

MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL EM SUBSTRATO DE CULTIVO SÓLIDO PARTICULADO

Daniel Cardoso Morais¹
 Priscila Rosseto¹
 Rafael de Carli Marcante¹
 Paola Silva Frison¹
 Fabio Gomes Ferreira²
 Henrique Susumu Tanaka³
 Nelson Barros Colauto⁴
 Juliana Silveira do Valle⁴
 Silvia Graciele Hülse de Souza⁴
 Odair Alberton⁴
 Giani Andrea Linde⁴

MORAIS, D. C.; ROSSETO, P.; MARCANTE, R. C.; FRISON, P. S.; FERREIRA, F. G.; TANAKA, H. S.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do; SOUZA, S. G. H.; ALBERTON, O.; LINDE, G. A. Microscopia de epifluorescência para a determinação de biomassa micelial fúngica em substrato de cultivo sólido particulado. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 185-189, jul./dez. 2012.

RESUMO: A determinação de biomassa micelial fúngica crescida em substratos de cultivo sólido particulado (SCSP) é ainda um desafio devido à dificuldade de separação do micélio e o substrato. O objetivo deste trabalho foi avaliar a técnica de microscopia de epifluorescência para determinação da biomassa micelial de *Pleurotus ostreatus* em SCSP. Para determinação da exatidão da metodologia *P. ostreatus* foi crescido em meio líquido de extrato de malte e; a biomassa micelial foi separada por centrifugação, liofilizada e moída. Concentrações conhecidas do pó do micélio foram misturadas ao SCSP, composto de bagaço de cana de açúcar e fibra de soja, previamente autoclavado. Em seguida, a biomassa micelial foi determinada por microscopia de epifluorescência. Para promover a variação da biomassa micelial a ser determinada por microscopia de epifluorescência, SCSP adicionado de diferentes concentrações de ferro foram utilizados para o crescimento do fungo. Concluiu-se que a técnica apresenta baixa precisão e exatidão, o que implica na necessidade de maiores estudos para aplicação desta técnica para a determinação de biomassa micelial crescida em SCSP.

PALAVRAS-CHAVE: Basidiomiceto; Biomassa micelial; Ergosterol; Fermentação.

EPIFLUORESCENCE MICROSCOPY FOR THE DETERMINATION OF MYCELIAL BIOMASS IN PARTICULATED SOLID SUBSTRATE CULTIVATION

ABSTRACT: Determination of fungal mycelial biomass grown on solid substrate cultivation (SSC) is still a challenge due to the difficulty in separating mycelium and substrate. The objective of this study was to evaluate the epifluorescence microscopy to determine the mycelial biomass of *Pleurotus ostreatus* grown in SSC. *P. ostreatus* was grown in malt extract liquid medium and mycelial biomass was separated by centrifugation. It was then lyophilized and milled. Mycelial powder was added at known concentrations to SSC composed of sugarcane bagasse and soy fiber, previously autoclaved. Mycelial biomass was determined by epifluorescence microscopy. In order to promote mycelial biomass variation for the determination by epifluorescence microscopy, SSC added at different iron concentrations was used for fungus growth. It was concluded that the technique has low precision and accuracy, which implies the need for further studies in order to apply this technique for the determination of mycelial biomass grown in SSC.

KEYWORDS: Basidiomycete. Mycelial biomass. Ergosterol. Fermentation.

MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA MICELIAL EN SUSTRATO DE CULTIVO SÓLIDO PARTICULADO

RESUMEN: La determinación de biomasa micelial fúngica crecida en sustratos de cultivo sólido particulado (SCSP) es todavía un reto debido a la dificultad de separación del micelio y el sustrato. El objetivo de este estudio fue evaluar la técnica de microscopía de epifluorescencia para determinación de la biomasa micelial de *Pleurotus ostreatus* en SCSP. Para determinación de exactitud de la metodología *P. ostreatus* se cultivó en medio líquido de extracto de malta y; la biomasa micelial separada por centrifugación, liofilizada y molida. Concentraciones conocidas del polvo del micelio fueron mezcladas al

