

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CONTRIBUIÇÃO PARA MANUTENÇÃO E INCORPORAÇÃO DE ESPÉCIES  
NO BANCO DE DADOS DE UMA SUBCOLEÇÃO DE CULTURAS DE  
MICRORGANISMOS DA UEA**

MANAUS – AM

2022

JULIANA RAMOS DA SILVA TEIXEIRA

**CONTRIBUIÇÃO PARA MANUTENÇÃO E INCORPORAÇÃO DE ESPÉCIES  
NO BANCO DE DADOS DE UMA SUBCOLEÇÃO DE CULTURAS DE  
MICROORGANISMOS DA UEA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade do Estado do Amazonas – UEA/ENS,  
como requisito para obtenção do título de  
Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Larissa Kirsch Barbosa

Co-orientadora: Dra. Patrícia Melchionna  
Albuquerque

MANAUS – AM

2022

### **Ficha Catalográfica**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

T266cc Teixeira, Juliana Ramos da Silva  
Contribuição para manutenção e incorporação de espécies  
no banco de dados de uma subcoleção de culturas de  
microrganismos da UEA / Juliana Ramos da Silva  
Teixeira. Manaus : [s.n], 2022.  
35 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura  
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

Inclui bibliografia

Orientador: Barbosa, Larissa Kirsch

Coorientador: Albuquerque, Patrícia Melchionna

1. Subcoleção. 2. Microrganismos. 3. Viabilidade. I.  
Barbosa, Larissa Kirsch (Orient.). II. Albuquerque,  
Patrícia Melchionna (Coorient.). III. Universidade do  
Estado do Amazonas. IV. Contribuição para manutenção e  
incorporação de espécies no banco de dados de uma  
subcoleção de culturas de microrganismos da UEA

**Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

JULIANA RAMOS DA SILVA TEIXEIRA

**CONTRIBUIÇÃO PARA MANUTENÇÃO E INCORPORAÇÃO DE ESPÉCIES  
NO BANCO DE DADOS DE UMA SUBCOLEÇÃO DE CULTURAS DE  
MICRORGANISMOS DA UEA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Universidade do Estado do Amazonas –  
UEA/ENS, como requisito para obtenção do título  
de Licenciada em Ciências Biológicas.

Aprovado em:     /     /

Banca Examinadora

---

Dra.

---

Dr.

---

Dr

Dedico este trabalho à minha família por todo esforço, dedicação e investimento para que eu pudesse ingressar no curso e concluí-lo com ânimo. Também dedico aos orientadores deste trabalho pela oportunidade e privilégio de realizar uma pesquisa com uma das subcoleções da UEA.

## **AGRADECIMENTOS**

Com toda gratidão e respeito agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de firmar ainda mais a minha fé através do curso de Licenciatura em Biologia e por ter me mantido forte, corajosa e animada em meio a tantas dificuldades que o ambiente universitário é carregado.

À minha família, amigos, Igreja, professores e orientadores também vão meus sinceros agradecimentos. Com eles pude viver experiências incríveis que contribuíram para que a minha formação fosse marcante.

Por último, agradeço imensamente ao professor Leandro Barreto Dutra por ter sido a maior referência de um professor capacitado e competente a engajar futuros professores em uma sala de aula.

*“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande”*  
(Louis Pasteur)

## RESUMO

Para a preservação de microrganismos com importância econômica, as coleções biológicas têm-se mostrado bastante eficientes, pois se as técnicas de preservação e manutenção forem adequadas, o material biológico manterá suas características viáveis durante períodos prolongados. Com isso, o objetivo desta pesquisa foi reorganizar parte de uma subcoleção da Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CCM/UEA), buscando melhorias da viabilidade celular e aperfeiçoamento do armazenamento dos microrganismos preservados. O desenvolvimento do trabalho foi efetuado em 4 etapas, onde foram selecionadas 25 linhagens preservadas nas técnicas de Castellani e em óleo mineral para realizar a reativação, a identificação a nível de gênero, manutenção e novas preservações. Dentre as 25 linhagens, 6 apresentaram-se inviáveis pelo erro das primeiras preservações realizadas anteriormente ou pela presença de contaminação não sendo possível a purificação, e 15 chegaram à etapa de preservação, porém só foi possível identificar 9 linhagens.

**Palavra-chave:** Subcoleção; Microrganismos; Viabilidade.

## ABSTRACT

For the conservation of economically important microorganisms, biological collections have been shown to be quite efficient, because if conservation and maintenance techniques are adequate, the biological material will maintain its viable characteristics for prolonged periods. Therefore, the objective of this research was to reorganize a subcollection of the Microbiological Culture Collection Center of the Amazonas State University (CCM/UEA), seeking improvements in cell viability and improvement in the storage of preserved products. The development of the work was carried out in 4 stages, where 25 lineages preserved in Castellani and in mineral oil techniques were selected to carry out reactivation, identification at the gender level, maintenance and new preservation. Among the 25 lineages, 6 were unviable due to the error of the first conservations carried out previously or by the presence of contamination, making purification not possible, and 15 reached the conservation stage, but it was only possible to identify 9 lineages.

