, textura lisa, gram negativa, catalase positiva, fluorescente
2	Circular, branca, margem inteira, textura lisa, gram negativa, catalase positiva, não fluorescente
3	Circular, branca, margem inteira, textura lisa, gram e catalase positiva, não fluorescente
4	Circular, amarela translúcida, margem inteira, textura lisa, gram negativa, catalase positiva, fluorescente
5	Circular, amarela translúcida, margem inteira, textura lisa, gram negativa, catalase positiva, não fluorescente
6	Circular, amarela forte, margem inteira, textura lisa, gram negativa, catalase positiva, não fluorescente
7	Circular, branca, margem inteira, textura lisa, gram negativa e catalase negativa, fluorescente

8	Circular, amarela translúcida, margem inteira, textura lisa, gram positiva, catalase negativa, não fluorescente
9	Circular, branca, margem ondulada, textura rugosa, gram e catalase negativa, não fluorescente
10	Irregular, amarela translúcida, margem ondulada, textura lisa, gram negativa, catalase positiva, fluorescente
11	Circular, amarela translúcida, margem inteira, textura lisa, gram e catalase positiva, não fluorescente
12	Circular, amarela translúcida, margem inteira, textura lisa, gram e catalase negativa, fluorescente

Em relação a frequência de isolamento de bactérias dos diferentes grupos verificou-se uma maior ocorrência de isolados do grupo 4, o qual corresponde a 21,05% dos isolados testados até o momento. Dentro de cada grupo serão selecionados cinco isolados representativos do grupo para bioensaios com o mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* e identificação das espécies bacterianas, baseada na sequência parcial do gene rDNA 16S.

Conclusões

Na água, sedimento e mexilhões dourados obtidos do Lago Guaíba existe uma grande diversidade de bactérias cultiváveis, dentre as quais pode haver potenciais agentes de biocontrole de *L. fortunei*.

Apoio

ANEEL/ FURNAS, CENECO/UFRGS

Referências

- Brooks, S. J. & Waldock, M. 2009. Copper biocides in the marine environment. In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (eds.) **Ecotoxicology of antifouling biocides**. 437p. Springer, Tokyo.
- Buck, J.D. 1982. Non staining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 44 (4): 992- 993
- Caprari, J. J. 2006. Pinturas antiincrustantes. In: Darrigran, G. & Damborenea, C. (Eds). **Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano**. 218p. Edulp, Buenos Aires, Ag.
- Mansur, M.C.D.; Quevedo, C.B.; Santos, C.P.; Callil, C.T. 2004. Prováveis vias da introdução de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) na baía da laguna dos Patos, Rio Grande do Sul e novos registros de invasão no Brasil pelas bacias do Paraná e Paraguai, p. 33-38. In: J.S.V. Silva & R.C.C.L. Souza (Eds). **Água de lastro e Bioinvasão**. Rio de Janeiro, Interciências, XVIII+224p
- Resende, M.F. Impacto da infestação de condutos forçados de PCHH's pelo *Limnoperna fortunei*. **Anais VI Simpósio Brasileiro sobre Pequenas e Médias Centrais Hidrelétricas**, p. 1-15, 2008.
- Soares, M.F.; Pereira, D.; Santos, C.P.; Mansur, M.C.D.; Pires, M.; Breintebach, L.O.; Grespan, C. 2009. Toxicidade do sulfato de cobre ao mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), em água bruta. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, 4 (1-3): 37-48.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *ACANTHAMOEBA* DE EQUIPAMENTOS LAVA-OLHOS

Lua Panatieri¹; [Ana Maris Carlesso](mailto:anacarlesso@yahoo.com.br)²; Marilise Brittes Rott³

¹Graduanda do Curso de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, E-mail: lua.ferpan@gmail.com; ²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, E-mail: anacarlesso@yahoo.com.br; ³Professora orientadora – Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, E-mail: marilise.rott@ufrgs.br

Resumo – Dentre as amebas de vida livre (AVL), a *Acanthamoeba* é o gênero mais amplamente distribuído na natureza. Este protozoário é importante devido ao seu caráter anfitriônico. Lava-olhos são equipamentos de proteção coletiva, presentes em locais onde há riscos de acidentes com produtos químicos, de modo que a NR-32 estabelece a necessidade de processos de higienização e desinfecção semanal destes equipamentos. A ineficiência deste procedimento possibilita a formação de biofilmes e favorece o desenvolvimento de diversos microorganismos, inclusive de *Acanthamoeba*, que pode ser agente da ceratite amebiana, doença progressiva e dolorosa que ameaça a visão. Este trabalho teve como objetivo isolar amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* em amostras de biofilme e água de equipamentos lava-olhos, e caracterizá-las morfológicamente seguindo critérios propostos por Page (1988). Amostras de água e biofilme foram coletadas de equipamentos lava-olhos de laboratórios de uma universidade. Após processadas, as amostras foram avaliadas quanto aos critérios morfológicos, através da observação em microscópio óptico. Das 74 amostras coletadas, 37 foram de biofilme e 37 de água. Destas, 28 de biofilme e 27 de água foram positivas para AVL possivelmente pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, segundo os critérios de Page para morfologia dos cistos e trofozoítos. Os resultados obtidos demonstram que as condições sanitárias dos lava-olhos avaliados são precárias e podem oferecer aos usuários risco de contaminação com AVL do gênero *Acanthamoeba*.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*; Lava-olhos; Biofilme

Introdução

Dentre as Amebas de Vida Livre (AVL) existentes, a *Acanthamoeba* é o gênero mais amplamente distribuído na natureza, sendo encontrada em água doce e salgada, piscinas, estojos de lente de contato, água potável, poeira, ar condicionado e em biofilmes, inclusive de bebedouros coletivos (Carlesso *et al.*, 2010; Caumo *et al.*, 2009; Pens *et al.* 2008; Khan, 2006; Marciano-Cabral & Cabral, 2003.). Este protozoário possui um caráter anfitriônico, uma vez que se adapta tanto à vida livre quanto parasitária. Lava-olhos são equipamentos de proteção coletiva, presentes em locais onde há riscos de acidentes com produtos químicos, como laboratórios acadêmicos e de pesquisa, indústrias e almoxarifados de reagentes. A Norma Regulamentadora 32 (NR-32), do Ministério do Trabalho e Emprego, referente à segurança e saúde no trabalho em serviços de saúde, estabelece que estes equipamentos devem estar em locais de fácil acesso e passar por processos adequados de higienização e desinfecção semanal, garantindo desta forma a salubridade do equipamento no momento do uso. Neste sentido, quando a manutenção correta dos lava-olhos não ocorre, possibilita-se a formação de biofilmes, que favorecem o desenvolvimento de diversos microorganismos,

inclusive de *Acanthamoeba*. Ceratite amebiana é uma doença progressiva e dolorosa que ameaça a visão. Conforme já bem descrito na literatura, a ceratite pode ser causada por várias espécies do gênero *Acanthamoeba*, entre elas *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. quina* e *A. lugdunensis* (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Os critérios de Page estabelecem características morfológicas para identificação das AVL em relação ao gênero. Para identificação do gênero *Acanthamoeba*, em relação aos cistos, são considerados: tamanho, além da presença e formato da dupla parede celular. Quanto aos trofozoítos são considerados a presença de nucléolo evidente, vacúolos digestórios e contráteis bem como a presença de acantopódios (Figura 1). Este trabalho teve como objetivo isolar amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* em amostras de biofilme e água de equipamentos lava-olhos, e caracterizá-las morfológicamente seguindo critérios propostos por Page (1988).

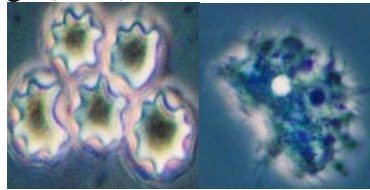


Figura 1 – Cistos e trofozoítos morfológicamente característicos, segundo os critérios de Page (1988). Imagens: Caumo, K.S. Laboratório de parasitologia UFRGS.

Materiais e Métodos

Amostras de água e biofilme foram coletadas de equipamentos lava-olhos de laboratórios de uma universidade. As amostras de biofilme foram coletadas das saídas de água com suabes estéreis e armazenados em tubos estéreis até o momento do processamento da amostra. Posteriormente, foram coletados 50 mL de água em tubos estéreis por acionamento do equipamento. Pressupondo-se que os equipamentos ao serem utilizados serão acionados imediatamente, ao coletar as amostras não houve prévio escoamento da água.

Os suabes utilizados na coleta dos biofilmes foram transferidos para tubos estéreis, contendo 50 mL de água destilada estéril e submetidos à sedimentação espontânea por 2 horas. Após, os suabes foram espremidos e os tubos centrifugados a 2500 rpm /10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento ressuspenso em 500 µL de solução salina de Page (De Carli, 2001). 100 µL dessa suspensão foram inoculados em placa contendo ágar não nutriente 1,5% recoberto com suspensão de *E. coli*. Os tubos contendo a água coletada foram centrifugados a 2500 rpm/10 minutos e processados conforme já descrito.

Após inoculação, as placas foram incubadas a 30°C e observadas diariamente, por até dez dias, ao microscópio óptico em aumento de 100X. Os critérios de Page foram avaliados por observação em microscópio, após obtenção dos isolados monoxênicos em placas.

Resultados e Discussão

Das 74 amostras coletadas, 37 foram de biofilme e 37 de água. Destas, 28 de biofilme e 27 de água foram positivas para AVL possivelmente pertencentes ao gênero

Acanthamoeba (Figura 2), segundo os critérios de Page para morfologia dos cistos e trofozoítos.

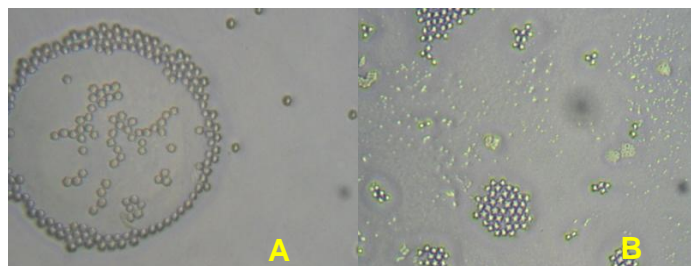


Figura 2 – em A cistos característicos do gênero *Acanthamoeba*, de uma das amostra de biofilme. Em B cistos e trofozoítos característicos do gênero *Acanthamoeba* isolados de ima amostra de água (aumento 100x).

Apesar de haver poucos trabalhos relacionando *Acanthamoeba* a lava-olhos, Tyndall *et al* (1987) coletaram 130 amostras de 11 equipamentos lava-olhos de uma cidade dos EUA, obtendo 59 isolados de AVL. Ainda neste estudo, os autores testaram o potencial patogênico de seus isolados, tendo observado que três das amostras possuíam amebas patogênicas, pois foram capazes de infectar camundongos.

É importante destacar que um indivíduo que procura auxílio do equipamento lava-olhos sofreu alguma lesão nos olhos, que pode servir de porta de entrada para microrganismos, dentre eles a *Acanthamoeba*. Diversas espécies deste organismo possuem capacidade de invadir e colonizar a epitélio ocular, causando ceratite amebiana, sendo esta uma doença de progressão grave podendo levar a perda completa da visão e enucleação (Khan, 2006). De acordo com nosso estudo, as condições sanitárias dos lava-olhos avaliados mostram o desenvolvimento de *Acanthamoeba* em decorrência da instalação de biofilme, representando risco àqueles que utilizam esses equipamentos.

Conclusão

Os resultados demonstram que as condições sanitárias dos lava-olhos avaliados são precárias, e podem oferecer risco de contaminação com AVL do gênero *Acanthamoeba* aos usuários.

Apoio

PROPESQ- UFRGS, PIBIC- CNPq e CAPES.

Referências

- CABRAL, F.M & CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol 16 (2) 273-307, 2003.
- CARLESSO, A.M., CAUMO, K., ARTUSO, G.L., ROTT, M.B., Potentially pathogenic *Acanthamoeba*. Isolated from a Hospital in Brazil. *Rev.Current*. 2010
- CAUMO, K.S; FRASSON, A.P; PENS, C.J; PANATIERI, L.F; FRAZZON, A.P.G; ROTT, M.B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. Vol 103 (6) 477-485, 2009
- DE CARLI: Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas. 2001
- KHAN, N.A. *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology*. Vol 30 564-595, 2006
- PAGE, FC. A New key to freshwater and soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK*, 1988.
- PENS, C.J; COSTA, M; FADANELLI, C; CAUMO, K.S; ROTT, M.B. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. *Parasitology Research*. Vol 103, 1241-1245, 2008.

TYNDALL, R.L; LYLE, M.M; IRONSIDE, K.S. The presence of free-living Amoeba in Portable and Stationary Eye wash Station. American Industrial Hygienic Association Journal. Vol 48 (11) 933-934, 1987.

NBR-12 – Ministério do Trabalho e Emprego, disponível em:
http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/default.asp

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Acanthamoeba* sp. (SARCOMASTIGOPHORA: SARCODINA) DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Dayane Andriotti Otta¹; Marilise Brittes Rott²; Éder Moraes Saucedo¹; Ana Maris Carlesso¹; Onilda Santos da Silva²

¹Estudantes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; E-mail: dayaneotta@gmail.com; ²Professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, setor de Parasitologia. E-mail: onilda.silva@ufrgs.br

Resumo – O gênero *Acanthamoeba* enquadra-se entre os protozoários de maior prevalência no meio ambiente. Estudos anteriores demonstram a capacidade de *Acanthamoeba polyphaga* em desenvolver-se no intestino de larvas e adultos de *Aedes aegypti* em condições de laboratório. Entretanto, a susceptibilidade de mosquitos de origem silvestre à infecção por esta ameba de vida livre (AVL), ainda não foi investigada. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *Acanthamoeba* sp. em populações naturais de *Ae. aegypti* e caracterizar as amebas isoladas. As larvas de *Ae. aegypti* foram obtidas com o auxílio de armadilhas de oviposição. A presença de cistos e trofozoítos de amebas de vida livre foi investigada em *pools* de larvas saudáveis pertencentes ao 3º e 4º estágio, após identificação e um rigoroso processo de lavagem. As larvas foram maceradas e centrifugadas, e um inóculo de 50 µL do sedimento foi depositado no centro da placa contendo ágar não-nutriente a 1,5%, com uma sobrecamada de *Escherichia coli* (ATCC 25922) mortas pelo calor a 56°C, para o isolamento e cultivo de amebas. O procedimento foi realizado em triplicata. Até o momento, foram realizadas cinco coletas distintas de culicídeos, onde aspectos morfológicos evidenciaram a presença de *Ae. aegypti*. AVL foram isoladas em todos os *pools* analisados, cuja caracterização morfológica sugere a ocorrência do gênero *Acanthamoeba*. AVL possivelmente pertencente ao gênero *Acanthamoeba* é capaz de infectar populações naturais de *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; *Acanthamoeba* sp.; isolamento; caracterização.

Introdução

Aedes aegypti é considerado o mosquito vetor mais importante dos sorotipos virais DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 que ocasionam a dengue clássica e a sua forma hemorrágica (Gubler, 2001). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a infecção pode acometer anualmente 50 milhões de pessoas no mundo. Por exemplo, em 2009 foram reportados 853.468 casos na região das Américas, incluindo 20.832 episódios correspondentes à dengue hemorrágica (World Health Organization, 2009a, b).

É importante ressaltar a dificuldade existente em realizar o controle populacional deste mosquito, uma vez que possui um ciclo de vida particular, bem como uma fácil adaptação ao ambiente. Por estas razões, a busca por meios de controle mais eficientes e específicos vêm aumentando, sendo imprescindíveis estudos acerca da atividade de possíveis agentes biológicos, os quais reduzem naturalmente a população de mosquitos. Embora existam muitos avanços científicos, até o momento há uma lacuna relevante acerca de alguns protozoários e seu grau de nocividade a culicídeos.

O gênero *Acanthamoeba* enquadra-se entre os protozoários de maior prevalência no meio ambiente. É bem distribuído em todo o mundo e já foi isolado do solo, poeira, água tratada e natural, piscinas, lentes de contato, entre outros (Salazar et al., 1982; Lorenzo-Morales et al., 2005; Carlesso et al., 2007; Pens et al., 2008; Caumo et al., 2009; Kawaguchi et al., 2009).

Estudos preliminares demonstram a capacidade de *Acanthamoeba polyphaga* em desenvolver-se no intestino de larvas e adultos de *Ae. aegypti* em condições de laboratório (Rott et al., 2010). Entretanto, a susceptibilidade de mosquitos de origem silvestre à infecção por este parasito ainda não foi investigada, não havendo, portanto, estimativas de sua prevalência. Deste modo, objetivou-se avaliar a ocorrência de *Acanthamoeba* sp. em populações naturais de *Aedes aegypti*, além de caracterizar os isolados obtidos.

Materiais e Métodos

A coleta de larvas de *Ae. aegypti* foi feita em cinco bairros distintos de Porto Alegre, RS: Camaquã, Cavalhada, Cristal, Jardim Vila Nova e Santa Tereza, com o auxílio de armadilhas de oviposição (ovitrampas).

As larvas utilizadas no experimento passaram por um rigoroso processo de lavagem, seguido de maceração. Após, as mesmas foram centrifugadas e 50 µL do sedimento, em triplicata, foi depositado no centro da placa de ágar não-nutriente a 1,5%, com uma sobrecamada de *Escherichia coli* (ATCC 25922) mortas pelo calor a 56°C, para o isolamento de amebas de vida livre. As placas foram vedadas com filme plástico (Parafilm®) e mantidas em estufa, a 30°C. Após 48 horas, as placas foram analisadas ao microscópio óptico (100X) por até 10 dias. A caracterização morfológica dos isolados de *Acanthamoeba* seguiu os critérios propostos por Page (1988).

Para a exclusão do gênero *Naegleria fowleri*, foi realizada a técnica de exflagelação, que consiste na adição de 10 mL de água destilada estéril sobre cada placa de ágar não-nutriente com crescimento de amebas de vida livre e observação por até 1h em microscópio óptico (100X) para verificar a emissão de flagelos.

Como parte da caracterização dos isolados de *Acanthamoeba* sp., avaliou-se o tempo de contração do vacúolo pulsátil de cada amostra, em microscópio óptico (100X) (De Carli, 2001), além da realização de testes de osmotolerância e termotolerância, de acordo com Khan et al. (2001).

Resultados e Discussão

Das cinco coletas de larvas de *Ae. Aegypti* realizadas, todas apresentaram, nos pools, amebas de vida livre com características morfológicas sugestivas do gênero *Acanthamoeba*. A figura 1 mostra um isolado com típico crescimento de AVL possivelmente do gênero *Acanthamoeba* em placa de ágar não-nutriente a 1,5%, recoberto com *Escherichia coli*.

Os testes de exflagelação foram negativos para os cinco isolados de amebas de vida livre, indicando que não há a presença de *Naegleria fowleri* entre as amostras estudadas. Neste gênero amebiano, os trofozoítos possuem a capacidade de se transformar em estruturas flageladas, possuindo, tipicamente, dois flagelos anteriores, embora três ou quatro flagelos possam ser visualizados ocasionalmente (Visvesvara & Schuster, 2008).

Em todas as amostras foi possível verificar a nítida presença de vacúolos pulsáteis, cujo tempo de contração é mostrado na tabela 1.

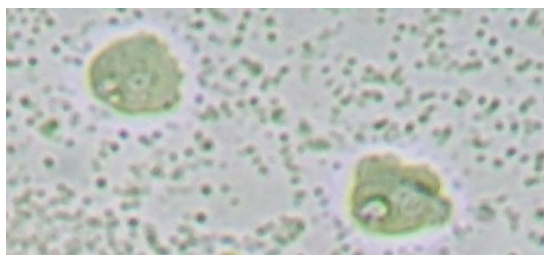


Figura 1: Trofozoítos de AVL provavelmente pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* da amostra do bairro Santa Tereza (Microscópio óptico 100X).

Tabela 1. Tempo de contração de vacúolos de amebas de vida livre isoladas de *Ae. aegypti*.

Isolados (de acordo com bairro de origem)	Tempo de contração médio (em segundos) ^a
Camaquã	37,2
Cavanhada	31,1
Cristal	27,2
Jardim Vila Nova	32,8
Santa Tereza	36,4

^a10 trofozoítos por amostra.

Analisando-se os testes de tolerância à temperatura e ao manitol, todos os isolados apresentaram crescimento a 30°C (controle), 37°C e 0,5 M de manitol. Nenhuma amostra apresentou crescimento a 42°C e 1,0 M de manitol. Estes resultados evidenciam que, diante da incapacidade de adaptação à elevada temperatura e concentração osmolar, os isolados podem ser isentos de patogenicidade para humanos e outros mamíferos, de acordo com sugestão de Khan et al. (2001).

Conclusões

O gênero *Acanthamoeba* é capaz de infectar populações naturais de *Ae. aegypti*. O prosseguimento do presente trabalho, com um maior número amostral e confirmação dos isolados através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) fornecerá importantes informações acerca da prevalência desta ameba de vida livre em culicídeos vetores. Desta forma, servirá como subsídio para posteriores pesquisas sobre a interação e o possível impacto do microorganismo sobre o ciclo de vida de *Ae. aegypti*.

Referências

- CARLESSO, A. M. et al. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 316-320, maio-jun. 2007.
- CAUMO, K. et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, n. 6, p. 477-485, sept. 2009.
- DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica** - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 156-206, 2001.
- GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, p. 13-24, dec. 2001.

- KAWAGUCHI, K. et al. Prevalence of *Helicobacter* and *Acanthamoeba* in natural environment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 4, p 465-471, apr. 2009.
- KHAN, N.A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiology**, New York, v. 43, p. 204-208, sep. 2001.
- LORENZO-MORALES, J. et al. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 12, n. 2, p. 233-236, 2005.
- PAGE, F. C. **A new key to freshwater and soil Gymnamoebae**. Ambleside: Freshwater Biological Association, Cumbria, 1988. 122p.
- PENS, C. J. et al. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, n. 6, p. 1241-1245, nov. 2008.
- ROTT, M. B. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Acanthamoeba polyphaga* (Sarcocystidophora: Acanthamoebidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 1, p. 195-198, jun. 2010.
- SALAZAR, H. C.; MOURA, H.; RAMOS, R. T. Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 16, n. 5, out. 1982.
- VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F. L. Opportunistic free-living amebae, parte II. **Clinical Microbiology Newsletter**, Boston, v. 30, p. 159-166, nov. 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact sheet N°117. Mar. 2009a. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 19 fev. 2010.
- _____. Situación del dengue en las Américas en el 2009. 2009b. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/es/>>. Acesso em: 19 fev. 2010.

POPULAÇÃO FÚNGICA ASSOCIADA A SUBSTRATOS DE CULTIVO DE CHAMPIGNON (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach)

Elisandra Minotto¹; Eduardo Bernardi²; José Soares do Nascimento⁴

¹Estudante de doutorado do Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, UFRGS. E-mail: elisminotto@yahoo.com.br; ²Prof. Dr. do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel. E-mail: eduardobernardi@yahoo.com.br; ⁴Prof. Dr. do Departamento de Fisiologia e Parasitologia, UFPB. Coordenador do Grupo de Pesquisa. E-mail: jsnufpel@hotmail.com

Resumo- O cultivo de *Agaricus bisporus*, popularmente conhecido como champignon, é realizado a partir de uma mistura de substratos celulósicos compostados e pasteurizados. Apesar de o composto ser próprio ao cultivo, pragas e doenças que surgem durante o cultivo reduzem a produção e/ou qualidade dos mesmos. Logo, os objetivos deste estudo foram identificar e quantificar as populações fúngicas do substrato e da camada de cobertura utilizados durante o cultivo do champignon. Para realizar o levantamento da população fúngica efetuou-se amostragem em uma produção comercial de champignon. A coleta constituiu-se de 10 amostras da terra da camada de cobertura e 08 de substrato compostado. O método de avaliação utilizado foi o de diluição seriada e semeio em meio BDA acidificado. Para efeito de análise quantitativa procedeu-se a contagem das UFC, e posteriormente identificação dos gêneros fúngicos. Na análise dos resultados observou-se que a maior população fúngica foi encontrada no substrato compostado ($2,8 \times 10^7$). Os gêneros fúngicos mais freqüentes são *Trichoderma*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Cladosporium* e *Verticillium*.

Palavras-chave: Cogumelos comestíveis, champignon, fungos contaminantes.

Introdução

O cultivo de cogumelos é mundialmente dominado pela produção de *Agaricus bisporus* popularmente conhecido como “cogumelo branco” ou “champignon de Paris”. Esta foi a primeira espécie comercialmente cultivada no Brasil, introduzida em 1953 devido à crise avícola (CHANG; MILES, 2004).

O substrato para o cultivo comercial de *A. bisporus* pode ser preparado a partir de uma mistura de materiais orgânicos, sujeitos a um processo de compostagem para torná-lo apropriado ao seu desenvolvimento (COLAK, 2004). Conseqüentemente, muitas pragas e doenças podem causar perdas na produção de *A. bisporus*. Isso se deve principalmente a fatores como: compostagem imprópriamente preparada, pasteurização inadequada do composto e da camada de cobertura, e galpões mal desinfetados, como também, ao composto de baixa qualidade (CHEN et al., 1999).

Existem muitos fungos patogênicos que influenciam na redução da produção e/ou qualidade dos cogumelos. No entanto, poucos são verdadeiros patógenos atacando o micélio e o corpo de frutificação, os não patogênicos simplesmente competem por espaço e nutrientes, podendo influenciar negativamente o crescimento e absorção nutricional do *A. bisporus* (CHANG; MILES, 2004). A bolha seca causada por *Verticillium fungicola* é uma das mais significativas doenças na produção comercial de *Agaricus* spp. (COLES et al., 2002). Esta doença pode causar substancial redução do rendimento. A manifestação de *Trichoderma* spp., é caracterizada pelo aparecimento de manchas marrons, irregulares e de diversos tamanhos na

superfície do píleo, tornando as áreas afetadas flácidas e deprimidas (CHANG; BUSWELL, 1996). O conhecimento dos agentes envolvidos em desordens durante o processo de cultivo de cogumelos torna mais fácil e eficiente o desenvolvimento de meios de prevenção e controle. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar a população fúngica associada ao substrato compostado e a camada de cobertura utilizados para o cultivo de *A. bisporus*.

Materiais e Métodos

A coleta das amostras foi realizada em um cultivo comercial de *Agaricus bisporus*, localizado no município de Tupanciretã (29° 4' S, 53° 50' W), RS, Brasil. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório Experimental de Micologia (LEMICO), DMP/IB/UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

A amostragem foi realizada em diferentes pontos com evidência de contaminação, totalizando 10 amostras provenientes da camada de cobertura e 08 do substrato compostado. Para o isolamento de fungos foi empregada a técnica de diluição seriada das amostras e plaqueamento em meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar) acidificado (pH 3,5). Porções de 25 g de substrato de cada amostra foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0,1%, constituindo-se assim, a primeira diluição. Adicionou-se uma gota de Tween® 80 à mistura e esta foi homogeneizada durante 10 minutos em agitador. A partir desta realizaram-se diluições decimais até 1:100000 (10^{-7}). De cada diluição foram semeados em superfície do meio BDA acidificado com ácido tartárico (10%), com alça em “L”, alíquotas de 0,1mL, em triplicatas, e incubados a 25°C por 4-6 dias, para obtenção das unidades formadoras de colônias (UFC) e identificação dos fungos presentes.

Para efeito de análise quantitativa foram consideradas apenas as diluições que apresentaram a formação de colônias entre 20 e 200 unidades formadoras de colônia (UFC), sendo posteriormente identificados os principais gêneros fúngicos presentes, através da confecção de lâminas. A visualização das estruturas fúngicas foi realizada em microscópio estereoscópico e microscópio óptico para identificação.

Resultados e Discussão

A diversidade da população fúngica determinada em dois diferentes materiais utilizados para o cultivo de *A. bisporus* apresentou pouca variação, porém elevada concentração. Resultados esses que podem ser evidenciados por meio da contagem de da UFC (tab. 1). A maior população fúngica foi observada no substrato compostado ($2,8 \times 10^7$), enquanto que a análise da terra de cobertura demonstrou uma menor incidência de UFC. No entanto, esse dado deve ser considerado devido à importância que exerce como fontes de multiplicação de esporos, os quais podem permanecer no ambiente e causar danos à safras futuras.

Tabela 1: Quantificação (UFC g^{-1}) e identificação da população fúngica associadas a substratos de cultivo de *A. bisporus*.

População fúngica associada a substratos ao cultivo de <i>A. bisporus</i>		
Substratos	UFC.g ⁻¹	Gêneros
Terra da camada cobertura	$1,3 \times 10^5$	<i>Trichoderma</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Pennicillium</i> sp., <i>Verticillium</i> sp.,
Substrato compostado	$2,8 \times 10^7$	<i>Trichoderma</i> sp., <i>Pennicillium</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Verticillium</i> sp., <i>Aspergillus niger</i>

De modo geral, a diversidade da população fúngica encontrada no amostras analisadas restringiu-se a poucos gêneros. O substrato compostado foi o componente do cultivo de *A. bisporus* que apresentou maior diversidade de gêneros identificados, tais como: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Verticillium* sp e a espécie *Aspergillus niger*. Nas amostras de terra da camada de cobertura predominaram os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*, no entanto outros gêneros como *Paecilomyces* e *Cladosporium*, e *Verticillium*. foram observados. Resultados estes, que evidenciam deficiências de assepsia no cultivo de *A. bisporus*, especialmente durante as fases de compostagem e pasteurização do substrato, bem como no ambiente de cultivo ou pelos manipuladores.

A elevada ocorrência de *Trichoderma* spp. demonstra a capacidade de disseminação e resistência de suas estruturas aos tratamentos térmicos ao qual os substratos foram submetidos. Algumas espécies do gênero *Trichoderma* apresentam a capacidade de decompor a celulose presente no substrato não dependendo apenas de nutrientes solúveis disponíveis (CHEN et al., 1999). Aliado a isso, está sua habilidade de se desenvolver tanto de forma saprofítica como parasítica, dependendo da espécie, além de sua elevada taxa de crescimento, o que os torna os fungos mais problemáticos no cultivo do *A. bisporus* (GEA, 2001).

Outro fungo muito comum e de vital importância para os substratos de cultivo e produção de cogumelos é o *Verticillium*. A preocupação com sua presença nos cultivos de *A. bisporus*, mesmo em concentrações baixas, se deve a sua elevada patogenicidade, responsável por causar perdas de até 100% na produção deste cogumelo. O patógeno é capaz de atacar o micélio vegetativo de *A. bisporus* (CALONJE et al., 2000), mas quando a terra de cobertura é infestada com conídios de *V. fungicola*, o patógeno é detectado no interior de primórdios muito pequenos 1-2 mm de diâmetro (LARGETEAU et al. 2007).

Conclusões

A maior população fúngica encontrada é observada no substrato compostado. Os gêneros fúngicos presentes no cultivo de *A. bisporus* foram *Trichoderma*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Verticillium*. Sendo que o substrato compostado apresentou maior diversidade de população fúngica.

Referências Bibliográficas

- CALONJE, M.; GARCIA M.C.; PEREZ, C.A.; BERNARDO D.; NOVAES-LEDIEU, M.; Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, v.104, n.8, p.988–992, 2000
- CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, n.5, p.473-476, 1996.
- CHANG, S.T.; MILES, P.G.; *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact*, 2 ed., Flórida: CRC Press, 2004. 482 p.
- CHEN, X.; ROMAINE, C.P.; TAN, Q.; SCHLAGNHAUFER, B.; OSPINA-GIRALDO, M.D.; ROYSE, D.J.; HUFF, D.R. PCR-Based genotyping of epidemic and preepidemic *Trichoderma* isolates associated with green mold (*Aphyllophoromycetidae*). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1, p.139-146, 1999.
- COLAK, M. Temperature profiles of *Agaricus bisporus* in composting stages and effects of different composts formulas and casing materials on yield. **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.9, p.456-462, 2004
- COLES, P.S.; BARBER, W.; RINKER, D.; WHITNEY, S.; KEIL, C.; BEYER, D.; WUEST, P.; ROMAINE, P. **Mushroom integrated pest management**. Pennsylvania: State University, 2002.
- LARGETEAU, M.L., REGNAULT-ROGER, C.; SAVOIE, J.M. *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*: variations in host contribution to the total fungal DNA in relation to symptom heterogeneity. **European Journal of Plant Pathology**. v.118, n.2, p.155–164, 2007

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO CONTINENTE ANTÁRTICO

Igor Stelmach Pessi¹; Susana de Oliveira Elias²; Alexandre José Macedo³

¹Estudante de mestrado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia (UFRGS); E-mail: igor.pessi@ufrgs.br; ²Estudante do curso de Biomedicina (UFRGS); ³Professor Adjunto do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia (UFRGS); E-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br

Resumo - A Antártica é um dos ambientes mais extremos habitados por microrganismos. Microrganismos adaptados ao frio têm sido muito estudados por serem potenciais produtores de compostos com diversas aplicações industriais e biotecnológicas, principalmente enzimas com atividade catalítica em baixas temperaturas. Este trabalho tem como objetivo realizar a prospecção de compostos de interesse industrial e biotecnológico em bactérias isoladas da Ilha Rei George (Península Antártica). Isolados bacterianos foram obtidos através do plaqueamento de amostras de água, solo e neve em diversos meios de cultura seletivos e não-seletivos. Esses isolados foram avaliados em relação à produção de amilase, endo- α -glucanase, esterase e protease, através da inoculação em meios de cultura contendo amido, carboximetil celulose, Tween 80 e leite em pó, respectivamente. Até o momento, foram selecionados 43 isolados com atividade proteolítica, oito com atividade celulolítica, oito com atividade amilolítica e nove com resultado positivo para a produção de esterase. Esses microrganismos estão atualmente sendo submetidos a ensaios de quantificação da atividade enzimática. Esses resultados preliminares evidenciam a grande relevância de estudos de bioprospecção em ambientes extremos.

Palavras-chave: Antártica; microrganismos; psicrófilos; bioprospecção

Introdução

A Antártica é o continente mais remoto da Terra, estando isolado do resto do mundo pelo Oceano Antártico e pela Corrente Circumpolar Antártica (PEARCE *et al.*, 2009). De modo geral, ambientes frios, os mais abundantes em toda a superfície terrestre, têm sido colonizados com sucesso por muitos organismos, especialmente bactérias, leveduras, algas unicelulares e fungos (GERDAY *et al.*, 2000).

Microrganismos adaptados ao frio são únicos porque, apesar de possuírem uma temperatura interna próxima a do ambiente e do forte efeito negativo de baixas temperaturas em reações bioquímicas, são capazes de crescer e se multiplicar a taxas similares a espécies de temperaturas mais amenas (GERDAY *et al.*, 2000). As enzimas de organismos psicrófilos possuem diversas adaptações estruturais que possibilitam um alto rendimento em baixas temperaturas, tornando estes compostos importantes para diversas aplicações industriais. As enzimas de extremófilos possuem potencial de aplicação em múltiplas áreas, seja no uso das enzimas propriamente ditas, ou como fonte de conhecimento para modificação de enzimas derivadas de organismos mesófilos (ROTHSCHILD e MANCINELLI, 2001). Não obstante seu grande potencial biotecnológico, poucas enzimas adaptadas ao frio estão em uso comercial, em comparação com enzimas termoestáveis (CAVICCHIOLI *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho é realizar a prospecção de enzimas de interesse biotecnológico em bactérias isoladas da Ilha Rei George (Península Antártica).

Materiais e Métodos

Três amostras de água, cinco de neve e seis de solo da Ilha Rei George (Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica) foram coletadas durante o verão de 2009/2010 em frascos de polipropileno previamente autoclavados, e armazenados a 4 °C até a execução das análises. Para o isolamento de microrganismos, as amostras foram semeadas em cinco meios de cultura diferentes (agar LB, agar PCA, agar R2A, agar nutriente e agar TSA em concentração 10⁻¹). Para as amostras de solo, 10 g foram suspensos em 90 mL de solução salina 0,5% (w/v) previamente à inoculação. O isolamento foi feito em quadruplicata, sendo duas placas incubadas a 5 °C por 40 dias e duas a 25 °C por sete dias. Após o período de incubação, as colônias morfológicamente diferentes foram selecionadas e isoladas por esgotamento no mesmo meio de cultura e incubadas à mesma temperatura.

Para verificar a produção de enzimas extracelulares, os isolados foram inoculados em meios de cultura contendo amido, carboximetil celulose, Tween 80 e leite em pó, para testar as atividades de amilase, endo-β-glucanase, esterase e protease, respectivamente. Em todos os ensaios, as placas foram incubadas a 25 °C por 72 h. Após a incubação, as atividades de protease, endo-α-glucanase e amilase foram evidenciadas através da visualização de um halo de degradação ao redor da colônia. Para a visualização das atividades celulolítica e amilolítica, as placas foram inundadas com vermelho-congo 0,1% e lugol, respectivamente. A atividade de esterase foi evidenciada através da formação de um precipitado branco ao redor da colônia, devido à presença de CaCl₂ no meio de cultura.

Para a quantificação da atividade amilolítica, os microrganismos com resultado positivo no *screening* anterior foram crescidos em meio líquido contendo peptona (1%), extrato de levedura (0,5%) e amido solúvel (1%) por quatro dias a 25 °C e 150 rpm, coletando-se alíquotas a cada 24 h. As alíquotas foram centrifugadas a 15.000 rpm por 20 minutos, e a atividade amilolítica a 25 °C e pH 7 foi quantificada através do método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959), utilizando maltose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de maltose minuto⁻¹ ml⁻¹.

Resultados e Discussão

Ao total, foram obtidos 236 isolados bacterianos, sendo 106 provenientes das placas incubadas a 25 °C e 130 das placas incubadas a 5°C. Em relação ao tipo de amostra, 127 bactérias foram isoladas das amostras de solo, 68 das amostras de água e 41 das amostras de neve. Das 106 bactérias isoladas a 25 °C que foram avaliadas em relação à produção de enzimas extracelulares, 43 demonstraram atividade proteolítica, oito foram positivas para atividade de endo-α-glucanase, oito demonstraram atividade amilolítica e nove tiveram resultado positivo para a produção de esterase. Experimentos adicionais serão realizados para o rastreamento total da coleção.

Quantitativamente, os oito isolados com resultado positivo para a produção de amilase obtiveram baixa atividade enzimática (Figura 1), se comparados com outros microrganismos relatados na literatura (ASOODEH *et al.*, 2010). O máximo de atividade enzimática (0,56 U) foi obtida pelo isolado N52R1 no quarto dia de incubação. Novos experimentos serão realizados a fim de testar o uso de outros meios de cultura e condições de incubação.

Conclusões

Estes resultados preliminares evidenciam a grande relevância de estudos de bioprospecção em ambientes extremos. Atualmente, estão sendo quantificadas as atividades de esterase, endo-α-glucanase e protease. Os isolados com atividade proteolítica também

serão testados em relação à produção de queratinase e dissulfeto redutase, visto que penas de aves são uma fonte abundante de nutrientes na Península Antártica. Em adição, as atividades hidrolíticas também serão rastreadas através da construção de uma biblioteca metagenômica.

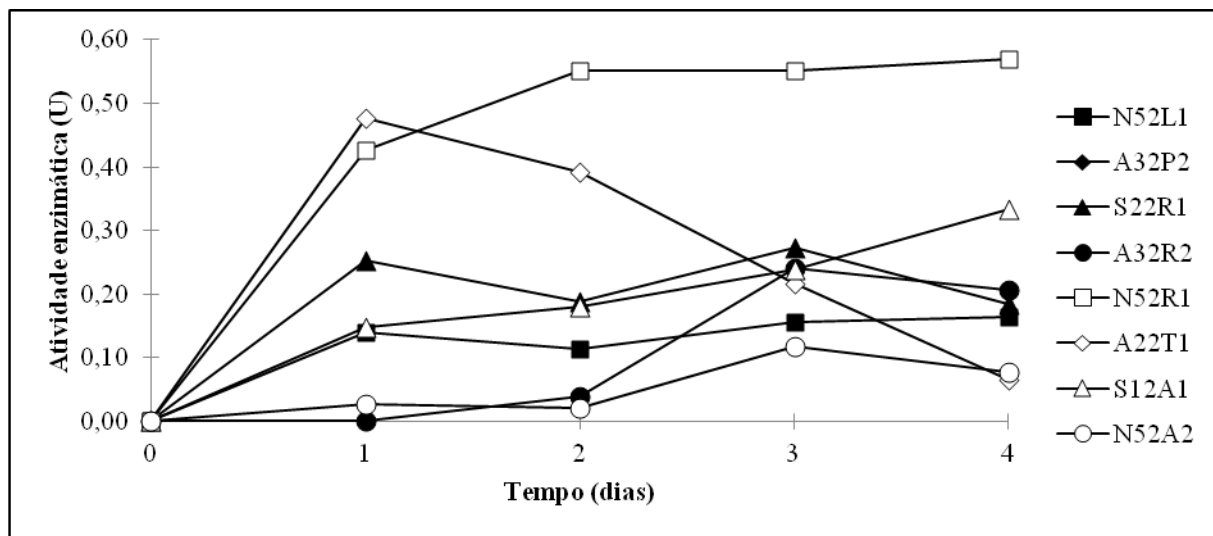


Figura 1. Atividade amilolítica dos isolados.