¹Acadêmico do Curso de Farmácia, Universidade Paranaense – UNIPAR - Umuarama-PR, e-mail: demorais@hotmail.com.br

²Mestrando em Biotecnologia Aplicada à Agricultura – Universidade Paranaense - UNIPAR

³Mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura – Universidade Paranaense - UNIPAR

⁴Professor Titular do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Biotecnologia Aplicada à Agricultura – Universidade Paranaense - UNIPAR, CP 224, 87502-210, e-mail: gianilinde@unipar.br

SCSP, compuesto de bagazo de caña de azúcar y fibra de soya, previamente tratado en autoclave. A continuación, la biomasa micelial a ser determinada por microscopía de epifluorescencia. Para promover la variación de la biomasa micelial a ser determinada por microscopía de epifluorescencia, SCSP añadida con diferentes concentraciones de hierro fueron utilizados para el crecimiento del hongo. Se concluye que la técnica presenta baja precisión y exactitud, lo que implica en la necesidad de realizar más estudios para aplicación de esta técnica para la determinación de biomasa micelial crecida en SCSP.

PALABRAS CLAVE: Basidiomiceto; Biomasa micelial; Ergosterol; Fermentación.

Introdução

A expansão mundial, a globalização e o desenvolvimento da tecnologia implicam em aumento da atividade industrial, com consequente aumento de subprodutos e/ou resíduos industriais e preocupação com os destinos destes materiais no ambiente. O uso mais destacado desses subprodutos é nos processos fermentativos (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007). Dentre estes processos, o uso de cultivo de fungos em substrato sólido particulado é mais vantajoso em relação aos processos submersos devido ao menor custo e ao maior rendimento da biocompostos (MANTONANI et al., 2012). Contudo, um dos desafios deste cultivo é mensurar a biomassa micelial entremada no substrato (MIYASHIRA; RODRIGUES; KILIKIAN, 2003).

A quantificação de micélio em substrato sólido particulado pode ser efetuada por diversos métodos químicos, biológicos ou bioquímicos. Uma das técnicas mais utilizadas é o uso do ergosterol para mensurar a quantidade de micélio em um substrato (GALVÃO et al., 2003). Entretanto, essa técnica apresenta alta variabilidade nos resultados devido às variáveis de extração do ergosterol, que muitas vezes estão intrinsecamente ligadas ao substrato de cultivo. Ademais, a determinação do ergosterol é efetuada por cromatografia gasosa, o que implica em diversos processos de purificação do composto e torna o método apenas indicativo para mensurar a quantidade de micélio em determinado substrato.

Outro método de quantificação micelial envolve respiração celular, medida pelo consumo de O_2 e liberação CO_2 , e exige a utilização de um biorreator com balanço de gases com prévia determinação da energia convertida em biomassa, produtos e energia de manutenção (RUTSATZ, 2006). Esse método é mais complexo e custoso e é afetado por inúmeras variáveis, sendo que a correlação entre a energia convertida em substrato líquido e em substrato sólido particulado é o fator de maior erro, tornando-o um método apenas indicativo da mensuração da biomassa micelial fúngica.

A microscopia de epifluorescência é amplamente utilizada para a quantificação de micro-organismos presentes na água e no solo (BLOEM; VOS, 2004). Essa técnica tem sido utilizada como método qualitativo para detecção de oocistos vivos de *Pneumocystis jirovecii* em fluidos brônquicos humanos (BRAGADA, 2008), para caracterização microbiológica de fungos micorrízicos em solo (MELLONI et al., 2011), para quantificação de *Salmonella* sp em tomate cereja (SÃO JOSÉ, 2009) e para identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a orquídeas epífitas neotropicais (PEREIRA et al., 2005). Apesar dessa técnica ser amplamente utilizada em diferentes micro-organismos, pouco se informação foi encontrada sobre o uso da microscopia de epifluorescência na quantificação de biomassa micelial em basidiomicetos. O aprimoramento dessa técnica para a determinação de biomassa micelial em substrato sólido particulado representa um avanço para a esta área de mensuração micro-

biana. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar a biomassa micelial de *Pleurotus ostreatus* crescido em substrato sólido particulado por microscopia de epifluorescência.

