



Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

**Manutenção de culturas de
fungos e bactérias**

Prof. Ivan Paulo Bedendo



Manutenção de Culturas de Fungos e Bactérias

O Método

- “Não há um método universal para manutenção de fitopatógenos”.
- "Escolha do método deve ser feita em função da natureza do patógeno, e das vantagens e desvantagens técnicas e econômicas de cada método“.

O Patógeno

- Para o tipo padrão do patógeno devem ser conhecidas as características morfológicas, de crescimento e de patogenicidade, para a identificação de qualquer mudança que ocorra durante a sua manutenção.
- Estádios de desenvolvimento dos patógenos para conservação:
 - Fungos: fase de esporulação abundante
 - Bactérias: fase logarítmica de crescimento

*Evitar uso de meios ricos

→ metabólitos → alteração de características/morte



O PRINCÍPIO para manutenção de culturas:

REDUÇÃO NA TAXA DE METABOLISMO CELULAR

OS MEIOS PARA REDUÇÃO DO METABOLISMO

- Redução na disponibilidade de nutrientes;
- Redução de trocas gasosas;
- Redução da temperatura ambiente;
- Redução na disponibilidade de água.

OS PRINCIPAIS MÉTODOS

- Repicagens sucessivas;
- Cultura inclinada com cobertura de óleo;
- Manutenção em água;
- Incorporação ao solo e areia;
- Secagem (sílica gel e papel de filtro);
- Congelamento/secagem (liofilização);
- Congelamento em nitrogênio líquido.



Repicagens sucessivas

➤ **Consiste em transferir periodicamente o patógeno para meios recém preparados.**

➤ **Periodicidade das repicagens é variável:**

Fungos → 3-6 meses

Bactérias → semanas/meses



Condições exigidas: meio de cultura adequado, condições de incubação que desfavoreçam a desidratação do meio de cultura

(geladeira, tampão borracha, tampa rosca, tampão de algodão com filme plástico).

➤ **Vantagens:** custo baixo (uso de equipamentos), fácil manuseio (treinamento técnico).

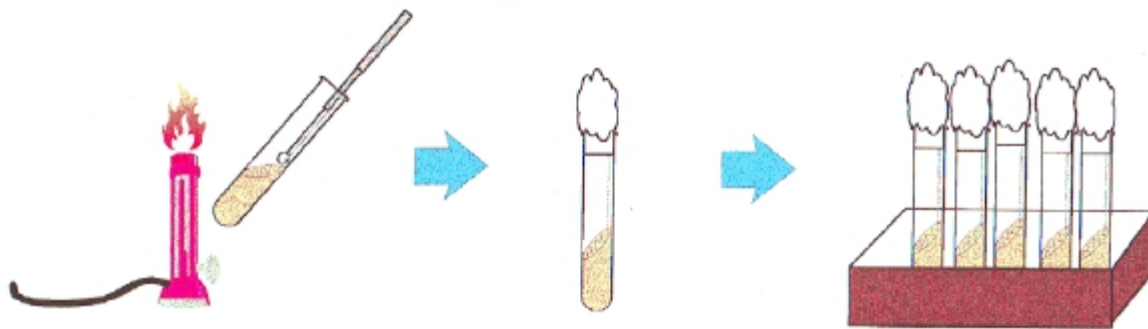
➤ **Desvantagens:** Perda de características, risco de contaminação e infestação por ácaros, desgastante rotina de trabalho

Transferência periódica

1. Repique
a. em Ágar:



- b. em Caixas de Estocagem:

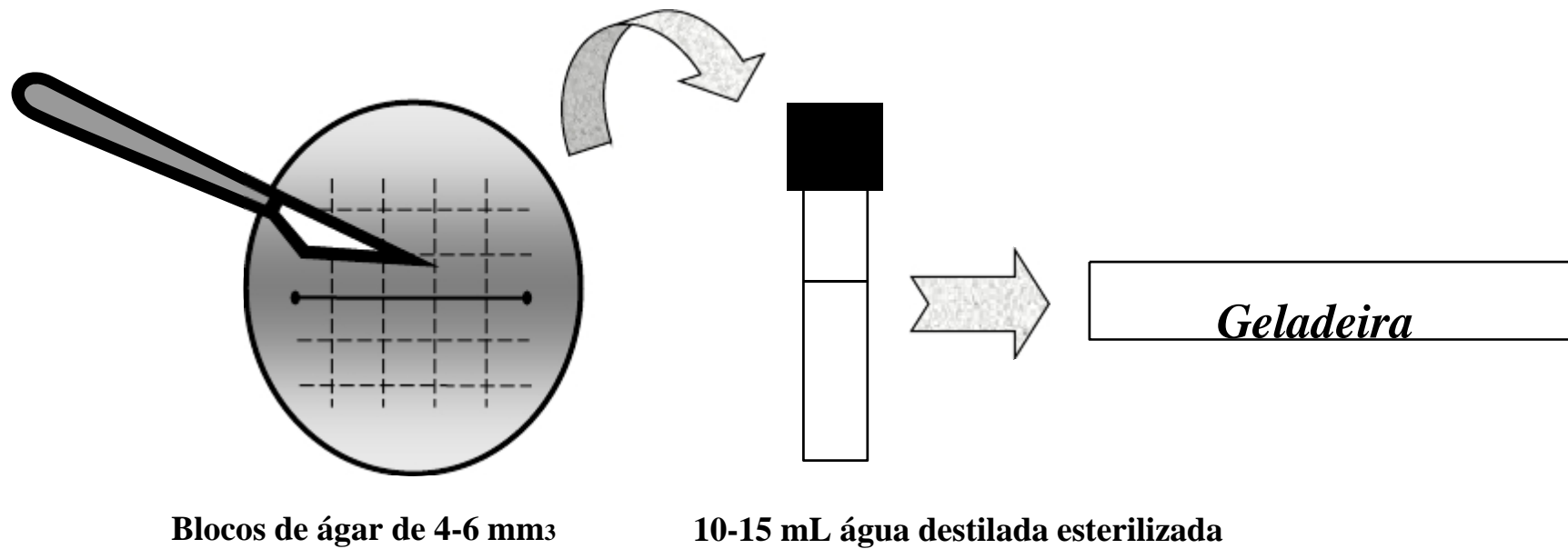




Preservação em água (*Método de Castellani, 1939*)

- **Consiste em transferir um disco ou bloco de meio de cultura contendo estruturas do microrganismo para água destilada esterilizada contida em tubos de vidro.**
- **Restrição: microrganismos que tenham aderência ao ágar (fungos).**
- **Estocagem em condições ambiente ou geladeira.**
- **Periodicidade: mínimo de 2-3 anos.**
- **Reativação: transferência de discos e cubos diretamente para meio de cultura.**
- **Vantagens: custo baixo, fácil manuseio, não infestação por ácaros, baixo risco de contaminação, pouco trabalho para manutenção das culturas**
- **Desvantagens: recuperação da colônia que pode exigir várias repicagens.**

Preservação em água (Método de Castellani, 1939)





Preservação em óleo

- **Consiste em se cobrir a cultura crescida em meio inclinado ou não, com óleo mineral esterilizado**

- **Uso: para fungos e bactérias.**
- **Esterilização de óleo mineral a 121 C por 45' ou duas vezes por 15-20'.**
- **Função do óleo:**
 - reduz tensão de O_2 // reduz metabolismo // reduz crescimento.