Apoio

CAPES, CNPq e Centro Polar e Climático (UFRGS).

Referências

- ASOODEH, A.; CHAMANI, J.; LAGZIAN, M. A novel thermostable, acidophilic α -amylase from a new thermophilic "*Bacillus sp. Ferdowsicus*" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 289-297, 2010.
- CAVICCHIOLI, R.; SIDDIQUI, K. S.; ANDREWS, D.; SOWERS, K. R. Low-temperature extremophiles and their applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 253-261, 2002.
- GERDAY, C.; AITTALEB, M.; BENTAHIR, M.; CHESSA, J.-P.; CLAVERIE, P.; COLLINS, T.; D'AMICO, S.; DUMONT, J.; GARSOUX, G.; GEORLETTE, D.; HOYOUX, A.; LONHIENNE, T.; MEUWIS, M.-A.; FELLER, G. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 103-107, 2000.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- PEARCE, D. A.; BRIDGE, P. D.; HUGHES, K. A.; SATTLER, B.; PSENNER, R.; RUSSELL, N. J. Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, p. 143-157, 2009.
- ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, p. 1092-1101, 2001.

SELEÇÃO DE ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA *BIPOLARIS SOROKINIANA*

Cristina de Castro Spadari¹; Sueli T. Van Der Sand²

¹Estudante do curso de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia, UFRGS; e-mail: cris_spadari@hotmail.com; ² Professor do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UFRGS; e-mail: svands@ufrgs.br

Resumo - *Bipolaris sorokiniana* é um fungo fitopatogênico do trigo e outros cereais de inverno, responsável por moléstias como a podridão comum da raiz, carvão do nó, ponta preta dos grãos e mancha marrom. Este fungo é capaz de sobreviver no solo ou em restos vegetais infectados sendo difícil eliminá-lo completamente das regiões agrícolas afetadas, assim, um sistema de controle do mesmo se faz necessário. Como o controle constante com fungicidas implica em problemas ambientais e a resistência do fitopatógeno a esses compostos, a utilização do controle biológico representa uma estratégia alternativa e com potencial. Sabe-se que bactérias do grupo dos actinomicetos são conhecidas por produzirem metabólitos secundários com grande potencial antibacteriano e antifúngico, assim, o objetivo deste trabalho é testar e selecionar 25 isolados de actinomicetos com atividade antifúngica contra 10 isolados do fungo *Bipolaris sorokiniana*. Para isso, foram realizados ensaios de dupla-camada em meio ágar amido caseína (ACA), onde os actinomicetos foram inoculados por picada e as placas incubadas por dez dias a 30°C. Os fungos eram inoculados em meio ágar batata dextrose (BDA) e incubados por sete dias a 28°C. Após esse período, foi preparada uma suspensão dos esporos e 1 mL da suspensão homogeneizada com 9 mL de meio BDA liquefeito e esta mistura foi vertida sobre as placas de ACA com os actinomicetos crescidos. Após cinco dias, observava-se a presença ou ausência de halos de inibição. Os resultados obtidos demonstram que o isolado 1S tem grande potencial antifúngico frente aos dez isolados do fungo.

Palavras-chave: *B. sorokiniana*, controle biológico, actinomicetos.

Introdução

Bipolaris sorokiniana é um fungo fitopatogênico encontrado em todo o mundo, que provoca doenças no trigo e outros cereais de inverno. Plantas com helmintosporiose apresentam sintomas como mancha marrom das folhas, podridão radicular e ponta preta dos grãos. Mudanças infectadas desenvolvem lesões necróticas marrom escuro nas raízes, coroas e bainhas. O trigo (*Triticum aestivum*) é uma das culturas mais afetadas pelo *B. sorokiniana*, sendo que os danos na produção podem variar de 20 a 80% (Kumar 2007).

O controle do fitopatógeno é difícil e caro, por ele infectar folhas, coroa, rizomas e raízes de espécies sensíveis e poder estar ativo em uma ou mais plantas em toda a estação de crescimento (Salehpour 2005), por apresentar uma grande variabilidade morfológica, fisiológica e genética. O controle na agricultura é feito utilizando-se principalmente fungicidas químicos (Khamna 2009), que causam severos efeitos negativos, ou seja, o desenvolvimento de resistência dos patógenos aos agentes aplicados e seus impactos ambientais não-alvo (Compant 2005). Desta forma, o controle biológico com microrganismos está sendo considerado uma alternativa ou uma forma complementar de redução do uso de produtos químicos na agricultura (Compant 2005, Khamna 2009).

Os actinomicetos são um grupo de microrganismos conhecidos pela capacidade de produzir diferentes antibióticos e antifúngicos. Microrganismos desse grupo tem sido amplamente estudados devido a essa capacidade de produzirem metabólitos secundários e portanto de grande aplicação biotecnológica. Deste modo, esse estudo tem como objetivo testar e selecionar 25 isolados de actinomicetos com atividade antifúngica contra 10 isolados do fungo *Bipolaris sorokiniana*.

Materiais e métodos

Foram utilizados 10 isolados de *B. sorokiniana*, sendo 7 (98003, 98007, 98010, 98011, 98012, 98025 e 98028) oriundos do Brasil, e os outros três de outras regiões do mundo (CF02-01 – África do Sul, BS18M2 – México, e 1965 – Dinamarca). Os 25 isolados de actinomicetos tiveram origem em composto de processo de compostagem.

Para selecionar os isolados de actinomicetos com potencial antifúngico, foi realizado o ensaio de dupla-camada em placas em duplicata. Os isolados bacterianos foram inoculados por picada em placas contendo meio de cultura ágar amido caseína (ACA) e incubados por 10 dias a 30°C. Os isolados do fungo eram inoculados em meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) e incubados por 7 dias a 28°C. Após o crescimento dos fungos uma suspensão de esporos era preparada colocando-se 3 ml de solução salina 0,85% estéril sobre as colônias nas placas e, com o auxílio de uma alça de Drigalski os esporos eram removidos e a mistura transferida para tubos de ensaio estéreis. A concentração final da suspensão de esporos era ajustada para 5×10^4 esporos/ml, através da contagem de conídios em câmara de Neubauer. Dessa suspensão 1 mL era homogeneizada com 9 mL de meio BDA liquefeito e a mistura vertida sobre as placas contendo os actinomicetos crescidos. As placas eram incubadas a uma temperatura de 28°C por 5 dias. Após o período de incubação a presença ou ausência de halos de inibição era determinada.

Resultados e Discussão

Através do ensaio de dupla-camada foi possível avaliar e selecionar os isolados de actinomicetos com potencial antifúngico. O isolado 1S mostrou 100% de eficiência contra as amostras do fungo *B. sorokiniana* e o isolado 6S mostrou atividade antifúngica apenas contra o isolado BS18M2, os demais actinomicetos não tiveram atividade antifúngica contra *B. sorokiniana* (Tabela 1).

Nascimento & Van Der Sand (2008), analisaram o polimorfismo das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA de 57 isolados de *B. sorokiniana*. Os 10 isolados utilizados no presente estudo estão entre os avaliados pelos autores. Conforme resultados obtidos no trabalho de polimorfismo, foi possível notar que o isolado BS18M2 mostrou baixa similaridade com os demais isolados utilizados no presente trabalho. Sendo esta uma possível explicação para que o actinomiceto 6S tenha conseguido inibir apenas o isolado BS18M2.

Tabela 1. Resultados do potencial antifúngico de isolados de actinomicetos frente isolados de *Bipolaris sorokiniana* obtidos no ensaio de dupla-camada.

	98003	98007	98010	98011	98012	98025	98028	BS18M2	CF0201	1965
AP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6s	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
6e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Conclusão

O isolado 1S demonstra grande potencial antifúngico contra *Bipolaris sorokiniana*.

Referências

- COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT, C. & BARCA, E. A. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 4951-4959.
- KHAMNA, S., YOKOTA, A., PEBERDY, J. F. & LUMYONG, S. 2009. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology* 6(3): 143-147.
- KUMAR, D., CHAND, R., PRASAD, L. C. & JOSHI, A. K. 2007. A new technique for monoconidial culture of the most aggressive isolate in a given population of *Bipolaris sorokiniana*, cause of foliar spot blotch in wheat and barley. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 1647-1651.
- NASCIMENTO, E. J. & VAN DER SAND, S. T. 2008. Restriction analysis of amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana* isolates. *World Microbiol Biotechnol* 24: 647-652.
- SALEHPOUR, M., ETEBARIAN, H. R., ROUSTAEI, A. & AMINIAN, H. 2005. Biological Control of Common Root Rot of Wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by *Trichoderma* Isolates. *Plant Pathology Journal* 4(1): 85-90.

SUSCETIBILIDADE DE BIODIESEL DE SEBO A CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS

Juciana Cazarolli¹; Francielle Bücken¹; Fernando Viscardi¹; Laiza Canielas²; Gabriela Pereira da Silva Maciel³; Bruna Onorevoli³; Márcia Cardoso Manique⁴; Gerônimo Rodrigues Prado⁵; Tatiana Simonetto Colla⁵; Fátima Menezes Bento⁶

¹DMIP/UFRGS, jucianacazarolli@gmail.com; ²UFPEL; ³ IQ/UFRGS; ⁴PGCIMAT; ⁵PPGMAA-UFRGS; ⁶RBTB-UFRGS, fatimabento@yahoo.com.br

Resumo - A produção de biodiesel vem sendo aprimorada utilizando-se diferentes matérias primas, catalisadores e purificadores na transesterificação, resultando em um combustível de melhor qualidade e de menor custo. As características do biodiesel produzido podem influenciar na suscetibilidade deste combustível à contaminação microbiana, o que tem sido uma freqüente preocupação, visto que esta acarreta em alterações nas propriedades do combustível, durante seu armazenamento. O objetivo do trabalho é comparar o crescimento microbiano no biodiesel de gordura animal, produzido com NaOH e KOH e purificado com diferentes métodos, via água e via magnésol. O experimento foi realizado em frascos de vidro com capacidade para 200mL, constituído de 45mL de meio mínimo mineral e 5mL de cada tipo de biodiesel (4 tratamentos), e foram adicionados 10^4 esporos.mL⁻¹ de um fungo. O experimento foi conduzido em triplicata, sendo que as análises foram realizadas durante 60 dias. A cada 10 dias avaliou-se: formação de biomassa do fungo (peso seco); produção de enzimas (lípase); produção de metabólitos oriundos do crescimento do fungo (pH); e, na fase oleosa, a variação no teor de ésteres totais (cromatografia gasosa, Norma ANP-EN 14103). Ao final dos 60 dias, pode-se observar menor formação de biomassa no biodiesel NaOH-Água (576mg), seguido pelo biodiesel NaOH-Magnésol (773mg). Os biodieseis KOH-Magnésol e KOH-Água favoreceram a formação de biomassa (891mg e 930mg, respectivamente). As análises de Tensão Superficial e índice de emulsificação indicaram que o fungo não produziu nenhum produto emulsificante. As medidas de pH não se alteraram ao longo das análises.

Palavras Chave: biodiesel, gordura animal, armazenamento, contaminação.

Introdução

A suscetibilidade do biodiesel e das misturas de diesel e biodiesel à contaminação microbiana tem sido uma freqüente preocupação, visto que esta contaminação, além de reações de natureza hidrolítica e oxidativa, acarretam em alterações nas propriedades do combustível, durante seu armazenamento (Bento *et al*, 2006). Estudos (Passman, 2005) indicam que quanto maior a concentração de biodiesel na mistura maior a tendência de formação de borras de origem biológica. Isto foi verificado para fungos deteriorogênicos de diesel e biodiesel, *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* sp., que apresentaram maior crescimento em B100 e B20 (Bücken *et al*, 2010). Neste sentido, há estudos voltados para análises do comportamento de biodiesel proveniente de gordura animal (sebo), além do biodiesel de soja.

Óleos vegetais e gorduras animais passam por processos químicos como a transesterificação, que envolve a reação entre um triglicerídeo (gordura animal ou óleo vegetal) com um álcool, resultando no biodiesel (ésteres de ácidos graxos) e glicerina, como co-produto. Visando economizar no processo e otimizar as condições de produção de

biodiesel por transesterificação, o biodiesel vem sendo desenvolvido utilizando diferentes catalisadores e avaliando a purificação do produto, por meios alternativos ao uso de água (Passman, 2005). Diante da possibilidade em se produzir biodiesel utilizando-se os mais variados produtos, verificou-se a necessidade em avaliar a suscetibilidade a contaminação microbiana dos mesmos.

Assim, o objetivo deste trabalho é comparar o crescimento microbiano no biodiesel de gordura animal e produzido com NaOH e KOH e purificado com diferentes métodos, via água e via magnesol produzidos pelo Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Material e Métodos

Avaliou-se o crescimento de um fungo deteriorogênico de diesel e biodiesel, isolado de borra de centrífuga de biodiesel, em frascos de vidro, contendo uma fase oleosa do biodiesel de gordura animal (NaOH-água, NaOH-magnesol, KOH-água, KOH-magnesol) (5 mL) e uma fase aquosa com meio mínimo mineral (45 mL), na durante 60 dias, onde foi adicionada uma suspensão de 10^4 esporos.mL⁻¹. A avaliação da biomassa foi feita por medidas de peso seco. A fase aquosa dos experimentos de curva de crescimento foi avaliada quanto à presença de substâncias emulsificantes, tensoativas, e de metabólitos com características ácidas ou básicas. Na fase oleosa será verificada a degradação das cadeias de ésteres de ácidos graxos pela EN 1403. A análise estatística constou da análise da pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

Na Figura 1 pode-se verificar o crescimento do fungo em meio mineral e os quatro tipos de biodiesel de sebo. Ao final de 60 dias de avaliação observa-se que os biodieseis KOH-Magnesol e KOH-Água favoreceram a formação de biomassa (891 mg e 930 mg, respectivamente) diferindo significativamente ($p < 0,05$) da biomassa formada em NaOH-Água (576 mg), em que se observou o menor crescimento.

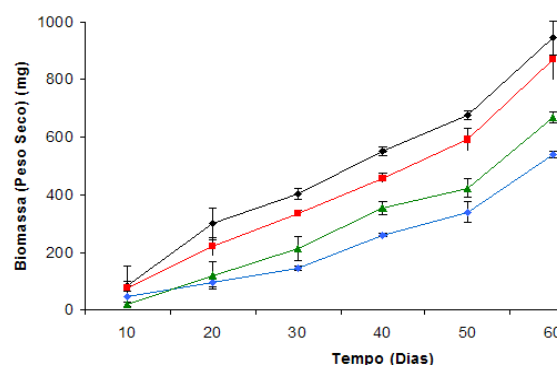


Figura 1. Curva de crescimento do fungo filamentososo em meio mineral e quatro tipos de biodiesel de sebo durante 60 dias, a 28°C. (♦) KOH-Água, (■)KOH-Magnesol, (▲)NaOH -Magnesol, (◆) NaOH-Água.

Os dados de crescimento do fungo utilizando o biodiesel de sebo como única fonte de carbono, indicam que o biodiesel (B100) favorece o crescimento de microrganismos, além disso, as condições de produção também podem influenciar a formação de biomassa. Neste sentido, verifica-se que em termos de armazenamento, o biodiesel produzido com o catalisador NaOH e purificado com água ou com magnesol, seriam os mais indicados para

compor as misturas (BX) em circulação no país. No entanto, esta sugestão é referente ao biodiesel produzido a partir de gorduras animais, uma vez que a matéria prima utilizada na produção pode apresentar características diferenciadas ao final da transesterificação (Leung *et al.*, 2010).

Tabela 1. Medidas de tensão superficial e de pH nos tratamentos com os diferentes biodieseis e seus respectivos controles (sem inóculo), ao final de 60 dias.

<i>Biodiesel</i>		<i>Tensão Superficial</i> (mN.m ⁻¹)	<i>pH</i>
<i>NaOH-Água</i>	Tratamento	31,7	6,88
	Controle	30,3	6,81
<i>NaOH-Magnesol</i>	Tratamento	30,1	6,87
	Controle	28,7	6,93
<i>KOH-Água</i>	Tratamento	29,8	6,87
	Controle	29,9	6,84
<i>KOH-Magnesol</i>	Tratamento	29,2	6,89
	Controle	30,5	6,86

As análises de medidas de tensão superficial (Tabela 1) mostraram que houve redução nas medidas de tensão superficial da fase aquosa em todos os tratamentos. Provavelmente, essa redução foi causada pelo próprio biodiesel de sebo, uma vez que sua composição apresenta ésteres (hidrofílicos) de ácidos graxos (hidrofóbicos), ou seja, atua como um surfactante e reduz as medidas de tensão superficial. As análises de índice de emulsificação indicaram que, nestas condições, o fungo não produziu nenhum produto emulsificante. Inicialmente as medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos foram em torno de 7,2, no entanto, tais medidas indicaram que não houve uma redução significativa deste parâmetro ao final de 60 dias (Tabela 1).

A caracterização cromatográfica do biodiesel de sebo nos dará informações sobre a composição dos ésteres de ácidos graxos e o teor de ésteres, que o compõem; além disso, outras informações como o teor de glicerina livre e total, de mono/di/triglicerídeos podem indicar qual fração do biodiesel foi utilizada pelo fungo como fonte de carbono.

Apoio

Ao MCT/SGTS, FINEP, e CNPq.

Referências

- Bento, F. M., Viscardi, L.C.; Daroda, R. Menezes, A.G.; Gaylarde, C.C.; Camargo, F. A.; Suscetibilidade do óleo diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. **Revista Biodiesel**, Vol 4, p. 24-26, 2006.
- Bücker, F. ; Santestevan, N. A. ; Jacques, R. J. S. ; Peralba, M. C. ; Camargo, F. A. O. ; Gaylarde, C. C. ; BENTO, F. M.; Impact of biodiesel on biodeterioration of stored brazilian diesel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, in press, 2010.
- Leung, D.Y.C., Wu, X., Leung, M.K.H.; A review on biodiesel production using catalyzed transesterification, **Applied Energy**, Vol 87, p. 1083–1095, 2010.
- Passmann, F.; Dobranick, J.K. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: **International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, p.18-22, 2005.

3. Microbiologia Industrial

BIOACCUMULATION AND BIOREMOVAL OF SELENITE BY *Enterococcus* SPECIES

Simone Pieniz¹; Robson Andreazza²; Benedict C. Okeke³; and Adriano Brandelli¹

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA) – UFRGS; E-mail: nutrisimone@yahoo.com.br / Professor PPGMAA; E-mail: abrand@ufrgs.br; ²Pós-Doutorando do Departamento de Solos – UFRGS; Bolsista REUNI; E-mail: robsonandreazza@yahoo.com.br; ³Professor do Departamento de Biologia, Auburn University at Montgomery / AUM - USA; E-mail: bokeke@aum.edu

Abstract - The genus *Enterococcus* belong to the genera of bacteria that produce lactic acid and can confer health benefits to living organisms. Selenium (Se(IV)) is an essential micronutrient for humans and animals. Thirty-six *Enterococcus* species isolated from dairy products were screened for Se(IV) sorption capacity for use as a probiotics in animal nutrition. Several isolates grew luxuriantly and significantly removed Se(IV) from Se(IV) amended medium. Two isolates, LAB 14 and LAB 18, identified by 16S rRNA gene sequence analysis as *Enterococcus faecalis* (98% nucleotide sequence similarity) and *Enterococcus faecium* (97% nucleotide sequence similarity), respectively, were selected for further studies. LAB 18 displayed the highest Se(IV) bioremoval capacity and removed more than 8 mg L⁻¹ of Se(IV). Substantial amount of Se(IV) was detected in biomass of *E. faecium* (0.4599 mg g⁻¹ of dry weight) and *E. faecalis* (0.4759 mg g⁻¹ of dry weight). The significant uptake of Se(IV) by the *Enterococcus* species observed in this study suggest that they can be used to deliver dietary Se(IV) through feed augmentation with Se(IV)-enriched *Enterococcus* biomass.

Keywords: *Enterococcus*; selenium; biomass production; biosorption.

Introduction

The enterococci, considered probiotic microorganisms, are Gram-positive, catalase-negative, spherical bacteria that share many characteristics with the genera *Streptococcus* and *Lactococcus* in the order Lactobacillales (Cai, 1999). Currently, there is increasing interest to add probiotic microorganisms to animal diets in place of antibiotics because they leave no residues in the environment and the carcass of the animal which may cause resistance to antimicrobials (Simon, 2005).

Se(IV) is an essential micronutrient because of its antioxidant properties. A number of microorganisms have been reported to take up and transform significant concentrations of selenium species such as selenate and selenite (Siddique et al., 2005). However, only few studies on selenite uptake and transformation have been conducted with probiotic microorganisms (Zhang et al., 2009). Se-enriched probiotic microbial biomass can be used to deliver dietary levels of Se(IV) to livestock through feed augmentation. In this study the capacity of *Enterococcus* strains to remove and accumulation Se(IV) added to culture medium was investigated.

Materials and methods

Thirty six lactic acid bacteria (LAB) isolated from “Minas Frescal” cheese were used in this study. Each inoculum were prepared by transferring three loops of each isolate to 20

mL of tryptic soy broth (TSB) in air-tight sealed tubes without shaking and incubated at 35°C for 24 h without agitation. Optical density (OD₆₀₀) of each inoculum was measured using a spectrophotometer. Five milliliters of TSB amended with sodium selenite were inoculated in independent experiments with 100 µL of each inoculum and gently mixed. Cultures were incubated at 35°C for 24 h. Inhibition (%) was calculated as % difference in OD₆₀₀ of cultures amended and not amended with Se(IV).

Biomass development in culture was monitored by measuring optical density (OD₆₀₀) using sterile tryptic soy broth as the blank. Remaining Se concentrations in supernatants of cultures subjected to centrifugation (2.500 x g for 10 min) were analyzed by hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS).

The method of Zhang et al. (2009) was used with slight modification for determination of selenium content in biomass. Briefly, twenty milliliters of TSB medium amended with 15 mg L⁻¹ of sodium selenite were inoculated with 100 µL of each inoculum. Strains were cultivated at 35°C for 24 h. Cells were harvested by centrifugation and then submitted to digestion. The selenium content in each sample was determined following digestion in concentrated nitric-perchloric acid by Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). Two isolates LAB 14 and LAB 18, selected for further studies were identified by 16S ribosomal rRNA gene sequencing.

Results and discussion

Selenium, a metalloid, is an essential nutrient necessary for good health in living systems at low concentrations. Two *Enterococcus* species identified as *E. faecalis* and *E. faecium* by 16S rRNA sequencing displayed significant uptake of Se(IV) under different culture conditions. Cells were slightly red in most cases and substantiate the uptake and transformation of Se⁺⁴ to elemental Se⁰.

Substantial growth was recorded with the 36 lactic acid bacterial isolates. Between 0% and 28% inhibition of biomass development was observed amongst the isolates. LAB 20 was the most sensitive to Se(IV) and 28% inhibition was observed after 24 h of growth in medium amended with 10 mg L⁻¹ Se(IV). On the other hand, isolate LAB IS 197 was the least sensitive to Se(IV) with 0% inhibition observed in 24 h. Bioremoval of Se(IV) from media by LAB isolates is shown in Figure 1.

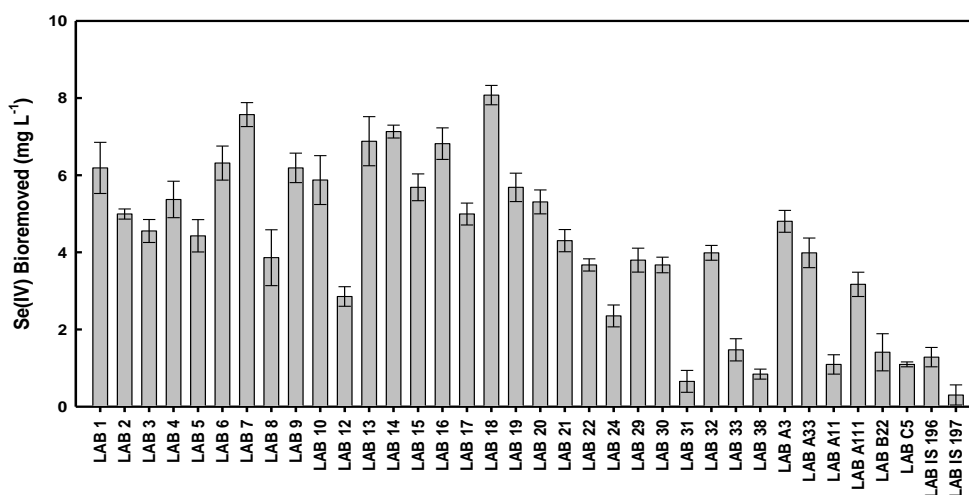


Figure 1. Se(IV) bioremoval LAB isolates after 24 h incubation in medium amended with 10 mg L⁻¹ of selenite at 30°C under static condition. Error bars are standard errors of the means of triplicate independent experiments.

Many of the isolates displayed significant Se(IV) bioremoval. Se(IV) bioremoval capacity was however comparatively higher in isolates LAB 7, 13, 14, 16 and 18 compared to other isolates. LAB 18 displayed the highest Se(IV) bioremoval capacity and removed more than 8 mg L⁻¹ of Se(IV) (> 80% bioremoval in 24 h). Se(IV) bioremoval was less than 2% in isolates LAB 31, 33, 38, A11, B22, C5, IS 196 and IS 197. Two isolates, LAB 14 and LAB 18, were selected for characterization of Se(IV) bioaccumulation in biomass.

Our results showed that LAB 14 and LAB 18 are efficiently able to bioaccumulate selenium in the microbial biomass. The selenium content in the biomass of isolates LAB 14 and LAB 18 was determined after growth in medium amended with 15 mg L⁻¹ of Se(IV) for 24 h (Table 1). The selenium content in biomass was 0.4759 and 0.4599 mg of selenium g⁻¹ of dry weight of biomass of *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively.

Table 1. Selenium accumulation in biomass by isolates LAB 14 (*E. faecalis*) and LAB 18 (*E. faecium*) growing in medium without selenium (control) and medium amended with 15 mg L⁻¹ of sodium selenite (Se-IV).

Isolates	Biomass		Se(IV) Accumulation	
	Control	Se(IV)	Control	Se(IV)
	----- OD ₆₀₀ -----		----- mg g ⁻¹ -----	
LAB 14	1.580 ± 0.0030*	1.118 ± 0.0008	0.0040 ± 0.0018	0.4759 ± 0.0198
LAB 18	1.500 ± 0.0032	0.997 ± 0.0024	ND**	0.4599 ± 0.0622

*Values are means ± standard errors of triplicates.

**ND: not detectable.

Conclusion

Our results indicate that LAB 14 and LAB 18 are potential organisms for supply of dietary levels of selenium through use of Se-enriched biomass as probiotic agents and in feed supplementation.

Acknowledgments

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

References

- CAI, Y. Identification and Characterization of *Enterococcus* Species Isolated from Forage Crops and Their Influence on Silage Fermentation. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2466-2471, 1999.
- SIDDIQUE, T.; OKEKE, B.C.; ZHANG, Y.; ARSHAD, M.; HAN, K.; FRANKENBERGER, W.T.Jr. Bacterial diversity in selenium reduction of agricultural drainage water amended with rice straw. *Journal of Environmental Management*, v. 34, p. 217-226, 2005.
- SIMON, O. Micro-Organisms as Feed Additives - Probiotics. *Advances in Pork Production*, v. 16, p. 161-16, 2005.
- ZHANG, B.; ZHOU, K.; ZHANG, J.; CHEN, Q.; LIU, G.; SHANG, N.; QIN, W.; LI, P.; LIN, F. Accumulation and species distribution of selenium in Se-enriched bacterial cells of the *Bifidobacterium animalis* 01. *Food Chemistry*, v. 115, p. 727-734, 2009.

DIVERSIDADE DE MICROORGANISMOS QUERATINOLÍTICOS CULTIVÁVEIS DO CONTINENTE ANTÁRTICO COM POTENCIAL UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL

Jamile Queiroz Pereira^{1,2}; Michele Utpott²; Fernanda Cortez Lopes^{1,2}; Luis Fernando da Costa Medina³; Adriano Brandelli².

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular-UFRGS, ²Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos-UFRGS, ³Programa de Pós Graduação em Biologia-UNISINOS

Resumo – Micro-organismos são uma valiosa alternativa para tornar biodisponíveis compostos de difícil degradação por outros organismos. Um exemplo desta utilização são as bactérias capazes de degradar a queratina de penas. Porém, o uso de enzimas microbianas com este propósito é restrito, devido aos elevados custos energéticos envolvidos, uma vez que a maioria dos micro-organismos estudados com esse propósito apresenta ótimos de atividades enzimáticas sob temperaturas mesofílicas ou termofílicas. O objetivo desse estudo foi determinar a diversidade de bactérias cultiváveis obtidas da Antártida capazes de degradar queratina, assim como a identificação de uma linhagem com ótimo de temperatura ótima de ação enzimática reduzida. Amostras de penas foram coletadas em pinguineiras abandonadas nas ilhas Rei George, Antártida e cultivadas a temperatura ambiente em ágar farinha de pena como única fonte de carbono e nitrogênio. Após o crescimento, colônias com morfologias diferentes foram repicadas para placas com meio TSA, mantidas sob refrigeração e utilizadas para a obtenção do rDNA 16S, construção de filogenias e para os testes enzimáticos. Os resultados preliminares revelaram a existência de 8 isolados pertencentes a linhagens bacterianas distintas, todos apresentando capacidades variáveis de degradar queratina, mesmo sob baixas temperaturas, fator de relevância para seu emprego industrial com diminuição dos gastos energéticos.

Palavras-chave: queratinases, 16S rDNA, filogenia, Antártida

Introdução

Microrganismos são uma valiosa alternativa para tornar biodisponíveis compostos de difícil degradação por outros organismos. Um exemplo desta utilização são as bactérias capazes de degradar a queratina de penas, tornando tal resíduo da indústria avícola, utilizado como suplemento da ração animal, uma fonte melhor aproveitável de aminoácidos, em contrapartida aos métodos tradicionais de cocção e moagem. Esses métodos podem destruir certos aminoácidos essenciais e diminuir a qualidade protéica e sua digestibilidade (MORITZ e LATSHAW, 2001). No entanto, os resíduos ricos em queratina são de difícil degradação, uma vez que o polipeptídeo está densamente empacotado e fortemente estabilizado por várias pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, em adição a várias pontes dissulfeto (BRANDELLI, 2008). Queratinases são uma classe particular de enzimas proteolíticas que apresentam a capacidade de degradar queratina insolúvel (ONIFADE et al., 1998). O melhoramento nutricional da ração de penas através do tratamento com essas enzimas microbianas já tem sido descrito há bastante tempo. Elmayergi e Smith (1971), mostraram que a ração de pena fermentada por *Streptomyces fradiae* e suplementada com metionina resultou em um aumento na taxa de crescimento em frangos de corte quando comparados com aqueles alimentados com proteína de soja isolada. Porém, o uso de enzimas microbianas com este propósito é restrito, devido aos elevados custos energéticos para se atingir o máximo de crescimento e degradação dos resíduos, pois a maioria das enzimas

queratinolíticas estudadas provêm de bactérias com características mesofílicas ou termofílicas (RIFFEL e BRANDELLI, 2006). Nos últimos anos, tem crescido o interesse na investigação do potencial para a aplicação biotecnológica dos micro-organismos psicrófilos (AGUILLAR, 1996), dos quais ainda existe uma lacuna de conhecimento. Assim, os objetivos deste trabalho foram conhecer a diversidade de micro-organismos cultiváveis provenientes da Antártida produtores de queratinases, bem como identificar uma linhagem microbiana que apresente ótimos de crescimento e produção de queratinases sob temperaturas reduzidas.

Materiais e Métodos

Amostras de penas foram coletadas em pinguineiras abandonadas nas ilhas Rei George, Antártida durante o verão de 2010. Em laboratório, 0,1g do material foram solubilizados em 900 µL de solução salina (0,85%) e 100 µL da solução foram semeadas pelo método *spread plate* em meio ágar farinha de pena (AFP) 1% como única fonte de carbono e nitrogênio. Após uma semana incubadas em temperatura ambiente ($\approx 20^{\circ}\text{C}$) colônias com morfologias visivelmente diferentes foram repicadas para novas placas AFP. Depois de cultivos subsequentes, as colônias puras foram semeadas em placas contendo meio ágar tripsina de soja (TSA) e mantidas sob refrigeração (4°C). O DNA total foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio (MANIATIS et al 1982), modificado e os primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') foram utilizados para amplificar o gene ribossomal 16S. Para o seqüenciamento, foram utilizados o primer 27F e o senso interno 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'). As sequências obtidas foram submetidas ao algoritmo de busca por similaridade BLAST do banco de dados *Genbank* e posteriormente editadas no software *Bioedit 7.0* (HALL, 1999), a partir de onde foi elaborada uma matriz com os dados. As árvores filogenéticas foram inferidas a partir do modelo de Jukes e Cantor no programa MEGA 4.0 (KUMAR et al, 2001). A confiabilidade dos nós foi avaliada através de 1000 réplicas de *Bootstrap*. Para os testes enzimáticos, uma alçada de cada isolado foi inoculada em 25 mL de meio BHI e após 24 h, 1 mL deste pré-inóculo foi inoculado em 50mL do meio caldo farinha de pena (CFP) 1% e mantidas em agitador orbital (125 rpm), 25°C , por até 72h. A cada 12h, alíquotas de 1mL do meio foram retiradas e a atividade queratinolítica foi avaliada utilizando-se azoqueratina, sintetizada de acordo com Riffel et al. (2003), como substrato através do seguinte método. A mistura para a reação consistiu em 100µl de sobrenadante enzimático e 500 µl de solução de azoqueratina 20mg/ml em tampão fosfato dissódico pH 7,0. A mistura foi incubada em temperaturas que variaram de 30°C a 40°C por 1h. A reação foi parada pela adição de 800µl de ácido tricloroacético 30%. Depois de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 440nm. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada a quantidade de enzima capaz de causar uma mudança na absorbância de 0,01 a 440nm por 1h em determinada temperatura (MACEDO et al., 2005).

Resultados e Discussão

Os resultados preliminares evidenciaram a existência de pelo menos 8 isolados diferentes capazes de crescer em AFP como única fonte de nutrientes. Destes, foram obtidas as sequências parciais (763pb) do gene do rDNA 16S de 4 isolados, os quais foram submetidos ao algoritmo de busca por similaridade BLAST do banco de dados do GenBank. A identificação e reconstrução filogenéticas preliminares apontaram que estes 4 isolados pertencem a grupos distintos com propriedades queratinolíticas variáveis. O isolado A08

mostrou-se estreitamente relacionado a *Arthrobacter*, enquanto o isolado A01 foi recuperado em um ramo com 100% de valor de suporte juntamente com *Rhodococcus*, ambas pertencentes aos Actinomycetales, os quais formaram um ramo monofilético com valor de *bootstrap* de 100%. O isolado A03 compartilhou um ramo com alto valor de suporte (100%) com *Lysobacter* e o isolado A04 exibiu estreita relação com *Burkholderia* (100%), ambas pertencentes ao grupo Proteobacteria. Nos ensaios enzimáticos, os isolados A03 (*Lysobacter*) e A04 (*Burkholderia*) apresentaram as maiores atividades no substrato azoqueratina, a temperatura de 30°C, pH 7,0, exibindo ótimos de atividade enzimática entre 24 e 36h. Este estudo revela a diversidade de microrganismos queratinolíticos em grupos não estudados anteriormente, podendo ser utilizado como ponto de partida na investigação da degradação de queratina por bactérias ambientais de regiões frias como a Antártida.

Conclusões

As queratinases são enzimas valiosas para a degradação de compostos recalcitrantes como a queratina presente na pena das aves. O conhecimento sobre os micro-organismos queratinolíticos tem crescido enormemente nos últimos anos. Dessa forma, uma melhor estimativa da sua diversidade é de extrema importância para seu uso industrial. Através das análises e discussão dos resultados preliminares deste trabalho, colocou-se em evidência uma série de aspectos: num primeiro momento, foi estudada a diversidade de bactérias queratinolíticas cultiváveis amostradas em pinguineiras no continente Antártico. Observou-se que existe uma diversidade considerável de tais organismos que estão distribuídos por vários domínios de bactérias. Verificou-se ainda, que várias bactérias desenvolvem-se em meios contendo queratina e que a atividade proteolítica foi induzida por esta proteína mesmo sob baixas temperaturas, o que representa um fator relevante para a diminuição dos gastos energéticos para a utilização de tais enzimas.

Apoio

CAPES, PPGBCM-UFRGS, PROANTAR, PPG em Biologia – UNISINOS.

Referências

- AGUILLAR, A. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*, n.18, p. 89–92, 1996.
- BRANDELLI, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology*, n. 1, p.105–116, 2008.
- ELMAYERGI, H. H.; SMITH, R. E. Influence of growth of *Streptomyces fradiae* on pepsin-HCl digestibility and methionine content of feather meal. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 17, p. 1067-1072, 1971.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- KUMAR, S.; DUDLEY, J.; NEI, M.; TAMURA, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, n. 9, p. 299-306, 2008.
- MACEDO, A.J.; SILVA, W.O.B.; GAVA R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J.A.P., TERMIGNONI, C. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, n.71, p.594–96, 2005.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOCK, J. Molecular cloning. A laboratory manual. Nova Iorque: Cold spring harbour laboratory press, 1992.

MORITZ, J. S.; LATSHAW, J. D. Indicators of nutritional value of hydrolyzed feather meal. *Poultry Science*, n. 80, p. 79-86, 2001.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, n. 37, p. 395–399, 2006.

RIFFEL, A.; ORTOLAN, S.; BRANDELLI, A. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, n. 78, p. 855-59, 2003.

IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Bacillus* sp. ISOLADOS DE PUBA, UM PRODUTO FERMENTADO DE MANDIOCA

Karla Joseane Perez¹, Fernanda Cortez Lopes²; Silvia Malta Crispim¹; Adriano Brandelli³; Regina Maria Nardi Drummond⁴

¹Estudante do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG. E-mail: karlapj@ufmg.br, silviamcrispim@yahoo.com.br; ²Estudante do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS. E-mail: fernandacortezlopes@yahoo.com.br; ³Professor do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS. E-mail: abrand@ufrgs.br; ⁴Professora do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. E-mail: nardi@ufmg.br.

Resumo Diversos peptídeos antimicrobianos são produzidos por diferentes espécies de *Bacillus* sp. e alguns já foram purificados. Neste trabalho foram identificados, por meio de testes bioquímicos e moleculares, duas espécies de *Bacillus* sp. isolados de puba, um produto fermentado de mandioca, além de terem sido testadas suas atividades antibacterianas contra espécies intimamente relacionadas e algumas bactérias lácticas. Os resultados demonstraram 99% de similaridade de ambas as espécies para *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*. Também apresentaram atividade antibacteriana contra todos os micro-organismos testados, exceto contra uma espécie de bactéria láctica, quando os sobrenadantes de culturas foram liofilizados e concentrados 10 vezes e tiveram produção de antimicrobianos na melhor condição analisada.

Palavras-chave: *Bacillus*, atividade antimicrobiana, identificação, puba.