Material e Métodos

Micélio de *Pleurotus ostreatus* (U6-10) proveniente da micoteca do laboratório de biologia molecular da Universidade Paranaense Campus I de Umuarama-PR foi transferido para placas de Petri (120 mm de diâmetro) contendo meio de cultura de extrato de malte (20 g L⁻¹) e ágar (15 g L⁻¹) (AEM). O crescimento foi realizado no escuro a 28 °C ± 1 °C por cinco dias. Três discos (ø 8 mm) de AEM contendo micélio homogêneo e sem setoriamento foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura líquido de extrato de malte (20 g L⁻¹), previamente autoclavado a 121 °C por 20 min. O crescimento micelial foi realizado no escuro a 28 °C ± 1 °C por 10 dias. Após o crescimento os Erlenmeyers foram separados em dois grupos, o primeiro foi utilizado para obtenção de biomassa micelial para determinação de exatidão da metodologia e o segundo como inóculo para o substrato de cultivo sólido particulado (SCSP).

Preparo do substrato de cultivo sólido particulado

O SCSP foi composto de bagaço de cana de açúcar (20 g) proveniente de usina de cana de açúcar e fibra de soja proveniente de indústria alimentícia (8,16 g). As matérias-primas foram vigorosamente homogeneizadas e a relação carbono/nitrogênio (C/N) foi de 40. Ao SCSP foi adicionado uma solução aquosa de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (15000 mg L⁻¹) para ajustar a umidade em 77% e para adicionar ferro no SCSP em zero, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 mg kg⁻¹. Cada SCSP, com diferentes concentrações de ferro, foi transferido para sacos de polipropileno com filtro bacteriológico e autoclavados a 121 °C por 3 h. Após atingir temperatura ambiente cada SCSP recebeu inóculo de 30 mL de meio líquido de extrato de malte colonizado pelo fungo, foi vigorosamente homogeneizado e mantido no escuro a 28 °C ± 1 °C por 10 dias. O SCSP completamente colonizado foi vigorosamente homogeneizado e uma amostra foi utilizada para determinar a biomassa micelial, conforme item apresentado a seguir.

Exatidão da determinação da biomassa fúngica

Para verificar a exatidão da metodologia para determinar a biomassa fúngica em substrato, centrifugou-se (1699 g a 4 °C por 15 min) o cultivo líquido colonizado pelo fungo, descartou-se o sobrenadante e a biomassa precipitada foi lavada com 30 mL de água ultrapura, seguido de repetição desse processo de centrifugação e lavagem por quatro vezes. A biomassa micelial obtida foi liofilizada, triturada até obtenção de um pó e armazenada a -20 °C. O pó da biomassa

micelial foi vigorosamente misturado ao SCSP, previamente autoclavado a 121 °C por 3 h e com relação carbono/nitrogênio (C/N) de 40, para obter a proporção final de zero, 10000, 100000 ou 200000 μg de micélio por g de SCSP. A biomassa micelial da mistura foi definida conforme item apresentado a seguir.