- **Estocagem em geladeira ou ambiente.**
- **Periodicidade: mínimo de 2-3 anos**

- **Reativação: transferência de partes da colônia para meio de cultura.**

- **Vantagens: baixo custo, fácil manuseio, não infestação por ácaro, pouco trabalho**
- **para manutenção da cultura, longa viabilidade**

- **Desvantagens: reativação um pouco demorada, risco de contaminação**
- **durante a reativação**

Preservação em óleo



armazenamento em geladeira



Preservação em solo ou areia

- **Consiste na adesão de esporos de fungos ou células de bactéria na superfície de partículas de solo ou areia.**
- **Usar solo ou areia esterilizados.**
- **Colocar em tubos ou pequenos frascos de vidro com tampa de rosca (5g solo/areia).**
- **Esterilizar 2 vezes a 121 C durante 15', com intervalo de 24 horas.**
- **Adicionar 1ml suspensão em água de esporos ou células de bactéria ao solo/areia**
- **Deixar os tubos ou frascos à temperatura ambiente por 10 dias para crescimento.**
- **Estocar os tubos/frascos tampados levemente em geladeira.**
- **Fungos que produzem esporos têm sido mantidos por 10 anos.**
- **Reativação: semeadura de partículas de solo sobre meio adequado.**

- **Vantagens: técnica simples, baixo custo, pouco trabalho para manutenção, viabilidade longa, não há risco de contaminação por ácaros, não altera as características do microrganismo**



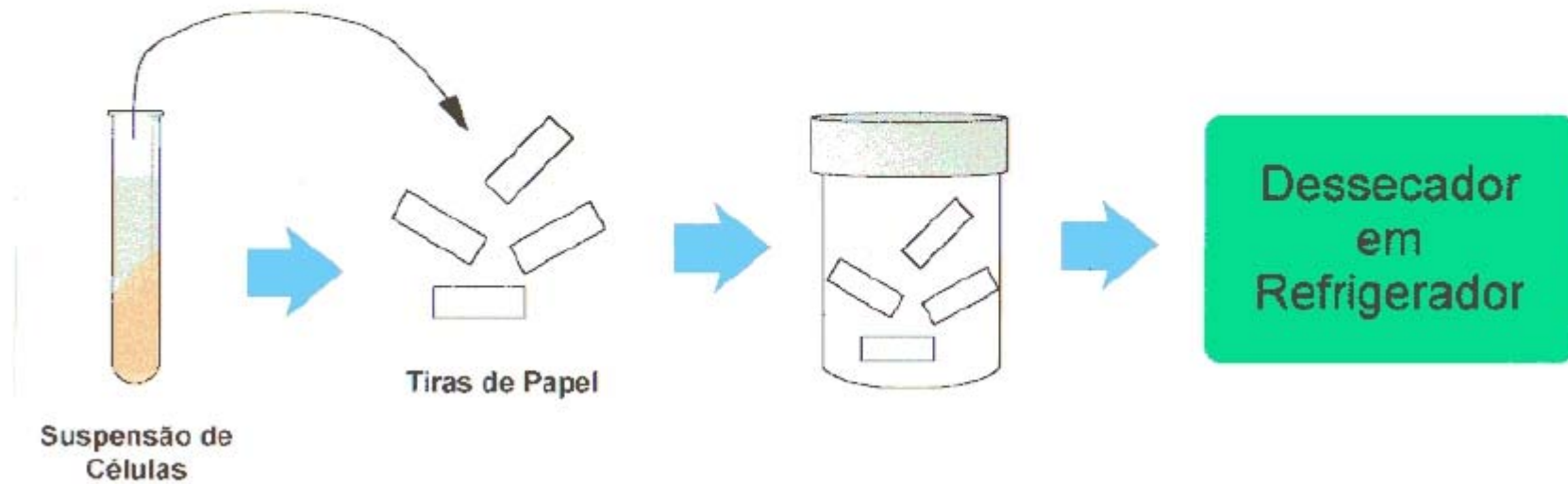
Preservação em disco ou tira de papel

- **Consiste na impregnação de papel de filtro com suspensão de células bacterianas e posterior secagem**
- **Discos e tiras de papel de filtro esterilizados no interior de placas, em estufa**
- **Umedecer o papel com suspensão bacteriana (10⁸ células / ml).**
- **Secar ao ar ou usando vácuo.**
- **Guardar os discos ou tiras em um só tubo/frasco com tampa.**
- **Estocar o material no interior de dessecadores, em geladeira.**
- **Duração: vários anos.**
- **Reativação: discos e tiras são transferidos assepticamente para meio apropriado.**
- **Vantagens: técnica simples, baixo custo, pouco trabalho de manutenção, facilidade para envio de materiais**
- **Desvantagem: talvez período de viabilidade não seja tão longo.**