Introdução

Atualmente, o gênero *Bacillus* é fenotípicamente composto por um conglomerado de bactérias Gram-positivas, de fermentação aeróbia, esporuladas e associadas com habitats terrestres. Os limites fenotípicos deste grupo são mal definidos, devido à falta de padrões para diagnóstico informativo e caracterização fenotípica. Mesmo com melhorias recentes na aplicabilidade de abordagens moleculares para a filogenia microbiana, como o sequenciamento baseado em análise de 16S rDNA, este não tem sido capaz de discriminar espécies intimamente relacionadas dentro deste grupo (YAMADA et al., 1999).

Os peptídeos antibacterianos estão ganhando mais atenção como uma alternativa terapêutica, bem como para a prevenção da deterioração e degradação de alimentos entre outros produtos (ANTHONY et al., 2009). A produção de bacteriocinas ou substâncias do tipo bacteriocina foi descrita em muitas espécies do gênero *Bacillus*, incluindo *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium* e outros (JACK et al, 1995). Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi testar a atividade antibacteriana de isolados de *Bacillus* sp., recuperados de puba, contra diferentes bactérias, bem como identificar estes isolados, por métodos bioquímicos e moleculares.

Materiais e Métodos

Dois tipos de amostras bacterianas foram incluídas no estudo. As primeiras são duas amostras de *Bacillus* sp., que foram isoladas do alimento fermentado de origem indígena, produzido a partir de raízes de mandioca imersas em água, denominado puba. E as demais,

foram amostras indicadoras da atividade antimicrobiana: *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, *Weissella paramesenteroides* (isolado de alimento), *B. cereus* A-1 (isolado de puba), *B. cereus* B-2 (isolado de puba), *B. cereus* C-3 (isolado de puba), *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis* DSM 3258, *B. subtilis* ATCC 21228, *B. subtilis* ATCC 7971. As culturas de trabalho de *Bacillus* sp. foram cultivados em ágar e caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubados em agitador sob condições de agitação constante a 125 rpm a 37°C/24h e 42°C/24h. Os micro-organismos indicadores foram conservados, dependendo da sua espécie, em ágar BHI ou ágar MRS (*Lactobacillus* Ágar - *De Man, Rogosa and Sharpe*). No ensaio de determinação da atividade antibacteriana foram analisadas algumas condições de crescimento e produção da(s) possível(is) substância(s) antimicrobiana(s), pelos dois microrganismos estudados, utilizando os meios BHI e TSB (“Tryptic Soy Broth”).

Tabela 1- Condições de crescimento e produção da(s) substância(s) antimicrobiana(s) em agitador.

Condição	Meio	Temperatura (°C) de Incubação	
		Pré-Inóculo	Inóculo
1	TSB	30 , 24	30 , 24
2	TSB	30 , 24	42 , 24
3	TSB	37 , 24	42 , 24
4	BHI	30 , 24	30 , 24
5	BHI	30 , 24	42 , 24
6	BHI	37 , 24	42 , 24

Tempo de Incubação: 24 h. Agitação de 125 rpm.

A atividade antibacteriana dos sobrenadantes foi determinada de acordo com o método de difusão em ágar segundo Motta & Brandelli (2002) com adaptações. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Foram realizados testes fenotípicos e moleculares para a identificação dos micro-organismos. A identificação presuntiva foi baseada na morfologia celular, pela coloração de Gram e pesquisa de catalase. Os testes bioquímicos utilizados foram: Fermentação da Glicose, Motilidade, Redução de Nitrato, Resistência à Lisozima, Voges-Proskauer, Hemólise, Crescimento rizoidal e verificação da presença de cristais de toxina. A identificação molecular foi realizada por meio do sequenciamento do rDNA16S. O DNA genômico foi extraído pelo método fenol/clorofórmio e as Reações em Cadeia da Polimerase foram realizadas empregando os *primers* universais 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), conforme Lisboa et al. (2006). Os amplicons foram purificados e sequenciados pelo ATCGene (Porto Alegre, Brasil). O algoritmo BLAST foi utilizado para busca por sequências homólogas no GenBank e, para alinhamento destas sequências, utilizou-se o software BioEdit.

Resultados e Discussão

No presente trabalho, foram selecionadas duas linhagens de *Bacillus* sp. isoladas de duas amostras de puba. Os resultados dos testes bioquímicos estão na tabela 2.

Os resultados das análises de sequenciamento do rDNA 16S foram os seguintes: para o isolado *Bacillus* sp. (C) e *Bacillus* sp. (E) obtivemos 99% de identidade com as espécies *B. cereus* e *B. thuringiensis* com 1507 pb e 1420 pb, respectivamente. De fato, a taxonomia do denominado grupo *B. cereus* não foi ainda completamente elucidada. Espécies deste grupo compreendem, atualmente *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides*,

apresentando, uma estreita e notável proximidade genética. Devido às características fenotípicas indistinguíveis e as características genotípicas destes organismos, Ash et al. (1991) consideram que *B. thuringiensis*, *B. mycoides* e *B. anthracis* são subespécies de *B. cereus*.

Tabela 2- Resultados dos testes fenotípicos para as amostras de *Bacillus* sp. estudadas.

Colônia/ Amostra	Ferm. Glic.	Motil.	Redu. Nitrito	Resist. Liso.	V.P.	Hem.	Cresc. Rizoid.	Gram	Catal.	Cristais de toxina
<i>Bacillus</i> sp. (C)	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>Bacillus</i> sp. (E)	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Bacillus cereus</i> (controle +)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-

As análises de atividade antibacteriana revelaram que a melhor condição de inibição dos micro-organismos indicadores utilizados foi do cultivo de *Bacillus* sp. (E) em pré-inóculo a 37°C e inóculo a 42°C em caldo BHI, ocorrendo inibição de todos os micro-organismos testados, com exceção da *W. paramesenteroides*, com halos que variaram de 10 a 14 mm. Além disso, a mesma condição de incubação descrita acima, mudando-se apenas o meio de cultura para TSB foi a segunda melhor condição para *Bacillus* sp. (E), inibindo micro-organismos como *B. subtilis* ATCC – 21228, *B. subtilis* DSM 3258, *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350 e *B. cereus* ATCC 14579. Já para o *Bacillus* sp. (C) a melhor condição de inibição foi o meio TSB com pré-inóculo a 30°C/24h e inóculo a 30°C/24h igualmente, inibindo apenas um microrganismo: *Bacillus cereus* ATCC 14579 e inibindo *B. cereus* (C-3) (isolado de alimento) na condição de pré-inóculo a 30°C/24h e inóculo a 42°C/24h no meio TSB igualmente. Resultados semelhantes foram encontrados por Bizanni e Brandelli (2002) onde uma espécie de *Bacillus cereus* 8A, posteriormente caracterizada e identificada como produtora de uma bacteriocina denominada cereína, inibiu diversos microrganismos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* e diversas espécies de *Bacillus*, além de inibir *Streptococcus bovis* e *Micrococcus luteus*.

Conclusões

Sugere-se que os micro-organismos isolados de pupa de mandioca identificados por testes bioquímicos e moleculares sejam pertencentes ao gênero *Bacillus* e possivelmente a espécie *B. cereus* ou *B. thuringiensis*. No entanto, mais análises, possivelmente moleculares, se fazem necessárias para confirmação da espécie.

As análises de atividade antibacteriana revelaram amplo espectro de inibição contra todas as bactérias testadas, especialmente para a bactéria *Bacillus* sp. (E), na melhor condição de cultivo, apresentando-se como possível candidata para seleção para estudos posteriores de purificação e identificação dos compostos antimicrobianos produzidos por esta espécie.

Apoio
CNPq

Referências

ANTHONY, T. et al. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 872–877, 2009.

ASH, C. et al. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related, species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 41, 343– 346, 1991.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 512–519, 2002.

LISBOA, M. P. et al. Characterization of a bacteriocin- like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. i v. 9, p. 111- 118, 2006.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 63-70, 2002.

YAMADA, S., OHASHI, E., AGATA, N., VENKATESWARAN, K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1483– 1490, 1999.

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE PIGMENTOS

Fernanda Cortez Lopes¹; Deise Michele Tichota²; Renata Voltolini Velho¹; Jamile Queiroz Pereira¹; Alessandro de Oliveira Rios³; Adriano Brandelli³

¹Estudante do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS; E-mail: fernandacortezlopes@yahoo.com.br; re.voltolini@hotmail.com; jamile_uni@yahoo.com.br;

²Estudante do Curso de Farmácia da UFRGS; E-mail: deisee_m@yahoo.com.br; ³Professores do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos; E-mail: 00156046@ufrgs.br; abrand@ufrgs.br.

Resumo - A produção de pigmentos fúngicos é uma área nova em expansão e apresenta um potencial biotecnológico muito atraente. Neste estudo, foi realizada a padronização de técnicas moleculares para a identificação de fungos produtores de pigmentos, como *Monascus purpureus*, largamente utilizado como corante de alimentos nos países orientais. Protocolos de extração de DNA foram testados, sendo que obtivemos êxito com o protocolo que utiliza lise química e lise mecânica com pérolas de vidro. Além disso, realizamos algumas modificações nas condições da Reação em Cadeia de Polimerase, obtendo sucesso na identificação de três dos cinco fungos produtores de pigmentos.

Palavras-chave: fungos filamentosos; pigmentos fúngicos; ITS rDNA.

Introdução

Microrganismos tem sido utilizados para produzir diversas substâncias aplicáveis industrialmente. Fungos filamentosos, em particular, tem demonstrado ser extremamente úteis, devido à sua habilidade de produzir metabólitos primários e secundários como peptídeos, enzimas, antibióticos e pigmentos. Há um grande interesse mundial na produção de pigmentos de origem natural, devido a sérios problemas de segurança de muitos corantes sintéticos que tem sido utilizados industrialmente (CHO *et al.*, 2002). Pigmentos microbianos são uma alternativa promissora em relação aos de origem animal ou vegetal, pois não apresentam problemas de sazonalidade e mostram grande produtividade (MEINICKE, 2008).

Historicamente, isolados fúngicos tem sido identificados baseados principalmente em características morfológicas, microscópicas e macroscópicas. Estes métodos consomem tempo, são imprecisos e podem levar a identificações incorretas (DEAN *et al.*, 2005). Métodos moleculares baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são uma rápida e mais sensível alternativa às técnicas convencionais de cultivo (HAUGLAND *et al.*, 1999).

Um marcador molecular amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies é o DNA ribossômico (DNAr). O DNAr nos eucariotos está presente repetidas vezes, e cada unidade consiste de regiões codificadas para os genes RNAr 18S, 5.8S e 28S, e dois espaçadores internos (ITS 1 e ITS 2) que separam essas regiões (WACULICZ-ANDRADE, 2009). O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (FUNGARO, 2000). Portanto, o objetivo do trabalho foi padronizar técnicas de extração e de PCR para a correta identificação de fungos produtores de pigmentos.

Materiais e Métodos

Microorganismos: Os fungos *Penicillium* sp, *Penicillium expansum* e *Monascus purpureus* pertencem à coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UFRGS. Os fungos *Diplodia* sp e *Fusarium graminearum* foram cedidos gentilmente pelo professor Nelson Netto da Universidade de Cruz Alta. Os fungos são mantidos a 4°C em tubos com ágar batata inclinado, onde o micélio é recoberto com óleo mineral, sendo cultivados periodicamente.

Seleção dos fungos produtores de pigmentos: Os fungos foram selecionados de acordo com a capacidade de produzir pigmentos e de excretar para o meio quando cultivados em ágar batata (MAPARI *et al.*, 2005). Os fungos foram inoculados em ágar batata em picada central, incubados a 30 °C por um período de 7 dias.

Extração do DNA genômico: A extração do DNA genômico foi realizada segundo CASALI *et al.* (2003). Os fungos filamentosos utilizados no estudo foram cultivados em tubos com caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 5 dias a 30°C. O micélio foi transferido para um microtubo sendo adicionado 500 µL de tampão de extração (200 mM NaCl / 10mM Tris-HCl pH 7,5 / 1% SDS / 2% Triton X-100 / 1mM EDTA) e 200 µL de pérolas de vidro (200µm). Essa mistura foi agitada em vórtex por 4 ciclos de 2 minutos, alternando com 30 segundos em banho de gelo. Adicionou-se 500µL de clorofórmio, seguido por agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, repetindo nova lavagem com clorofórmio. Para precipitar os ácidos nucléicos, foram utilizados 2 volumes de etanol absoluto e 200 mM de NaCl, que foram incubados overnight a -20°C. Após, foi realizada a centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 200 µL de etanol 70%. O álcool foi deixado evaporar a temperatura ambiente e o sedimento foi ressuspendido em 20 µL de água MilliQ.

Reação em Cadeia da Polimerase: Para a PCR foram utilizados os primers universais: ITS1 (tccgtaggtgaacctgctgg) e ITS4 (tctccgcttattgatatgc). As condições da PCR utilizadas foram desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 30 segundos a 46°C para o anelamento dos primers, 80 segundos a 72°C para extensão e 7 minutos a 72°C para extensão final (Adaptado de HORISAWA *et al.*, 2009). O produto de PCR foi avaliado através de gel de agarose 1%.

Sequenciamento: Os produtos de PCR foram sequenciados no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS) usando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer. As sequências foram editadas no software BioEdit (1997-2005 Tom Hall) e então submetidas ao algoritmo BLAST para procurar sequências homólogas no GenBank (National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]).

Resultados e Discussão

Para a extração do DNA genômico foram utilizadas diversas técnicas: como lise química com adição de tampão de lise e β-mercaptoetanol, uma técnica com lise química e enzimática (lizosima) segundo POSPIECH, A. & NEUMANN (1995), uma extração utilizando uma suspensão de esporos do fungos (DEAN *et al.*, 2005), além de extração com lise química associada à lise mecânica, com adição de pérolas de vidro (CASALI *et al.*, 2003). Somente obtivemos êxito utilizando a última técnica de extração, devido, principalmente, à estrutura da parede celular do fungo ser altamente complexa, contendo quitina, β-glicanos, lipídeos e peptídeos. Além disso, uma camada de melanina pode estar presente, podendo dificultar ainda mais a extração.

O protocolo para o PCR foi baseado no protocolo de Horisawa et al, (2009), que necessitou ser ligeiramente adaptado baixando a temperatura de anelamento em dois graus, mantendo as outras condições. Os resultados obtidos até agora se encontram na tabela 1.

Tabela 1: Identificação fornecida pelo algoritmo de alinhamento BLAST

Identificação anterior	Identificação BLAST	Identidade	Fragmento (pb)
<i>Penicillium</i> sp	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	552
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	580
<i>Diplodia</i> sp	-	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Giberella zeae</i> (<i>Fusarium graminearum</i>)	100%	545
<i>Monascus purpureus</i>	<i>Monascus purpureus</i> / <i>Monascus ruber</i>	100 %	450

O fungo *Diplodia* sp, ainda não foi identificado pelos métodos utilizados, pois não obtivemos sequências satisfatórias a fim de submeter ao algoritmo BLAST. Bem como o fungo *Monascus purpureus*, que obtivemos duas espécies com 100 % de identidade. Dessa forma, novos sequenciamentos serão necessários para identificar a espécie deste fungo, a fim de obtermos sequências maiores e de maior qualidade, além da utilização de outros genes como beta-tubulina.

Conclusões

O protocolo de extração do DNA e da PCR foram eficientes para a identificação dos isolados de *Penicillium* sp e *Penicillium expansum*, identificados como *Penicillium chrysogenum* e *Fusarium graminearum*, respectivamente. Para os fungos *Diplodia* sp. e *Monascus purpureus* serão necessários novos sequenciamentos para identificar a espécie destes fungos, pois não obtivemos sequências satisfatórias.

Referências

- CASALI, A. K. ; GOULART, L; SILVA, L. K. R. ; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. A. ; ALVES, S.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M. H. Molecular typing of Clinical and Environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian State Rio Grande do Sul.. **FEMS Yeast Research**, EUA, v. 3 (4); 405-415, 2003.
- CHO, Y.J.;HWANG, H.J.; KIM, S.W.; SONG, C.H.; YUN, J.W. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. **Journal of Biotechnology** v. 95; 13–23, 2002.
- DEAN, T. R.; ROOP, B.; BETANCOURT, D.;MENETREZ, M. Y. A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. **Journal of microbiological methods**, 61(1):9-16. 2005.
- FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento** 3:12-16. 2000.
- HAUGLAND ET AL., 1999. R.A. HAUGLAND, J.L. HECKMAN AND L.J.WYMER. Quantitative evaluation of different methods for extracting PCR templates from fungal conidia. **J. Microbiol Methods**, v. 37, 1999.
- HORISAWA S, SAKUMA Y, TAKATA K, DOI S. Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. **J Wood Sci.**, 2009.

MAPARI, S.A.S; NIELSEN, K.F.; LARSEN, T.O.; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology** 16:231-238, 2005.

MEINICKE, R.M. Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, 2008.

POSPIECH, A. & NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, 11 (6), 217-218, 1995.

WACULICZ-ANDRADE, C.E. Sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA na identificação dos isolados de *Colletotrichum* endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. Monografia de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PRODUÇÃO DE AMILASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SEDIMENTO MARINHO

Fernanda Brocca de Matos¹; Diego Antonio Viana Gomes^{2*}; Walter de Nisa e Castro Neto^{2**};
José Carlos Germani³

¹Discente do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente UFRGS; E-mail: fernandabrocca@gmail.com; ²Professores da Universidade Luterana do Brasil - Torres vinculados ao PROJETO CARCHARIAS; Departamento de Biologia; Rua Universitária, 1900, Parque do Balonismo; Torres, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP 95560-000. (mrvgomes@yahoo.com.br*, nisacn@terra.com.br**); ³Professor do Departamento de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente UFRGS E-mail: germani@ufrgs.br

Resumo - As amilases são enzimas conversoras de amido pertencentes à classe das hidrolases, são produzidas por uma diversa gama de organismos, entre esses, bactérias, fungos e plantas são importantes produtores desse catalisador biológico. Apresentam importantes aplicações biotecnológicas, sendo utilizadas amplamente na indústria. Os fungos filamentosos são encontrados nos mais diversos ambientes, como na camada superficial do sedimento marinho. E este é responsável por inúmeras trocas tróficas que influenciam na dinâmica desde a superfície até o assoalho marinho. Mesmo diante de condições ambientais tão diversas são encontrados praticamente todos os táxons de fungos neste ambiente. As amostras de sedimento marinho foram coletas com auxílio de seringas estéreis, à 9m de profundidade, e transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas resfriadas. O processamento das amostras deu-se com a inoculação das mesmas em Ágar Sabouraud acrescido com 20% de água marinha e incubadas a temperatura ambiente por até 15 dias, para posterior isolamento das amostras. A produção das amilases foi determinada por um meio nutriente acrescido de 0,2% de amido, o qual, após a incubação do fungo foi adicionado 10 ml de Lugol. Das 30 colônias isoladas, sete apresentaram reação positiva através do aparecimento de uma zona clara no entorno da colônia, indicando a produção de amilase. Outras cinco colônias isoladas não cresceram nas condições desse experimento. A ampliação do conhecimento sobre a capacidade biotecnológica de fungos do sedimento marinho é de vital importância, pois o isolamento de fungos em ambientes naturais pode contribuir para a obtenção de amostras com melhor potencial e permite a constatação do grau de diversidade microbológica.

Palavras-chave: fungos filamentosos, sedimento marinho e amilase.

Introdução

Há muito tempo o homem vem utilizando enzimas sintetizadas por microrganismos para catalisar diversas reações (SPIER, 2005). Embora, não se conhecesse o modo como às reações aconteciam, a ação das enzimas produzidas por microrganismos era utilizada na produção de vinhos e pães desde antes dos tempos bíblicos.

Uma série de vantagens são apresentadas pelas enzimas microbianas em relação às de origem animal e vegetal, entre elas o custo, que é relativamente baixo. Uma variedade de enzimas podem ser obtidas através de microrganismos em condições biológicas reprodutíveis (OLIVEIRA et al., 2007).

As amilases são enzimas conversoras de amido pertencentes à classe das hidrolases, são produzidas por uma diversa gama de organismos, entre esses, bactérias, fungos e plantas são importantes produtores deste catalisador biológico (SPIER, 2005). Por décadas, as

amilases eram aplicadas restritamente nos processos de panificação, mas nos últimos anos as essas enzimas têm sido extensivamente estudadas e em consequência encontra-se sob diferentes características e aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica, têxteis e de papel (ALBUQUERQUE, 2009)

Os fungos filamentosos são de grande importância na síntese de enzimas de interesse industrial (TORTORA, 2006) e sua ocorrência no ambiente marinho merece atenção, pois mesmo diante de condições ambientais extremas, são encontrados praticamente todos os táxons de fungos neste ambiente. A camada superficial do sedimento marinho possui uma alta diversidade biológica, e esta, é responsável por inúmeras trocas tróficas que influenciam na dinâmica de toda essa região e coluna d'água. Os fungos agem, assim como no solo degradando a matéria orgânica no mar (RICKLEFS, 2003).

Objetivou-se verificar a capacidade dos fungos filamentosos isolados do sedimento de marinho de produzirem a enzima amilase.

Materiais e Métodos

As amostras de sedimento foram coletadas com auxílio de seringas estéreis, a 10m de profundidade e a uma temperatura de 25°C, na área externa ao limite da Reserva Biológica do Arvoredo, no estado de Santa Catarina e transportadas até o laboratório de Microbiologia da ULBRA-Torres em caixas isotérmicas. O processamento das amostras deu-se com a homogeneização e posterior inoculação de alíquotas de 1ml em Ágar Sabouraud acrescido com 20% de água do mar (GOMES, 2009 e após incubadas a temperatura ambiente por 15 dias. Após o crescimento, fragmentos de micélio foram repicados no centro da placa de petri no meio de cultura, para isolamento das amostras.

O prova de hidrólise do amido serve para testar a capacidade do fungo de produzir a amilase. A produção das mesmas foi determinada por um meio nutriente acrescido de 0,2% de amido, o qual, após a incubação do fungo foi adicionado 10 ml de Lugol. A área amarelada ao redor da colônia, em contraste com o meio azulado, indicou a atividade amilolítica (MACFADDIN, 2000).

Resultados e Discussão

Dos fungos que cresceram nas condições deste experimento, sete apresentaram reação positiva para amilase. Após a adição do lugol, o amido não hidrolisado no substrato adquiriu uma cor azulada desenvolvida pelo aprisionamento do iodo em suas cadeias lineares (amilose), e aparecimento de uma zona clara entorno da colônia indicou a produção desta enzima. Já que na presença da amilase o complexo amido-iodo se rompe, dissociando assim o iodo no meio.

As avaliações de atividades enzimáticas podem ser úteis para indicar em que medida está ocorrendo o potencial de ciclagem de nutrientes, oxidação e outros processos vitais desempenhados pelos microrganismos (GIANFREDA *et al.*, 2002). A diversidade de enzimas microbianas é quase sem limite e pode trazer um futuro biotecnológico bastante promissor.

Conclusões

A ampliação do conhecimento sobre a capacidade enzimática de fungos do sedimento marinho é de vital importância, pois o isolamento de fungos em ambientes naturais pode contribuir para a obtenção de amostras com melhor potencial biotecnológico e nos permite constatar o grau de diversidade biológica neste ambiente.

Apoio

PROJETO CARCHARIAS e CAPES

Referências

- ALBUQUERQUE, Ubirajara Samuel de. **Detecção de enzimas hidrolíticas em bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto, Estação Mangueira, Recife, Pernambuco.** Dissertação de Mestrado Em Desenvolvimento De Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 2009, 71p.
- GIANFREDA, A.; RAO, M. A.; SANNINO, F.; SACCOMANDI, F.; VIOLANTE, A. **Enzymes in soil: properties, behavior and potential applications.** Developments in Soil Science, v.28B, p.301-327, 2002.
- GOMES, Diego Antonio Viana. **Identificação de microrganismos presentes nos pescados e nos compartimentos de armazenamento de embarcações.** Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS, 2009, 80p.
- GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. **Microbial α -Amylases:Biotechnological Perspective.** Process Biochemistry. Jan. p.1. 2003.
- MACFADDIN, Jean F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincot Williams & Wilkins, Baltimore, 912p. 2000.
- OLIVEIRA, Arlem Nascimento de; OLIVEIRA, Luiz Antonio de; ANDRADE, Jerusa Souza; CHAGAS-JÚNIOR, Aloisio Freitas. **Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(1): 61-66, jan.-mar. 2007
- RICKLEFS, Robert. A economia da Natureza. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Kogan 470p. 2003.
- SPIER, Michele Rigon. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas A-amilase e amiloglucosidase por fermentação no Estado sólido.** Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2005, 178p.
- TORTORA, Gerard J.; et., al. **Microbiologia.** 10ª ed. Porto Alegre: ArtMed, 894p. 2006.

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIPASE E ESTERASE E BIOSURFACTANTES POR BACTÉRIAS E LEVEDURAS ISOLADAS DE BORRA OLEOSA

Cristiane Santos Barbosa¹; Francielle Bucker²; Naiara Santestevan³; Marcela Moreira⁴; Fátima Menezes Bento⁵

¹Bolsista DTI-I do CNPq do Laboratório de Micologia Ambiental do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; E-mail: crisbbarbosa@gmail.com; ²Bolsista DTI-II do CNPq do Laboratório de Micologia Ambiental do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ³Bolsista de Iniciação Científica CNPq e estudante do Curso de Ciências Biológicas da UFRGS; ⁴Estudante do Programa de Pós graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente; ⁵Professora Dr^a. do Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Líder do Grupo de Pesquisa. E-mail: fatimabento@yahoo.com

Resumo – A bioprospecção de microrganismos, tais como bactérias e leveduras, capazes de utilizar diesel e biodiesel como fonte de carbono para seu metabolismo, é importante para se conhecer as atividades química e fisiológicas envolvidas no processo de deterioração de combustíveis ou biorremediação de locais contaminados. Sendo assim, algumas das principais atividades que estão relacionadas a estes processos seriam a produção de enzimas lipolíticas e esterásicas, pois estão diretamente envolvidas na degradação de óleo diesel, além da detecção de produção de biosurfactantes por bactérias e leveduras que podem aumentar a biodisponibilidade do diesel e seus compostos à ação degradativa dos mesmos. Neste trabalho o objetivo foi isolar, de borras oleosas provenientes de centrifuga de diesel (B0; B4; B5) e de biodiesel (B100), bactérias e leveduras capazes de produzir enzimas lipase, esterase e a detecção de ramnolipídios, estas foram avaliadas de acordo com a sua capacidade de utilizar o diesel, biodiesel e suas misturas como fonte de carbono. Dos 23 microrganismos isolados: 20 apresentaram atividade da enzima lipase, enquanto 9 para esterase e nenhum isolado apresentou resultados positivos na detecção de ramnolipídios.

Palavras-chave: microrganismos; degradação; óleo diesel; lipase; esterase.

Introdução

A degradação microbiana desempenha um papel importante na desagregação da composição de uma mistura de hidrocarbonetos de petróleo, sendo sua biodegradação em um ambiente natural, complexa, porque envolve as propriedades do óleo, a natureza da comunidade microbiana e a variedade de fatores ambientais que influenciam na atividade microbiana. A atenção se foca nos ambientes marinhos desde que o ambiente oceânico são os últimos e maiores receptores de hidrocarbonetos poluentes (Atlas, 1981).

Por outro viés, o controle da biodeterioração do diesel/biodiesel em tanques de armazenagem é um fator expressamente importante para a indústria petrolífera, pois a biodeterioração de diesel e seus compostos causam muitos transtornos como o entupimento de filtros em veículos, a redução na qualidade do combustível com o crescimento de microrganismos no óleo, aumento de partículas e metabólitos produzidos por estas e até mesmo, corrosão em tanques de combustível de carros e de armazenagem (Hill & Hill, 2009).

Sendo assim, o isolamento de microrganismos provenientes de resíduos oleosos é de interesse para processos de biorremediação e de controle das populações microbianas em armazenamento de diesel/biodiesel.

A seleção de microrganismos que produzem enzimas lipase e esterase e biossurfactantes pode ser mais uma ferramenta para o conhecimento da atividade metabólica destes microrganismos que podem deteriorar óleo diesel/biodiesel durante sua armazenagem, com o objetivo de controlá-los e também como para a seleção e posterior utilização deste na biorremediação de locais contaminados por combustíveis diesel.

Materiais e Métodos

Microrganismos isolados: Para a avaliação da produção de enzimas e biossurfactantes foram utilizados 12 bactérias e 11 leveduras isoladas de centrífuga de diesel (B5; B4) e de biodiesel (B100).

Avaliação de utilização de diesel/biodiesel como única fonte de carbono: Os microrganismos também foram avaliados em placa, pelo crescimento em meio contendo com única fonte de carbono o óleo diesel 1%.

Preparação das placas para avaliação da atividade enzimática da lipase e esterase; e produção de ramnolipídeos: A atividade da lipase foi avaliada em placa pelo aparecimento fluorescente das colônias sob a luz ultravioleta. Este meio é composto de 5g/L de Peptona; 1g/L de Extrato de levedura; 4g/L de NaCl; 0,01g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 15 % de Agar; 2,5 % de óleo de Oliva (esterilizado separadamente por filtração e adicionado ao meio durante o preparo); e 0,001% de solução de Rhodamina B.

A atividade da esterase foi avaliada pelo aparecimento de um halo ao redor do crescimento da colônia, em placa. O meio é composto de: 5g/L de Peptona; 1g/L de Extrato de levedura; 5g/L de NaCl; 0,01g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1g/L de Extrato de carne; 15g/L de Agar; e 1% de Tween 80 (esterilizado separadamente por filtração e adicionado ao meio durante o seu preparo).

A produção de biossurfactantes foi testada em meio Azul de Metileno, onde a detecção dos ramnolipídeos é realizada pelo aparecimento de um halo branco ao redor do crescimento de cada colônia, devido a precipitação do corante azul de metileno (Wild et. al., 1997; Peixoto, 2008). Este meio possui em sua composição : 10g/L de Peptona; 10g/L de Lactose; 2g/L de NaH_2PO_4 ; 0,005g/L de Azul de metileno; 15g/L de Agar; e 0,2g/L de Brometo de cetil-trimetilamônio.

Os microrganismos foram semeados em culturas novas de caldo nutriente para bactérias e caldo Sabouraud para leveduras. Estes, então, foram semeados em cada placa por uma picada com agulha de alça bacteriológica e incubados por 48h a 28°C e posteriormente avaliados.

Resultados e Discussão

As enzimas esterases agem em ésteres solúveis ou hidrolisam outros lipídeos em água. Já as lipases são enzimas hidrolíticas que, além de em sua maioria poderem hidrolisar os substratos de esterases, sendo o inverso impossível, atuam na interface óleo/água, catalisando as reações de hidrólise de triacilglicerídeos que resulta na formação de mono e diacilglicerídeos, ácidos graxos e glicerol e também propiciam a quebra de emulsões de ésteres, glicerinas e ácidos graxos de cadeia longa. Ambas enzimas são capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases atuem em ésteres insolúveis em água, como os triglicerídeos (Jaeger et. al. 1999; Bückner, 2009).

A produção de ramnolipídeos por cepas de microrganismos isolados de amostra de borra oleosa é uma alternativa para obtenção de tensoativos não tóxicos e nocivos ao meio ambiente, como os produzidos quimicamente. Os surfactantes são moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial de interfaces óleo/água e ar/água. Estes biosurfactantes podem ser utilizados na biorremediação para limpeza de derrames de óleo e a recuperação de óleo em reservatórios podendo ser mais efetivos que os surfactantes químicos (Neto, 2010).

E dos 23 isolados 12 isolados, entre bactérias e leveduras apresentaram capacidade para degradação de óleo diesel em 48 h de avaliação.

Em nenhum dos isolados bacterianos e de leveduras se detectou a produção de ramnolipídios. Já das 12 bactérias isoladas 10 apresentaram atividade lipolítica e das 11 leveduras 10 apresentaram resultados positivos na atividade enzimática da lipase.

Na atividade de esterase somente 1 bactéria apresentou resultado positivo enquanto 8 leveduras produziram o halo que detecta a ação da enzima esterase.

Conclusões

As leveduras e bactérias isoladas demonstraram bons resultados para sua seleção como microrganismos produtores principalmente de lipase e somente alguns para esterase, levando em conta que nenhum microrganismo apresentou resultado positivo para detecção de ramnolipídios.

Apoio

Agradecimento ao CNPq pela concessão das bolsas.

Referências

- ATLAS, Ronald M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: na Environmental Perspective. Microbiological Reviews, Kentucky. V.45, n.1, p.180-209, 1981.
- BÜCKER, Francielle. Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas. Julho de 2009.140 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) UFRGS. Porto Alegre, 2009.
- HILL, E. C.; HILL, G.. Strategies for Resolving Problems Caused by Microbial Growth in Terminals and Retail Sites Handling Biodiesels. ECHA Microbiology. **IASH 2009, the 11th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, República Tcheca, 2009.
- NETO, Doumit C. Produção de Ramnolipídios por fermentação em estado sólido. 2010. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica). UFP. Curitiba, 2010.
- PEIXOTO, Renata de M. Bioprospecção de organismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biosurfactantes. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia). USP. São Paulo, 2008.

PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Aspergillus niger*

Deise Michele Tichota¹; Fernanda Cortez Lopes²; Lucas André Dedavid e Silva²; Adriano Brandelli³

¹Estudante do Curso de Farmácia da UFRGS; E-mail: deisee_m@yahoo.com.br; ²Estudantes de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS; E-mail: fernandacortezlopes@yahoo.com.br; lucasandred@gmail.com; ³Professor do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos; E-mail: abrand@ufrgs.br.

Resumo – Xilanas são hemiceluloses e o segundo mais abundante polímero natural, sendo encontradas em resíduos agroindustriais, além da celulose e da lignina. A lignina, devido a sua natureza recalcitrante, faz com que sejam necessários tratamentos nos resíduos para a sua retirada, aumentando, assim, a disponibilidade das celuloses e das hemiceluloses para a hidrólise enzimática. Neste trabalho, *Aspergillus niger* foi cultivado nos meios casca de acácia negra e casca de arroz tratadas química e termicamente. O meio casca de acácia suplementado com proteína de soja e com o surfactante Tween 80 demonstrou ser o mais adequado, induzindo a produção de maior atividade xilanolítica em 120 horas de cultivo. Sendo este meio selecionado para os próximos estudos acerca da produção desta(s) enzima(s).

Palavras-chave: xilanases; tratamento alcalino; *Aspergillus niger*.

Introdução

Resíduos agroindustriais são as fontes renováveis mais abundantes. O acúmulo de biomassa em grandes quantidades resulta na deterioração do meio ambiente e também na perda de substratos potencialmente valiosos que podem ser processados em produtos com grande valor agregado, como alimentos, combustíveis, rações entre outros. Estes resíduos são constituídos, principalmente, de celulose, hemicelulose e lignina, sendo a hemicelulose a segunda fração mais abundante na natureza. O tratamento alcalino destes resíduos é geralmente realizado para remover o conteúdo de lignina, permitindo a maior acessibilidade da celulose e da hemicelulose durante a hidrólise (NIGAM et al., 2009; SINGHANIA, 2009).

A hemicelulose está associada com a celulose e a lignina e apresenta um importante papel estrutural na formação da parede celular de plantas. A composição da hemicelulose inclui heteropolímeros ramificados de pentoses, hexoses e ácidos urônicos. A xilana é o principal resíduo hemicelulolítico encontrado na parede celular de plantas (DOBREV et al., 2007).

Fungos filamentosos são utilizados para a produção de enzimas hidrolíticas de importância industrial, entre elas as xilanases. Entre os micro-organismos xilanolíticos, estão descritas espécies do gênero *Aspergillus*. As xilanases apresentam diversas aplicações, como em indústrias de alimentos e bebidas e na melhoria de matérias-primas e melhoria de resíduos lignocelulósicos (FANG et al, 2010; PAL e KHANUM, 2010). Portanto, o objetivo do trabalho foi selecionar o meio de cultura mais adequado para produção de xilanases pelo fungo *Aspergillus niger* utilizando resíduos agroindustriais.

Materiais e Métodos

1. Microrganismo: O fungo *Aspergillus niger*, pertence à coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UFRGS. Para o cultivo do microrganismo, foram realizadas suspensões de esporos segundo DEDAVID e SILVA et al. (2009).

2. Meios de Cultura e Condições de Cultivo: Foi realizado pré-tratamento térmico e alcalino dos resíduos casca de arroz (CA) e casca de acácia negra (Cac). Para isso os resíduos foram autoclavados durante 30 minutos a 121 °C em solução de hidróxido de sódio 4%. Após, os resíduos foram lavados com água destilada e secos em estufa a 45 °C por 48 horas. Os meios de cultura constituíram de 1% dos resíduos tratados suplementados com 0,5% de proteína de soja (PS), extrato de levedura (EL), peptona (PT) e glicerol (GC). Após a seleção do meio em que foi mensurada maior produção de xilanases, foram utilizados os seguintes tensoativos: Tween 80, Triton X-100, Deoxicolato de Sódio e SDS, todos na concentração de 0,1%, com o intuito de promover aumento da produção de xilanases. Todos os cultivos foram realizados durante 120 horas, a 30 °C e agitação de 120 rpm. As amostras foram coletadas ao final de cada cultivo, através de filtração à vácuo em papel filtro.

3. Determinação da Atividade Xilanolítica: Para mensurar a atividade de xilanases, o substrato xilana foi utilizado na concentração de 1%, em tampão citrato 50 mM pH 4,8. Foram adicionados volumes iguais de tampão citrato, substrato e amostras filtradas, obtidas dos cultivos realizados, conforme item 2. A reação foi incubada a 50 °C por 15 minutos. Transcorrido o tempo, foram adicionados 3 mL do reagente DNS. As amostras foram aquecidas durante 5 minutos a 100 °C em banho-d'água. Após foram adicionados 20 mL de água destilada à reação e esta foi homogeneizada. A reação foi mensurada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade enzimática foi determinada pela liberação de 1 μmol de xilose. $\text{mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nas condições do ensaio. O valor de absorbância foi comparado com uma curva padrão de xilose.

4. Análise Estatística: Os resultados obtidos da produção de xilanases por *A. niger* foram analisados por ANOVA seguida do teste estatístico de Tukey, utilizando o software Statistica 7.0.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na primeira seleção de meio de cultura encontram-se na figura 1. Os meios contendo casca de acácia suplementados com fontes de nitrogênio apresentaram as maiores atividades enzimáticas, sendo que o meio de cultura que induziu a maior atividade xilanolítica foi Casca de acácia 1% + proteína de soja 0,5%. O tratamento com adição de fonte de carbono, como glicerol, apresentou a mesma atividade enzimática dos resíduos sem suplementação. A utilização de diferentes fontes de nitrogênio permite uma produtividade maior na secreção de enzimas celulásicas, conforme visto neste estudo.

A produção de xilanases utilizando casca de acácia negra, resíduo da cultura da árvore de mesmo nome popular, é pouco explorada na literatura. Neste estudo, obtivemos uma maior produção de xilanases em uma fonte lignocelulósica ainda pouco estudada, em cultivo submerso.

Surfactantes podem atuar no aumento da produção de enzimas extracelulares. Segundo Singh et al (2007), os detergentes aniônicos (SDS, ácido cólico) e os não-iônicos (Tweens) aumentam a permeabilidade da membrana celular e facilitam a secreção das enzimas. Além disso, no trabalho de Reese e Maguire (1969) que relataram a produção e a caracterização de uma celulase produzida por *Trichoderma*, foi observado que a incorporação de Triton X-100 no meio de cultura aumentou a atividade celulolítica.

Foi verificado que a adição do tensoativo não-iônico Tween 80 aumentou a produção de xilanase, com diferença significativa em relação aos outros tensoativos testados. A adição de Tween 20 (dado não demonstrado) apresentou resultados similares ao Tween 80. Segundo

Zeng et al (2006), Tween 80 e ramnolípido aumentaram a atividade enzimática de xilanase produzida por *Penicillium simplicissimum*, sendo que os autores relatam que além do aumento da permeabilidade da membrana celular, também pode ocorrer um efeito de maior estabilização da atividade enzimática.