Determinação da biomassa fúngica

A biomassa micelial foi definida conforme Vries et al. (2006) e Bloem e Vos (2004). Para esse processo, uma amostra de 1 g do SCSP com e sem colonização foi utilizada para determinar a umidade a 105 °C até obtenção de massa constante. Outra amostra de 1 g do SCSP colonizada foi suspensa em 570 mL de água destilada e triturada em liquidificador em velocidade máxima por 1 min. Uma alíquota de 9 mL dessa suspensão foi transferida para tubo tipo Falcon de 15 mL, homogeneizada gentilmente com 1 mL da solução de formaldeído (37%) por 10 s e deixada em repouso por aproximadamente 2 min. Em seguida, uma alíquota de 12 μL da suspensão foi distribuída uniformemente sobre uma lâmina microscópica (64 mm²) e desidratada a 50 °C por 2 h. As lâminas foram dispostas sobre toalhas de papel umedecidas e sobre cada lâmina foi gotejado 50 μL de solução recém preparada de *fluorescent brightener 28* (Sigma F3397: componentes C40, H42, N12, O10, S2 e Na2; 1 mg mL⁻¹ de etanol 50%). Depois de coradas as lâminas foram acondicionadas, em temperatura ambiente, em sala escura por 2 h e lavadas com água destilada por três vezes, por 20 min, para remoção do excesso de corante. Em seguida as lâminas foram secas no escuro, em temperatura ambiente, e receberam uma gota de óleo de imersão e uma lamínula para observação em microscópio.

A biomassa micelial foi determinada por microscopia de epifluorescência de luz ultravioleta, com ampliação da imagem de 400 vezes. A observação foi realizada pelo método da grade de intersecção, selecionando-se aleatoriamente 100 campos e contando-se a presença ou ausência de micélio. A biomassa micelial total ($\mu\text{g}_{\text{micélio}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ em base seca) foi calculada conforme descrito por Vries et al. (2006) e Bloem e Vos (2004).

Resultados e Discussão

Biomassa micelial crescida em substrato com adição de ferro

Na Figura 1 é mostrada a redução da concentração de biomassa micelial no SCSP, em função da concentração de ferro adicionada ao substrato. Pode-se observar que o fungo cresceu em todos os SCSP, mesmo naqueles com 1000 mg kg⁻¹ de ferro. Entretanto, quando a concentração de ferro no SCSP foi acima de 200 mg kg⁻¹ houve forte redução da biomassa micelial.

Apesar da alta variabilidade dos resultados obtidos, o método de epifluorescência foi capaz de detectar a redução da biomassa micelial, conforme o aumento da concentração de ferro no SCSP. Mesmo o aumento da biomassa micelial em concentrações de 100 mg kg⁻¹ de ferro no SCSP foi detectado pelo método de epifluorescência. Isso indica que a técnica tem potencial para determinar a quantidade de bio-

massa micelial em substratos de cultivo orgânico. Devido às diferenças nos métodos de quantificação de biomassa microbiana torna-se difícil a comparação de determinadas técnicas (VRIES et al., 2006). Entretanto, Eduard et al. (2001) relataram que em estudo comparativo para quantificação micelial de micro-organismos pela técnica de microscopia de epifluorescência um nível de erro de até 37%, confirmando a alta variabilidade na determinação da biomassa por esse método.

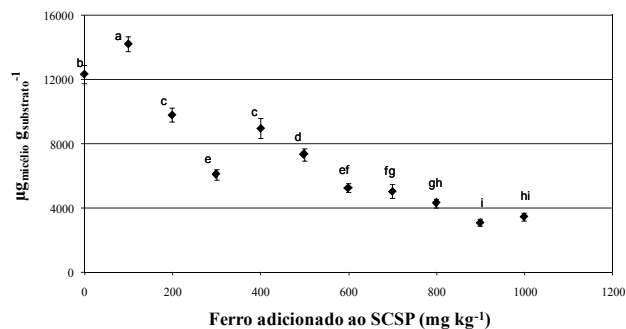


Figura 1: Biomassa micelial ($\mu\text{g}_{\text{micélio}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) de *Pleurotus ostreatus* crescida em substrato de cultivo sólido particulado (SCSP) adicionado com diversas concentrações de ferro (mg kg^{-1}) e determinada por microscopia de epifluorescência.

Padronização da quantificação da biomassa micelial

Na Tabela 1 pode-se observar que para a mistura de 10000 $\mu\text{g}_{\text{micélio}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ foi determinado de apenas 457,64 $\mu\text{g}_{\text{micélio}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$, o que representa 4,57% da proporção real originalmente utilizada do fungo, indicando baixa precisão da medida. As outras misturas tiveram uma porcentagem de determinação da biomassa micelial ainda menores (Tabela 1). Além da reduzida detecção da quantidade de biomassa micelial, os dados apresentaram alta variabilidade. O coeficiente de variação foi de 70,7%, 13,3% e 14,2%, respectivamente, para as três concentrações de biomassa micelial avaliadas. Esses valores foram obtidos a partir de triplicata, após o tratamento dos dados e a retirada dos valores mais distantes das médias.