Preservação em disco ou tira de papel

2. Secagem


c. em discos ou tiras de papel:





Preservação em sílica-gel

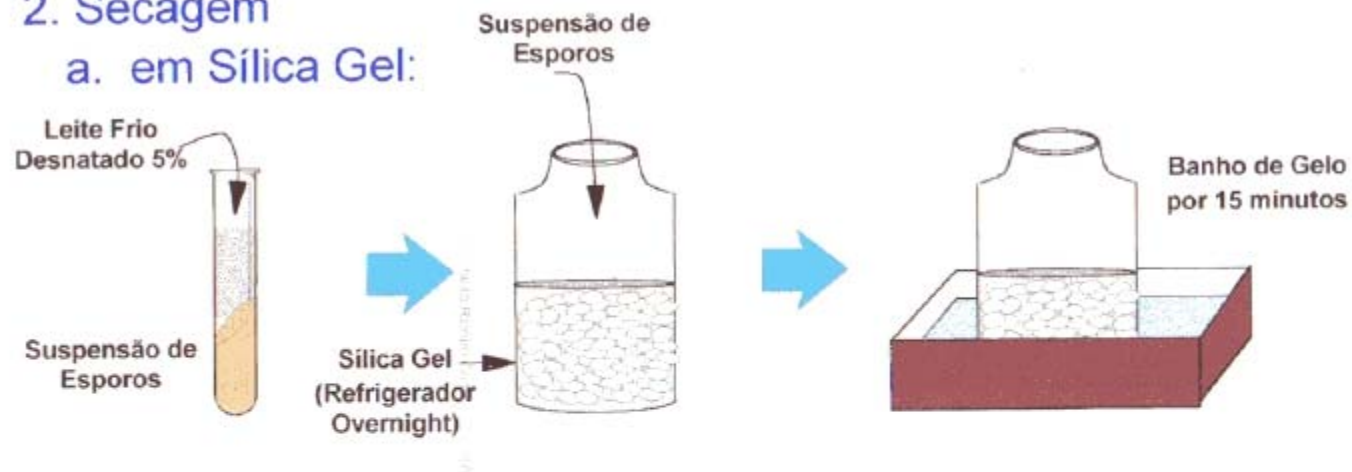
- **Consiste na adesão de esporos de fungos ou células bacterianas na superfície de pequenos cristais ou bolinhas de sílica-gel**
- **Usar sílica-gel purificada de granulometria 1-3mm.**
- **Colocar em tubos de vidro com tampa de rosca até 3/4 do volume do tubo.**
- **Esterilizar em estufa a 180° C por 3 horas.**
- **Resfriar a sílica-gel em banho de gelo por uma noite**
- **Preparar a suspensão de esporos / bactéria em 5% de leite frio desnatado.**
- **Colocar a suspensão fria sobre a sílica gelada, em quantidade suficiente para umedecer 3/4 do volume de sílica-gel contido nos tubos**

- 
- Deixar os tubos em banho de gelo por 15-30'.
 - Manter os tubos tampados levemente por 10-14 dias a 25° C até que os cristais ou bolinhas de sílica-gel estejam totalmente soltos, após leve agitação manual dos tubos
 - Tampar firmemente os tubos.
 - Estocar tubos à temperatura ambiente ou geladeira, em dessecadores contendo sílica-gel
 - Fungos que produzem esporos têm sido mantidos por 7-11 anos.
 - Reativação: semeadura de alguns cristais sobre meio adequado
 - **Vantagens:** técnica simples, baixo custo, pouco trabalho de manutenção, viabilidade longa, não há risco de contaminação por ácaro, não altera as características do microrganismo.
 - **Desvantagem:** técnica limitada a fungos esporulantes, não sendo usada para fungos de micélio e esporos frágeis