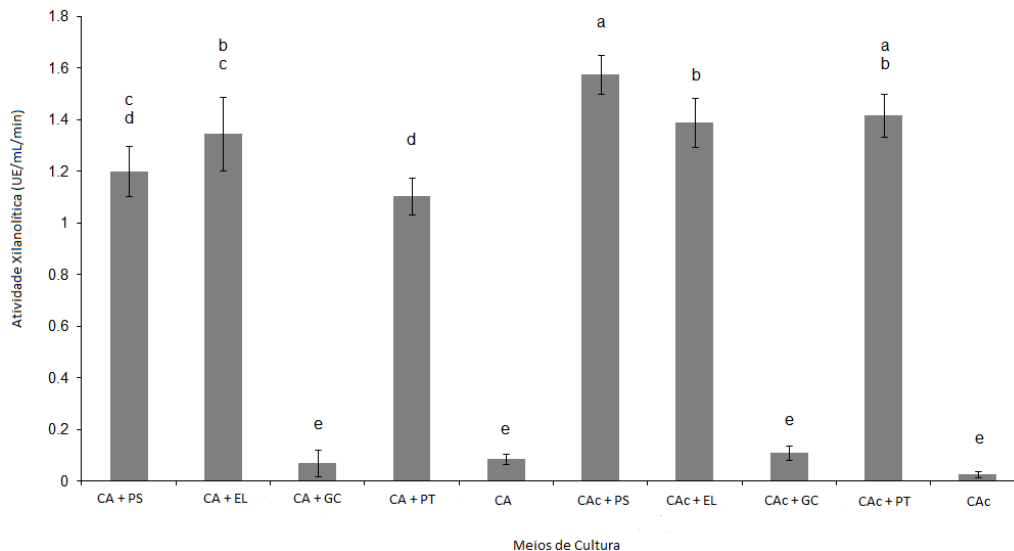


Figura 1: Atividade Xilanolítica nos meios de cultura casca de acácia tratada e casca de arroz tratada. O fungo foi cultivado por 120 horas a 30 °C e 120 rpm.*CA = casca de arroz.

Conclusões

Neste estudo obtivemos resultados promissores para a produção de xilanases por um resíduo lignocelulósico pouco explorado na literatura, com necessária suplementação de uma fonte de nitrogênio, no caso proteína de soja. A adição do surfactante não-iônico Tween 80, aumentou a secreção de xilanase, demonstrando ser importante na produção de xilanases por *A. niger*.

Referências

- DEDAVID E SILVA, L.A., LOPES, F.C., SILVEIRA, S.T., BRANDELLI, A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009 152: 295-300.
- DOBREV, G.T., PISHTIYSKI, I.G., STANCHEV, V.S., MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. *Bioresource Technology*, v. 98, p.2671-78, 2007.
- FANG, T., LIAO, B.C., LEE, S.C. Enhanced production of xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural using statistical approach. *New Biotechnology*, v. 27, n 1, 2010.
- NIGAM, P.S., GUPTA, N., ANTHWAL, A. Pre-treatment of Agro-industrial residues. In: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, p. 13-33 DOI: 10.1007/978-1-4020-9942-7-2.
- PAL, A. e KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 7563-69, 2010.

REESE ET, MAGUIRE A. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl Microbiol*; v. 17, p. 242–9, 1969.

SINGH, A., VAN HAMME, J.D., WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology; Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* v.25, p. 99–121, 2007.

SINGHANIA, R.R. Cellulolytic Enzymes. In: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, p. 371-381 DOI: 10.1007/978-1-4020-9942-7-2.

ZENG, G.M., SHI, J.G., YUAN, X.Z. LIU, J., ZHANG, Z.B., HUANG, G.H., LI, J.B., XI. B.D., LIU, H.L. Effects of tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. *Enzyme and Microbial Technology* v. 39, p. 1451–1456, 2006.

4. Microbiología Clínica

ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS CASOS DE DERMATOFIToses ATENDIDOS PELA SEÇÃO DE MICOLOGIA DO IPB/LACEN-RS NO PERÍODO DE 2005-2010

Vanessa Da Silva Fay¹; Aideê Dourado Laporta²; Ilana Hendira Neumann Boeira¹; Diana Mara Garcia Rodrigues³; Stela Maris Bottin Gonçalves⁴

¹Estudantes do Curso de Ciências Biológicas, Estagiárias da Seção de Micologia do IPB/LACEN-RS; E-mail: nessabiosinos@yahoo.com.br e ilanaboeira@gmail.com.; ²Estudante do Curso de Farmácia, Estagiária da Seção de Micologia do IPB/LACEN-RS; E-mail: aideedl@hotmail.com.; ³Bioquímica da Seção de Micologia do IPB/LACEN-RS Participante do Grupo de Pesquisa; E-mail: diana-rodrigues@fepps.rs.gov.br.; ⁴Bioquímica da Seção de Micologia do IPB/LACEN-RS Líder do Grupo de Pesquisa; E-mail: stela@fepps.rs.gov.br

Resumo - A expressão dermatófitos é utilizada para designar grupo de fungos parasitários que vivem à custa da ceratina da pele, unhas e pelos enquadrando-se nos gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Com o intuito de avaliar e traçar o perfil epidemiológico das infecções causadas por estes fungos no RS, foram analisados espécimes clínicos oriundos de registros micológicos de pacientes portadores de lesões sugestivas de dermatofitoses encaminhados ao IPB/LACEN-RS no período de janeiro de 2005 a julho de 2010. Das 4.332 suspeitas analisadas, 827 casos foram positivos para dermatofitoses, entre os quais: 561 (68%) *Trichophyton rubrum*; 210 (25%) *Trichophyton mentagrophytes*; 22 (3%) *Microsporum gypseum*; 17 (2%) *Microsporum canis*; 11 (1%) *Epidermophyton floccosum*; e 6 (1%) *Trichophyton tonsurans*. Quanto aos sítios, 71% lesões foram diagnosticadas em pele, 49% em unhas e 3% em pelos. Dos 984 casos identificados, 589 (60%) pertencem ao sexo feminino e 395 (40%) ao sexo masculino. Observou-se o predomínio de *T. rubrum*, sendo esta a espécie antropofílica e a maior incidência de casos no sexo feminino, sendo a pele o sítio mais afetado. Vários fatores, como condições climáticas, práticas sociais e a mobilidade de populações humanas entram na epidemiologia das dermatofitoses.

Palavras-chave: dermatofitoses; micose; micologia.

Introdução

As dermatofitoses são infecções superficiais causadas por um grupo de fungos parasitários que vivem à custa dos tecidos queratinizados (pele, pelo e unha), denominados dermatófitos, que compreendem os gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (LACAZ, 1998). A importância de reconhecer-se em determinada espécie de dermatófito a que microecossistema ele pertence está relacionada à resposta que ele pode desencadear no hospedeiro humano; assim, acredita-se que, quanto mais distanciado filogeneticamente está um dermatófito da espécie por ele parasitada, maior será a resposta inflamatória. As formas de classificação clínica das dermatofitoses denominam todas as infecções de tineas (em latim), associadas a uma outra palavra (também em latim) que aponta o sítio anatômico da lesão. A distribuição geográfica dos dermatófitos mostra-se bastante variável, podendo ser antropofílico (humanos), zoofílicos (animais) e geofílicos (solo). Enquanto alguns são cosmopolitas, a distribuição de outros depende dos seguintes fatores: adaptação ao meio ambiente, deslocamento humano, convívio com animais domésticos, aspectos sócio-econômicos, sexo, idade e imunidade do hospedeiro, promovendo variações no espectro

destes fungos, de região para região (SANTOS et al., 1997; WILMINGTON; ALY; FRIEDEN, 1996). Dessa forma, é importante o conhecimento das espécies dos dermatófitos de uma dada região, durante um período de tempo prolongado, permitindo estabelecer as espécies de ocorrência comum, esporádica ou excepcional (LONDERO; RAMOS, 1989). Quando se faz referência ao homem, tem-se em mente um agrupamento específico de dermatófitos, os antropofílicos acredita-se que esses fungos em determinado período de sua evolução foram paulatinamente galgando andares superiores da escala filogenética, saindo do solo para uma adaptação ao homem (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Por não figurarem entre as doenças de notificação obrigatória no Brasil, apenas estudos epidemiológicos fragmentados são relatados na literatura nacional, fazendo-se inquestionável a necessidade de pesquisas epidemiológicas, clínicas e laboratoriais que relatem dados reais, no tocante a incidência das dermatofitoses no nosso meio. O presente trabalho teve o intuito de avaliar e traçar o perfil epidemiológico das infecções causadas por estes fungos no Estado do Rio Grande do Sul no período de janeiro de 2005 a julho de 2010.

Materiais e Métodos

De janeiro de 2005 a Julho de 2010, foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisas Biológicas do LACEN de Porto Alegre, 4.332 amostras de diferentes regiões do corpo (pele, pelo e unhas) com suspeita clínica de infecção fúngica, sendo registrados os dados pessoais dos pacientes como, sexo e localização das lesões. Do couro cabeludo, o pelo parasitado foi retirado com pinça de depilação estéril e das outras regiões foram coletadas mediante raspagem com bisturi e tesoura. A etapa inicial do processamento laboratorial dos espécimes clínicos consistiu no exame direto com KOH a 40% (para unhas) e a 20% (para pele e pelos) acrescidos de tinta Parker que permitiu o clareamento de escamas proporcionando uma coloração azulada aos elementos fúngicos. Os isolamentos das amostras foram realizados em ágar Sabouraud clorafenicol e cicloheximida, quando que em unhas das mãos usou-se Sabouraud clorafenicol, ambas as culturas foram incubadas à temperatura de 37°C por 15 dias. As leituras dos cultivos foram realizadas semanalmente e a identificação dos gêneros e espécies de dermatófitos foi baseada nas características macro e microscópicas de suas colônias bem como através de microcultivo em lâmina. Provas adicionais como da utilização da uréia foram utilizadas para diferenciar *T. mentagrophytes* de *T. rubrum*, seguindo o Manual do Diagnóstico Micológico da Seção de Micologia do IPB/LACEN.

Resultados e Discussão

Das 4.332 suspeitas analisadas, 827 casos foram positivos para dermatofitoses, entre os quais: 561 (68%) *Tricophyton rubrum*; 210 (25%) *Tricophyton mentagrophytes*; 22 (3%) *Microsporum gypseum*; 17 (2%) *Microsporum canis*; 11 (1%) *Epidermophyton floccosum*; e 6 (1%) *Tricophyton tonsurans* (tab. 1) A literatura mundial aponta o *T. rubrum* como a espécie de dermatófito mais comumente isolada. Estudos de incidência de dermatofitose nas regiões Sul e Sudeste do Brasil têm apontado *T. rubrum*, *M. canis* e *T. mentagrophytes*, respectivamente, como as três espécies mais prevalentes de dermatófitos isolados (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Quanto aos sítios: 700 (71%) lesões foram diagnosticadas em pele; 482 (49%) foram em unhas e 30 (3%) foram em pelos (fig. 1). Vários fatores são aventados no crescimento da incidência das infecções fúngicas de pele, e dentre eles podemos citar: o melhor diagnóstico laboratorial e clínico, o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras e o uso de medicações que de uma forma ou de outra exercem uma pressão seletiva e permitem a instalação de microrganismos convencionalmente saprófitos.

Dessa forma, os dermatófitos, como patógenos clássicos de pele, têm tido maior possibilidade de causar processos infecciosos e, assim, tornarem-se o grupamento de fungos mais isolados em patologias humanas (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Dos 984 casos identificados, 589 (60%) pertencem ao sexo feminino e 395 (40%) ao sexo masculino (fig. 2). Observou-se o predomínio de *T. rubrum*, sendo esta a espécie antropofílica e a maior incidência de casos no sexo feminino, sendo a pele o sítio mais afetado.

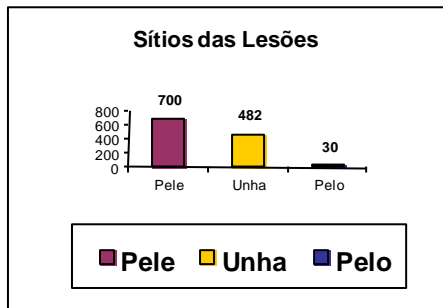


Fig 1. Sítios anatômicos das micoses.

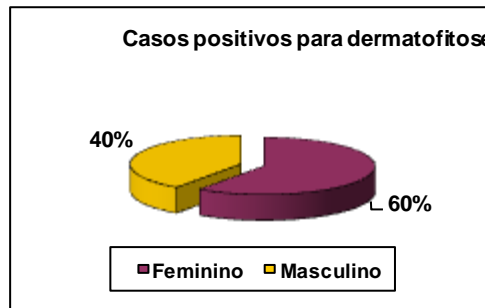


Fig 2. Distribuição por gênero das micoses.

Conclusão

Diante do exposto, podemos concluir que o sítio mais lesado pelas infecções fúngicas foi a pele, sendo o sexo feminino o mais cometido. Já a espécie mais prevalente foi *T. rubrum*. Vários fatores, como condições climáticas, práticas sociais e a mobilidade de populações humanas entram na epidemiologia das dermatofitoses. O conhecimento da etiologia, o qual se relaciona com o habitat natural dos agentes (geofílicos, antropofílicos e zoofílicos) provavelmente seja a principal meta para evitar a propagação das dermatofitoses. Sugerimos, portanto, que estudos prospectivos da etiologia destas doenças devam ser realizados continuamente, de modo a contribuir no controle da infecção (COSTA et al., 2002).

Referências

- COSTA, M.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B.; LEMOS, J. A.; JÚNIOR, J. G. O.; SILVA, M. R. R. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 1, p. 19-22, jan./fev. 2002.
- LACAZ, C. S. *Micologia Médica*. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 1998. 502 p.
- LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. *Agentes de dermatofitoses humana no interior do Estado do Rio Grande do Sul no período de 1960-1987*. In: ANAIS BRASILEIROS DE DERMATOLOGIA. Rio de Janeiro: 1989. v. 64, p. 161-164.
- SANTOS, J. I., NEGRI, C. M., WAGNER, D. C., PHILIPPI, R., NAPPI, B. P., and COELHO, M. P. Some Aspects of Dermatophytoses Seen at University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 39, p. 137-140, 1997.
- SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 287 p.
- WILMINGTON, M.; ALY, R.; FRIEDEN, I.J. Trichophyton tonsurans tinea capitis in the San Francisco Bay area: increased infection demonstrated in a 20-year survey of fungal infections from 1974 to 1994. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 34, n. 4, p. 285-7, 1996.
- BASSANESI, M. C. *Manual do Diagnóstico Micológico Laboratorial*. Porto Alegre, 2008. 100 p.

ANÁLISE FILOGENÉTICA PRELIMINAR DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Pythium insidiosum* PELO GENE DA COXII

Camila Donato Mahl¹; Maria Isabel de Azevedo²; Carla Weiblen³; Letícia Menussi³; Lucas Thomas³; Francielli Pantella Kunz de Jesus², Daniela Isabel Brayer Pereira^{4a}, Janio Morais Santurio^{4b}; Sydney Hartz Alves^{4b}, Sônia de Ávila Botton^{4c}

¹Estudante do Curso de Farmácia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (DMP/CCS/UFSM); E-mail: mila.donato@hotmail.com; ²Estudante do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM; ³Estudante do Curso de Medicina Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Rurais (DMVP/CCR/UFSM) e do DMP/CCS/UFSM; ⁴Professores do ^aInstituto de Biologia da UFPel, ^bDMP/CCS/UFSM e do ^cDMVP/CCR/UFSM, do Grupo de Pesquisa Micologia Médica e Veterinária. E-mail: sabott20@gmail.com

Resumo – *Pythium insidiosum* é o oomiceto causador da pitiose, doença comumente fatal em animais e humanos. Casos de pitiose ocorrem em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, acometendo, especialmente, equinos e caninos. Os genes que codificam proteínas estruturais, como a citocromo oxidase II (COX II), tem sido empregados em análises filogenéticas. A COX II é um gene do DNA mitocondrial que reúne mutações da evolução de seres vivos, sugerindo que pode ser usado para estudar relações filogenéticas entre os indivíduos. Utilizou-se a sequência parcial do gene da COX II para estudos filogenéticos de isolados brasileiros de *P. insidiosum*. Amostras: *controle*: ATCC 58643 e ATCC28251 (cepas-padrão de *P. insidiosum*) e ATCC 26081 de *P. aphanidermatum*; *teste*: 6 isolados clínicos de *P. insidiosum* (Micoteca/LAPEMI). Realizou-se a PCR com os *primers* específicos para sequência parcial do gene da COXII de eucariotos. Os produtos obtidos, com aproximadamente 600pb, foram verificados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo sob luz UV, purificados (Kit PureLink/Invitrogen[®]) e enviados ao sequenciamento de DNA (LABDROS/UFSM). As sequências foram utilizadas para preparar consensos que foram alinhados com as sequências no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), sendo confirmada a identificação molecular do *P. insidiosum* pelo gene da COXII. Uma alta homologia entre os isolados clínicos com as cepas-padrão de *P. insidiosum* foi verificada, porém os maiores graus de homologia foram observados com os isolados de origens geográficas similares. No momento, outros isolados de *P. insidiosum* estão sendo analisados a fim de concluir a caracterização filogenética e filogeográfica dos isolados brasileiros de *P. insidiosum*.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum*, Pitiose, filogenia, COXII.

Introdução

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum*, pertencente ao Reino *Stramenopila* e à Família *Pythiaceae*, é o agente etiológico da pitiose, uma doença granulomatosa que atinge principalmente equinos provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo, caninos com apresentação gastrintestinal e cutânea, bovinos com doença cutânea e humanos apresentando quadro clínico de arterite, queratite e celulite periorbital (Santurio *et al.* 2006). Dentre as espécies citadas, a prevalência é maior nos equinos, onde a lesão subcutânea apresenta-se na forma de úlceras granulomatosas que podem evoluir à grandes massas

tecduais com presença de *kunkers*. Epidemiologicamente, a pitiose é mais prevalente em áreas temperadas, subtropicais e tropicais.

Avanços em métodos moleculares têm permitido um melhor estudo das relações filogenéticas entre vários organismos. Em estudo realizado por Schurko *et al.* (2003) com isolados de *P. insidiosum* provenientes das Américas, Ásia e Austrália, a possibilidade de uma reclassificação em sub-espécies foi evidenciada devido a comparação do espaço ribossomal intergênico e análise dos *clusters* que representam populações geneticamente distintas, sendo as amostras agrupadas em 3 *clusters* diferenciados: I- amostras oriundas das Américas, II- Ásia e III- Tailândia e Estados Unidos. Além do gene do DNA nuclear que codifica a região intergênica do rDNA (ITS – *Internal transcribed spacer*), também têm sido empregados como marcadores genéticos para estudos de filogenia de oomicetos os genes que codificam proteínas estruturais, como a citocromo oxidase II (COX II). COX II é um gene codificado pelo DNA mitocondrial, que é mais variável que o DNA nuclear; portanto, reúne mutações ao longo da evolução individual e pode ser utilizado para examinar as relações filogenéticas entre os indivíduos. Nos estudos realizados por Villa *et al.* (2006) e por Kammarnjesadakul *et al.* (2010) incluíram o gene da COX II nas suas análises de filogenia e sugeriram o emprego deste gene para investigar a relação filogenética de isolados de oomicetos do gênero *Pythium*.

O presente trabalho teve por objetivo empregar o gene da COX II para investigar a relação filogenética entre isolados brasileiros de *P. insidiosum*.

Materiais e Métodos

Amostras: *controle*: ATCC 58643 e ATCC 28251 (cepas-padrão de *P.insidiosum*) e ATCC 26081 de *P. aphanidermatum* (*Outgroup*); *amostras teste*: isolados clínicos de *P.insidiosum* (Micoteca do Laboratório de Pesquisas Micológicas – LAPEMI, da UFSM).

Cultivo microbiológico: As amostras foram crescidas em caldo Sabouraud a 37°C por 72 a 96h, coletas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Caracterização molecular e análise filogenética: a) *extração de DNA*: os isolados foram congelados e macerados em tampão de lise, CTAB 10% e NaCl 5N, seguido de extração fenólica. b) *PCR*: foram utilizados os *primers* específicos para amplificação da região parcial da COXII de eucariotos (Villa *et al.*, 2006). Após, as amostras foram purificadas em coluna do *Kit Pure Link PCR Purification* (Invitrogen®); c) *Sequenciamento e análise filogenética*: a identidade dos produtos foi verificada por sequenciamento do DNA (MEGABACE 1000) e as sequências foram alinhadas no programa *Bioedit*. As sequências foram, então, alinhadas e analisadas no programa *ClustalW* e pelo *MEGA 4.0* e comparadas com as depositas no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Resultados e Discussão

As sequências obtidas foram utilizadas para montagem de consenso que foi alinhado com as sequências do *GenBank*, sendo confirmada a identificação de *P. insidiosum*. A análise filogenética utilizando a sequência do gene da COXII foi realizada no programa *MEGA 4.0.*, com a formação de dois grupos. Um grupo, representado por *P. aphanidermatum* (*outgroup*), e outro com os isolados clínicos de *P.insidiosum* (121, 146, 210, 123, 125 e 118) e as cepas-padrão (ATCC 28251, 58643). O segundo grupo apresentou alta homologia, entretanto os maiores graus de homologia foram observados entre as isolados de origem geográfica similar (121 e 146 – Pantanal/MS; 210 e 123 – Uruguiana/RS; 125 e 118 - Alegrete/RS).

Villa *et al.* (2003) empregaram a sequência do gene da COXII para análise filogenética de isolados de *Pythium* e *Phytophthora*, sendo capaz de agrupar isolados de espécies diferentes, mas morfológicamente semelhantes. Kammarnjesadakul *et al.* (2010)

investigaram a relação filogenética de isolados tailandeses de *P.insidiosum* através da região ITS e do gene da COXII, e as sequências da COXII geraram um árvore filogenética com maior resolução que a da região ITS. Em nosso trabalho, a árvore filogenética obtida pela sequência do gene da COXII também demonstrou ser uma ferramenta bastante útil aos estudos de filogenia, propiciando o agrupamento com alta homologia dos isolados brasileiros de *P. insidiosum* de origens geográficas similares.

Conclusões

Atualmente a caracterização filogenética incluindo um número maior de isolados de *P. insidiosum* está sendo desempenhada, a fim de comprovar a homologia nas seqüências e realizar a classificação filogeográfica dos isolados brasileiros de *P. insidiosum*. Desta forma, a caracterização molecular do *P. insidiosum* pelo gene da COXII é uma importante ferramenta para a identificação e filogenia, auxiliando no diagnóstico da infecção, bem como em estudos epidemiológicos da pitiose.

Apoio

Apoio financeiro: CNPq e FIPE Jr/UFSM.

Referências

- SANTURIO, J. M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006.
- VILLA, N. O. et al. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and b-tubulin gene sequences. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 410-422, 2006.
- SCHURKO, A. et al. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and the Americas are explored. **Mycologia**, v. 95, n. 2, p. 200-208, 2003.
- KAMMARNJESADAKUL, P. et al. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). **Medical Mycology**, p. 1-7, 2010.

ATIVIDADE ANTI-*TRICHOMONAS VAGINALIS* DO EXTRATO DE *HYPERICUM POLYANTHEMUM* OBTIDO POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO E DE SEUS COMPOSTOS ISOLADOS

Simone Tasca Cargin¹; Patrícia Brum Vieira³; Samuel Cibulski⁵; Jarbas Montanha⁵; Paulo Roehe⁵; Eduardo Cassel²; Rubem Vargas²; Geraldo A. De Carli⁴; Gilsane Lino von Poser¹; Tiana Tasca³

¹Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, UFRGS, E-mail:simonetc@gmail.com; ²Laboratório de Operações Unitárias, Faculdade de Engenharia, PUCRS; ³Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFRGS; ⁴Instituto de Geriatria e Gerontologia, PUCRS; ⁵Laboratório de Virologia, ICBS, UFRGS.

Resumo - *Trichomonas vaginalis* é o protozoário responsável pelo tricomonose, doença não viral sexualmente transmissível mais comum no mundo. Isolados resistentes aos fármacos de escolha para tratamento, metronidazol e tinidazol, já foram descritos. Além disso, estes fármacos podem gerar efeitos colaterais desagradáveis nos pacientes. No sentido de melhorar a terapia da tricomonose, este trabalho tem o propósito de avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* do extrato de *Hypericum polyanthemum* obtido por fluido supercrítico (CO₂) e de seus compostos isolados (benzopiranos HP1, HP2, HP3 e uliginosina B). Para isso, realizaram-se ensaios quali e quantitativos anti-*T. vaginalis*, utilizando o isolado ATCC 30236. Foram feitos testes de citotoxicidade em eritrócitos e em células de mamíferos (VERO), e ensaio de liberação de LDH para verificar mecanismo de ação das substâncias. Tanto o extrato quanto as substâncias isoladas apresentaram atividade anti-*T. vaginalis*. As substâncias isoladas mataram mais da metade dos trofozoítos na concentração de 250 µg/mL, já o extrato, matou 100% dos trofozoítos na concentração de 325 µg/mL. Os compostos não provocam lise de eritrócitos, mas apresentaram alta liberação de LDH, sugerindo seletividade no rompimento de membrana dos parasitos. O extrato e o composto HP2 apresentaram-se altamente citotóxicos para células de mamíferos, sendo então, HP1, HP3 e uliginosina B os compostos que podem servir como protótipos de novas moléculas com baixa toxicidade e alta atividade antiprotozoária.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, *Hypericum*, efeito citotóxico.

Introdução

Trichomonas vaginalis é um protozoário que parasita o trato urogenital humano e causa a tricomonose, doença não viral sexualmente transmitida (DST) mais comum no mundo, que afeta 170 milhões de pessoas por ano (WHO, 2001). Estudos têm mostrado muitas complicações relacionadas a esta doença, como: infertilidade (Goldstein et al., 1993) e câncer cervical (Viikki et al., 2000). Metronidazol e tinidazol são os únicos fármacos recomendados pelo FDA para o tratamento desta DST, porém, além de gerar sérios efeitos colaterais, isolados resistentes a estes fármacos já tem sido descritos (Grossman e Galask 1990, Sobel et al.1999). Visando melhorar a terapia da infecção causada por *T. vaginalis*, produtos naturais podem ser fontes ou protótipos de novos fármacos com alta atividade antiprotozoária e baixa toxicidade. Plantas do gênero *Hypericum* são bastante conhecidas na medicina tradicional, sendo *H. perforatum* L. o mais estudado. No Sul do Brasil, este gênero é representado por cerca de 20 espécies, entre elas, destaca-se *H. polyanthemum*, que possui como metabólitos em extrato lipofílico um derivado de floroglucinol, uliginosina B e três

benzopiranos: HP1, HP2 e HP3. Com o intuito de obter maiores teores destes metabólitos, foi proposta, em trabalho prévio, uma nova metodologia de extração, utilizando fluido supercrítico (CO₂) (Cargin et al., 2010), o qual além de ser mais seletivo na extração de compostos lipofílicos, possui inúmeras vantagens quando comparado às técnicas convencionais. Considerando a prevalência e relevância da tricomonose, bem como os problemas relacionados à utilização dos fármacos de escolha, torna-se relevante a pesquisa de novos agentes antiprotozoários, que sejam pouco citotóxicos, e conseqüentemente, gerem poucos efeitos adversos. Neste sentido, testou-se a atividade anti-*T. vaginalis* de uma fração de extrato obtido por fluido supercrítico e dos metabólitos majoritários isolados de *H. polyanthemum*: uliginosina B, HP1, HP2 e HP3.

Materiais e Métodos

Material vegetal, extração com fluido supercrítico, quantificação e isolamento dos metabólitos secundários: As partes aéreas de *H. polyanthemum* foram coletadas em Caçapava do Sul, RS, em outubro de 2009. Para este estudo, utilizou-se a fração obtida por fluido supercrítico a 50°C e 150 bar, o qual foi submetido a quantificação por CLAE, apresentando valores de HP1, HP2, HP3 e uliginosina B iguais a 141,3; 117,5; 102,6 e 352,5 mg/g de extrato, respectivamente. O isolamento dos metabólitos foi realizado através de cromatografia em coluna, seguido de purificação por cromatografia em camada delgada preparativa, e a pureza confirmada por CLAE. **Cultura de *Trichomonas vaginalis*:** Neste estudo, utilizou-se o isolado ATCC 30236, sensível ao metronidazol. Os parasitos foram cultivados anaerobicamente in vitro em meio trypticase–yeast extract–maltose (TYM), pH 6,0, suplementado com 10% de soro bovino e incubados a 37 °C (Diamond 1957). Culturas com mais de 95% de trofozoítos exibindo motilidade e morfologia normal foram centrifugadas e os *pellets* ressuspensos em meio TYM. **Ensaio qualitativo e quantitativo de suscetibilidade:** Para avaliar a atividade anti- *T. vaginalis* das amostras, realizou-se um ensaio qualitativo em placa de 96 poços. Para cada amostra foram feitas diluições ao meio, variando de 1,3 a 0,162 mg/mL para o extrato, e de 250 a 31,25 µg/mL para as substâncias isoladas. Cada poço possui um volume final de 200 µL, contendo 5x10⁴ trofozoítos/mL. Após 24 h de incubação, a placa foi visualizada em microscópio invertido, observando-se a viabilidade celular. Para o extrato, a viabilidade foi quantificada através do ensaio da rezasurina (Duarte et al., 2009). Os ensaios quantitativos estão sendo realizados em eppendorf, utilizando-se 3 concentrações das substâncias isoladas a partir do resultado do ensaio qualitativo. Foram utilizados 5x10⁴ trofozoítos/mL em um volume final de 1 mL, incubados por 24 h, e a contagem realizada utilizando câmara de Thoma. **Ensaio de Hemólise:** Ensaio visando verificar a ação das substâncias sobre a membrana de eritrócitos. Para isso, foi utilizado o método descrito por Gauthier et al. (2009) com algumas modificações. Sangue tipo O⁺ foi coletado com solução de Alsever (1:1), e após tratamento, ressuspensado em tampão PBS, obtendo-se uma suspensão de eritrócitos a 1%. A esta suspensão, adicionou-se cada uma das substâncias, em triplicata, na concentração de 125 µg/mL. Após 1 h no homogeneizador, o sobrenadante das amostras foi lido em espectrofotômetro (540 nm). A porcentagem de hemólise causada pelas amostras foi comparada com o controle, 100% de hemólise, provocado por uma saponina comercial. **Determinação de liberação de LDH:** A fim de verificar o mecanismo de ação das substâncias, avaliou-se a ação das mesmas sobre a membrana plasmática dos trofozoítos. O rompimento da membrana foi analisado através da liberação de LDH no meio de incubação. As amostras, em triplicata, na concentração de 125 µg/mL foram incubadas com 10 µL de inibidor de protease e 5x10⁴ trofozoítos/mL por 24 h a 37°C. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente no sobrenadante, em 500 nm, usando o kit Labtest. A

atividade da enzima LDH em cada amostra foi comparada com o 100% de atividade de LDH liberada por lise total de parasitos. **Citotoxicidade em células VERO:** Para avaliar a toxicidade do extrato e das substâncias isoladas sobre células de mamíferos, utilizou-se o ensaio MTT (Mosmann, 1983). Para cada poço da placa de 96 poços utilizou-se uma densidade celular de 4×10^4 células/mL, que foram tratadas com extrato nas concentrações de 0,325; 0,162 e 0,081 mg/mL, e com as substâncias isoladas nas concentrações de 250; 125; 62,5 e 31,25 µg/mL, por 24 h. A seguir, adicionou-se solução de MTT (5mg/mL), e após 3 h de reação, DMSO para solubilizar os cristais de formazan. A viabilidade celular foi avaliada colorimetricamente, em 550nm (Anthos 2020).

Resultados e Discussão

No ensaio da resazurina, o extrato de *H. polyanthemum* obtido por extração com fluido supercrítico apresentou uma concentração inibitória mínima (MIC) de 325 µg/mL frente a trofozoítos de *T. vaginalis*. Porém, mostrou-se altamente citotóxico para as células de mamíferos, apresentando na MIC em torno de 13% de viabilidade celular. No ensaio qualitativo, os metabólitos isolados nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL reduziam de forma significativa viabilidade dos trofozoítos. Os ensaios quantitativos estão sendo realizados, confirmando esta redução de viabilidade, que é de pelo menos, mais da metade dos trofozoítos. HP1, HP3 e uliginosina B não se mostraram citotóxicos nestas concentrações para as células de mamíferos, apresentando de 70 a 99% de viabilidade celular. Já o composto HP2, embora apresente atividade anti-*T. vaginalis*, mostrou-se altamente citotóxico. Nenhuma das substâncias testadas causou hemólise de eritrócitos, e todas apresentaram valores de mais de 90% de liberação de LDH. Estes dados sugerem que os compostos apresentam-se seletivos no rompimento de membranas, rompendo apenas a membrana plasmática dos parasitos.

Conclusões

O extrato obtido por fluido supercrítico de *H. polyanthemum* e seus compostos isolados apresentam atividade citotóxica frente a trofozoítos de *T. vaginalis*. Embora a atividade antiprotozoária das substâncias testadas não seja muito pronunciada, a ausência de lise de eritrócitos e de citotoxicidade frente a células de mamíferos são indícios que estas moléculas, principalmente HP1, HP3 e uliginosina B, podem ser utilizadas como protótipos de novas moléculas com alta atividade antiprotozoária e baixa toxicidade.

Apoio

CNPq, Capes e Fapergs.

Referências

- Cargnin ST; Nunes, JM; Haas JS; et al. Supercritical fluid extraction and HPLC determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*. Journal of Chromatography B, 878: 83–87, 2010
- Diamond LS. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. Journal of Parasitology 43: 488–490, 1957
- Duarte M, Giordani RB, De Carli GA, et al. A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis* and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents. Experimental Parasitology 123: 195–198, 2009

Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K, et al. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semisynthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 2002–2008, 2009

Goldstein F, Goldman MB, Cramer DW. Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology* 137: 577-584, 1993

Grossman JH, Galask RP. Persistent vaginitis caused by metronidazole resistant trichomonas. *Obstetrics Gynecology* 76: 521–522, 1990

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63, 1983

Sobel JD, Nagappan V, Nyirjesy P. Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis-an emerging problem. *The New England Journal of Medicine* 341: 292–293, 1999

World Health Organization - Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. In: WHO, Geneva, pp 27–29, 2001

Viikki M, Pukkala E, Nieminen P, Hakama M. Gynecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica* 39:71-75, 2000

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE SAPONINAS DE *CHENOPODIUM QUINOA* SOBRE *TRICHOPHYTON RUBRUM*

Simone Gasparin Verza¹; Roberta Stefanello de Jesus²; Alexandre Meneghello Fuentefria³;
George González Ortega³

¹Estudante de Pós-graduação do Curso de Farmácia da UFRGS – PPGCF - Departamento de Produção e Controle de Medicamentos. E-mail: simofar@gmail.com; ²Estudante de Graduação do Curso de Farmácia da UFRGS – Departamento de Análises. E-mail: betastefanello@gmail.com; ³Professores do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos e do Departamento de Análises. E-mail: ortega@farmacia.ufrgs.br; alexmf77@gmail.com

Resumo – A atividade antifúngica de saponinas de *Chenopodium quinoa*, uma planta originária dos Andes, foi avaliada nesse trabalho. Para tanto frações enriquecidas em saponinas, denominadas FR70 e FR90, foram obtidas e caracterizadas utilizando-se UPLC/Q-TOF-MS. Mediante a utilização dessa técnica a estrutura do sinal majoritário foi identificada como 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl phytolaccagenic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester. Não foi observada atividade para as frações de saponinas testadas frente a fungos leveduriformes, porém evidenciou-se uma atividade significativa sobre *Trichophyton rubrum*. Os halos de inibição do crescimento foram maiores para a FR90, indicando que a estrutura das saponinas pode exercer influência sobre a atividade, uma vez que a FR90 foi caracterizada pela presença de saponinas mais apolares.

Palavras-chave: *Chenopodium quinoa*, saponinas, atividade antifúngica

Introdução

Chenopodium quinoa Willd é uma planta da família *Chenopodiaceae*, originária dos Andes, onde tem sido cultivada com fins alimentícios há pelo menos cinco mil anos destacando-se pelo seu elevado teor de proteínas, aminoácidos, fibras e minerais (ZHU et al., 2002; MADL et al., 2006). O gosto amargo das sementes é atribuído às saponinas, que obriga à aplicação de um tratamento prévio de desaponificação por lixiviação com água ou remoção mecânica do farelo (WOLDEMICHAEL;WINK, 2001; ZHU et al., 2002; MADL et al., 2006).

O *pool* de saponinas de sementes de quinoa é bastante complexo e de maneira geral é caracterizado por triterpenos que incluem derivados dos ácidos oleanólico, fitolacagênico, serjânico e ácido 3 β ,23,30,-triidroxiole-12-ano-28-oico e da hederagenina (WOLDEMICHAEL;WINK, 2001; MADL et al., 2006).

Dentre as atividades atribuídas às saponinas cabe destacar a antifúngica, considerando as mesmas na forma isolada, em frações purificadas ou extratos brutos. Woldemichael e Wink (2001) avaliaram a atividade antifúngica e hemolítica das saponinas de *Chenopodium quinoa* e verificaram para a fração de saponinas totais um efeito inibitório no crescimento de *Candida albicans*. Stuardo e San Martin (2008) detectaram para as saponinas de *Chenopodium quinoa* atividade significativa contra o fungo *Botrytis cinerea*, responsável por doenças em parreirais. A pesquisa contra dermatofitoses utilizando-se espécies vegetais com potencial medicamentoso é crescente. Isso porque, estas constituem um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica (SIQUEIRA et al., 2006), com tendência para cronicidade. Tais infecções são tratadas por meio da correção de fatores predisponentes

e de terapêutica medicamentosa, no entanto, têm apresentado resistência aos tratamentos convencionais.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade de inibição sobre o crescimento de espécies de fungos leveduriformes oportunistas e fungos dermatófitos, de frações enriquecidas em saponinas obtidas a partir de *Chenopodium quinoa*.

Materiais e Métodos

A partir de extrato bruto de *Chenopodium quinoa* foram obtidas frações enriquecidas em saponinas, codificadas como FR70 e FR90. A caracterização estrutural das mesmas foi realizada utilizando-se UPLC/Q-TOF-MS (a Waters Acquity Ultra Performance LC system). Nitrogênio foi usado como gás de nebulização e gás auxiliar e o argônio como gás de colisão. Uma coluna Hypersil Gold (Thermo) com 100 mm x 2,1mm e 1,9 µm foi utilizada como fase estacionária e como fase móvel ácido fórmico a 0,1% (A) e acetonitrila (B) em sistema gradiente. As análises foram realizadas em modo positivo de ionização, monitorando sinais de 200 a 1500 *m/z*.

Foram submetidas ao ensaio de susceptibilidade espécies selecionadas de fungos leveduriformes oportunistas e fungos dermatófitos. Os isolados leveduriformes, a saber, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* foram previamente semeados em Ágar Sabouraud contendo cloranfenicol 0,04% por 48h a uma temperatura de 30°C, para obtenção de células viáveis para os testes. Para os isolados filamentosos, *Aspergillus Níger*, *Penicillium* sp. e *Trichophyton rubrum* também foram semeados em Ágar Sabouraud, porém, o período de incubação foi de 7 dias a 30°C. Tomando-se como referencial, o método de difusão em ágar, segundo as recomendações do *Clinical Laboratory Standart Institute* (CLSI, 2006), as saponinas foram solubilizadas em solução de água e DMSO, e na sequência foram diluídas a uma concentração final de 1000 µg/mL. Posteriormente, utilizando-se cânulas estéreis, foram produzidas cavidades que abrigaram 50µL dos inóculos das saponinas. A partir de uma cultura fúngica pura e viável e água destilada estéril, foi preparado um inóculo equivalente a concentração de 10⁵ UFC/mL e este foi semeado por espalhamento com um *swab* previamente esterilizado, em uma placa de Petri estéril contendo Ágar Sabouraud com cloranfenicol. As placas foram incubadas a 30°C, por 48h e durante 7 dias, para fungos leveduriformes e filamentosos, respectivamente. A leitura das placas foi realizada mediante avaliação da presença de halo de inibição ao redor da canaleta.

Resultados e Discussão

A caracterização estrutural das saponinas presentes nas frações enriquecidas foi realizada utilizando-se UPLC/Q-TOF-MS, o que possibilitou a identificação das principais saponinas que constituem as frações sendo o sinal majoritário identificado como derivado do ácido fitolacagênico: 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-□-L-arabinopyranosyl phytolaccagenic acid 28-*O*-β-D-glucopyranosyl ester e cuja presença é relatada para a espécie em questão (ZHU et al., 2002; MADL et al., 2006).