Ademais de a metodologia apresentar reduzida precisão e exatidão, foi verificado resultados falso-positivos. Este aspecto poderia indicar que a forma de homogeneização do material não foi a mais indicada ou que a liofilização e moagem do micélio misturado ao SCSP tenha criado um modelo de pesquisa muito diferente do real. Entretanto, nos Controles, com SCSP e sem mistura de pó de micélio, foram determinadas biomassa micelial entre 2234,66 a 5205,33 $\mu\text{g}_{\text{micélio}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$. Isso indica que pode ter havido contaminação do material ou que o corante usado na metodologia de microscopia de epifluorescência é eficiente em corar outras substâncias que afetam a determinação da biomassa micelial em pó de *P. ostreatus* misturado ao SCSP.

Tabela 1: Biomassa micelial adicionada ao substrato de cultivo sólido particulado ($\mu\text{g}_{\text{micélio}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) e biomassa micelial determinada no substrato de cultivo sólido particulado ($\mu\text{g}_{\text{micélio}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) por microscopia de epifluorescência.

Biomassa adicionada ao substrato ($\mu\text{g}_{\text{micélio}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$)	Biomassa determinada ($\mu\text{g}_{\text{micélio}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$)	Biomassa determinada em relação à adicionada (%)
0	3719,99 ± 1024,38	-
10000	457,64 ± 323,6	4,60
100000	1487,32 ± 198,16	1,50
200000	4042,45 ± 575,85	2,02

Diversos fatores afetam a robustez da técnica de microscopia de epifluorescência (SHARMA; EDWARDS; BECKETT, 1993). Dentre eles, os corantes fluorescentes são diferentes no modo de reação para produzirem fluorescência, dificultando a escolha do que melhor se adapta à metodologia. Por exemplo, o *fluorescent brightener* cora a parede celular de azul reagindo com polissacarídeos e celulose, o *europium chelate* cora o material genético, o que é importante quando se quer verificar a viabilidade celular do micro-organismo (VRIES et al., 2006), entretanto o corante DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) tem ação fluorescente sobre o núcleo celular (CARDOSO et al., 2007). Neste trabalho foi utilizado apenas o corante *fluorescent brightener*, sendo possível que o uso de outros corantes possa melhorar a qualidade dos resultados obtidos para a quantificação da biomassa micelial de *P. ostreatus* em SCSP.

Outro fator importante a ser considerado para a quantificação de biomassa micelial misturada ao SCSP é a diluição das amostras. O corante *fluorescent brightener* possui alta especificidade para os compostos da parede celular de fungos o que permite a quantificação de pequenas quantidades de biomassa fúngica. Entretanto ao SCSP em nosso experimento foi misturada uma alta concentração de biomassa fúngica. A grande quantidade de biomassa fúngica, principalmente após ter sido liofilizada e moída, pode ter propiciado uma aglomeração da biomassa, o que aumentaria os erros de amostragem, diluição e homogeneização da amostra, principalmente em substratos orgânicos, dificultando uma contagem real, conforme relata Rutsatz (2006). Em nosso trabalho foi necessário uma diluição da amostra de 1:570 para estar numa faixa de células em que a contagem por microscopia de epifluorescência fosse viável. O alto fator de diluição, associado à aglomeração entre a biomassa fúngica e dela com o substrato podem ter auferido erros na determinação no processo de determinação da biomassa micelial.

Em nosso trabalho os erros variaram de 13,3% a 70,7%, com 4,57% de exatidão. Apesar dos altos erros encontrados, há potencial de desenvolvimento desta metodologia para a quantificação de biomassa micelial em SCSP. Mais estudos devem ser efetivados para viabilizar o uso desta metodologia.