Secagem em sílica e em solo

2. Secagem

a. em Sílica Gel:



b. em Solo Estéril:





Preservação em partes do Hospedeiro

FOLHAS

- **Folhas com sintomas são colocadas para secagem entre folhas de papel em prensas de madeira**
- **Secagem à temperatura ambiente ou uso de calor moderado.**
- **Manter as folhas em envelopes de papel, armazenados à temperatura ambiente (local seco)**
- **Recuperação do patógeno:**
 - **por meio de pedaços de tecido da folha colocados em meio de cultura.**
 - **por meio de pedaços de folha colocados em câmara úmida para esporulação do patógeno e transferência de esporos para meio de cultura**



Preservação em partes do Hospedeiro

COLMOS E CAULES

- Colmos e caules infectados por inoculação de patógenos.
- Tecido com estruturas do patógeno é colocado em recipientes fechados.
- Manter sob refrigeração de 5-10° C.
- Exemplo: *Macrophomina phaseolina* (feijão)
Fusarium oxysporum vasinfectum (algodão)



Preservação em partes do Hospedeiro

SEMENTES

- **a) Sementes provenientes de lotes naturalmente infectados.**
- **b) Sementes inoculadas com patógeno desejado.**
- **Armazenamento:**
condições de baixa umidade e temperatura de refrigeração



Estruturas especiais

Uredósporos → Ferrugens do feijoeiro ou do milho

- **Conservados secos em cápsulas de gelatina.**
- **Cápsulas adquiridas em farmácias de manipulação.**
- **Material da cápsula permite certa troca gasosa.**
- **Cápsulas colocadas em vidros pequenos e fechados com tampa.**
- **Vidros são mantidos em vidros maiores contendo sílica -gel.**
- **Manutenção no congelador.**
- **Em um ano, a germinação cai bastante, mas é possível a recuperação.**

Teliósporos → Carvão (cana)

- **Conservados secos em papel manteiga.**
- **Mantidos no congelador.**
- **Duração: meses - um ano.**

Liofilização

Princípio

- Envolve retirada de água do microrganismo por processo congelamento e secagem.
- Conteúdo final de água na amostra liofilizada varia de 2-3 %.
- Atividade metabólica cessa e célula permanece em dormência.
- Primeira etapa: consiste no congelamento.
- Secagem: passagem direta da água da forma de gelo para vapor (sublimação).
- Secagem feita a alto vácuo.
- Equipamento utilizado: Liofilizador

Recuperação

- Abrir ampola e manter em câmara úmida por 4-48 horas.
- Adicionar água esterilizada para dissolver o material.
- Dispor a suspensão sobre o meio de cultura.





Congelamento

Temperaturas:

- Congelador comum: -17 a -24°C
- Congelador especial: -30 a -80°C
- Nitrogênio líquido : -196°C
- Congelamento pode ser usado como um método alternativo para culturas de difícil liofilização, tanto para fungos como para bactérias.
- Suspensão de esporos ou micélio é preparada em glicerol 10%.
- Em ampolas de borossilicato ou criotubos, é colocado 0,5 ml da suspensão e fechadas com maçarico ou tampas.
- Material é pré-congelado a -35°C por 45-60 minutos.
- Em seguida as ampolas ou criotubos são colocados em nitrogênio líquido (-196°C).
- Reativação: colocar ampolas ou criotubos diretamente a 37°C, até desaparecimento do gelo.
- Suspensão é distribuída em meio adequado.
- **Vantagens:** baixo risco de contaminação, manutenção por períodos longos.
- **Desvantagem:** manutenção é cara.