Dentre os isolados fúngicos testados se evidenciou atividade para *Trichophyton rubrum*, fungo dermatófito (figura 1), sendo mais acentuada a inibição observada quando utilizou-se a FR90. Para todos os agentes leveduriformes testados não se observou atividade inibitória do crescimento.

Atividades antifúngicas são relatadas para várias espécies do gênero *Phytolacca* que apresentam saponinas derivadas do ácido fitolacagênico, sendo essa a aglicona descrita para a

substância majoritária presente nas frações de saponinas obtidas de *Chenopodium quinoa* (SPARG et al., 2004).

Pode-se inferir ainda, que a atividade de inibição do crescimento do fungo em questão está relacionada com a estrutura das saponinas presentes, isso porque na FR90 estão presentes saponinas mais apolares quando comparada a FR70.

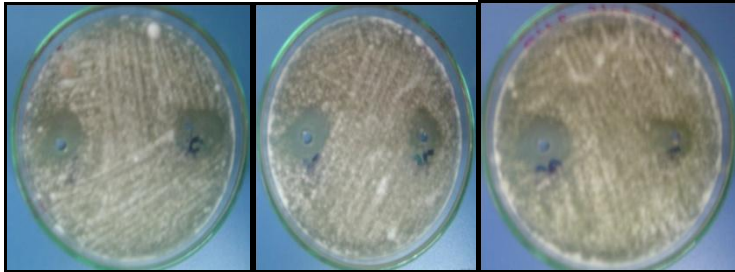


Figura 1. Halos de inibição do crescimento de *Trichophyton rubrum*

Conclusões

A partir do trabalho realizado verificou-se atividade antifúngica frente a *Trichophyton rubrum* das saponinas presentes em *Chenopodium quinoa*. Pode-se inferir ainda a respeito de uma seletividade das saponinas em questão, pois não se observou atividade frente aos fungos leveduriformes. As características estruturais das saponinas também parecem interferir no potencial antifúngico, uma vez que, o halo de inibição do crescimento foi ligeiramente maior para a FR90, onde saponinas mais apolares estão presentes. Estudos adicionais para avaliar a atividade antifúngica das frações de saponinas em questão, frente a outros fungos dermatófitos, estão sendo realizados.

Apoio
CNPq

Referências

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S16. Wayne, PA, USA: CLSI, 2006.
- KULJANABHAGAVAD, T.; THONGPHASUK, P.; CHAMULITRAT, W.; WINK, M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd, *Phytochemistry*, v. 69, p. 1919-1926, 2008.
- MADL, T.; STERK, H.; MITTELBAACH, M. Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, v. 17, p. 795-806, 2006.
- SIQUEIRA, E. R.; FERREIRA, J. C.; MAFFEI, C. M. L.; CANDIDO, R. C. Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, p. 269-271, 2006.
- SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. V. Biological activities and distribution of plant saponins, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 219-243, 2004.
- STUARDO, M.; SAN MARTIN, R. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*, *Industrial Crop and Products*, v. 27, 296-302, 2008.

WOLDEMICHAEL, G. M.; WINK, M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 2327-2332, 2001.

ZHU, N.; SHENG, S.; SANG, S.; JHOO, J-W.; BAI, N.; KARWE, M. V.; ROSEN, R. T.; HO, C.-T. Triterpene saponins from debittered Quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 865-867, 2002.

AValiação DA SENSIBILIDADE DE *Duddingtonia flagrans*, FRENTE A RESÍDUOS DE FUNGICIDAS AGRÍCOLAS, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR

Deise Luiza Mahl¹; Francielli Pantella Kunz de Jesus²; Maria Isabel de Azevedo²; Régis Adriel Zanette²; Sydney Hartz Alves³; Janio Morais Santurio³

¹Estudante do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM; E-mail: dizlm@hotmail.com; ²Estudantes do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM; ³Professores do Grupo de Pesquisa Micologia Médica e Veterinária da UFSM.

Resumo - As helmintoses gastrointestinais geram diversos prejuízos a pecuária, sendo buscados métodos alternativos de controle, frente a resistência parasitária. O fungo *Duddingtonia flagrans* resiste à passagem ao trato digestório dos animais e possui ação nematófaga, sendo utilizado no controle biológico. Resíduos de fungicidas podem interferir no desenvolvimento deste agente. O objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de *D. flagrans* a resíduos de triazóis e benzimidazóis, através de diluição em ágar. Apenas resíduos de Tiabendazol não demonstrar atividade inibitória.

Palavras-chave: *D. flagrans*; fungicidas; resíduos; susceptibilidade.

Introdução

O parasitismo gastrointestinal é um dos principais limitantes da pecuária. O controle das helmintoses em ruminantes é realizado com o uso indiscriminado de anti-helmínticos e favorece a resistência parasitária. Controle biológico por fungos nematófagos é uma alternativa utilizada. O fungo *Duddingtonia flagrans* possui a capacidade de destruir larvas no solo e produzir clamidósporos resistentes aos processos digestivos (MOTA et al., 2003).

Várias substâncias são utilizadas como pesticidas e os alimentos possuem limite máximo de resíduos (LMR) definidos pela ANVISA. Alguns benzimidazóis são utilizados como antihelmínticos em ruminantes e fungicidas agrícolas. Diversos fungicidas inibem fungos entomopatogênicos *in vitro* (Ignoffo et al., 1975). *D. flagrans* já demonstrou inibição por carbendazim e tiabendazol (LUZ et al., 2007). O objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de *D. flagrans* a LMRs de triazóis e benzimidazóis por diluição em ágar.

Materiais e Métodos

A cepa ARSEF 5701 foi testada em triplicata frente os fungicidas triazóis: Ciproconazol, Difenoconazol, Tebuconazol e Triadimenol; e benzimidazóis: Tiabendazol e Carbendazim, pela técnica de diluição em ágar (ALVES & CURY, 1992) modificada. Foram avaliadas concentrações superiores e inferiores aos LMRs (ANVISA, 2008). Os compostos solubilizados em dimetilsulfóxido, foram diluídos em ágar batata e distribuídos em placas de Petri, com dez concentrações diferentes para de cada fungicida e LMR em concentrações centrais. Obtendo 0,8-0,0015625µg/mL de Ciproconazol e Difenoconazol, 1,6-0,003125µg/mL de Tebuconazol e Tiabendazol, 8-0,015625µg/mL de Carbendazim e 3,2-0,00625µg/mL de Triadimenol. Foi retirado plugs das culturas em ágar batata a 25°C/sete dias e depositado nas placas. Os resultados foram obtidos após sete dias.

Resultados e Discussão

As médias dos diâmetros dos micélios frente às diferentes concentrações estão representadas pelas figuras 1, 2, 3 e 4. Sendo os LMRs as quintas a concentrações testadas.

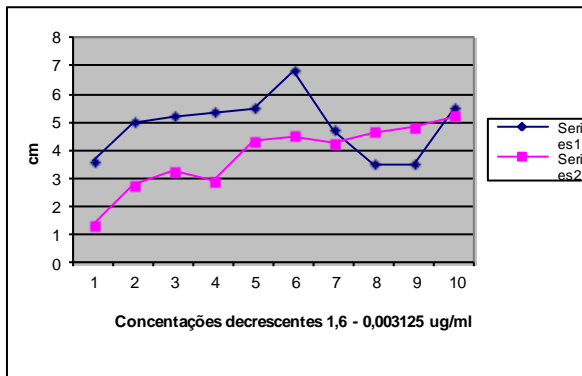


Figura 1: Médias dos diâmetros das colônias frente a Difenonazol (Seqüência 1) e Ciproconazol (Seqüência 2).

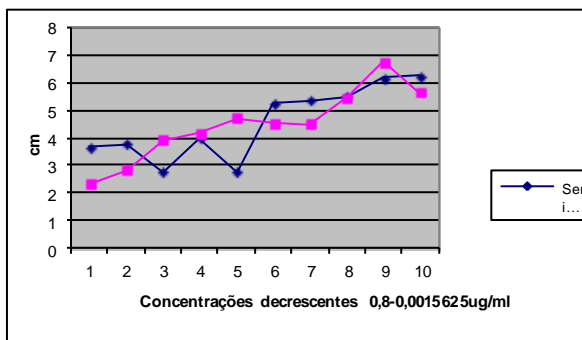


Figura 2: Médias dos diâmetros das colônias frente a Tiabendazol (Seqüência 1) e Tebuconazol (Seqüência 2).

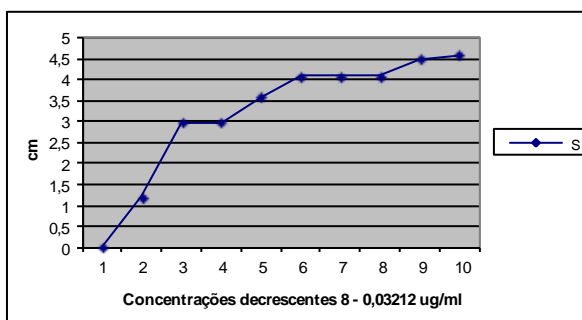


Figura 3: Médias dos diâmetros das colônias frente a Carbendazim (Seqüência 1).

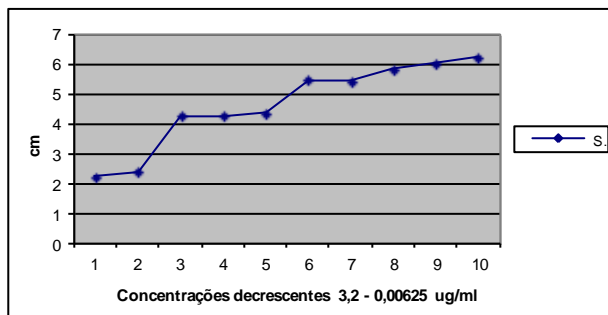


Figura 4: Médias dos diâmetros das colônias frente a Triadimenol (Seqüência 1).

Verificou-se inibição no crescimento fúngico, em concentrações LMRs dos fungicidas, exceto Tiabendazol. Os triazóis interferem na síntese do ergosterol, levando ao rompimento da membrana. Os benzimidazóis atuam na inibição da mitose e divisão celular (ZAMBOLIM et al., 2007). Os dados demonstram que *D. flagrans* é susceptível as resíduos destes fungicidas, sendo necessária precaução se utilizados em conjunto.

Conclusões

Todos os fungicidas avaliados, exceto Tiabendazol, testados nas concentrações preconizadas como LMRs têm efeito inibitório no crescimento de *D. flagrans*.

Apoio

Universidade Federal de Santa Maria

Referências

- ALVES, S.H.; CURY, A.E. Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com câncer, a antifúngicos poliênicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 34:251-254, 1992.
- ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: monografia de produtos agrotóxicos. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 01 jun., 2010.
- IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; GARCIA, C.; PINNELL, R.R. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomurae rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. **Environmental Entomology**, v. 4, p.765-768, 1975
- LUZ, C.; NETTO, M.C.B.; ROCHA, L. F. N. In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate pathogenic and saprobic fungi. **Mycopathologia**, v.164, p.39-47, 2002.
- MOTA, M. A. et al. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.
- ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. F. **Manejo da resistência de fungos a fungicidas**. Viçosa: UFV, 2007. P. 168.

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DETECÇÃO DO GENE *mecA* DE *Staphylococcus* spp. OBTIDOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

MATTIELLO, S. P.; JARDIM, W. M.; RARO, O. H. F.; GALLO, S. W.; ALCÂNTARA, L.R.; SANDRI, A.M.; OLIVEIRA, S. D.

Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Biociências, PUCRS. E-mail: silviadias@pucrs.br

Resumo – Infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* são de grande relevância para a saúde humana. O *S. aureus* é considerado de maior importância clínica, sendo o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) um dos principais agentes de infecções nosocomiais. Os MRSA sintetizam uma proteína ligadora de penicilina alterada (PBP2a) codificada pelo gene *mecA*, responsável pela resistência à meticilina. Este estudo teve como objetivo isolar e identificar espécies de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos e detectar a presença do gene *mecA* responsável pela resistência aos beta-lactâmicos. Foi obtido um total de 75 isolados de *Staphylococcus* spp., dos quais 53 foram identificados em nível de espécie. As espécies mais frequentes foram *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. saprophyticus*. Em um total de 37 isolados foi verificada a presença do gene *mecA*, sendo detectado em 29 isolados.

Palavras-chaves: *Staphylococcus* spp., MRSA, gene *mecA*.

Introdução

Staphylococcus spp. são cocos Gram positivos que podem ser classificados em coagulase-positivos e coagulase-negativos. Os *Staphylococcus* coagulase-negativos (CNS) pertencem à microbiota normal da pele humana, embora algumas espécies possam causar infecções graves (Tortora et al., 2005). Entre os *Staphylococcus* coagulase positivos (*Staphylococcus intermedius*, *S. hyicus* e *S. aureus*), o *S. aureus* é considerado de maior importância clínica, causando diversas infecções piogênicas, intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico, sendo uma das principais causas de infecções hospitalares graves. No entanto, também é componente da microbiota normal, sendo portado nas fossas nasais por 20% a 30% da população humana saudável (Plata et al., 2009).

Atualmente, tem sido descrita a resistência de *S. aureus* a diversas drogas antimicrobianas, especialmente aos β -lactâmicos. A resistência a estes antimicrobianos pode ser mediada por β -lactamases, bem como pelo gene *mecA* carregado pelo cassete gênico SCC*mec*, que codifica para uma proteína ligadora de penicilina alterada, PBP2a ou PBP2', sendo conhecidos como *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Utsui & Tokota, 1985).

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Staphylococcus* spp. entre amostras ambientais obtidas na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital São Lucas da PUCRS em Porto Alegre, bem como realizar a caracterização fenotípica desses isolados e a detecção do gene *mecA* através de PCR.

Materiais e Métodos

Foram coletadas 25 amostras semanalmente, durante 4 semanas de diferentes locais e equipamentos dos leitos da UTI do Hospital São Lucas. As amostras foram obtidas com o

auxílio de *swab* estéril embebido em solução salina 0,85% e colocados em tubos de ensaio contendo o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram semeadas em agar Chapman e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, verificou-se a presença de colônias manitol positivas e de colônias manitol negativas que foram submetidas à coloração de Gram para visualização de cocos Gram positivos em formato de cachos de uva. A caracterização complementar foi realizada através da prova da catalase, prova da coagulase em tubo, produção de DNase e provas bioquímicas (glicose, maltose, manitol, sacarose, trealose e urease).

Para a detecção do gene *mecA* por PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos AS-1 5'AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC3' e AS -2 5'AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC3', que amplificam uma região de 533 pb. O DNA dos isolados foi extraído utilizando um protocolo que emprega tiocinato de guanidina (Rademaker & Bruijn, 1997). A mistura para a reação de PCR foi preparada em um volume total de 25 µL, contendo 1 µL do DNA alvo, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 0,2 U de *Taq* DNA polimerase e água milliQ. A amplificação foi obtida através de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C seguida por 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 54°C e 1 minuto a 72°C e por uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

Resultados e Discussão

Um total de 75 isolados de *Staphylococcus* spp. foi obtido a partir de diferentes locais dos leitos da UTI (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Staphylococcus* isoladas da UTI e presença do gene *mecA*.

Espécies	Frequência (%)	Presença de <i>mecA</i>
<i>Staphylococcus</i> spp.	22 (29,3)	9/12
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 (22,6)	13/15
<i>Staphylococcus intermedius</i>	12 (16)	3/5
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	10 (13,3)	3/4
<i>Staphylococcus hyicus</i>	5 (6,6)	2/3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5 (6,6)	6/6
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4 (5,3)	1/2
Total	75	29/37

Entre as espécies identificadas, o *S. aureus* foi o mais prevalente. Este microrganismo é uma das principais causas de infecções hospitalares graves, podendo levar à bacteremia, bem como infectar pele, tecidos moles, trato respiratório inferior, endocárdio e ossos. Os pacientes hospitalizados estão particularmente expostos a infecções por este microrganismo devido ao seu sistema imunológico comprometido e frequentes punções e inserções de cateteres (Chongtrakool et al., 2006; Moeira et al., 2007).

O *S. intermedius*, segunda espécie mais isolada neste trabalho, causa infecções especialmente associadas à exposição a animais, mas também pode causar abscessos na pele e em tecidos moles (Kelesidis & Tsiodras, 2010). O *S. saprophyticus* está presente na microbiota normal da pele, região periuretral e mucosas do trato genito urinário, mas pode causar infecções do trato urinário (Martins & Cunha, 2007). O *S. epidermidis* pertence à microbiota endógena da pele e das mucosas, entretanto está associado a infecções hospitalares resultantes da contaminação de cateteres, sondas de plástico, bem como a próteses devido à

sua capacidade de formar biofilmes (Tortora et al., 2005). Do total de isolados 6,6% foram identificados como *S. epidermidis* e 6,6% como *S. hyicus*.

S. haemolyticus foi a espécie com menor percentual de isolamento (5,3%), sendo raramente associado a infecções de tecidos moles, geralmente em pacientes imunocomprometidos (Tortora et al., 2005).

Dos 75 isolados, 37 foram submetidos à detecção do gene *mecA* através de PCR, onde verificou-se que 29 isolados apresentam o gene responsável pela resistência aos β -lactâmicos, mostrando a alta prevalência do cassete gênico SCC*mec* entre os isolados obtidos no ambiente hospitalar.

Conclusão

Uma alta frequência de isolados de *Staphylococcus* no ambiente hospitalar, incluindo espécies patogênicas para o ser humano, que carregam resistência à meticilina foi observada neste estudo, o que constitui uma possível fonte de infecção para pacientes internados, especialmente imunodeprimidos.

Referencias

- CHONGTRAKOOL, P., ITO, T., XUE MA, X., KONDO, Y., TRAKULSOMBOON, S., TIENSASITORN, C., JAMKLANG, M., CHAVALIT, T., SONG, Jae-H., HIRAMATSU, K. **Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in 11 Asian Countries: a Proposal for a New Nomenclature for SCC*mec* Elements.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 1001–1012. Mar. 2006.
- KELESIDIS, T., & TSIODRAS, S. **Staphylococcus intermedius is not only a zoonotic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva.** *Int J Infect Dis.* 2010 Oct;14(10):e838-41. Epub 2010 Jun 17.
- MARTINS, A., & CUNHA, M.L.R.S. **Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspect.** *Review. Microbiol. Immunol.* 51 (9), 787-795, 2007.
- PLATA, K., ROSATO, A.E., WĘGRZYN, G. ***Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity.** *Acta Biochimica Polonica* Vol. 56 No. 4/2009, 597–612.
- MOREIRA, M., FREITAS, M.R., MARTINS, S.T., CASTELO, A., MEDEIROS, E.A.S. **Efficacy of a Program of Prevention and Control for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in an Intensive-Care Unit.** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*; 11(1):57-62, 2007.
- TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L. **Microbiologia.** Ed.8°. Porto Alegre. Artmed. 2005.
- UTSUI, Y., TOKOTA, Y.; . **Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 28:397-403.

PADRONIZAÇÃO DO ANTIFUNGIograma PELO MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO PARA ISOLADOS DE *Malassezia pachydermatis*

Francielli Pantella Kunz de Jesus¹; Deise Luiza Mahl²; Maria Isabel de Azevedo²; Cláudia Lautert³; Sydney Hartz Alves⁴; Sônia A. Botton⁴; Janio Morais Santurio⁴

¹Estudante do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM; E-mail: franciellikunz@hotmail.com; ²Estudantes do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM; ³Estudante do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS; ⁴Professores do Grupo de Pesquisa Micologia Médica e Veterinária da UFSM.

Resumo - O fungo leveduriforme *Malassezia pachydermatis* é considerado um habitante normal e patógeno oportunista do meato acústico externo de cães e gatos, também podendo ser encontrada no reto, pele interdigital, tegumento cutâneo, sacos anais e vagina. Novas drogas antifúngicas têm sido disponibilizadas para tratamento de infecções fúngicas. Necessário, pois se faz que o uso de antifúngico seja avaliado sobre *Malassezia pachydermatis*, proporcionando um uso mais racional dos antifúngicos na clínica, diminuindo a casuística de resistência deste agente frente a esta classe de medicamentos. Este estudo teve por objetivo padronizar a técnica de susceptibilidade de disco difusão através do protocolo M44-A para a levedura *Malassezia pachydermatis* frente aos antifúngicos tópicos e sistêmicos. Os resultados apresentados demonstraram que a técnica é reproduzível para a espécie *M. pachydermatis*, podendo ser utilizada como rotina laboratorial, no monitoramento da susceptibilidade deste agente à antifúngico.

Introdução

A *Malassezia pachydermatis* é considerada um habitante normal e patógeno oportunista do meato acústico externo de cães e gatos, também podendo ser encontrada no reto, pele interdigital, tegumento cutâneo, sacos anais e vagina (BOND et al., 1996), sendo considerada, por vários autores, um dos mais frequentes microorganismos associados com otite externa em cães (BAXTER, 1975; CHENGAPA, 1983; LANGONI et al., 1991; GUPTA, et al., 2000;) e nos últimos anos, os estudos também apontam essa levedura como causadora de dermatite canina (NOBRE et al., 1998). Embora a *M. pachydermatis* não represente uma ameaça à vida do animal, pode causar dor e prurido quando se torna patogênica. Porém a resposta ao tratamento eleito pode ser complicada se não for utilizado de forma adequada o medicamento.

As falhas no tratamento destas infecções podem ser atribuídas à resistência clínica ou microbiológica. A determinação da correlação entre ambas as resistências ainda é bastante ilimitada, o que aumenta a importância de estudos para conhecer o perfil de sensibilidade de cepas clínicas e o espectro de ação dos antifúngicos. Além disso, com a disponibilidade de novos antifúngicos e estratégias terapêuticas, a detecção de resistência poderá ser vital no momento de eleger uma alternativa terapêutica.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas 40 amostras de *Malassezia pachydermatis*, isoladas de cães e gatos apresentando quadros de dermatite e otite causados pelo agente. Todos os organismos foram repicados para ágar sangue ou ágar Sabouraud dextrose para assegurar a pureza e viabilidade. A técnica foi realizada seguindo o protocolo M44-A (CLSI, 2004), utilizando o meio MHA

suplementado com dextrose e azul de metileno, o tamanho do inóculo de 0,5 a 2,5x10³ UFC/mL preparado com o auxílio de espectrofotometria, os discos contendo antifúngico impregnado, foram dispensados nas placas a temperatura de incubação de 35°C e com tempo de leitura de 24h. A leitura foi realizada através da medida (mm) do halo de inibição de crescimento da levedura.

Resultados e discussão

Das 40 amostras de *M. pachydermatis* testadas 67,5% (n=27) dos isolados demonstraram sensibilidade ao antifúngico em estudo e 25% (n=10) apresentaram sensibilidade dose dependente sendo que 7,5% (n=3) foram resistentes ao antifúngico, quando comparadas as medidas dos halos com aos da Tabela 1.

Tabela 1. Normas Interpretativas para leitura e interpretação do Diâmetro da Zona para espécies de *Candida* spp.

Antifúngico	Concentração (µg/mL)	Diâmetro do halo (mm)		
Fluconazol	25µg/mL	R ≤14	S-DD 15-18	S ≥19

R- resistente; S-DD- sensível dose dependente; S- susceptível.

O método de disco difusão, descrito por Anderson e modificado por Kirby e Bauer, vem sendo empregado com sucesso na bacteriologia desde 1966, com a finalidade de determinar a susceptibilidade de bactérias a antimicrobianos, apresentando ótima correlação clínica laboratorial e bons resultados obtidos na bacteriologia são de extrema importância a tentativa de adaptar esta metodologia para os ensaios com antifúngicos (M44-A, 2004).

Conclusões

O teste de disco difusão proporciona um resultado rápido, de baixo custo, não exigindo equipamento específico para sua realização, proporcionando resultados qualitativos de fácil interpretação, podendo assim ser utilizado em laboratórios de rotina avaliando a susceptibilidade de leveduras. Entretanto é necessária cautela na interpretação de resultados de disco difusão em ensaios, onde o crescimento inadequado da espécie testada pode ocasionar resultado de falsa susceptibilidade.

Apoio

Laboratório de Pesquisas Micológicas, LAPEMI, UFSM.

Referências

- BAXTER, M. *Pityrosporum pachydermatis* in pendulous and erect ears of dogs. *New Zealand Vet J.* v. 24, p. 69-70, 1975.
- CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for antifungal Disk Diffusion susceptibility testing of yeast. Approved Guideline, v.23, n.6 M44 – A, 2004.
- GUPTA, A. K.; KOHLL, Y.; FAERGEMANN, J.; SUMMEBELL, R. C. In vitro susceptibility of seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafina. *Br J Dermatol*, v. 142, n. 4, p. 758-765, 2000.

LANGONI, H.; FESSEL, Y. M. N.; LISTONI, F. J. P.; FAVA, N. Microflora aeróbica de ouvido de cães sem otite. **Arq Brás Med Zootec**, v. 43, n. 3, p. 255-260, 1991.

NOBRE, M. O.; MEIRELLES, M. C. A.; GASPAR, L. F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L. F.; SOZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 447-452, 1998.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-ITS PARA ISOLADOS DE *Malassezia* spp

Francielli Pantella Kunz de Jesus¹; Deise Luiza Mahl²; Maria Isabel de Azevedo²; Cláudia Lautert³; Sonia A. Botton⁴; Sydney Hartz Alves⁴; Janio Morais Santurio⁴

¹Estudante do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM; E-mail: franciellikunz@hotmail.com; ²Estudantes do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM; ³Estudante do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS; ⁴Professores do Grupo de Pesquisa Micologia Médica e Veterinária da UFSM.

Resumo - Estudos moleculares têm possibilitado o uso da estrutura do material genético como ferramenta para identificação da espécie. Vários métodos têm sido aplicados para identificação da espécie *M. pachydermatis* em subgrupos e recentemente a investigação molecular das cepas isoladas de animais hígidos e isolados de otite e dermatite, para estudo epidemiológico da doença. O objetivo deste trabalho foi identificar espécies da levedura *Malassezia pachydermatis* proveniente de caninos e felinos através da técnica molecular PCR (*Reação da Polimerase em Cadeia*) - ITS (*Intergenic Transcribed Spacer*). Os produtos de amplificação foram verificados em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Após a amplificação, o produto foi enviado ao sequenciamento e foi confirmada sua identidade como *M. pachydermatis*, comprovando a padronização do teste.

Palavras-chave: PCR-ITS; *Malassezia* spp; *Malassezia pachydermatis*

Introdução

Em animais a maioria dos casos de malasseziose está associada com otite externa em cães e apresenta formações excessivas de cerume e prurido, determinando eritema do meato acústico externo. O exsudato produzido na otite externa quando causada pela levedura varia de marrom escuro a negro. Esses animais demonstram frequentemente, prurido, entretanto a apresentação clínica não é específica e o diagnóstico deve ser baseado na identificação da levedura, pela citologia do cerume e cultura do agente e identificação molecular (HUANG, 1994). Assim sendo, os autores consideram que a presença de células compatíveis morfológicamente com a *M. pachydermatis* em um exame direto não significa doença, mas a presença de numerosas células por campo é considerada patogênica (PLANT et al. GRIFFIN, 1998; BOND et al., 1996). Entretanto, Ribeiro et al, (1997) enfatizaram que a interpretação deste exame laboratorial deve ser prudente já que foi evidenciada a ocorrência de células de *M. pachydermatis* em número elevado tanto em animais hígidos como em animais afetados pelo agente. Atualmente técnicas moleculares de cariotipagem e PCR têm se tornado confiáveis na diferenciação entre as espécies de *Malassezia*. A importância na diferenciação de espécies ou subespécies de *Malassezia* não reside no fato de identificação por si só, mas sim no fato de que possa haver diferenças na patogenicidade e na susceptibilidade a antifúngicos (STAMENTO SCHIOTTFELDT et al., 2002).

Materiais e Métodos

Para extração do DNA das cepas de *Malassezia*, será utilizada uma colônia jovem com repique de até 72 horas, através do processo fenol/clorofórmio. PCR para identificação do

gênero *Malassezia* (SUGITA, et al., 2001): foram utilizados os *primers* específicos ITS1f-N GGATCATTAGTGATTGCCTTTATA e ITS4-R TCCTCCGCTTATTGATATG para identificação da região ITS (*intergenic transcribed spacer*) da levedura, que amplificaram a região do rDNA incluindo a região ITS-1, anterior à região 5.8S do gene rRNA, o produto de amplificação gerado apresentou aproximadamente 220 pb. As condições de amplificação foram ajustadas conforme a necessidade, sendo a ideal um volume de 30µl no final da reação, sendo 5µl do tampão 10X da DNA polimerase, 200 mM de cada dNTP, 5 mM MgCl₂, 30 pmol de cada primer, 50 ng do DNA molde, 2,5 U da enzima DNA polimerase. As amplificações foram realizadas no termociclador modelo PTC-100 – Peltier Effect Cycling, nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 30s a 94°C, 1 min a 62°C, 40s a 72°C e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram verificados em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

Resultados e discussão

A padronização da técnica de *ITS-PCR* disponibiliza uma ferramenta bastante útil para o diagnóstico de malassezioses, pois além de ser bastante específica para fungos quando amplifica a região ITS e sensível, é mais rápida que a cultura microbiológica comumente empregada na rotina de diagnóstico desta levedura. O resultado pode ser visualizado na Fig. 1.

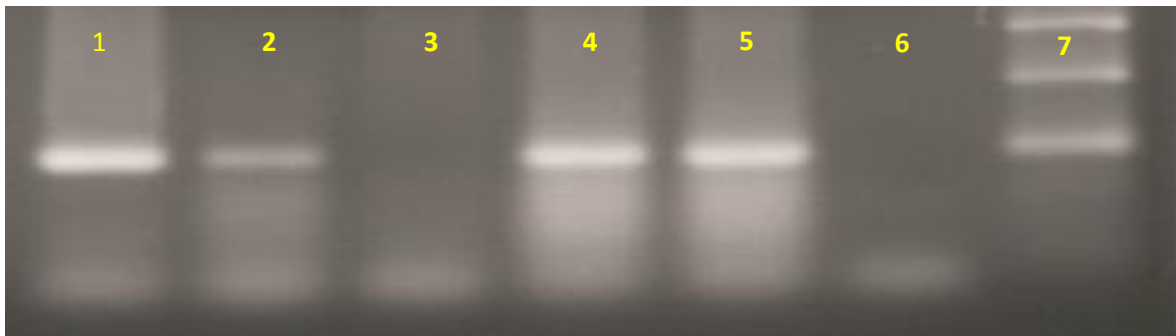


Figura 1. Reação de PCR-ITS para *Malassezia* spp. Fragmentos gerados a partir do 1º round de amplificação: Controle positivo: Linha 1 e 2 - *Malassezia pachydermatis*. Controle negativo: Linha 3 - *E.coli*. Amostras-teste: 22AM e 12 AM (Oriundas da Micoteca/LAPEMI/UFSM), linhas 4 e 5 respectivamente. Linha 6 - H₂O. Linha 7 - Marcador de peso molecular (DNA Ladder, Ludwig Biotec®).

Conclusões

As modificações realizadas para padronização não demonstraram alterações na qualidade do diagnóstico.

Apoio

Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de pesquisas Micológicas-LAPEMI.

Referências

BOND, R.; FERGUSON, E. A.; CURTIS, C. F.; GRAIC, J. M.; LLOYD, D. H. Factors associated whit elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* population in dogs whit pruritic skin disease. **J Small anim Pract.** V. 37, p. 103-107, 1996.

HUANG, H. P. & LITTLE, C .J. L. Lipid content of cemen from normal dogsand otitic canine ears. **Vet Rec.** v. 134, p. 380-381. 1994.

PLANT, J. D.; ROSENKRANTZ, W. S.; GRIFFIN, E. C. factores associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. **J Am Vet Med Assoc**, v. 201, n. 6, p. 879-882, 1992.

SUGITA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOT, R.; OGAWA, H.; SHINODA, T.; NISHIKAWA, A. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatites patientes and healthy subjects. **J Clin Microbiol**, v.39, n.10, p. 3486-3490, 2001.

PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix schenckii* ORIUNDOS DE QUATRO ESTADOS BRASILEIROS

Cheila Denise Ottonelli Stopiglia^{1,2}; Daiane Heidrich²; Fabiane Jamono Vieira²; Cibele Massotti Magagnin²; Julia Medeiros Sorrentino²; Maria Lúcia Scroferneker^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: cheila.dos@gmail.com; ²Laboratório de Fungos Patogênicos Humanos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: scrofern@ufrgs.br

Resumo – Setenta e cinco isolados de *S. schenckii*, oriundos de quatro estados brasileiros (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) foram avaliados *in vitro* frente a cinco agentes antifúngicos, utilizando um método de microdiluição de referência. Em geral, a terbinafina foi o fármaco mais ativo, seguida de cetoconazol e itraconazol. Houveram diferenças no perfil de sensibilidade dos isolados de diferentes origens geográficas para os antifúngicos cetoconazol e itraconazol.

Palavras-chave: *Sporothrix schenckii*; atividade antifúngica; concentração inibitória mínima.

Introdução

Sporothrix schenckii, agora considerado como um complexo (MARIMON et al., 2007), é um fungo patogênico dimórfico e agente etiológico da esporotricose humana e animal. A esporotricose predomina nas zonas tropicais e temperadas, sendo a micose subcutânea de maior incidência no estado do Rio Grande do Sul (DA ROSA et al., 2005).

O tratamento de escolha na esporotricose enquanto lesão cutânea é a quimioterapia sistêmica com iodeto de potássio ou de sódio (COSKUN et al., 2004). Nas formas cutâneas disseminadas, linfocutâneas recidivantes e extracutâneas, a anfotericina B é o fármaco mais efetivo. Porém, a frequência de intolerância ao iodo e a alta toxicidade da anfotericina B, muitas vezes, representam fatores impeditivos ao seu uso (STERLING & HEYMANN, 2000). Nas últimas décadas aumentou o emprego de derivados azólicos, dentre eles cetoconazol, itraconazol e fluconazol como alternativa terapêutica aos esquemas clássicos, sendo o itraconazol o mais efetivo deles (MEINERZ et al., 2007). Por outro lado, a terbinafina, em virtude da sua ótima atividade *in vitro* e *in vivo* está sendo usada para diversas infecções fúngicas (KOHLENER et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Sporothrix schenckii* de diferentes regiões do Brasil frente aos antifúngicos itraconazol, cetoconazol, fluconazol, anfotericina e terbinafina.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 75 isolados clínicos de *S. schenckii* oriundos de quatro estados brasileiros (Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro).

O ensaio de sensibilidade a antifúngicos foi desenvolvido segundo a técnica de microdiluição em caldo, através do protocolo M38-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2002). Utilizaram-se cinco antifúngicos disponíveis comercialmente para o

tratamento da esporotricose, citando: cetoconazol, fluconazol, itraconazol, terbinafina, anfotericina. A solução estoque dos antifúngicos foi preparada em dimetilsulfóxido e posteriormente, foram realizadas diluições no meio RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 com 165 mM de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), para obter concentrações de 0,25 a 128 µg/ml para fluconazol e de 0,03 a 16 µg/ml para os demais antifúngicos.

A suspensão de esporos de cada cultura foi ajustada em espectrofotômetro e, posteriormente, o inóculo foi diluído na proporção 1:50 em caldo RPMI-MOPS. O ensaio foi realizado em placas estéreis de 96 poços com fundo em U, onde foram adicionados 100µl de cada concentração do antifúngico a ser testado. Posteriormente, inoculou-se alíquotas de 100µl da diluição 1:50 do inóculo em cada um dos poços. A concentração final de microrganismos atingida foi de 5×10^3 a 5×10^4 UFC/ml. Foram incluídos nesses ensaios um controle livre de antifúngico (controle de crescimento) e um controle livre de microrganismo (controle de esterilidade). As placas foram incubadas a 35°C por 3 dias.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada visualmente por comparação com o crescimento do controle livre de fármaco. A CIM foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico para itraconazol e terbinafina e 50% do crescimento para os demais antifúngicos.

Resultados e Discussão

Terbinafina foi o antifúngico mais ativo, mostrando média geométrica (MG) de 0,06 µg/ml para todos os isolados analisados, seguido pelo cetoconazol, com MG 0,11 µg/ml. No entanto, este antifúngico apresentou maiores valores de CIM para isolados de Minas Gerais (MG 0,23 µg/ml). Neste estudo, 96% dos isolados de *S. schenckii* foram sensíveis ao itraconazol, apresentando CIM de até 0,5 µg/ml. Os isolados de Minas Gerais e Rio de Janeiro apresentaram maiores MG 0,47 e 0,34 µg/ml, respectivamente, sendo que os isolados do Rio Grande do Sul e São Paulo apresentaram MG de 0,19 e 0,24 µg/ml, respectivamente. A elevada sensibilidade de *S. schenckii* frente a terbinafina e ao itraconazol observada neste estudo está de acordo com estudos de isolados de outros países (MCGINNIS et al., 2001; SILVEIRA et al., 2009). A anfotericina apresentou MG de 1,20 µg/ml e não houveram variações entre os isolados de diferentes estados. Já o fluconazol, não foi ativo contra quaisquer um dos isolados testados, como já havia sido demonstrado por outros autores (TRILLES et al., 2005; MARIMON et al., 2008).

Conclusões

Nossos resultados sugerem que algumas diferenças podem existir no perfil de suscetibilidade a antifúngicos (cetoconazol e itraconazol), de acordo com a origem geográfica dos isolados. Estudos de tipagem molecular estão sendo desenvolvidos para investigar se há diferenças genotípicas e se as diferentes espécies do complexo *S. schenckii* são importantes para confirmar estes resultados. Além disso, os resultados deste estudo apóiam o uso terapêutico da terbinafina como uma primeira opção para o tratamento da esporotricose.

Apoio

Os autores são gratos a Capes, CNPq e FAPERGS.

Referências

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–206, ago. 2007.

DA ROSA, A.C.; SCROFERNEKER, M.L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R. L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, p.451-9, mar. 2005.

COSKUN, B.; SARAL, Y.; AKPOLAT, N.; ATASEVEN, A.; CICEK, D. Sporotrichosis successfully treated with terbinafine and potassium iodide: case report and review of the literature. **Mycopathologia**, v. 158, p. 53-56, jul. 2004.

STERLING, J.B.; HEYMANN, W.R. Potassium iodide in dermatology: a 19th century drug for the 21st century – Uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 4, p. 691-7, out. 2000.

MEINERZ, A.R.M.; NASCENTE, P.S.; SCHUCH, L.F.D.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; BRUM, C. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n.1, p. 60-2, 2007.

KOHLER, L.M.; SOARES, B.M.; SANTOS, D.A.; BARROS, M.E.S.; HAMDAN, J.S. *In vitro* susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: comparison of yeast and mycelial forms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 843-7, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2002). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved Standard*. CLSI, Vilanova, pp. 221–27.

MCGINNIS, M. R.; NORDOFF, N.; LI, R. K.; PASARELL, L.; WARNOCK, D. W. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 369–71, ago. 2001.

SILVEIRA, C.P.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; ALVARADO-RAMÍREZ, E.; MURCIANO-GONZALO, F.; DOLANDE, M.; PANIZO, M.; REVIKINA, V. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1607-10, ago 2009.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; DOS SANTOS M. L.; WANKE, B.; DE OLIVEIRA, A. S.; DE ALMEIDA, R. P.; INZA, I.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n.9, p. 3952-4, set. 2005.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *In vitro* susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52, n.2, p. 732–4, fev. 2008.

PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE DERMATÓFITOS ISOLADOS DE PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA

Cheila Denise Ottonelli Stopiglia^{1,2}; Cibele Massotti Magagnin²; Fabiane Jamono Vieira²; Daiane Heidrich² e Maria Lúcia Scroferneker^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: cheila.dos@gmail.com; ²Laboratório de Fungos Patogênicos Humanos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: scrofern@ufrgs.br

Resumo – As dermatofitoses apresentam alta prevalência na população em geral e, principalmente, em pacientes com insuficiência renal crônica, necessitando tratamentos com antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos. Estudos *in vitro* para avaliar a ação de antifúngicos são raros, especialmente em fungos filamentosos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de suscetibilidade de diferentes espécies de dermatófitos, isolados de pacientes com insuficiência renal crônica, frente a nove antifúngicos disponíveis comercialmente para o tratamento de dermatofitoses. Foram analisados 26 isolados de dermatófitos de pacientes com insuficiência renal crônica frente a nove antifúngicos (cetoconazol, ciclopirox olamina, fluconazol, griseofulvina, itraconazol, miconazol, piroctona olamina, terbinafina e tioconazol), através do método de microdiluição em caldo proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com modificações para dermatófitos. Dentre os antifúngicos testados, a terbinafina e o tioconazol obtiveram os melhores resultados de sensibilidade e o fluconazol apresentou baixa atividade. O perfil de sensibilidade dos antimicóticos testados ratifica a necessidade de conhecimento da espécie causadora de dermatofitose, devido à variação do perfil de suscetibilidade entre as espécies. Além disso, nossos resultados demonstram a importância da realização de ensaios de sensibilidade *in vitro*, pois alguns isolados da mesma espécie apresentaram diferente perfil de sensibilidade.

Palavras-chave: antimicóticos; Arthrodermataceae; insuficiência renal crônica; micoses.

Introdução

Dermatófitos são um grupo de fungos estreitamente relacionados, capazes de invadir tecidos queratinizados como pele, cabelo, pelo e unha, causando infecções denominadas dermatofitoses (CHINELLI et al., 2002). Estudos epidemiológicos indicam que esta patologia está dentre as mais prevalentes no mundo, sendo considerada a segunda doença de pele mais frequente na população adulta (GREER, 1994). Estudos tem mostrado que pacientes com insuficiência renal crônica são mais suscetíveis a dermatofitoses, principalmente onicomicose, a qual é a segunda desordem mais frequente em pacientes em hemodiálise, sendo uma das condições dermatológicas com maior dificuldade de tratamento (KUVANDIK et al., 2007).

A escolha do tratamento adequado é determinada pelo local e extensão da infecção, pela espécie envolvida, bem como pela eficácia, perfil de segurança e cinética dos medicamentos disponíveis. A terapia com agentes de uso tópico pode ser realizada com antimicóticos imidazólicos, como tioconazol e miconazol ou com griseofulvina. A aplicação tópica de ciclopirox olamina pode ser um tratamento alternativo para infecções fúngicas superficiais, particularmente quando usado em combinação com outros antifúngicos como amorolfina, ácido salicílico e cetoconazol (LORETTE & ERMOSILLA, 2006). A terapia oral

com agentes antifúngicos como terbinafina, itraconazol, cetoconazol e fluconazol são o tratamento de escolha para dermatofitoses que não respondem às terapias com fármacos de uso tópico (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2002).

O espectro de atividade desses antifúngicos é variável, podendo levar a falha no tratamento, possivelmente devido à baixa adesão dos pacientes, falta de penetração do fármaco, biodisponibilidade do medicamento, interações medicamentosas ou resistência (MANZANO-GAYOSSO et al., 2008). A análise *in vitro* da atividade antifúngica destes agentes permite a comparação entre diferentes antifúngicos, podendo vir a auxiliar na escolha de uma terapia eficaz para os pacientes acometidos por estas infecções. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de suscetibilidade de diferentes espécies de dermatófitos, isolados de pacientes com insuficiência renal crônica, frente a nove antifúngicos disponíveis comercialmente para o tratamento de dermatofitoses.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 26 isolados clínicos de dermatófitos (4 *Microsporum canis*, 7 *Microsporum gypseum*, 4 *Trichophyton interdigitale*, 8 *Trichophyton mentagrophytes* e 3 *Trichophyton rubrum*) oriundos de pacientes com insuficiência renal crônica do Ambulatório de Dermatologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, submetidos à exame micológico direto e cultural.

O ensaio de sensibilidade a antifúngicos foi desenvolvido segundo a técnica de microdiluição em caldo, através do protocolo M38-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2002), modificado para dermatófitos. Utilizaram-se nove antifúngicos disponíveis comercialmente para o tratamento de dermatofitoses, citando: cetoconazol, ciclopirox olamina, fluconazol, griseofulvina, itraconazol, miconazol, piroctona olamina, terbinafina e tioconazol. A solução estoque dos antifúngicos foi preparada em dimetilsulfóxido e posteriormente, foram realizadas diluições no meio RPMI 1640 tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico, para obter concentrações de 0,25 a 128 µg/ml para fluconazol e de 0,03 a 16 µg/ml para os demais antifúngicos.

A suspensão de esporos de cada cultura foi ajustada em espectrofotômetro e, posteriormente, o inóculo foi diluído na proporção 1:50 em caldo RPMI-MOPS. A concentração final de microrganismos atingida foi de 5×10^3 a 5×10^4 UFC/ml. Foram incluídos nesses ensaios um controle livre de antifúngico (controle de crescimento) e um controle livre de microrganismo (controle de esterilidade). As placas foram incubadas a 28°C por 3 dias.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada visualmente por comparação com o crescimento do controle livre de fármaco. A CIM foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico para itraconazol e terbinafina e 80% do crescimento para os demais antifúngicos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

Fluconazol mostrou a menor atividade dentre todos os antifúngicos avaliados, estando de acordo com outros estudos (DA SILVA BARROS & HAMDAN, 2005, WILDFEUER, 1994). Além disso, cerca de 86% dos isolados de *M. gypseum*, 50% de *T. mentagrophytes* e 25% de *T. interdigitale* apresentaram resistência ao fluconazol, o que corrobora com o estudo de DA SILVA BARROS & HAMDAN (2005). No entanto, *T. rubrum*, a espécie mais frequente causadora de onicomicoses com altos índices de recidivas, foi mais sensível ao fluconazol que as outras espécies avaliadas.

De uma forma geral, os antifúngicos mais eficazes foram tioconazol para *M. gypseum* e *T. rubrum* e terbinafina para as demais espécies, inclusive para a *M. canis*, a qual de acordo

com os estudos de CLAYTON & HAY (1994) apresenta baixa sensibilidade aos antifúngicos azólicos. No entanto, observa-se que o perfil de sensibilidade de alguns isolados dentro da mesma espécie é variado. Esta questão reforça a importância de realizar análise de sensibilidade em, pelo menos, todas as culturas fúngicas obtidas de pacientes com micoses superficiais associadas a falha terapêutica, e, por sua gravidade, em todos os casos de micoses sistêmicas.

Conclusões

A variação no perfil de suscetibilidade entre as espécies de dermatófitos testadas ratifica a necessidade de conhecimento da espécie causadora da dermatofitose para orientar o melhor antifúngico para o tratamento. Além disso, nossos resultados demonstram a importância da realização de ensaios de sensibilidade *in vitro*, pois alguns isolados da mesma espécie apresentaram perfis de sensibilidade diferentes.

Apoio

Os autores são gratos a Capes, CNPq e FAPERGS.

Referências

- CHINELLI, P.A.V.; SOFIATTI, A.A.; NUNES, R.S.; MARTINS, J.E.C. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.45, p. 259-63, set/out. 2003.
- CLAYTON, Y.M.; HAY, R.J. Epidemiology of fungal skin and nail disease: roundtable discussion held at dermatology 2000, Vienna, 17 May 1993. *British Journal of Dermatology*, v. 43, p. 9-11, abril 1994.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2002). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved Standard*. CLSI, Vilanova, pp. 221–27.
- DA SILVA-BARROS, M.E.; HAMDAN, J.S. Determination of susceptibility/resistance to antifungal drugs of *Trichophyton mentagrophytes* isolates by a macrodilution method. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 11, p. 983-7, nov. 2005.
- FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CABAÑES, F.J.; CARRILLO-MUNÓZ, A.J.; ESTEBAN, A.; INZA, I.; ABARCA, L. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing condition for dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 3999-4003, nov. 2002.
- GREER, D.L. An overview of common dermatophytes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 31, n. 3, p. 112-6, set.1994.
- KUVANDIK, G.; ÇETIN, M.; GENCTOY, G.; HOROZ, M.; DURU, M.; AKCALI, C. The prevalence, epidemiology and risk factors for onychomycosis in hemodialysis patients. *BMC Infectious Diseases*, v.7, p. 102-6, ago. 2007.
- LORETTE, G.; ERMOSILLA, V. Clinical efficacy of a new ciclopiroxolamine/zinc pyrithione shampoo in scalp seborrheic dermatitis treatment. *European Journal of Dermatology*, v. 16, n. 5, p. 558-64, 2006.
- WILDFEUER, A. The *in vitro* activity of fluconazole against fungi involved in dermal infections. *Mycoses*, v. 37, p. 447-9, nov/dez. 1994.

PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO URINÁRIA EM ACADÊMICAS DO CURSO DE ENFERMAGEM DA UNOESC, CAMPUS DE SÃO MIGUEL DO OESTE (SC)

Juniara Bonora¹; Andressa Schmid Basso²; Diane Scapin³; Everton Boff⁴;

^{1,2}Estudante do Curso de Biomedicina da Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. juny_@hotmail.com; ³Bióloga, Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. dianescapin2005@yahoo.com.br; ⁴Farmacêutico e Bioquímico, Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Santa Maria. Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. everton.boff@unoesc.edu.br

Resumo - A infecção do trato urinário (ITU) é uma doença infecciosa que atinge principalmente mulheres, sendo *Escherichia coli* uma das principais causas das infecções. Assim o objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência de infecção do trato urinário, os agentes etiológicos mais frequentes e o perfil de suscetibilidade dos microrganismos encontrados nos processos de ITUs de acadêmicas do curso de Enfermagem da Unoesc. Foram analisadas 63 amostras de urina que foram semeadas em ágar Mac Conkey e ágar CLED, incubadas à 36 ± 1 °C por 24-48 horas. As amostras que apresentaram contagens superiores a 10^5 UFC/mL foram submetidas a coloração de Gram e testes bioquímicos segundo Koneman et al. 2001; Macfaddin, 2000. O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizada através da técnica de Kirby-Bauer conforme recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). Das 63 uroculturas analisadas, 10 (15,87 %) amostras apresentaram contagens superiores a 10^5 UFC/mL, destas 6 (60%) foram positivas para *Escherichia coli*, 2 (20%) foram positivas para *Staphylococcus aureus* e 2 (20%) de *Staphylococcus coagulase negativa*. A maioria das voluntárias (53,96%) relatou casos anteriores de ITU diagnosticada através de exames de urocultura, apenas 3,17% das voluntárias faz uso de “chuveirinhos” e 23,8% utiliza absorventes internos na fase menstrual. Para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* os antimicrobianos ácido nalidíxico e ceftriaxona foram os que apresentaram maior resistência, e para *E.coli*, sulfazotrim e cefaclor foram os mais resistentes, demonstrando que o uso contínuo e errôneo dos antimicrobianos favorecem o desenvolvimento de cepas resistentes, sendo assim necessário a realização do antibiograma para o correto tratamento dessas infecções.

Palavras-chave: infecção urinária; urocultura; prevalência.

Introdução

A infecção do trato urinário (ITU) é definida como a invasão microbiana de qualquer órgão do trato urinário, desde a uretra até os rins (PIRES et al., 2007) e é uma das principais afecções mais comuns da clínica médica, figurando como a segunda infecção mais comum no ser humano.

Embora a maioria das infecções seja aguda e de curta duração, elas contribuem para uma taxa significativa de morbidade na população. A pielonefrite (infecção do trato urinário superior) tem uma apresentação mais grave podendo resultar em perda da função renal e em sequelas graves permanentes (MIMS et al, 1999). A *Escherichia coli* é uma das principais

causas de doenças infecciosas em seres humanos e é o agente etiológico mais frequente das ITUs, acometendo principalmente mulheres (ESPARIS et al. 2005).

No Brasil, um total de 80% das consultas clínicas devem-se à ITU. Aproximadamente 50 a 70% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de ITU em suas vidas, sendo que, 20 a 30% destas apresentam episódios recorrentes (POLETTTO; REIS, 2005).

Quando sintomática, o quadro clínico de ITU pode ser bastante sugestivo para o diagnóstico. Contudo, o diagnóstico só é confirmado pela urocultura, considerada o padrão-ouro no diagnóstico de ITU. A urocultura quantitativa não só indica a ocorrência de multiplicação bacteriana no trato urinário, como também permite o isolamento do agente etiológico e o estudo de sua sensibilidade aos antimicrobianos através do antibiograma (PIRES et al, 2007).

O tratamento visa, principalmente, erradicar a bactéria do trato urinário, com consequente melhora dos sintomas, tratamentos de curta duração com antimicrobianos orais são eficazes para infecção do trato urinário inferior; a pielonefrite exige tratamentos mais prolongados (GUIDONI; TOPOROVSKI, 2001).

Desta forma o objetivo desse trabalho foi verificar a prevalência de infecção do trato urinário, os agentes etiológicos mais frequentes e o perfil de suscetibilidade dos microrganismos encontrados nos processos de ITUs em universitárias do curso de enfermagem da Unoesc, Campus de São Miguel do Oeste (SC).

Materiais e Métodos

Os procedimentos metodológicos foram efetuados no Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste-SC. Foram realizadas 63 uroculturas, de acadêmicas do curso de Enfermagem da Universidade do Oeste de Santa Catarina, campus de São Miguel do Oeste, Brasil. Para as participantes foi distribuído coletores universais e instruções para coleta, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, juntamente com isso foi aplicado um questionário para as mesmas, para avaliar os hábitos de higiene pessoal.

As amostras foram homogeneizadas, foi realizado o teste de tiras reativas, posteriormente uma alíquota de 10 µL de urina de cada amostra foi semeada em ágar MacConkey e ágar CLED e incubadas a 36 ±1°C por 24-48 horas. Foram consideradas culturas positivas, aquelas apresentando contagem de colônias igual ou superior a 10⁵ UFC/mL. As colônias foram identificadas por coloração de Gram e provas bioquímicas segundo Koneman et al. (2001); Macfaddin, (2000). Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo método de difusão de discos, de Kirby-Bauer, segundo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). Os antibióticos testados foram: imipenem (10ug), sulfazotrim (25ug), norfloxacin (10ug), nitrofurantoina (30ug), cefaclor (30ug), ácido nalidixico (30ug), ceftriaxona (30ug), cefalexina (30ug), ciprofloxacina (5ug), azitromicina (15ug), amicacina (30ug), gentamicina(10ug).

Resultados e Discussão

Das 63 uroculturas analisadas, 10 (15,87%) amostras apresentaram contagens superiores a 10⁵ UFC/mL. Destas 6 (60%) foram positivas para *Escherichia coli*, 2 (20%) foram positivas para *Staphylococcus aureus* e 2 (20%) para *Staphylococcus coagulase negativa*. Esses resultados são semelhantes aos de Randrianirina et al. (2006) e Pires et al. (2007), que encontraram *E. coli* como a bactéria predominante em ITU, representando 67,2% e 62,4% do total de amostras analisadas, respectivamente.

A maioria das voluntárias (53,96%) relatou casos anteriores de ITU diagnosticada através de exames de urocultura e EQU, sendo que grande maioria dessas infecções relatadas foi assintomática. De acordo com Nuutinen, Uhari (2001), a infecção urinária recorrente é descrita em 12 a 75% dos pacientes.

A faixa etária das acadêmicas avaliadas foi de 18 a 33 anos e não houve relato de Diabetes Mellitus e gravidez. Apenas 3,17% das voluntárias faz uso de “chuveirinhos” e 23,8% utiliza absorventes internos na fase menstrual, o que pode facilitar a contaminação da bexiga por bactérias da região peri-anal. Não houve relato de uso de géis espermicidas, internação recente e uso de cateter.

Os antimicrobianos que apresentaram maior resistência para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa foram, ácido nalidíxico e ceftriaxona e para *E.coli*, foi sulfazotrim e cefaclor. Assim o monitoramento da resistência e o estudo do perfil de sensibilidade auxiliam no acompanhamento terapêutico e na orientação dos pacientes, uma vez que a prescrição de medicamentos sem o conhecimento do perfil de sensibilidade antimicrobiana da bactéria causadora da infecção pode significar um gasto desnecessário com antibióticos e um erro terapêutico.

Conclusões

Os resultados encontrados revelam que *E. coli*, foi o principal agente etiológico causador de infecção urinária, seguido por *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa.

A resistência encontrada neste trabalho, ressalta a importância da realização do antibiograma, para nortear o tratamento dessas infecções, pois muitas vezes, o tratamento empírico, sem o conhecimento do perfil de resistência, gera a maior utilização de antibióticos de amplo espectro, estimulando, dessa forma, o desenvolvimento de cepas resistentes.

Referências

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performande Standards for Antimicrobral Susceptibility Testing**. Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS. Document M100 – 515. Pennsylvania, USA, 2005.
- ESPARIS, C. M. et al. Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na Cidade do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 573-576, 2006.
- GUIDONI, E. B. M.; TOPOROVSKI, J. Infecção urinária na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 2, p. 165-169, 2001.
- KONEMAN, E. W. et al. – **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 1465 p.
- MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identifications of medical bactéria**. 3 ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p.
- MIMS, C. A et al. **Microbiologia médica**. São Paulo: Manole, 1999. 584 p.
- NUUTINEN M., UHARI M. Recurrence and follow-up after urinary tract infection under the age of one year. **Pediatric Nephrology**, v. 16, p. 69-72, 2001.
- PIRES, M. C. S. et al. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 643-647, 2007.
- POLETO, K. Q.; REIS, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 416-420, 2005.
- RANDRIANIRINA, F. et al. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in Antananarivo, Madagascar. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 29, p. 1-4, 2006.

PREVALÊNCIA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

Carla Rossana Silva de Moura; Franciane Rios Senger; Letícia Beatriz Matter

Curso de Farmácia, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus Santo Ângelo - e-mail: lmatter@urisan.tche.br

Resumo - As infecções do trato urinário estão entre as mais freqüentes infecções presentes tanto na comunidade como também em hospitais. O presente estudo visou identificar as bactérias prevalentes nas infecções urinárias diagnosticadas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Santa Rosa - RS, bem como, verificar o perfil de suscetibilidade das mesmas aos antimicrobianos e ainda, relacionar o perfil do paciente (sexo e idade) com a infecção. Foram analisadas 294 resultados positivos de urocultura realizadas no período de agosto de 2007 à fevereiro de 2008. As bactérias isoladas foram: *Escherichia coli* (58,51%), *Enterobacter sp.* (15,31%), *Staphylococcus saprophyticus* (14,62%), *Proteus sp* (5,44%), *Pseudomonas aeruginosa* (3,74%), *Staphylococcus sp.* (2,38%). Os resultados dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para as bactérias gram-negativas mostraram a ampicilina, tetraciclina, sulfametoxazol e o ácido nalidíxico como os quatro antimicrobianos mais freqüentes nos casos de resistência, já para as bactérias gram-positivas os antimicrobianos foram o ácido nalidíxico, sulfametoxazol, tetraciclina e norfloxacin. Os resultados mostraram que pacientes do sexo feminino foram os mais acometidos (80,95%). Em relação à idade dos pacientes, 12,24% estavam abaixo de 10 anos; 10,20% estavam na faixa etária entre 10 e 20 anos; 26,87% estavam na faixa etária entre 20 e 40 anos; 22,79% encontravam-se entre 40 e 60 anos e 27,90% apresentavam idade superior a 60 anos. A *E. coli* foi a bactéria mais encontrada tanto em homens como em mulheres. Uma explicação para este fato é a presença de adesinas que fornecem vantagens para seu estabelecimento no trato urinário.

Palavras-chave: infecção urinária, resistência bacteriana, *Escherichia coli*.

Introdução

As Infecções do Trato Urinário (ITU) são extremamente freqüentes e ocorrem em todas as idades. Dependendo do local acometido pelos microrganismos pode resultar em uretrite, cistite, prostatite e pielonefrite (TRAPP & HASENACK, 2001).

As infecções urinárias podem ocorrer em qualquer sexo, apesar das mulheres serem as mais afetadas. Estima-se que 40% delas, em algum momento de suas vidas, apresentarão um episódio característico desta infecção (HASENACK, 2004). São geralmente de caráter benigno, porém geram um grande desconforto, dor, podem tornar-se complicadas, necessitando de internação hospitalar e com freqüência propensas a reincidências (TRAPP & HASENACK, 2001).

A era da antibioticoterapia deu a comunidade médica uma poderosa arma na batalha contra as infecções, mas trouxe também a questão da resistência bacteriana. A resistência bacteriana tem se tornado um grande desafio pois tem se disseminado muito rapidamente entre as comunidades bacterianas, dificultando o tratamento das infecções em geral (BAUM & MARRE, 2005).

Diante do exposto, o estudo das principais bactérias que predominam nestas enfermidades pode nos possibilitar a identificar o seu foco de origem e impedir a

contaminação. Da mesma forma, se faz necessária a pesquisa sobre os antibióticos mais resistentes para tais bactérias, no sentido de rastrear a resistência das mesmas

O objetivo deste trabalho foi identificar as bactérias prevalentes nas infecções urinárias diagnosticadas em um laboratório de análises clínicas, bem como, verificar o perfil de suscetibilidade das bactérias aos antimicrobianos e também relacionar o perfil do paciente (sexo e idade) com a infecção.

Materiais e Métodos

Foram analisados os resultados positivos de 294 exames de urocultura, ou seja, com desenvolvimento bacteriano acima de 10^5 UFC/mL, realizados no período de agosto de 2007 à fevereiro de 2008, de pacientes atendidos em um laboratório de análises clínicas da cidade de Santa Rosa/RS. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da URI, Campus Santo Ângelo. Foram coletadas todas as informações necessárias de acordo com as variáveis a serem analisadas como: o tipo de bactéria, a idade, o sexo do paciente e a suscetibilidade da bactéria aos antimicrobianos.

Resultados e Discussão

Os 294 exames bacteriológicos de urina considerados positivos para ITU pertenciam a pacientes ambulatoriais e hospitalares. Os resultados mostraram que pacientes do sexo feminino foram os mais acometidos com 80,95% (n=238) dos casos de ITU, enquanto do sexo masculino 19,04% (n=56). Estes dados conferem com outros estudos (MENEZES *et al.*, 2005; POLETTTO *et al.*, 2005). Segundo a literatura existem diversos fatores que podem explicar a maior tendência feminina à infecção como: anormalidades anatômicas do trato urinário, gravidez, menopausa e comprimento da uretra (TRAPP & HASENACK, 2001).

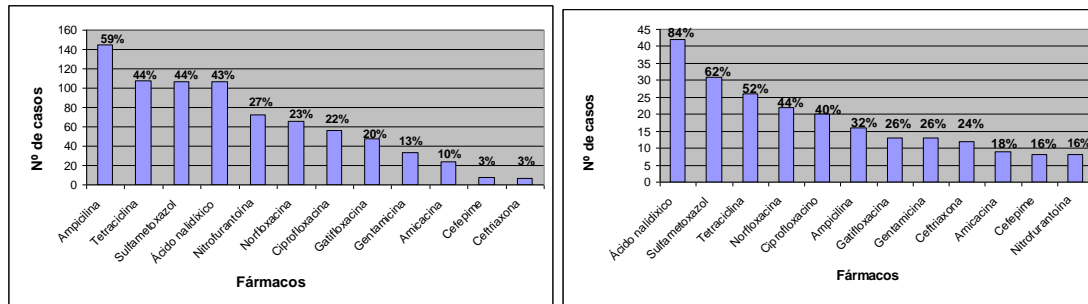
Em relação à idade dos pacientes, 12,24% (n=36) estavam abaixo de 10 anos, 10,20% (n=30) estavam na faixa etária de 10 a 20 anos, 26,87% (n=79) estavam na faixa etária de 20 a 40 anos, 22,78% (n=67) encontravam-se entre 40 a 60 anos e 27,89% (n=82) apresentavam idade superior a 60 anos. Estes dados conferem com a literatura que cita uma prevalência maior de UTI em adultos com vida sexual ativa e idosos com mais de 60 anos de idade (MULLER *et al.*, 2008). Em pacientes idosos podem ser esperadas maiores taxas devido a condições que favorecem a infecção, como uropatias obstrutivas da próstata nos homens e esvaziamento insuficiente da bexiga devido prolapso uterino nas mulheres (MULLER *et al.*, 2008)

Os microrganismos isolados foram *Escherichia coli* com 58,51% (n=172), *Enterobacter sp.* com 15,31% (n=45), *Staphylococcus saprophyticus* com 14,62% (n=43), *Proteus sp.* com 5,44% (n=16), *Pseudomonas aeruginosa* com 3,74% (n=11) e *Staphylococcus sp.* com 2,38% (n=7). A *E. coli* foi a bactéria mais encontrada tanto em infecções em homens quanto em mulheres, o que também foi verificado em outros trabalhos (POLETTTO *et al.*, 2005). Ela possui uma série de fatores de virulência que facilitam a sua infecção, entre eles, as adesinas. As adesinas permitem a aderência da *E. coli* na célula eucariótica facilitando a colonização dos tecidos. Entre as adesinas mais conhecidas podem ser citadas as fimbriadas (tipo I, P, S, FIC, Dr) e as afimbriadas (ANTÃO *et al.*, 2009). Outros fatores de virulência que favorecem a *E. coli* uropatogênica são as toxinas como hemolisina, fator necrozante citotóxico e protease autotransportadora (KAPER, 2004; ANTÃO *et al.*, 2009).

Em relação aos antimicrobianos testados para bactérias gram-negativas (n=244) como *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus sp.* e bactérias gram-

positivas (n=50) como *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus sp.*, os resultados observados estão demonstrados nas figuras abaixo (Figura 1 e 2).

Os quatro antimicrobianos mais freqüentes nos casos de resistência para as bactérias gram-negativas foram ampicilina, tetraciclina, sulfametoxazol e ácido nalidíxico (figura 1), já para as bactérias gram-positivas foram o ácido nalidíxico, sulfametoxazol, tetraciclina e a norfloxacino (figura 2). Estes resultados são compatíveis com os encontrados por NOGUEIRA & MOREIRA, (2006) mas diferentes dos encontrados por HÖRNER *et al.*, (2006). Estes últimos verificaram um grande número de casos de resistência das bactérias gram-negativas à nitrofurantoína, o qual representa o quinto fármaco com maiores casos de resistência na nossa pesquisa.



Figuras 1 e 2: Número de casos de resistência das bactérias gram-negativas (figura 1-esquerda) e das gram-positivas (figura 2- direita) em relação aos fármacos.

Conclusão

O predomínio da bactéria *E. coli* (58%) nos isolados das ITU nos mostra a importância de se pensar em uma maneira de impedir o seu acesso ou a sua colonização nos tecidos, ou por medidas preventivas ou por vacina para algum dos seus fatores de virulência.

Referências

- ANTÃO, E.M., WIELER, L. H. & EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, 1 (22): 1-12, 2009.
- BAUM, H. & MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**, 295: 503-511, 2005
- HASENACK, Beatriz S.; GUILHERME, Rosiley L.; *et al.* Disúria e polaciúria: sintomas sugestivos de infecção do trato urinário? **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 36, nº 3, p. 163-166, 2004.
- HÖRNER, Rosmari. *et al.* Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.38, n.3, 147-150,2006.
- KAPER, James B., NATARO, James P., MOBLEY, Harry L.T. *Pathogenic Escherichia coli* **Nature Reviews Microbiology**, v.2: 123 – 140, 2004.
- MENEZES, Everardo A. *et al.* Infecções Hospitalares urinárias causadas por *Enterococcus faecalis* na cidade de Fortaleza. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.37, n.2:67-69,2005.
- MULLER, Erildo V.; *et al.* Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas da Universidade Paranaense – Umuarama, PR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40 n.1 35-37, 2008.
- NOGUEIRA, Nádia A.; MOREIRA, Maria A. Bacteriúria assintomática em gestantes do Centro de Saúde Ambulatorial Abdoral Machado, Crateús, CE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.38,n1:19-21, 2006.

POLETTO, Karine Queiroz; REIS, Cleomenes. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na cidade de Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.38, n.5, 2005.

TRAPP, Éryka H.; HASENACK, Beatriz S. Bacteriúria assintomática: principais aspectos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.33 n.3:159-164, 2001.

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE CANDIDA NA SALIVA DE USUÁRIOS DE APARELHO ORTODÔNTICO FIXO

Amanda Gomes Faria^{1,2}; Dariane de Castro Pereira^{1,2}; Igor Oliveira Palagi de Souza^{1,2}; Julyana Pezzi de Oliveira^{1,2}; Rosana Fernanda Fogaça²; Alexandre Meneghello Fuentefria³;

¹Estudante da Faculdade de Farmácia da UFRGS; ²Grupo de Pesquisa em Micologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFRGS; ³Professor do Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, coordenador do Grupo de Pesquisa em Micologia; E-mail: alexmf77@gmail.com

Resumo – Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por causar boa parte de infecções fúngicas no homem, sendo *Candida albicans* a espécie predominante. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar leveduras do gênero *Candida*, e a capacidade que estas leveduras têm de produzir biofilme e hemólise. Foram isoladas e identificadas 70 amostras de *Cândida*, e avaliada a capacidade de formar biofilme e hemólise promovida por estas. A espécie predominante foi *C. albicans* (63%), seguida por *C. glabrata* (13%). A espécie que foi maior produtora de biofilme foi *C. glabrata* (56%). Nenhum dos isolados apresentou halo de hemólise. O aumento dos diagnósticos de candidíase em pacientes com algum tipo de prótese oral é decorrente da emergente patogenicidade das cepas das diversas espécies de *Candida*.

Palavras-chave: candidíase oral; biofilme; hemólise.

Introdução

As leveduras do gênero *Candida* são constituintes da microbiota da mucosa oral, intestinal e vaginal, permanecendo nestes habitats como colonizantes até encontrarem condições apropriadas para se multiplicarem, expressarem fatores de virulência, invadirem a mucosa e causarem infecção. As principais espécies de interesse clínico neste gênero são *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*, *C. guilliermondi* e *C. kefyr* (COLOMBO et al. 2006, LEWIS et al. 2009).

Diversos fatores são citados como responsáveis pela ocorrência de candidíase oral, podendo ser relacionado com o indivíduo ou com a própria levedura. A capacidade de aderência dessas leveduras, é um dos fatores associados ao potencial de virulência presente nestas (LYON et al., 2010). Este fator determina a capacidade que esta levedura tem de produzir biofilme (GAPARETTO et al., 2005).

Levando-se em consideração que o aparelho ortodôntico fixo (AOF) muitas vezes causa lesões no paciente e a dificuldade desses pacientes em fazer a correta higienização da cavidade oral, há um aumento considerável no oportunismo das leveduras do gênero *Candida* na cavidade oral (ATASSI et al., 2010; Salerno et al., 2010). Baseado neste contexto, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras oriundas de indivíduos usuários e não-usuários de AOF, assim como avaliar a capacidade destes microrganismos em formar biofilme e a capacidade hemolítica dos mesmos.

Materiais e Métodos

Isolamento e Identificação: A saliva de pacientes sintomáticos e assintomáticos foi coletada com um swab, que foi posteriormente incubado por 24h em caldo sabouraud com

cloranfenicol, seguido de plaqueamento em ágar sabouraud, também acrescido de cloranfenicol, e incubado a 32°C durante 48 h. Com o crescimento do fungo leveduriforme, confirmado pelo exame direto, foi feita semeadura em meio cromogênico (CHROMagar® Candida), o qual foi incubado a 32°C por 72 h, onde identificou-se *C. albicans* como colônias verdes, *C. krusei* como colônias rosas, *C. tropicalis* como colônias azuis, *C. glabrata* como colônias lilás e colônias brancas como outras espécies de *Candida* (PFALLER 1996).

Formação de Biofilme: Para verificar a produção de biofilme foi feita a avaliação em triplicata pela técnica proposta por Stepanovic (2000) modificada em microplacas utilizando *S. epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo. A formação de biofilme foi quantificada em espectrofotômetro a 450nm e classificado como forte, médio, fraco ou não formador de biofilme, de acordo com os pontos de corte validados pela técnica.

Capacidade Hemolítica: Para determinação da produção de hemólise, fez-se a partir de uma colônia pura, a semeadura em uma placa de ágar sangue de acordo com a técnica proposta por França (2010). A capacidade hemolítica foi observada a partir da formação de um halo de hemólise em torno do crescimento da colônia fúngica.

Resultados e Discussão

Das 70 amostras de *Candida* testadas até o momento, 63% são *C. albicans*, 13% *C. glabrata*, 4,3% *C. tropicalis*, 8,7% *C. krusei* e 11% são *Candida* não-*albicans*. A formação de biofilme foi observada em graus variáveis entre os isolados, sendo 30% dos isolados fraco produtor de biofilme; 13% médio produtor de biofilme; 4% forte produtor de biofilme e 53% dos isolados foi não produtor de biofilme. *C. glabrata* foi a espécie que apresentou maior formação de biofilme (56%) e *C. albicans* foi a que apresentou menor formação de biofilme, sendo 66% não formador de biofilme. No teste de hemólise, realizado em ágar sangue para observação da presença de halos de hemólise indicativos de potencial capacidade de infecções na corrente sanguínea, não foi observada a produção de hemólise em nenhum dos isolados.

Tabela 1. Percentagens da capacidade de formação de biofilme das leveduras isoladas da mucosa oral de portadores de AOF.

Faixa de OD	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. não-albicans</i>	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
> 0,280	1	1,4	1	1,4						
0,170 - 0,279	6	8,5			1	1,4			2	3
0,070 - 0,170	12	17	5	7	1	1,4	1	1,4	2	3
< 0,070	28	40	3	4,4	4	5,7	1	1,4	2	3
Total	47		9		6		2		6	

Formação de biofilme: Forte:> 0,280; Médio 0,170-0,279; Fraco 0,070-0,170; Não formador < 0,070

O uso de artefatos protéticos, como próteses e aparelhos ortodônticos, favorecem a colonização de microrganismos oportunistas, em potencial as espécies virulentas *Candida*. O aumento dos diagnósticos de candidíase em pacientes com algum tipo de prótese oral é decorrente da emergente patogenicidade das cepas das diversas espécies de *Candida* (ATASSI et al., 2010).

C. albicans é a espécie mais frequente segundo Schelenz et al. (2010), ocorrendo em 74% dos indivíduos estudados. Os dados deste trabalho confirmam a prevalência de *C. albicans*, correspondendo a 63% dos isolados. A segunda mais isolada foi *C. glabrata* com 13% dos isolados, concordando também com os resultados encontrados por Schelenz et al. (2010) e Zomorodian et al. (2010). Foram também isoladas *C. tropicalis*, *C. krusei*, porém em menor quantidade. Onze por cento das leveduras isoladas neste trabalho foram identificadas como *Candida* não-*albicans*.

Quanto à aderência 47% destes isolados foram capazes de produzir biofilme, concordando com os dados de Ciok et al. (2009). *C. glabrata* foi a espécie que mais produziu biofilme com (56%), demonstrando que os biofilmes produzidos por esta espécie possuem maior quantidade de proteínas de resposta ao estresse podendo contribuir para uma maior resistência aos antifúngicos (SENEVIRATNE et al., 2010). Estes dados sugerem que a maioria das leveduras do gênero *Candida* estudadas não tem a capacidade de aderirem às células do hospedeiro, não ocasionando o quadro de candidíase oral, com isto estas leveduras não apresentam resistência aos tratamentos com antifúngicos convencionais (RUKAYADI et al., 2010).

Do total de 70 isolados de *Candida* sp. analisados, 100% não promoveram hemólise, discordando dos resultados achados por França et al. (2010). Este dado mostra que as leveduras estudadas não têm a capacidade de secretar fatores hemolíticos com o objetivo de obter hemoglobina como fonte de ferro para sua sobrevivência, com isto não têm a capacidade de causar candidíase em outras partes do corpo do indivíduo (FRANÇA et al., 2010; NEGRI et al., 2010).

Conclusões

Das 70 cepas, 63% são *C. albicans*, 13% *C. glabrata*, 4,3% *C. tropicalis*, 8,7% *C. Krusei* e 11% são *Candida* não-*albicans*. 30% dos isolados é fraco produtor de biofilme; 13% médio produtor de biofilme; 4% forte produtor de biofilme e 53% dos isolados foi não produtor de biofilme, tendo *C. glabrata* como maior produtora de biofilme. Nenhum dos isolados foi capaz de utilizar hemácia como fonte de ferro para sua sobrevivência.

Apoio

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PIBIC/UFRGS.

Referências

- ATASSI, F. et al. Oral Hygiene Status among Orthodontic Patients. J Contemp Dent Pract. 2010 Jul 1;11(4):E025-32.
- AZEVEDO, R.V. et al. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of Propolis and Periogard. Rev. Microbiol., São Paulo, v. 30, n. 4, p. 335-341, 1999.
- CIOK, P. E. et al. The evaluation of relationship between the prigin of *Candida* sp. and the ability of biofilm formation on surface of different biomaterials. Med Dosw Mikrobiol. 2009;61(3):273-80.
- COLOMBO, A.L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. Journal of Clinical Microbiology 44, 2816-2823, 2006.
- FRANÇA, E.J.G. et al. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. Ver. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 43(3):318-321, mai-jun, 2010.
- GASPARETTO, A. et al. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. Acta Sci. Health Sci. Maringá, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2005
- LEWIS, R.E. Overview of the changing epidemiology of candidemia. 2009. Current Medical Research Opinion 25, 1732-40.
- LYON, J.P. et al. Inhibition of Virulence Factors of *Candida* spp. by Different Surfactants. Mycopathologia.2010
- NEGRI, M. et al. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. Mycopathologia. 2010 Mar;169(3):175-82

PFALLER, M.A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clinical Infectious Diseases* 22 (suppl 2): S89-S94, 1996.

RUKAYADI, Y. et al. In vitro activity of xanthorrhizol against *Candida glabrata*, *C. guilliermondii*, and *C. parapsilosis* biofilms. *Med Mycol.* 2010

SALERNO, C. et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Aug 15.

SCHELENZ, S. et al., Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *J Oral Pathol Med.* 2010

SENEVIRATNE, C.J. et al. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics.* 2010 Apr;10(7):1444-54.

STEPANOVIC, S. et al. A *modified* microtiter-plate test for quantification of staphylococcal *biofilm formation*. *Journal of Microbiological Methods.* 2000

TAMURA, N.K. et al. Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 156, n. 4, p. 269-272, 2003.

ZOMORODIAN, K. et al. *Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers.* *Med Mycol.* 2010

PROTEASES EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR ISOLADOS AMBIENTAIS E CEPAS PADRÃO DE *ACANTHAMOEBA*

Carolina De Marco Veríssimo¹; Ana Paula Folmer Correa²; Marilise Brittes Rott³

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: caroldmv@yahoo.com.br; ²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ³Professora orientadora - Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS;

Resumo – Considerando-se que o padrão de secreção de proteases extracelulares de diferentes isolados de *Acanthamoeba* pode estar associado ao potencial patogênico do gênero, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de proteases extracelulares produzidas por isolados ambientais de estojos de lentes de contato e cepas padrão de *Acanthamoeba*. Neste estudo foram usadas cepas padrão de *Acanthamoeba* patogênicas, ATCC 30461, e não patogênicas, ATCC 30010 e 30872 e isolados ambientais pré-existentes no Laboratório de Parasitologia – UFRGS, provenientes de estojos de lentes de contato. A partir de cultivos axênicos e monoclonais, obteve-se o meio condicionado (MC) de cada isolado, que foi utilizado para avaliação da atividade proteolítica por SDS-PAGE não desnaturante (zimograma), bem como para determinação de proteínas totais de todos os isolados. Os resultados demonstram que os isolados estudados produzem proteínas extracelulares, parte destas com atividade proteolítica.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*; Proteases Extracelulares; Ceratite

Introdução

Dentre as amebas de vida livre (AVL), o gênero *Acanthamoeba* é o mais isolado da natureza (Khan, 2006). AVL deste gênero são isoladas dos mais diversos ambientes, como solo, poeira, fontes naturais de água, reservatórios, água do mar, água de torneira, piscinas, soluções de lentes de contato, ambientes hospitalares, entre outros (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Caumo *et al.*, 2009; Carlesso *et al.*, 2010). Estes protozoários são ditos anfitriões, devido à sua capacidade de existir normalmente como organismos de vida livre, mas serem capazes de sobreviver em tecidos de seres humanos e outros animais, causando doenças como ceratite e encefalite (Visvesvara & Schuster, 2008).