Conclusão

Os resultados de exatidão do método de epifluores-

cência na determinação da biomassa micelial liofilizada e misturada em SCSP apresentam alto coeficiente de variação e não são efetivos. A determinação, pelo método de epifluorescência, da biomassa micelial crescida SCSP com diversas concentrações de ferro é de reduzida exatidão e precisão. Mais estudos são necessários para viabilizar a utilização desta técnica que apresenta potencial de uso, apesar de resultados negativos a princípio.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Paranaense, DEGPP/COPIC, Fundação Araucária, CAPES/PROSUP e o Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da UNIPAR.

Referências

BLOEM, J.; VOS, A. Fluorescent staining of microbes for total direct counts. In: KOWALCHUK, G. et al. **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004.

BRAGADA, C. S. P. **Optimização da detecção de *Pneumocystis jirovecii* por citometria de fluxo**. 2008. 45 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Molecular) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.

CARDOSO, D. E. et al. Avaliação morfológica e dos mecanismos de mobilização de Ca^{2+} pela glicose e acetilcolina em células pancreáticas humanas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 431-436, 2007.

EDUARD, W. et al. Recognition errors in the quantification of micro-organisms by fluorescence microscopy. **The Annals of Occupational Hygiene**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 493-498, 2001.

GALVÃO, J. G. et al. Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 840-845, 2003.

MANTOVANI, T. R. D. et al. Substratum formulation for laccase and mycelial biomass production of *Pleurotus ostreatus*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1681-1692, 2012.

MELLONI, R. et al. Fungos micorrízicos arbusculares em solos da reserva biológica municipal Serra dos Toledos, Itaububá/MG. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 4, p. 799-809, 2011.

MIYASHIRA, G. Y.; RODRIGUES, R.; KILIKIAN, B. V. Seleção de linhagens de *Monascus* sp. para cultivo em meio semi-sólido. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2003. CD-ROM.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O.

Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management and Innovation**, Santiago, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PEREIRA, O. L. et al. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 191-197, 2005.

RUTSATZ, M. D. **Cultivo em estado sólido**: modelagem e quantificação de biomassa em biorreator cilíndrico horizontal agitado. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Viçosa, 2009.

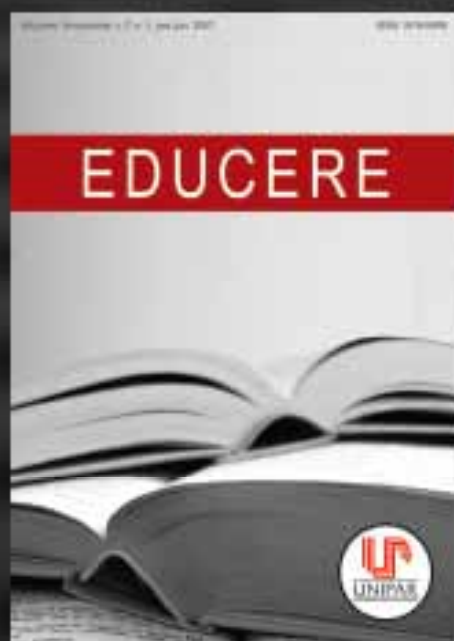
SÃO JOSÉ, J. F. B. **Sanitização por ultrassom e agentes químicos no processamento mínimo de hortaliças**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SHARMA, R. V.; EDWARDS, R. T.; BECKETT, R. Physical characterization and quantification of bacteria by sedimentation field-flow fractionation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 6, p. 1864-1875, 1993.

VRIES, F. T. et al. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 2092-2103, 2006.

EDUCERE

Revista de Educação - ISSN 1519-0099



- Publica trabalhos na área da Educação, tais como ensino-aprendizagem, políticas e práticas da Educação Básica e Ensino Superior, dentre outras.
- Periodicidade: Semestral
- e-mail: educere@unipar.br
<http://revistas.unipar.br/educere>

O CONHECIMENTO NÃO É NADA SE NÃO FOR COMPARTILHADO