Ceratite amebiana é uma doença progressiva e dolorosa que ameaça a visão, estando associada ao uso de lentes de contato. Seus principais sintomas são vermelhidão, lacrimejamento, fotofobia e edema nas pálpebras, podendo progredir para perda da visão e enucleação (Awwad *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm associado a patogenia causada por *Acanthamoeba* à produção e secreção de proteases (He *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 2009). Rocha-Azevedo *et al.* (2009), observaram que uma espécie patogênica de *Acanthamoeba* reconhece proteínas da matriz extracelular (MEC), como colágeno I e laminina, de maneira mais eficiente, quando comparadas à espécie não-patogênica. Considerando-se que o padrão de secreção de proteases extracelulares de diferentes isolados de *Acanthamoeba* pode estar associado ao potencial patogênico destas amebas, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de proteases

extracelulares produzidas por isolados ambientais de estojos de lentes de contato e cepas padrão de *Acanthamoeba*.

Materiais e Métodos

Organismos: Neste estudo foram usadas cepas padrão de *Acanthamoeba* patogênicas, ATCC 30461, e não-patogênicas, ATCC 30010 e 30872 e isolados ambientais pré-existent no Laboratório de Parasitologia – UFRGS, provenientes de estojos de lentes de contato. Todas as amostras foram avaliadas a partir de um cultivo axênico e monoclonal.

Cultivo e Obtenção do Meio Condicionado (MC): Os organismos foram cultivados em meio PYG (proteose peptona, extrato de levedura e glicose) contendo antibiótico penicilina-estreptomicina na concentração de 40 µL/mL e mantidos em estufa a 30 °C, por 72 horas. Após este período o MC foi centrifugado a 250 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,22 µm e estocado a 4°C. As amostras foram liofilizadas e posteriormente ressuspensas em tampão fostato, pH 7,0.

Perfil de Atividade proteolítica – Zimograma: Os MC liofilizados de diferentes isolados foram misturados ao tampão de amostra (1:1) (sem SDS ou β-mercaptoetanol) e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%, contendo 2 mg/mL de gelatina. Após a separação, os géis foram incubados em solução de Triton X-100 2,5% (w/v) por 60 minutos, sendo em seguida transferidos para o tampão de desenvolvimento (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, contendo 10 mM de CaCl₂) na temperatura de 37°C por 18 horas. Após esse período, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue*. As áreas de digestão foram visualizadas como regiões não coradas.

Quantificação de proteínas: As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry.

Resultados e Discussão

A produção de proteases é reconhecida como fator de virulência para diversos protozoários, incluindo *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* (Khan, 2006; Lejeune *et al.*, 2009; Ankarklev *et al.*, 2010). Em *Acanthamoeba* a presença e a quantidade de proteases tem sido relacionadas a sua capacidade invasora, talvez determinantes para o fenótipo virulento apresentado por alguns isolados (Ferreira *et al.*, 2009; Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, de acordo com os resultados dos zimogramas das amostras (figura 1), pode-se observar que todos os isolados possuem atividade proteolítica (bandas brancas). Os resultados das dosagens de proteínas totais, apresentados na tabela 1, demonstram os altos níveis de proteínas produzidas e secretadas por estes protozoários.

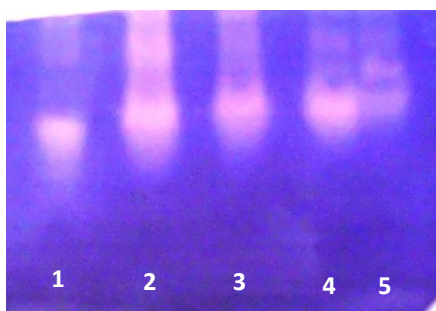


Figura 1. Zimograma dos isolados de ECL e cepas padrão de *Acanthamoeba*. 1= ATCC 30461P; 2 = ATCC 30010NP; 3= ATCC 30872NP; 4= ELC32; 5= ELC48

Tabela 1. Proteínas Totais nos isolados de ECL e cepas padrão de *Acanthamoeba*

Isolados	Proteínas Totais (mg/mL)
ATCC 30461 P	47,4
ATCC 30010 NP	61,6
ATCC 30872 NP	42,2
ELC32	52,6
ELC48	51,4

*ECL = estojos de lentes de contato; P= patogênica; NP= não-patogênica

Muitos estudos têm conseguido isolar e caracterizar proteases extracelulares de espécies variadas de *Acanthamoeba*, como determinado por Na *et al* (2001) que isolaram e caracterizaram uma serino-protease de 12 kDa de *A. castellanii*, capaz de degradar proteínas da MEC, entre outras proteínas da córnea de coelho. Em outro trabalho, também estudando *A. castellanii* foi isolada uma protease de 133 kDa, capaz de lisar células do epitélio corneano humano e de roedores (Hurt *et al*, 2003). Entretanto nenhum estudo buscou a comparação entre diversos isolados em relação às proteases produzidas, o que poderia possibilitar a descoberta de um possível marcador de patogenicidade para este gênero.

Conclusão

Os resultados demonstram que os isolados estudados produzem proteínas extracelulares e que parte destas possui forte atividade proteolítica. Estudos complementares fornecerão melhores dados sobre a caracterização destas proteases e suas funções.

Apoio

CNPq

Referências

- ANKARKLEV J, JERLSTRÖM-HULTQVIST J, RINGQVIST E, TROELL K, SVÄRD SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Nat Rev Microbiol* 8: 413-22, 2010.
- AWWAD, S. T.; PETROLL, W. M.; McCULLEY, J. P.; CAVANAGH, H. D. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. *Eye Contact Lens*. 33:1-8, 2007.
- CARLESSO, A. M.; ARTUSO, G. L.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. *Curr Microbiol*. v. 60: 185-190, 2010.
- CAUMO, K.; A. P. FRASSON, C. J. PENS, L. F. PANATIERI, A. P. G. RAZZON; M. B. ROTT. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. v. 103 (6): 477-485, 2009.
- FERREIRA, G. A.; MAGLIANO, A. C. M.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C. Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga*. *Acta Tropica*. v. 112: 156-163, 2009.
- HE, Y.; NIEDERKORN, J. Y.; McCULLEY, J. P.; STEWART, G. L.; MEYER, D. R.; SILVANY, R.; DOUGHERTY, J. In Vivo and In Vitro Collagenolytic Activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. v. 31 (11), 1990.
- HURT, M.; NIEDERKORN, J.; ALIZADEH, H. Effects of Mannose on *Acanthamoeba castellanii* Proliferation and Cytolytic Ability to Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. v. 44 (8), 2003.
- KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. Federation of European Microbiological Societies. *Microbiological Review*. v. 30: 564-595, 2006.
- LEJEUNE M, RYBICKA JM, CHADEE K. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol* 4: 105-18, 2009.
- NA, B-K.; KIM, J-C.; SONG, C-Y. Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii* *Microbial Pathogenesis*. v. 30: 39-48, 2001.
- ROCHA-AZEVEDO, B.; JAMERSON, M.; CABRAL, G. A.; SILVA-FILHO, F. C.; MARCIANO-CABRAL, F. *Acanthamoeba* Interaction with Extracellular Matrix Glycoproteins: Biological and Biochemical Characterization and Role in Cytotoxicity and Invasiveness. *J. Eukaryot. Microbiol*. 56(3): 270-278, 2009.
- VISVESVARA, G.S. & SCHUSTER, F.L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*. 30 (20), 2008.

VERIFICAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Duddingtonia flagrans* A FUNGICIDAS, PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Deise Luiza Mahl¹; Francielli Pantella Kunz de Jesus²; Maria Isabel de Azevedo²; Cláudia Lautert³; Sydney Hartz Alves⁴; Janio Morais Santurio⁴

¹Estudante do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM; E-mail: dizlm@hotmail.com; ²Estudantes do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM; ³Estudante do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS; ⁴Professores do Grupo de Pesquisa Micologia Médica e Veterinária da UFSM.

Resumo - As helmintoses gastrointestinais em ruminantes, geram diversos prejuízos à pecuária mundial. O fungo *Duddingtonia flagrans* é um agente de controle biológico que tem mostrado resultados satisfatórios na diminuição das larvas infectantes. Resíduos de pesticidas podem se depositar no solo e água, interferindo no desenvolvimento destes microrganismos. Este teve por objetivo avaliar a susceptibilidade de *D. flagrans*, frente a resíduos de fungicidas agrícolas, pela técnica de microdiluição em caldo (protocolo M38-A2), a partir das concentrações permitidas como limites máximos de resíduos (LMR). Os fungicidas Tebuconazol e Tiabendazol apresentaram concentrações inibitórias mínimas menores do que as permitidas como resíduos.

Palavras-chave: *Duddingtonia flagrans*; Microdiluição em caldo; Ruminantes

Introdução

A infecção por nematódeos gastrintestinais é um significativo limitante à criação de ruminantes mundialmente. Os prejuízos se devem especialmente a infecções subclínicas, levando à diminuição e ao retardo na produção (FORBES et al., 2002). A associação de métodos alternativos com a utilização correta dos anti-helmínticos, diminuindo a frequência de tratamentos no controle das infecções, são opções utilizadas frente ao desenvolvimento de resistência parasitária. Fungos nematófagos são agentes utilizados neste controle e *Duddingtonia flagrans* é a espécie mais estudada (CEZAR et al., 2008).

Os efeitos ambientais de um pesticida dependem da sua ecotoxicidade e concentrações atingidas no solo, água, plantas e atmosfera (SPADOTTO et al., 2004). Os alimentos, ficam sujeitos a um limite máximo de resíduos de pesticidas (LMR) na sua composição, de forma a proteger os consumidores (ANVISA, 2008). Ignoffo et al. (1975) observaram que diversos fungicidas e alguns inseticidas e herbicidas, testados em meio de cultura, inibiram o crescimento de fungos entomopatogênicos. Frente a *D. flagrans*, já foi demonstrada atividade inibitória *in vitro* de fungicidas benzimidazóis (LUZ et al., 2007). O objetivo deste estudo foi verificar a susceptibilidade de *D. flagrans* a resíduos de fungicidas agrícolas através de microdiluição em caldo.

Materiais e Métodos

Foram utilizados isolados de *D. flagrans*, cepa ARSEF, mantidos em ágar batata a 25°C/sete dias. Os fungicidas, testados em triplicata, foram: Ciproconazol, Difenconazol, Tebuconazol, Tiabendazol e Carbendazim, adquiridos da empresa Sigma Alrich. Utilizou-se o método de microdiluição em caldo RPMI 1640, adaptado para *D. flagrans*. Tendo os LMRs

preconizado pela ANVISA (2008) como as concentrações centrais, foram feitas dez diluições sucessivas de acordo com o protocolo M - 38 A2 (CLSI, 2008).

O inóculo foi preparado adicionando às colônias de sete dias, 3ml de solução salina estéril (85%) e a suspensão obtida através de movimentos com pipeta de Pasteur. A suspensão de conídios foi transferida para um novo tubo, mantida em repouso por cinco minutos, ajustada a densidade para 68 – 70% de transmitância em 530 nm em espectrofotômetro e diluído em RPMI 1640 para se obter 10^4 UFC/ml.

Alíquotas de cada concentração de fungicidas foram diluídas 1:5 em RPMI 1640 e 100µl dessas concentrações foram dispensadas sequencialmente nas placas de microdiluição. O inóculo foi então dispensado nos tubos, provendo concentrações fungicidas em estudo. As CIMs foram determinadas após 48h.

Resultados e discussão

A espectrofotometria é a metodologia com melhor reprodutibilidade para o teste de susceptibilidade a antifúngicos (PFALLER et al., 1988). A padronização do teste de susceptibilidade a antifúngicos pelo atual CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute), ocorreu após 15 anos de trabalhos colaborativos. Em 2008, foi publicado o documento M38-A2, que padroniza os ensaios microbiológicos para avaliação da suscetibilidade de hifomicetos, incluindo os gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* (CLSI, 2008). Nesta classe encontra-se o gênero *Duddingtonia*. A partir desta padronização, é possível a determinação das concentrações inibitórias mínimas dos antifúngicos testados.

As concentrações inibitórias mínimas de cada fungicida testado estão listadas na Tabela 1. A partir destes dados verificou-se que Tebuconazol e Cyproconazol tiveram concentrações inibitórias inferiores as permitidas como LMRs.

Tabela 1: Fungicidas testados e respectivas concentrações inibitórias mínimas a *D. flagrans*

Fungicida	Concentração Inibitória Mínima
Difenoconazol	0,1ug/ml
Tebuconazol	0,0125ug/ml
Carbendazim	4ug/ml
Tiabendazol	1,6ug/ml
Cyproconazol	0,025ug/ml
Triadimenol	0,8ug/ml

Vários compostos do grupo dos benzimidazóis são utilizados nos tratamentos antihelmínticos de ruminantes, sendo alguns deles também utilizados como fungicidas na agricultura, como o tiabendazol (HORSFALL, 1956). Embora os métodos *in vitro* não representem as reais condições a campo, este estudo demonstrou que estes fármacos têm ação inibitória a *D. flagrans*, sendo necessária precaução quando da utilização de fungicidas em conjunto com agentes de controle biológico, principalmente se tratando de Tebuconazol e Cyproconazol, cujas concentrações inibitórias foram menores do que os resíduos permitidos pela ANVISA (2008).

Conclusões

Os fungicidas Tebuconazol e Cyproconazol inibem *D. flagrans*, *in vitro*, em concentrações menores do que as permitidas como resíduos agrícolas e deve-se ter cautela na utilização do agente quando se faz uso destes compostos.

Apoio

Universidade Federal de Santa Maria

Referências

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: monografia de produtos agrotóxicos. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>

Acesso em: 01 jun., 2010.

CEZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.2083-2091, 2008.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standart. **Approved Guideline M38 – A2**, 2008.

FORBES, A.B. et al. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season. **Veterinary Parasitology**, v.104, p.339-344, 2002.

HORSFALL, J. G. Principles of Fungicidal Action. **Chronica Botanica Co.**, v. 279, 1956

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; GARCIA, C.; PINNELL, R.R. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomurae rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. **Environmental Entomology**, v. 4, p.765-768, 1975

LUZ, C.; NETTO, M.C.B.; ROCHA, L. F. N. In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi. **Mycopathologia**, v.164, p.39-47, 2007.

PFALLER, M.A.; BUSCHELMAN, B.; BALE, M.J., et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 1437-1441, 1988.

SPADOTTO, et al., Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2004 (Embrapa Meio Ambiente Documentos, 42). P. 29.

5. Microbiologia dos Alimentos

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA “*in vitro*” DE AÇAFRÃO-DA-TERRA (*Curcuma longa* L.)

Marcelo Pinto Paim¹; Mônica Jachetti Maciel²; Heloisa Helena Chaves Carvalho³; José Maria Wiest⁴

¹Estudante do Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; E-mail: marcelloppaim@yahoo.com.br; ²Estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; E-mail: monicajm@univates.br; ³Participante do Grupo de Pesquisa Alimentos de Origem Animal; E-mail: hncarvalho@terra.com.br; ⁴Professor do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFRGS) e líder do Grupo de Pesquisa Alimentos de Origem Animal; E-mail: jmwiest@ufrgs.br

Resumo - O objetivo principal deste trabalho foi fundamentar a utilização de recursos naturais renováveis (plantas), verificando a possível atividade antibacteriana de extratos de diferentes estruturas de Açafrão-da-terra (*Curcuma longa* L.). *In vitro*, determinou-se a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB), através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos, utilizando bactérias Padrões da American Type Culture Collection (ATCC), *Escherichia coli* (11229), *Staphylococcus aureus* (25923) e *Salmonella enteritidis* (11076) de interesse em segurança dos alimentos. Os resultados indicam que existe uma atividade bacteriostática frente os diferentes inóculos testados e bactericida principalmente para *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: segurança dos alimentos; atividade antibacteriana; Açafrão-da-terra.

Introdução

No sistema de produção de alimentos, é crucial que sejam tomadas medidas que venham a promover a segurança dos alimentos dos produtos durante o desenrolar de sua vida de prateleira, alimentos com uma grande carga de conservantes são utilizados para manter a sua integridade perante os microrganismos. Alguns preservativos químicos são suspeitos ou são tóxicos e há um aumento da pressão sobre as indústrias alimentícias para remoção destes produtos químicos, e conseqüente adoção de alternativas naturais para obtenção de seus propósitos (Forsythe, 2002).

O Açafrão-da-terra (*Curcuma longa* L.) tem cheiro forte, agradável, sabor aromático e picante. O seu uso é milenar na medicina tradicional da Índia e da China. No Brasil estes rizomas vêm sendo utilizados como tempero de alimentos (Lorenzi e Matos, 2008). Devido ao seu potencial como *pigmento natural*, e por conter óleos essenciais com qualidades técnicas e organolépticas, é utilizado pelos mercados de perfumaria, medicinal, alimentício (condimentar) e têxtil, abrindo novas perspectivas para a agroindústria brasileira (Lorenzi e Matos, 2002).

Este trabalho teve como objetivo principal fundamentar a utilização de recursos naturais renováveis (plantas), verificando a possível atividade antibacteriana de extratos de diferentes estruturas Açafrão-da-terra (*Curcuma longa* L.) sobre bactérias de interesse em segurança dos alimentos.

Materiais e Métodos

O Açafrão-da-terra foi colhido na região metropolitana de Porto Alegre/RS em uma propriedade agro familiar, sendo que, as estruturas planta foram separadas em folhas frescas e raízes

(rizomas frescos), estas foram picadas grosseiramente. O Pó de raiz seco foi adquirido em mercado varejista de Porto Alegre/RS. Todas as estruturas foram deixadas em maceração alcoólica e hidroalcoólica. Após tempo de contato adequado, os extratos foram submetidos à destilação fracionada sob pressão reduzida em sistema de rota vapor, desprezando-se a porção alcoólica e reidratando-os com água destilada estéril, reconstituindo-se na proporção inicial segundo Farmacopéia (1959) e Avancini e Wiest (2008). Estes extratos reconstituídos foram denominados de soluções conservantes ou antibacterianas.

Para a avaliação antibacteriana, foram utilizados inóculos padrões de *Escherichia coli* (ATCC 11229), de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e de *Salmonella enteritidis* (ATCC 11076) reativados em caldo BHI (Brain-Hearth Infusion Broth - Acumedia - Michigan, EUA) da coleção da bacterioteca do Laboratório de Higiene do ICTA/UFRGS, devendo atingir no mínimo $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC/mL para confrontação com as diferentes soluções conservantes através de diluições seriais logarítmicas (Avancini, 2002). A atividade do extrato foi lida como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e foram realizadas através do Teste de Diluição segundo (DVG, 1981) baseado na técnica do sistema de tubos múltiplos, modificada por Avancini (2002). Entendeu-se por IINIB/bacteriostasia, o resultado do confronto da bactéria com o extrato, em agar BHI (Brain Hearth Infusion) e por IINAB/bactericidia, o mesmo resultado, porém sob a influência de desinibidores bacterianos (desestressantes) como Tween 80, L-histidina e lecitina de soja, acrescidos ao mesmo BHI (Carvalho *et al.*, 2010).

Resultados e Discussão

Os resultados das atividades antibacterianas de inibição e inativação foram representados por variáveis arbitrárias, representados nos gráficos 1 e 2, que assumiram valores de 1 a 12, indicando a intensidade destas atividades. Assim a variável zero indicou a ausência de atividade antibacteriana dos diferentes extratos vegetais em todas as concentrações dos inóculos das diferentes bactérias e 12 indicou o máximo de atividade na maior concentração bacteriana, como pode ser observado nas figuras abaixo:

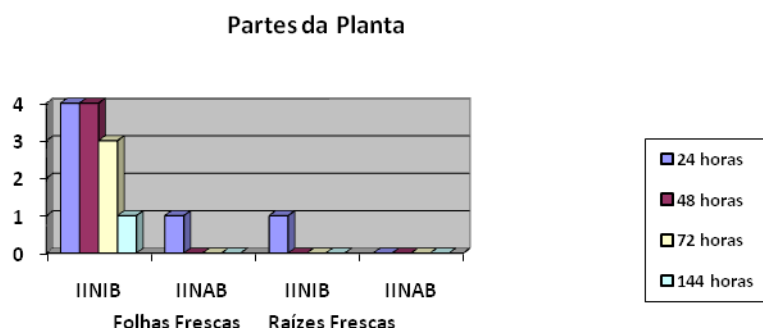


Figura 1 - Valores ordinais arbitrários da Intensidade de atividade de inibição = IINIB (bacteriostasia) e da Intensidade de atividade de inativação = IINAB (bacteriocidia) de folhas e raízes frescas de Açafraão-da-terra (*Curcuma longa* L.) sobre *Escherichia coli* (ATCC 11229), em diferentes tempos de confronto.

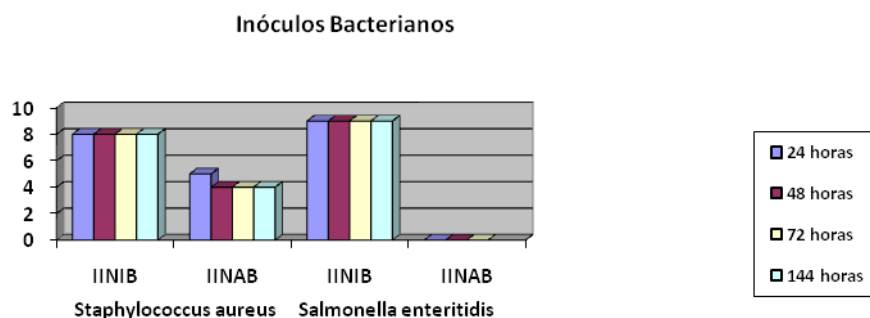


Figura 2 - Valores ordinais arbitrários da Intensidade de atividade de inibição = IINIB (bacteriostasia) e da Intensidade de atividade de inativação = IINAB (bacteriocidia) de raiz seca em pó de Açafraão-da-terra (*Curcuma longa* L.) sobre bactérias padrões de interesse em alimentos, em diferentes tempos de confronto.

Na figura 1 pode-se observar a pouca atividade dos extratos das estruturas frescas da planta em questão sobre *Escherichia coli*. Aparentemente os resultados foram significativos nas primeiras 48 horas em IINIB, mostrando possível resistência da bactéria à medida que o tempo de confronto se estendeu.

Os extratos indicaram uma atividade de bacteriostática frente aos diferentes inóculos testados, sendo que a bactéria mais sensível para bacteriostasia foi *Salmonella enteritidis*. Nota-se na figura 2 que o valor 9 (IINIB), indicou que a planta mostrou-se eficaz em relação a uma possível inibição (parada de multiplicação) até 10^5 UFC/ml e o valor 0 (zero) (IINAB) demonstrou que a planta não possui nenhuma atividade bactericida para a mesma bactéria. A mesma figura 2 demonstra que para o *Staphylococcus aureus* os valores apresentam-se relativamente altos para bacteriostasia, no entanto verifica-se que houve certa bacteriocidia (valor 4).

Observa-se que o extrato de planta verde/folhas apresentaram uma maior atividade antibacteriana quando comparada com as raízes. O extrato de planta desidratada (seca) manteve a sua atividade antibacteriana, não perdendo seus princípios ativos durante o processo de secagem.

Para os diferentes extratos de Açafraão-da-terra, o efeito antibacteriano diferiu quanto à adição ou não dos desinibidores e em relação aos horários e ação.

Conclusões

Os resultados parciais demonstraram as boas perspectivas do uso desta planta medicinal, condimentar e aromática. Assim, procura-se estabelecer a utilização de novos antimicrobianos naturais, contribuindo para segurança dos alimentos nas diferentes fases de obtenção do alimento.

Referências

- AVANCINI, C.A.M. *Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de Hypericum caprifoliatum Cham. e Schlecht. - Hypericaceae (Guttiferae) - ("escadinha", "sinapismo") para uso como desinfetante e antisséptico*. 2002. 309f. Tese (Doutor em Ciência Veterinária), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
- AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. E *shlecht. - Guttiferae (escadinha/sinapismo)* frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Bras. Pl.Med.*, Botucatu, v.10, n.1, p.64-69, 2008.
- CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M.; CRUZ, F. T. Atividade antibacteriana in vitro de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxigenas alimentares. *Rev. Bras. Pl. Med.*; v.12, n.1, p.8-12, 2010.
- DVG (*Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft*). *Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin. (Normas para o teste de desinfetantes químicos para a medicina veterinária)*. Giessen, 980. In: SCHLIESSER, Th.; STRAUCH, D. *Desinfektion in*

Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. (Desinfecção aplicada à Produção Animal, a Frigoríficos e Laticínios). Stuttgart: Enke Verlag, p.455, 1981.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo: Siqueira, p.532, 1959.

FORSYTHE, S. J., *Microbiologia da Segurança Alimentar.* Porto Alegre: Arthmed, p.13, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas,* Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.541, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.* Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, São Paulo, v. 1, p.544, 2002.

ATIVIDADE ANTI-SALMONELLA DE DIFERENTES PARTES DE *HIBISCUS SABDARIFFA* L.

Marcelo Pinto Paim¹; Mônica Jachetti Maciel²; José Maria Wiest³; Heloisa Helena Chaves Carvalho⁴

¹Estudante do Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; E-mail: marceloppaim@yahoo.com.br; ²Estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; E-mail: monicajm@univates.br; ³Professor do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFRGS) e líder do Grupo de Pesquisa Alimentos de Origem Animal; E-mail: jmwiest@ufrgs.br; ⁴Participante do Grupo de Pesquisa Alimentos de Origem Animal; E-mail: hrcarvalho@terra.com.br

Resumo - Atualmente os consumidores têm se preocupado em consumir alimentos naturais e menos processados. O uso de conservantes químicos artificiais pode ser prejudicial à saúde. Os conservantes químicos naturais podem ser utilizados como antibacterianos em alimentos, como o hibisco. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade bacteriostática/inibição e bactericida/inativação “*in vitro*” do extrato de sépalas e das cápsulas deiscetes por maceração alcoólica de *Hibiscus sabdariffa* L. frente ao microrganismo padrão *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076). O método utilizado foi o de diluição em sistema de tubos múltiplos. O extrato de sépalas mostrou-se mais eficiente do que o extrato de cápsulas deiscetes, frente a *Salmonella* Enteritidis.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa* L.; atividade anti-*Salmonella*; *Salmonella* Enteritidis.

Introdução

Os condimentos, as especiarias e as plantas medicinais podem aumentar a vida útil dos alimentos através da sua atividade bacteriostática e bactericida (SOUZA, 2003).

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) é um alimento funcional nos países da Ásia (LIU *et al.*, 2005). O interesse econômico está nos seus cálices desidratados para a produção de bebida, alimento, conservante e corante (D' HEUREX- CALIX & BADRIE, 2004). A atividade antibacteriana do hibisco pode ser comparada a da Estreptomicina. As sementes (cápsula deiscete) são trituradas para a alimentação humana e quando torradas, substituem o café (MORTON, *apud* ESA *et al.*, 2010).

As infecções provocadas pelas *Salmonella* são universalmente consideradas como as mais importantes causas de doenças transmitidas por alimentos (GERMANO & GERMANO, 2003).

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade bacteriostática/inibição e bactericida/inativação “*in vitro*” do extrato de sépalas e das cápsulas deiscetes por maceração alcoólica de *Hibiscus sabdariffa* L. frente ao microrganismo padrão *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076).

Materiais e Métodos

As sépalas e as cápsulas deiscetes do *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco) foram coletadas no município de Porto Alegre/RS. A obtenção das soluções conservantes ou antimicrobianas alcoólicas foram baseadas segundo Avancini & Wiest (2008).

Utilizou-se a amostra de inóculo padrão *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) para a avaliação da atividade antibacteriana (IINIB/bacteriostasia e IINAB/bactericidia) das diferentes partes de *Hibiscus sabdariffa* L. Os inóculos foram ativados em meio de cultura BHI à 37 °C por um período de 18 a 24 horas de incubação aeróbia, com o objetivo de atingir uma concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC/mL para confrontação com o extrato alcoólico de cápsulas deiscidas e sépalas de *Hibiscus sabdariffa* L.

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos de hibisco, utilizou-se o Teste de Diluição segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (DVG, 1981), modificada por Wiest *et al.* (2009). O valor final considerado constituiu-se da média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza (1974).

IINIB/bacteriostasia é o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio específico, e por IINAB/bactericidia, o mesmo resultado, porém sob a influência dos desinibidores bacterianos acrescidos ao BHI (WIEST *et al.*, 2009). Os resultados de IINIB e IINAB foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, com valores de 12 a 0, o valor de 12 (doze) representa atividade máxima e 0 (zero) a não-atividade. A avaliação dos resultados obtidos nas variáveis de IINIB e IINAB foi verificada através da Análise de Variância (ANOVA) num nível de significância de 5% ($p < 0,05$), através do programa Excel/Windows 2007.

Resultados e Discussão

A solução conservante de sépalas de hibisco frente a *Salmonella* Enteritidis mostrou intensa inibição (IINIB) e inativação (IINAB) (Tabela 1). Houve inibição e inativação mesmo após 144h de exposição do inóculo à solução conservante. Os resultados de IINIB e IINAB foram excelentes, pois além do estado de latência houve morte microbiana, ou seja, em todas as horas o extrato permaneceu com o efeito antibacteriano ($p=0,78$).

Tabela 1- Intensidade de Inibição e Inativação do extrato alcoólico das sépalas de *Hibiscus sabdariffa* L., sobre *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076)

Extrato alcoólico de Sépalas <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.						
	IINIB			IINAB		
Tempo	1ª análise	2ª análise	Média	1ª análise	2ª análise	Média
24h	12	12	12	9	11	10
48h	12	12	12	12	11	11,5
72h	12	12	12	12	11	11,5
144h	12	10	11	12	12	12

12 a 1=variáveis ordinais arbitrárias que representam a Intensidade de Inibição/latência (IINIB) ou Inativação/morte (IINAB). 0= não houve atividade.

Observando as Tabelas 1 e 2, em relação aos números arbitrários, ambas diferem notoriamente. As cápsulas deiscidas do hibisco apresentaram baixa atividade antibacteriana se comparado às sépalas, fato que também pode ser examinado na Figura 1. O extrato, tanto nas 144h do IINIB e do IINAB, parou de inibir/inativar as *Salmonellas* (Tabela 2).

Tabela 2- Intensidade de Inibição e Inativação do extrato alcoólico das cápsulas deiscidas de *Hibiscus sabdariffa* L., sobre *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076)

Extrato alcoólico de Cápsulas deiscidas <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.						
	IINIB			IINAB		
Tempo	1ª análise	2ª análise	Média	1ª análise	2ª análise	Média
24h	4	5	4,5	6	3	4,5
48h	2	1	1,5	8	0	4
72h	2	0	1	3	0	1,5
144h	0	0	0	0	0	0

12 a 1=variáveis ordinais arbitrárias que representam a Intensidade de Inibição/latência (IINIB) ou Inativação/morte (IINAB). 0= não houve atividade.

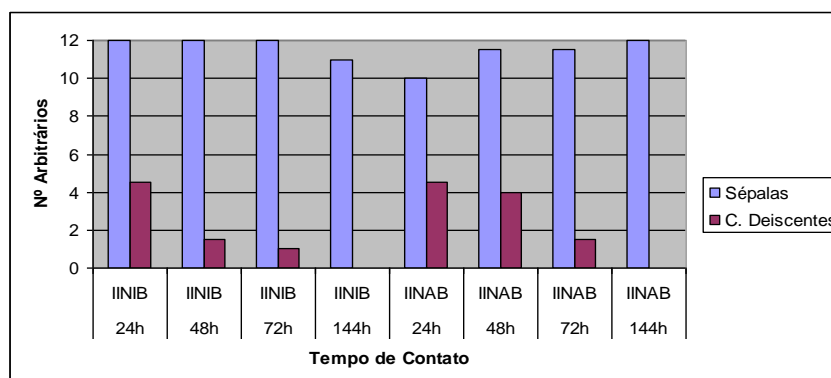


Figura 1 – Média da Intensidade de Inibição e Inativação do extrato alcoólico das sépalas e das cápsulas deiscuentes de hibisco, sobre *Salmonella* Enteritidis

Um dos fatores determinantes para a atividade antimicrobiana eficiente da sépala pode ser em razão da quantidade elevada de antocianinas existentes, o que não acontece com as cápsulas deiscuentes.

Conclusões

O extrato de sépalas do hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) demonstrou atividade antimicrobiana excelente frente a *Salmonella* Enteritidis, fato que se confirmou com o tempo de ação, inibição e inativação. O extrato das cápsulas deiscuentes não apresentou atividade antimicrobiana satisfatória.

Referências

- AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. E Schlecht. - Guttiferae (“escadinha/sinapismo”) frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Botucatu v. 10, n. 1, p. 64-69, 2008.
- CAVALLI-SFORZA, L. Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistik (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica). Stuttgart: Gustav Fisher V. p.201-204. 1974.
- D’ HEUREX- CALIX, F. & BADRIE, N. Consumer acceptance and physicochemical quality of processed red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sauces from enzymatic extracted calyces. *Food Serv Technol* 4:141–8, 2004.
- ESA, N.M., et al. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry* doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.074, 2010.
- DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft). Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin. (Normas para o teste de desinfetantes químicos para a medicina veterinária). Giessen, 1980. In: SCHLIESSER, Th.; STRAUCH, D. Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. (Desinfecção aplicada à Produção Animal, a Frigoríficos e Laticínios). Stuttgart: Enke Verlag, p.455, 1981.
- GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 2 ed. São Paulo: Manole, p. 234, 235, 236 e 237, 2003.
- LIU, K. S., TSAO, S. M. & YIN, M. C. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytother Res.*;19:942–945, 2005.
- SOUZA, E.L. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. *Revista Higiene Alimentar*, v.17, n.113, p.38- 42, 2003.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NA REGIÃO EXTREMO OESTE DE SANTA CATARINA

Diane Scapin¹; Mônica Lourdes Rosanelli²; Eliandra Mirlei Rossi³

¹Bióloga, Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. dianescapin2005@yahoo.com.br; ²Estudante do Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. monylrosanelli@hotmail.com; ³Bióloga, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente-UFRGS, Professora do Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. eliandra_bio@yahoo.com.br

Resumo - Atualmente o consumo e a comercialização dos alimentos artesanais têm aumentado constantemente por serem vistos como mais saborosos e naturais. Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de produtos produzidos e comercializados pelas agroindústrias do extremo oeste catarinense. Foram coletadas 44 amostras (10 de salame, 5 de linguiçinha, 5 de banha, 4 de torresmo, 1 de presunto, 1 de bacon, 2 de copa, 3 de morcela branca, 2 de queijo colonial, 2 de leite pasteurizado, 1 de manteiga, 1 de nata, 1 de doce de leite, 1 de requeijão, 1 de miúdos de frango, 1 de cortes congelados de frango e 2 amostras de peixes (filé e carpa) provenientes das agroindústrias. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração e conduzidas ao Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico de Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, para análise. As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a recomendação e exigência da RDC 12 de janeiro de 2001. A metodologia para efetuar as análises microbiológicas foi de acordo com a Instrução Normativa Nº 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Das 44 amostras analisadas, 6 (13,6%) estavam impróprias para o consumo. Destas, apenas duas (33,33%) estavam contaminadas somente por coliformes termotolerantes, duas (33,33%) por coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva e duas (33,33%) por *Staphylococcus* coagulase positiva. Os demais alimentos analisados estavam dentro dos padrões permissíveis. Não foram encontradas contaminações por *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, e *Clostridium* sulfíto redutor em nenhuma das amostras analisadas.

Palavras-chave: *Staphylococcus* coagulase positiva; agroindústrias; coliformes termotolerantes.

Introdução

Alimentos contaminados são uma das principais preocupações de saúde pública (WHO, 2007), podendo ser uma das maiores causas de doenças e mortes (SARTER; SARTER; GILABERT, 2010). Apesar dos esforços para a sua prevenção, as doenças transmitidas por alimentos (DTA) continuam sendo um evento muito frequente, podendo apresentar elevada gravidade para um grande número de pessoas, no Brasil e no mundo (HAVELAAR et al., 2009; SVS, 2005).

A substituição de produtos industrializados pelos coloniais tem aumentado nos últimos anos, pois estes são considerados pela população em geral como, mais saborosos e “naturais” que os industrializados, porém geralmente não possuem controle microbiológico e podem ser um veículo frequente de patógenos por serem, na maioria das vezes, bastante manipulados e elaborados sem tratamento térmico adequado.

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos artesanais produzidos pelas agroindústrias e comercializados NA região do extremo oeste catarinense, uma vez que esses alimentos são amplamente consumidos pela população.

Materiais e métodos

Foram coletadas 44 amostras de alimentos produzidos pelas agroindústrias da região extremo oeste de Santa Catarina. Nas agroindústrias foram adquiridos no mínimo 200 g ou mL de cada um dos produtos, de acordo com a disponibilidade no momento da coleta. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração e conduzidas ao Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico de Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, para análise.

Do total de amostras coletadas, 10 eram de salame, 5 de linguiçinha, 5 de banha, 4 de torresmo, 1 de presunto, 1 de bacon, 2 de copa, 3 de morcela branca, 2 de queijo colonial, 2 de leite pasteurizado, 1 de manteiga, 1 de nata, 1 de doce de leite, 1 de requeijão, 1 de miúdos de frango, 1 de cortes congelados de frango e 2 amostras de peixes (filé e carpa).

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a recomendação e exigências da RDC 12 de janeiro de 2001, uma vez que são variáveis para cada alimento comercializado. A metodologia para efetuar as análises microbiológicas foi de acordo com a proposta pela Instrução Normativa Nº 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Resultados e Discussão

Das 44 amostras analisadas, 6 (13,6%) estavam impróprias para o consumo, conforme os padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC/12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Destas, apenas duas (33,33%) estavam contaminadas por coliformes termotolerantes, duas (33,33%) por coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva e duas (33,33%) por *Staphylococcus* coagulase positiva.(Tabela 1).

As amostras de banha, presunto, torresmo, linguiçinha, copa, miúdos e cortes de frango, peixes (filé e carpa), leite pasteurizado, manteiga, doce de leite e requeijão estavam dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC/12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Além disso, destacam-se que não foram encontradas contaminações por *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, e *Clostridium* sulfito redutor em nenhuma das amostras analisadas.

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por Salvatori, Bessa, Cardoso (2003), que do total de 93 amostras de embutidos artesanais avaliados, nenhuma das amostras apresentou *Salmonella* sp, porém 5 amostras estavam em condições sanitárias insatisfatórias para coliformes termotolerantes.

Diferentemente dos nossos resultados, Rohden et al. (2005), em pesquisa realizada com salames coloniais coletadas, no comércio local da mesma região deste estudo, demonstraram que de 24 amostras analisadas, 21 estavam fora dos padrões permitidos pela legislação para *Staphylococcus aureus*, com média de $6,7 \times 10^7$ UFC/g.

As contagens elevadas de coliformes termotolerantes indicam um processamento inadequado e ou/ recontaminação pós processamento, sendo as causas mais frequentes aquelas provenientes da matéria-prima, equipamento contaminado ou manipulação sem cuidados de higiene. (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Tabela 1: Resultados encontrados para as amostras consideradas como impróprias para o consumo.

Alimento Analisado	Resultado	Padrões permissíveis
Salame 1	Coliformes termotolerantes: $1,9 \times 10^4$ UFC/g <i>Salmonella</i> sp.: Ausência em 25g <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva: $<1 \times 10^2$ UFC/g	10^3 UFC/g Ausência em 25g 5×10^3 UFC/g
Salame 2	Coliformes termotolerantes: $3,6 \times 10^3$ UFC/g <i>Salmonella</i> sp.: Ausência em 25g <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva: $<1 \times 10^2$ UFC/g	10^3 UFC/g Ausência em 25g 5×10^3 UFC/g
Bacon	<i>Salmonella</i> sp.: Ausência em 25g <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva: $1,4 \times 10^4$ UFC/g	Ausência em 25g 3×10^3 UFC/g
Morceia branca	Coliformes termotolerantes: 30 UFC/g <i>Salmonella</i> sp.: Ausência em 25g <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva: $3,5 \times 10^3$ UFC/g <i>Clostridium</i> sulfito redutor: $<1 \times 10^1$ UFC/g	10^3 UFC/g Ausência em 25g 3×10^3 UFC/g 5×10^2 UFC/g
Queijo colonial	Coliformes termotolerantes: $5,8 \times 10^6$ UFC/g <i>Salmonella</i> sp.: Ausência em 25g <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva: $1,5 \times 10^3$ UFC/g <i>Listeria monocytogenes</i> : Ausência em 25g	10^3 UFC/g Ausência em 25g 10^3 UFC/g Ausência em 25g
Creme de leite pasteurizado	Coliformes termotolerantes: NMP > 110/g <i>Salmonella</i> sp.: Ausência em 25g <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva: 550 UFC/g	NMP 10/g Ausência em 25g 10^2 UFC/g

Conclusões

Os resultados permitem concluir que apesar de apenas 13,6% das amostras avaliadas serem consideradas como impróprias para o consumo, elas apresentaram elevadas contagens de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, o que demonstra a falta de um controle mais efetivo das matérias-primas, dos manipuladores, bem como do processamento do produto até a fase final, pois esses resultados indicam condições higiênico-sanitárias deficientes no processo de produção destes alimentos.

Apoio

Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC.

Referências

- BRASIL, Instrução Normativa n°. 62 de 26/08/2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF. **Diário Oficial da União**, 18/09/2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°12, de 02/01/2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10/01/2001. Seção 1, p. 45-53.
- FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.
- HAVELAAR, A. H et al. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 79-94, 2009.
- RHODEN, F. et al. . *Staphylococcus aureus*: Presença e implicações em salames coloniais. **In: IV Simpósio de Alimentos para a Região Sul**, 2005, Passo Fundo, 2005.

SALVATORI, R. U.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. R. I. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto alegre, RS. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 771, 773, 2003.

SARTER, S.; SARTER. G.; GILABERT, P. A. Swot analysis of HACCP implementation in Madagascar. **Food Control** . v. 21, p. 253–259, 2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim eletrônico epidemiológico**. n. 6 , 2005. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf>. Acesso em 03 de junho de 2008.

WHO Food safety and foodborne illness. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>> Acesso em: 04 de janeiro de 2007.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* EM PRESUNTOS

Claudir Bazzotti¹; Diane Scapin²; Deomir Mario Gheno³, Débora Oro⁴; Eliandra Mirlei Rossi⁵

¹Biólogo, Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. claudircb@hotmail.com; ²Bióloga, Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. dianescapin2005@yahoo.com.br; ³Estudante do Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. d-mg@hotmail.com; ⁴ Biomédica, Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. debora0007@yahoo.com.br; ⁵Bióloga, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- UFRGS, Professora do Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. eliandra_bio@yahoo.com.br.

Resumo - A intoxicação estafilocócica é uma das doenças mais comuns transmitidas por alimentos (DTA), causada pela ingestão de toxinas pré-formadas no alimento. Desse modo, os sistemas de refrigeração têm sido utilizados para armazenar alimentos, no intuito de controlar o crescimento microbiano. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento de *Staphylococcus aureus* em presuntos sob diferentes temperaturas. Para a avaliação do comportamento do crescimento de *S. aureus* em presuntos foram cortados, em cubos de aproximadamente 10 g no qual foi inoculado 1 mL de *S. aureus* ATCC 25923 (10^6 UFC/mL). As amostras (presunto+ *S. aureus*) foram mantidas nas temperaturas avaliadas (7, 12, 15, 20, 25 °C) e analisadas no momento da inoculação, 01 h, 02 h, 03 h, 04 h, 06 h, 07 h e 24 h após a inoculação. Para contagem de *S. aureus* as amostras após homogeneizadas em 90 mL de água peptonada 0,1% foram semeadas em agar Baird-Parker e incubadas a 36 ± 1 °C por 48 horas. Colônias características foram contadas e confirmadas por coloração de Gram e testes bioquímicos. Os resultados demonstraram que temperaturas maiores como 20°C e 25°C favorecem o crescimento de *S. aureus*, ou seja, após 24 horas a contagem foi de 12 e 9 Log UFC/g respectivamente. Já nas temperaturas de 12 e 7 °C praticamente não houve crescimento, pois após 24 h as contagens foram de 6,49 e 6,07 logUFC/g, respectivamente. Assim, este estudo permite concluir que, baixas temperaturas diminuem a multiplicação celular de *S. aureus*, controlando o crescimento microbiano e consequentemente a produção de toxinas.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; presuntos; temperatura; refrigeração.

Introdução

Staphylococcus aureus é um dos principais causadores de intoxicação em todo o mundo e em muitos países é o principal causador de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (BALABAN, RASOOLY, 2000). Assim, surtos de intoxicação alimentar causado por este microrganismo são frequentemente relatados, pois, havendo no alimento condições favoráveis à sua multiplicação, em poucas horas, certas cepas podem produzir toxina termoestável que é responsável pelo quadro clínico.

Os produtos cárneos, como por exemplo, os presuntos são alimentos comumente expostos a contaminação e constituem um excelente meio para a multiplicação de microrganismos. Dentre as prováveis fontes de contaminação estão as matérias-primas, as tripas ou envoltórios, os temperos ou condimentos, bem como a água utilizada em todas as aplicações de limpeza e manutenção. Além disso, a manipulação desses alimentos também constituiu importante fonte de contaminação, uma vez que os manipuladores são veículos de transmissão de patógenos, como *S. aureus*. (CUNHA NETO, SILVA, STAMFORD, 2002).

O processo de refrigeração controla o crescimento dos microrganismos responsáveis pela deterioração dos produtos, contribui para o controle das infecções e toxinfecções alimentares, em virtude da incapacidade da maioria de seus agentes se proliferarem em temperaturas muito baixas, além de ser um excelente método de conservação de alimentos (MURMANN et al. 2004). Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de *S. aureus*, ATCC 25923, em presuntos armazenados em diferentes temperaturas e avaliados em diferentes tempos.

Materiais e Métodos

Presuntos de marca única, foram adquiridos em supermercados da região extremo-oeste de Santa Catarina e conduzidos ao Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus São Miguel do Oeste-SC.

Para os experimentos os presuntos foram cortados em cubos e 10 g de presunto, inoculado 1 mL de *S. aureus* ATCC 25923 (10^6 UFC/mL). As amostras (presunto+ *S. aureus*) foram mantidas nas temperaturas avaliadas (7, 12, 15, 20, 25 °C) e analisadas no momento da inoculação, 01 h, 02 h, 03 h, 04 h, 06 h, 07 h e 24 h após a inoculação. Como controle negativo foi realizado a pesquisa de *S. aureus* no presunto antes da inoculação do microrganismo.

Para contagem de *S. aureus* foi adicionado 90 mL de água peptonada 0,1% separadamente nas 10g do presunto, previamente inoculado com *S. aureus* e incubado nos tempos e temperaturas citados acima. Em seguida, as amostras foram agitadas por 60 segundos em Stomacher, diluídas e plaqueadas em Agar Baird-Parker e incubadas a 36 ± 1 °C por 48 horas. Colônias características foram contadas e confirmadas por coloração de Gram e testes bioquímicos conforme Instrução Normativa N° 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Resultados e Discussão

Os resultados dos testes sobre o comportamento de crescimento de *S. aureus* em presuntos revelaram que na temperatura de 25 °C a partir de 2 h após a contaminação observa-se aumento no número de *S. aureus*, atingindo 12 logUFC/g após 24 h. Na temperatura de 20°C, nas primeiras horas o crescimento microbiano manteve-se estável, com uma diminuição em 3 h, mas com aumento a partir de 4 h chegando a 9 logUFC/g. Na temperatura de 15 °C verificou-se o crescimento no número de microrganismos foi reduzido, atingindo apenas 6,88 log UFC/g somente após 24 h. Já nas temperaturas de 12 e 7 °C praticamente não houve variações com valores de crescimentos iniciais de 6,86 e 5,91 logUFC/g e valores finais de 6,49 e 6,07 logUFC/g, respectivamente (Figura 1).

Resultados semelhantes foram encontrados por Malheiros et al. (2010), que também observaram que nas primeiras horas não houve crescimento microbiano significativo, mas com altas contagens após 24 horas nas temperaturas mais elevadas. Em todos os resultados do presente trabalho foram observadas quantidades de *S. aureus* consideradas necessárias para

causar surtos de intoxicação alimentar, que fica em torno de 5 a 6 logUFC/g (Su, Wong, 1997).

Além disso, é necessário ressaltar que os resultados mais preocupantes desse estudo, são aqueles das temperaturas mais elevadas (25°C e 20°C) que apresentaram um acentuado crescimento, uma vez que segundo Malheiros et al (2010), células de *S. aureus* podem crescer até 7 °C, mas a produção de enterotoxinas só ocorre na faixa de temperatura entre 10 °C até 46 °C e é necessário que o alimento contenha pelo menos 5 logUFC/g do microrganismo para produzir enterotoxinas suficientes para causar intoxicação alimentar.

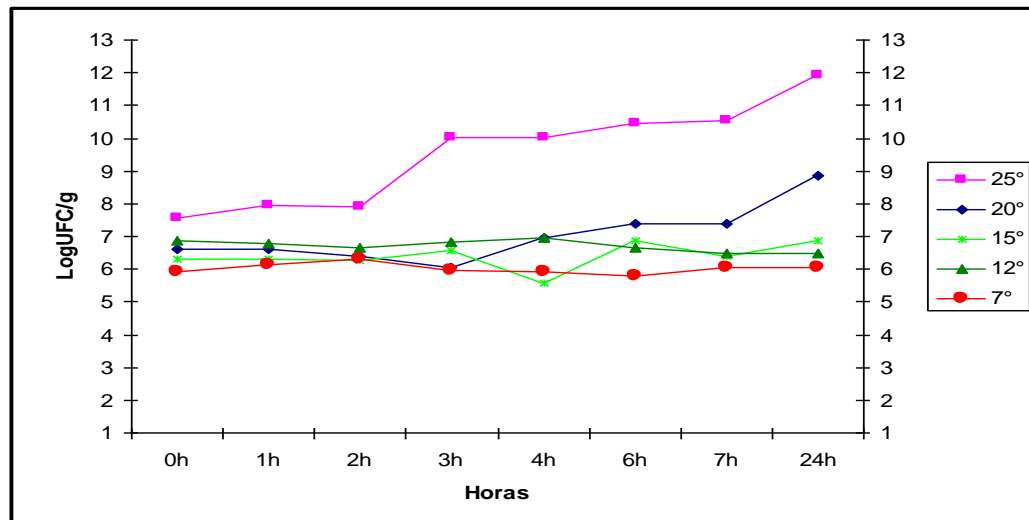


Figura 1: Comportamento de crescimento de *Staphylococcus aureus* em presuntos.
Fonte: O autor, 2009.

Os resultados encontrados para as temperaturas de 7°C e 12°C, foram as que obtiveram melhores resultados no controle do crescimento microbiano, com pequenas variações no crescimento microbiano (Figura 1), o que corrobora com a idéia de Murmann et al. (2004), que uma indústria de alimentos, em especial a de produtos industrializados, como o presunto, a adequação da refrigeração é de fundamental importância, para garantir que o produto chegue ao consumidor final com a qualidade e o aspecto desejáveis, sendo necessário, para isto, ter um controle eficiente da temperatura em ambientes onde há manipulação de matéria-prima, câmaras de estocagem, transporte, entre outros cuidados, sempre respeitando a cadeia de frios.

Conclusões

Os resultados encontrados revelaram que baixas temperaturas diminuem a multiplicação celular de *S. aureus* e que a refrigeração tem grande influência na multiplicação dos microrganismos, controlando o crescimento microbiano. Além disso, muitas doenças transmitidas por alimentos poderiam ser evitadas com a correta utilização da cadeia de frios.

Desta forma, para a indústria de alimentos a adequada utilização de refrigeração é de fundamental importância em todas as etapas da fabricação, principalmente durante a manipulação e industrialização da matéria-prima, para garantir a qualidade do produto final.

Apoio

Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC.

Referências

- BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000.
- BRASIL, Instrução Normativa n°. 62 de 26/08/2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF. **Diário Oficial da União**, 18/09/2003.
- CUNHA NETO, A. SILVA, C. G. M, STAMFORD, T. M. L. *Staphylococcus enterotoxigênicos* em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, BRASIL. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.
- MALHEIROS, P. S. et al., Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**. 298–301, no prelo.
- MURMANN, L. et al., Temperaturas de conservadores a frio em estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de Santa Maria/RS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 124, p.30-34, 2004.
- SU, W., WONG, L. A. C. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxin. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 195-202, 1997.

DETECÇÃO DE *Archaea* EM LEITE UHT ATRAVÉS DE PCR

Valdir Cristóvão Barth Junior; Fernanda Cattani; Carlos Alexandre Sanchez Ferreira; Sílvia Dias de Oliveira

Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, PUCRS. E-mail: silviadias@pucrs.br

Resumo – O processo de tratamento térmico por UHT visa à diminuição de contaminantes microbianos e potenciais patógenos, sem modificar as propriedades organolépticas do leite. O domínio *Archaea* apresenta microrganismos com elevada termorresistência, sendo possíveis candidatos a suportar o processo de tratamento por UHT. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de detecção de células viáveis de microrganismos do domínio *Archaea* em leite UHT. O microrganismo *Halobacterium salinarum* foi utilizado para a padronização dos métodos de extração de DNA e de detecção por PCR, a qual se demonstrou sensível e aplicável na matriz leite, detectando em torno de 1 UFC/mL. A utilização do intercalante de DNA propídio monoazida nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL não foi suficiente para a detecção seletiva de DNA de células viáveis. Portanto, o protocolo desenvolvido para detecção de representantes do domínio *Archaea* apresenta sensibilidade e aplicabilidade na matriz leite UHT, no entanto a detecção somente de células viáveis ainda necessita ser otimizada.

Palavras-chave: *Archaea*; PCR, células viáveis; leite.

Introdução

No Brasil, o leite *in natura* apresenta, de maneira geral, altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e coliformes, indicando assim uma deficiência na higiene durante a obtenção deste produto (Pinto et al., 2006; Rossi Jr et al., 2006). As fontes de contaminação por estes microrganismos são, principalmente, solo, água, vegetação, teto/úbere e equipamentos de ordenha higienizados inadequadamente (Coorevits et al., 2008). Portanto, o controle microbiológico do leite é de grande importância para a redução da contaminação microbiana do produto final, minimizando riscos de desenvolvimento de doenças relacionadas ao consumo deste produto (Moraes, 2005). O tratamento térmico conhecido como UHT (*Ultra High Temperature*) consiste no aquecimento entre 130°C a 150°C, por 2 a 4 segundos, seguido de imediato resfriamento e armazenamento em embalagens assépticas. Desta forma, consegue-se minimizar os riscos à saúde pública e aumentar o período de vida útil do produto (Aaku et al., 2004).

Muitos microrganismos extremófilos e termorresistentes estão agrupados dentro do domínio *Archaea*. Este domínio é caracterizado por uma ampla diversidade metabólica, contendo representantes psicrófilos, mesófilos, hipertermófilos, halofílicos e resistentes a outras condições extremas. Devido às suas características únicas, principalmente relacionadas à termorresistência, estes procariotos são possíveis candidatos a suportar o processo de tratamento UHT. Uma grande fração da biodiversidade deste domínio é representada por organismos até então não cultiváveis em laboratório, sendo identificados apenas através de seus registros moleculares. Para isso, a PCR pode ser utilizada para a detecção e identificação a partir de amplificação de fragmentos gênicos distintivos do grupo, como a região 16S de RNAr, podendo ser aplicada para detecção de *Archaea* em ambientes naturais e em alimentos (Einen et al., 2008; Park et al., 2009). Porém, tal técnica não é capaz de diferenciar células

viáveis de células comprometidas ou DNA livre, possivelmente gerando resultados superestimados. Entretanto, o uso concomitante do propídio monoazida (PMA) possibilita a detecção seletiva de células viáveis, impedindo a amplificação de DNA de células mortas (Nocker et al., 2006).

Portanto, este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de detecção de células viáveis de representantes do domínio *Archaea* por PCR que possa ser aplicado em amostras de leite UHT.

Materiais e Métodos

A padronização do protocolo de detecção de *Archaea* foi efetuada utilizando-se o *Halobacterium salinarum* ATCC 19700. Os métodos de contagem de colônias em superfície e medição da densidade óptica do cultivo em diferentes fases de crescimento foram utilizados para estabelecer a curva de crescimento padrão da *H. salinarum* a fim de localizar a sua entrada em fase estacionária e a densidade de células correspondente, possibilitando a contaminação artificial do leite com concentrações conhecidas do microrganismo.

Para a extração do DNA genômico, padronizou-se um protocolo que utiliza tiocianato de guanidina (Rademaker & Bruijn, 1997) em cultura de *H. salinarum*, em sedimento marinho e em conteúdo ruminal, com a possível presença de outros grupos do domínio *Archaea*. Para estabelecer o limite de detecção da técnica e sua aplicabilidade na matriz leite, alíquotas de leite UHT foram artificialmente contaminadas com *H. salinarum* em diluição decimal seriada, e a densidade celular correspondente foi determinada pela técnica de espalhamento em superfície, semeando 100 µL de cada diluição, em duplicata. As condições de amplificação foram padronizadas a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região 16S do rRNA do domínio *Archaea* previamente descritos (Takai & Horikoshi, 2000). Os produtos da amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob radiação ultravioleta.

Com intuito de restringir a detecção a apenas células viáveis, testou-se diferentes concentrações de PMA (5, 10 e 20 µg/mL) em cultivos inviabilizados por exposição ao calor (100°C por 30 minutos) e isopropanol 70%, por 30 minutos.

Resultados e Discussão

A amplificação específica de fragmentos de DNA menores que 500 pb foi obtida a partir do DNA oriundo de uma cultura pura de *H. salinarum*. Os resultados obtidos com as amostras de sedimento marinho e de conteúdo ruminal suportam a conclusão de que o protocolo pode ser utilizado para a extração de DNA e detecção de outros *taxa* de *Archaea*. A padronização da curva de crescimento de *H. salinarum* mostrou a sua entrada em fase estacionária no período de 48h de cultivo, correspondendo a uma densidade celular de $1,8 \times 10^8$ UFC/mL. A técnica de detecção por PCR se mostrou sensível, havendo amplificação de fragmentos gênicos até a diluição 10^{-8} (Figura 1), a qual corresponde a um densidade celular de em torno de 1 UFC/mL. Não houve inibição total da amplificação de DNA oriundo de células comprometidas utilizando PMA nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL.

Conclusões

O protocolo desenvolvido para detecção de representantes do domínio *Archaea* apresenta aplicabilidade e sensibilidade na matriz leite UHT.

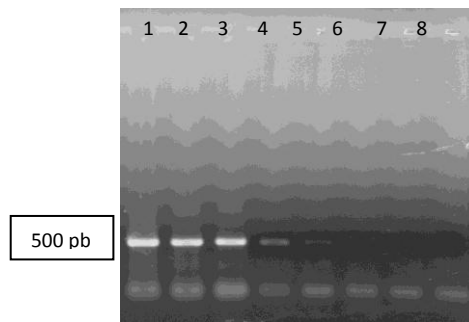


Figura 1 – Amplificação a partir de diluição seriada decimal (10^{-1} a 10^{-8}) de um cultivo com densidade celular correspondente a 10^8 UFC/mL.

Apoio

CNPq/PIBIC-CNPQ

Referências

- AAKU, E. M., COLLISON, E.K., GASHE, B.A., MPUCHANE S. Microbiological quality of milk from two processing plants in Gaborone Botswana. **Food Control**, v. 15, p. 181-186, 2004.
- COOREVITS, A., DE JONGHE, V., VANDROEMME, J., REEKMANS, R., HEYRMAN, J., MESSENS, W., DE VOS, P., HEYNDRICKX, M. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventinal dairy farms. **Systematics and Applied Microbiology**, v. 31, p. 126-140, 2008.
- EINEN, J., THORSETH, I. H., ØVREÅS, L. Enumeration of *Archaea* and *Bacteria* in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorecence microscopy. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, p.182-187, 2008.
- MORAES, C.R. **Qualidade bacteriológica de leite bovino de mistura, in natura e beneficiado, e detecção sorológica de brucelose em rebanhos da região metropolitana de Porto Alegre-RS**. Dissertação (mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- NOCKER, A.C., CHEUNG, C-Y., CAMPER, A.K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**. V. 67, p. 310–320, 2006.
- TAKAI, K., HORIKOSHI, K. Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. **Applied and Environmental Microbiology** v. 66, No 11, p. 5066-5072, 2000.
- PARK, E., H. CHANG, K. KIM, Y. NAM, S. W. ROH, E J. BAE. Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, archaeal, and yeast populations in kimchi. **The Journal of Microbiology** v. 47, No 6, p. 682-685, 2009.
- PINTO, C.L.O., MARTINS, M.L., VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóricas proteolíticas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, No 3, p. 645-51, 2003.
- RADEMAKER, J.L.W., BRUIJN, F.J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. **In: DNA markers: protocols, applications, and overviews**. New York: Caetano-Anollés, G, Gresshoff, P. M. 1997.
- ROSSI, JR, O.D., VIDAL-MARTINS, A.M.C., SALOTTI, B.M., BÜRGER, K.P., CARDOZO, M.V., CORTEZ, A.L.L. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivos do Instituto Biológico** v. 73, No 1, p. 27-32, 2006.

PESQUISA DE *Staphylococcus aureus* E COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM MANIPULADORES DE ALIMENTOS

Diane Scapin¹; Marcelo Rubin²; Eliandra Mirlei Rossi³

¹Bióloga, Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. dianescapin2005@yahoo.com.br; ² Biomédico, Graduação em Biomedicina pela Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste. veiorubin@yahoo.com.br; ³Bióloga, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente-UFRGS, Professora do Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC, Campus de São Miguel do Oeste, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. eliandra_bio@yahoo.com.br.

Resumo - Manipuladores de alimentos podem ser responsáveis por contaminações cruzadas nas indústrias, pois podem ser portadores assintomáticos de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, um dos principais causadores de doenças transmitidas por alimentos, ou carrear outras bactérias como, por exemplo, aquelas do grupo coliformes que são usadas como indicadoras de condições higiênicas sanitárias. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a prevalência de *S. aureus* nas mãos e narinas dos manipuladores e coliformes termotolerantes nas mãos dos manipuladores em um frigorífico. Foram coletadas 30 amostras das mãos e 30 das narinas de manipuladores, usando *swabs* embebidos em solução salina e transportados ao Laboratório de Microbiologia da Universidade, para análise. A metodologia usada para a contagem de coliformes termotolerantes foi baseada na Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Para a contagem de *S. aureus* 100 µl de cada amostra foram semeados em Ágar Sal Manitol e incubadas a 36±1°C por 48 h. Colônias características foram identificadas por coloração de Gram e testes bioquímicos, conforme Koneman et al. (2001) e Macfaddin (2000). Os resultados revelaram que 13 (44%) dos manipuladores apresentaram *S. aureus* nas mãos ou narinas. Destes, 17% apresentaram *S. aureus* nas mãos e 27% nas narinas. Nenhuma das amostras apresentou coliformes termotolerantes, o que demonstra as boas condições higiênicas sanitárias das mãos dos manipuladores. Já a presença de *S. aureus* indica que manipuladores de alimentos podem ser portadores assintomáticos desse microrganismo, o que aumenta os riscos de ocorrer contaminação durante a manipulação de alimentos. **Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*; coliformes termotolerantes; manipuladores de alimentos.

Introdução

As condições de higiene inadequadas dos manipuladores e a contaminação cruzada são os principais causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Dentre os microrganismos que comprometem a qualidade sanitária dos produtos em indústrias, destacam-se *Staphylococcus aureus* e os coliformes termotolerantes (BASS, ERSUN, KIVANÇ, 2006; FRANCO, LANDGRAF, 2005).

Segundo Acco et al. (2003), *S. aureus* é um dos mais importantes agentes causadores de intoxicação alimentar, devido a capacidade de produzir toxinas no alimento. A presença deste microrganismo em alimentos ocorre frequentemente devido manipulação inadequada das pessoas que carregam este microrganismo, principalmente nas mãos e mucosa nasal, sendo esta a principal fonte de propagação desta bactéria (HATAKKA et al. 2000; VON et al. 2001).

Os coliformes termotolerantes são microrganismos indicadores de contaminação de origem fecal e de provável presença de patógenos. A presença destes nos alimentos indica condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. Assim quando são encontrados coliformes termotolerantes em manipuladores isso indica uma situação de risco, devido a possibilidade de transmissão desses patógenos presentes nas fezes para os alimentos (OLIVEIRA et al. 2003).

Assim, o presente trabalho teve o objetivo de verificar a prevalência de *Staphylococcus aureus* e coliformes termotolerantes nos manipuladores de alimentos de uma indústria alimentícia do extremo-oeste catarinense, uma vez que estes podem transferi-los para os alimentos durante a manipulação. Além disso, esse trabalho poderá ser uma importante ferramenta para ser utilizado no controle de qualidade da indústria.

Materiais e Métodos

Foram coletadas 60 amostras provenientes das mãos (30) e da cavidade nasal (30) de manipuladores de alimentos do setor de produção de uma indústria alimentícia da região extremo-oeste de Santa Catarina.

As amostras das mãos foram coletadas com o auxílio de *swab* estéril previamente umedecido em solução fisiológica e friccionado três vezes em cada dedo da mão, na região entre os dedos e na palma da mão. A coleta da amostra nasal também foi realizada com o auxílio de um *swab* estéril previamente umedecido que foi friccionado em ambas as cavidades nasais dos manipuladores. Após a coleta, os *swabs* foram transportados em tubos contendo solução fisiológica, acondicionados em caixa térmica e conduzidos ao Laboratório de Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste, para análise.

Foi realizado a contagem de *S. aureus* e coliformes termotolerantes nas mãos e *S. aureus* nas narinas. A metodologia usada para a contagem de coliformes termotolerantes foi baseada na Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Para a contagem de *S. aureus*, 100 µl de cada amostra foram semeados em placas contendo Ágar Sal Manitol e incubadas a 36±1°C por 48 h. Colônias características foram identificadas por coloração de Gram e testes bioquímicos específicos, conforme Koneman et al. (2001) e Macfaddin (2000).

Resultados e Discussão

Dos 30 manipuladores avaliados 13 (44%) apresentaram *S. aureus* nas mãos ou narinas. Destes, 17% apresentaram *S. aureus* nas mãos e 27% nas narinas. Além disso, observou-se que todos os manipuladores que portavam *S. aureus*, apresentavam esta bactéria ou nas mãos ou nas narinas, ou seja, nenhum dos portadores apresentou em ambos.

Em nenhuma das amostras constatou-se a presença de coliformes termotolerantes nas mãos. Os dados encontrados neste estudo comprovam que manipuladores de alimentos podem ser portadores assintomáticos de *S. aureus*. Além disso, verificou-se que resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores como por exemplo, aqueles de Grandó et al. (2008), que isolaram *S. aureus* em 32,7% (19) das amostras. Destas, 8 isolados (42,10%) foram provenientes das mãos e 11 isolados (57,90%) da cavidade nasal dos manipuladores avaliados. Ainda, Rall et al. (2010), em pesquisa realizada com 82 manipuladores de cozinhas industriais, isolaram das mãos e cavidade nasal 20 cepas (24,4%) de *Staphylococcus coagulase* positiva.

Esses resultados corroboram com a idéia de Vandenberg et al. (1999) de que a presença de *S. aureus* na cavidade nasal pode variar de 20 a 55% em uma população adulta saudável.

Além disso, algumas pesquisas revelam que os portadores podem apresentar diferentes cepas de *S. aureus* na mucosa nasal, pois segundo um estudo realizado por Acco et al. (2003), dos 47 manipuladores de alimentos avaliados 14 (30%) apresentaram *S. aureus* na cavidade nasal e destes 11 portavam múltiplas cepas. A presença de diferentes cepas na mucosa nasal dos manipuladores pode aumentar os riscos de intoxicação alimentar. Desta forma, como *S. aureus* se encontra presente nas fossas nasais, o risco de ocorrer contaminação dos alimentos por manipuladores é elevado, já que este patógeno pode ser transferido ao alimento através de espirros (ACCO et al. 2003).

Esses resultados são preocupantes, pois os manipuladores tem um importante papel na segurança dos alimentos, e podem também contribuir para a transmissão desse microrganismo, uma vez que podem contaminá-los durante o processamento, distribuição e manipulação (ANGELILLO et al. 2001).

Conclusões

Embora a ausência de coliformes termotolerantes nas mãos avaliadas possam indicar boas condições higiênicas sanitárias dos manipuladores, eles podem ser portadores de *S. aureus* tanto nas mãos como nas narinas, o que aumenta o risco de contaminação microbiológica dos alimentos, através dos manipuladores. Desse modo, verifica-se a importância e a necessidade de implantação de Boas Práticas de fabricação para prevenir e evitar contaminações aos produtos.

Apoio

Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC.

Referências

- ACCO, M. et al. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v. 20, p. 489–493, 2003.
- ANGELILLO, I. F. et al. Consumers and foodborne diseases: Knowledge, attitudes and reported behavior in one region of Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 161-166, 2001.
- BASS, M. , ERSUN, A. S., KIVANÇ, G. The evaluation of food hygiene knowledge, and practices of food handlers in food businesses. **Food Control**, v. 17, p. 317-322, 2006.
- BRASIL, Instrução Normativa nº. 62 de 26/08/2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF. **Diário Oficial da União**, 18/09/2003.
- FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAG, M. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu: São Paulo, 2005. 182 p.
- GRANDO, W. F. et al. Suscetibilidade a Antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores de indústria de laticínios. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p. 467-471, 2008.
- HATAKKA, M. et al. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. **Journal of Food Protection**, v.11, p. 1487-1491.
- KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas colorido**. 5. ed. Medsi: Rio de Janeiro, 2001.1465p.
- MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identifications of medical bactéria**. 3 ed.Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p.
- OLIVEIRA, A. M. et al. Manipuladores de alimentos: Um fator de risco. **Higiêne Alimentar**, v. 17, p. 12-19, 2003.
- RALL, V. L. M. et al. Detection of enterotoxin of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 59-65, 2010.
- VANDENBERGH, M. F. Q. et al. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after years: redefining the persistent carrier state. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, p. 3133-3140, 1999.
- VON EIFF, C. et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **The new England Journal of Medicine**, v. 344, p. 11-16, 2001.

PROPRIEDADES DE AUTOAGREGAÇÃO E HIDROFOBICIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE LEITE E QUEIJO DE OVELHA

Stela Maris Meister Meira¹; Virginia Etges Helfer²; Renata Voltolini Velho³; Adriano Brandelli⁴

¹Estudante do Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS; E-mail: stelammm@yahoo.com.br; ²Estudante do Curso de Farmácia da UFRGS; E-mail: vikzinha@hotmail.com; ³Estudante do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS; E-mail: re.voltolini@hotmail.com; ⁴Professor do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS; E-mail: abrand@ufrgs.br.

RESUMO – Bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha foram identificadas e avaliadas *in vitro* quanto a características probióticas indicadoras da possibilidade de adesão ao intestino - autoagregação e hidrofobicidade. A maioria das linhagens foram identificadas como *Lactobacillus plantarum*. Todas as linhagens apresentaram autoagregação superior a 50%, com exceção de *L. casei* SM G e *L. parabuchneri* SM L, que também foram as bactérias com menor índice de hidrofobicidade (inferior a 30%). Estes resultados instigam a continuidade dos estudos de parte destes isolados visando aplicações probióticas.

Palavras-chave: bactérias lácticas; probióticos; autoagregação; hidrofobicidade.

Introdução

Bactérias ácido lácticas (BAL) são empregadas na produção de uma grande variedade de alimentos fermentados como produtos lácteos, cárneos e vegetais. Nos últimos anos, propriedades de promoção à saúde têm sido atribuídas às BAL e aplicações probióticas são majoritariamente desenvolvidas com este grupo, uma vez que várias espécies estão presentes no trato intestinal humano e muitas apresentam *status* GRAS (PINTO *et al.*, 2006).

A aderência da bactéria probiótica à mucosa intestinal, como primeiro passo para assegurar ao menos uma colonização temporária, é considerada de grande importância para possibilitar os efeitos benéficos à saúde a ela atribuídos. Este critério funcional pode estar relacionado ao aumento da habilidade de estimulação do sistema imune, bem como vantagem competitiva, importante para a manutenção da bactéria no trato gastrointestinal humano (SCHILLINGER *et al.*, 2005).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar propriedades *in vitro* de autoagregação e hidrofobicidade, indicativas da possibilidade de aderência às superfícies da mucosa intestinal, de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. Estudos anteriores revelaram que estes isolados apresentam, de uma forma geral, boa tolerância *in vitro* ao pH 3,0 e a 0,3% de sais biliares por 4 horas, características de importância para a passagem pelo estômago e intestino delgado.

Materiais e Métodos

Bactérias lácticas e identificação molecular: As bactérias ácido lácticas foram isoladas de leite ovino cru e de queijo elaborado a partir de leite cru de ovelha da raça Lacaune e maturado por 60 dias de laticínios do Rio Grande do Sul. Os isolados foram estocados a -20°C

em glicerol 20% (v/v) e propagados duas vezes antes do uso. Linhagens ATCC de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* também foram incluídas neste estudo.

A identificação molecular foi realizada por meio da obtenção e sequenciamento do rDNA16S. O DNA total foi extraído pelo método fenol/clorofórmio e as Reações em Cadeia da Polimerase foram realizadas empregando os *primers* universais 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), conforme Lisboa *et al.* (2006). Os amplicons foram purificados e enviados para ATCGene (Porto Alegre, Brasil), onde foram sequenciados. O algoritmo BLAST foi utilizado para busca por seqüências homólogas no GenBank e, para alinhamento destas seqüências, utilizou-se o software CLUSTAL W versão 1.8.

Ensaio de autoagregação e hidrofobicidade: As linhagens foram incubadas por 24 h a 30°C em caldo MRS. As células foram separadas por centrifugação a 12000 g por 5 min, lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 a uma absorbância (A_{600nm}) de $0,25 \pm 0,02$, para padronizar o número de bactérias em 10^7 - 10^8 UFC/mL (COLLADO *et al.*, 2008).

Para o ensaio de autoagregação, as suspensões celulares foram incubadas em alíquotas a 37°C e as absorbâncias a 600 nm monitoradas em diferentes tempos (2, 16, 20 e 24 horas). A porcentagem de autoagregação foi expressa como: $1 - (A_{600nm} \text{ da suspensão superior} / A_{600nm} \text{ da suspensão bacteriana total}) \times 100$. A avaliação da hidrofobicidade das linhagens foi realizada empregando-se xileno, de forma a determinar a adesão ao hidrocarboneto. Para isto, 3 mL das suspensões celulares foram misturados a 400 μ L de xileno, vortexando por 1 min. Após 2 h a 37°C, a fase aquosa foi removida e a absorbância a 600 nm medida. A afinidade pelo hidrocarboneto foi expressa como porcentagem de adesão: $[(A_0 - A) / A] \times 100$, onde A_0 e A representam a absorbância antes e após a extração com o solvente orgânico, respectivamente.

Resultados e Discussão

As linhagens bacterianas identificadas pertenceram ao gênero *Lactobacillus*, sendo a maioria *L. plantarum* (6 linhagens), conforme a Tabela 1. Outras duas linhagens foram identificadas como *L. casei* e as demais identificadas como *L. paracasei* ou *L. casei*, *L. parabuchneri* e *L. brevis*. Todas as linhagens apresentaram identidade superior a 98% com as respectivas espécies.

Tabela 1 – Linhagens de BAL identificadas por 16S rDNA e propriedades de autoagregação e hidrofobicidade.

Linhagem	Autoagregação (%)				Hidrofobicidade (%)
	2 h	16 h	20 h	24 h	
<i>L. plantarum</i> SM C	19,9 \pm 1,0	65,1 \pm 1,2	68,7 \pm 1,0	72,6 \pm 2,1	75,4 \pm 6,7
<i>L. plantarum</i> SM I	16,7 \pm 3,5	66,1 \pm 1,0	71,9 \pm 2,3	74,7 \pm 3,6	76,5 \pm 4,0
<i>L. plantarum</i> SM 5	21,7 \pm 1,8	45,7 \pm 0,5	51,1 \pm 1,0	55,4 \pm 2,5	70,6 \pm 6,7
<i>L. plantarum</i> LCN 35	28,6 \pm 3,0	59,0 \pm 0,4	62,2 \pm 0,9	67,0 \pm 1,6	33,6 \pm 1,2
<i>L. plantarum</i> LCN 39	22,6 \pm 0,8	50,9 \pm 3,1	53,2 \pm 4,0	56,3 \pm 1,2	69,3 \pm 3,4
<i>L. plantarum</i> LCN 56	26,2 \pm 2,5	60,5 \pm 3,5	65,6 \pm 1,4	70,6 \pm 5,4	82,8 \pm 3,5
<i>L. casei</i> SM G	15,7 \pm 4,0	35,4 \pm 2,9	39,3 \pm 3,2	43,3 \pm 4,4	17,7 \pm 5,0
<i>L. casei</i> SM H	32,2 \pm 3,9	70,1 \pm 2,1	75,2 \pm 1,7	79,8 \pm 2,6	51,7 \pm 3,3
<i>L. paracasei/casei</i> LCN 27	22,4 \pm 1,7	59,2 \pm 2,4	65,2 \pm 4,0	70,4 \pm 3,2	72,3 \pm 4,9
<i>L. parabuchneri</i> SM L	11,3 \pm 3,6	29,0 \pm 3,4	31,9 \pm 3,2	36,3 \pm 0,6	29,4 \pm 5,8
<i>L. brevis</i> SM A	18,4 \pm 2,6	38,9 \pm 4,6	45,2 \pm 2,4	52,3 \pm 5,0	88,0 \pm 2,1
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	19,8 \pm 2,7	49,7 \pm 4,6	51,0 \pm 5,8	56,2 \pm 5,4	34,9 \pm 7,5
<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	28,6 \pm 6,8	58,2 \pm 2,5	60,9 \pm 4,9	66,9 \pm 6,1	75,1 \pm 5,1

Uma propriedade importante de muitas linhagens bacterianas usadas como probióticos é a habilidade de aderência às células epiteliais e superfícies da mucosa intestinal. Neste sentido, em muitos casos, a capacidade de agregação está relacionada às propriedades de aderência celular. Em paralelo, a hidrofobicidade da superfície celular é comumente aceita como um dos principais fatores da adesão não específica (COLLADO *et al.*, 2008).

Os resultados da avaliação destas propriedades revelaram que a maior parte dos lactobacilos apresentaram valores de autoagregação (após 24 h) e de hidrofobicidade acima de 50% (Tabela 1). As linhagens com maior autoagregação foram *L. casei* SM H (79,8%) e *L. plantarum* SM I (74,7%), enquanto os maiores valores de hidrofobicidade foram obtidos para *L. brevis* SM A (88,0%) e *L. plantarum* LCN 56 (82,8%).

Superfícies celulares altamente hidrofóbicas são muitas vezes associadas à capacidade de autoagregação (MUÑOZ-PROVENCIO *et al.*, 2009). Neste sentido, esta associação foi evidenciada para *L. casei* SM G e *L. parabuchneri* SM L, ambas com os menores valores de autoagregação e hidrofobicidade, denotando a correlação entre estas propriedades.

A habilidade de autoagregar juntamente com a hidrofobicidade da superfície celular podem ser usadas como triagem inicial para a seleção de bactérias potencialmente probióticas, conforme Collado *et al.* (2008). Da mesma forma, Xu *et al.* (2009) afirmam que a hidrofobicidade pode ser considerada um indicador para essa triagem, pois em seu trabalho a afinidade com xileno foi altamente correlacionada com a autoagregação e habilidade de adesão a células Caco-2.

Conclusões

As bactérias lácticas avaliadas, pertencentes a espécies do gênero *Lactobacillus*, apresentaram em sua maioria interessantes características funcionais como potenciais probióticos para uso em alimentos – altos índices de autoagregação e hidrofobicidade. Os resultados significam a possibilidade de estas bactérias aderirem ao intestino, as quais serão objeto de estudos posteriores.

Referências

- COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, v. 226, p.1065–1073, 2008.
- LISBOA, M. P.; BONATTO, D.; BIZANI, D.; HENRIQUES, J. A. P.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin- like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology*, v.9, p. 111- 118, 2006.
- MUÑOZ-PROVENCIO, D.; LLOPIS, M.; ANTOLÍN, M.; TORRES, I.; GUARNER, F.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G.; MONEDERO, V. Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Archives of Microbiology*, v. 191, p.153–161, 2009.
- PINTO, M. G. V.; FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 109, p. 205–214, 2006.
- SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 1289–1297, 2005.
- XU, H.; JEONG, H.S.; LEE, H.Y.; AHN, J. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology*, v. 49, p 434–442, 2009.