**Keywords:** Subcollection; Microorganism; Viability.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Linhagem MBT 10340 reativada a partir do método de Castellani (a) e óleo mineral (b).

Figura 2: Linhagem MBT 10249 reativada a partir do método de Castellani (a) e óleo mineral (b).

Figura 3: Microscopia óptica (aumento 40x) da linhagem MBT 10245.

Figura 4: Microscopia óptica (aumento 40x) da linhagem MBT 10246.

Figura 5: Microscopia óptica (aumento 40x) da linhagem MBT 10266.

Figura 6: Microscopia óptica (aumento 40x) da linhagem MBT 10341.

Figura 7: Preparo das preservações em óleo mineral, água destilada, arroz integral e em papel filtro respectivamente.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Microrganismos.....	16
4.2 Reativação de preservados em água destilada e óleo mineral .....	18
4.3 Autenticação de preservados em água e óleo .....	19
4.4 Preservação dos microrganismos em água destilada e óleo mineral .....	19
4.5 Inserção dos novos preservados na coleção.....	20
4.6 Análise de dados.....	20
4.7 Atualização de informações no banco de dados.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS .....	29

## 1 INTRODUÇÃO

As coleções de culturas biológicas são recursos valiosos, pois apresentam características essenciais para o uso sustentável da diversidade microbiana e sua conservação (SHAMA e SHOUCHE, 2014), bem como possuem grande importância para o desenvolvimento de estudos direcionados à contribuição para a economia, cultura, saúde e educação. A preservação de microrganismos com importância econômica em coleções biológicas tem apresentado papéis importantes na área da saúde, indústrias, meio ambiente e descoberta de novos fármacos (DELLARETTI, 2014), pois apresentam informações necessárias para obter um conhecimento prévio da espécie, a qual possuirá ou não, utilidade para uma determinada linha de pesquisa. Essas informações são constantemente atualizadas por meios de trabalhos publicados, mas muitas vezes não são inseridas no banco de dados da coleção.

Como requisito de qualidade de toda instituição, é de extrema importância a atualização do banco de dados, bem como a execução de manutenções periódicas das coleções biológicas para que os microrganismos depositados e suas informações não se apresentem prejudicados no momento necessário de sua utilização em pesquisas diversas e para que mantenham suas características viáveis durante períodos prolongados. Visto que muitas vezes ocorrem contaminações por bactérias ou por outras espécies de fungos, prejudicando o estado dos espécimes, também é indispensável a verificação da viabilidade celular e do estado de preservação das linhagens preservadas.

A inviabilidade celular também é um grande obstáculo para a qualidade da cultura, sendo necessário a reposição de novas preservações à coleção, com uso de técnicas de reativação em meios de cultura diversificados que promovam a esporulação, purificação de colônias contaminadas, juntamente com a autenticação dos microrganismos e posteriores preparos de novos preservados.

Tendo em vista a necessidade de preservar microrganismos amazônicos, no estado do Amazonas foi criada em 2003, na Escola Superior de Ciências da Saúde - ESA juntamente com o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – PPGMBT, uma Coleção de microrganismos. Cinco anos mais tarde, o grupo de pesquisa Química Aplicada à Tecnologia iniciou sua coleção microbiológica. Nesse sentido, em 2010 foi criada a Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CCM-UEA) mantendo-se agora com duas subcoleções: a subcoleção de Química Aplicada à Tecnologia (EST) e a subcoleção dos Programas de Pós-graduação,

localizada na ESA.

No intuito de evitar adversidades envolvendo falta de recursos microbiológicos e inviabilidade dos microrganismos preservados, foi realizada uma contribuição para manutenção de parte de uma subcoleção microbiológica da Universidade do Estado do Amazonas, localizada na Escola Superior de Ciências da Saúde, objetivando melhorias no armazenamento e no estado de preservação dos isolados, seguindo protocolos já estabelecidos pela CCM/UEA, visando o aperfeiçoamento do estado de preservação dos espécimes preservados e enriquecimento do banco de dados.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Reorganizar parte de uma subcoleção da Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CCM/UEA), buscando melhorias da viabilidade celular e aperfeiçoamento do armazenamento dos preservados.

### **2.2 Específicos**

- Verificar a viabilidade celular dos fungos filamentosos preservados em água destilada e óleo mineral;
- Incorporar no banco de dados da subcoleção, informações referentes às características morfológicas e fisiológicas dos fungos filamentosos viáveis;
- Integrar no banco de dados informações oriundas de pesquisas científicas realizadas com os fungos da subcoleção.

## **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

O bioma amazônico é um dos que mais possuem diversidade de seres vivos, sendo os microrganismos representando a maior parte (VERO *et al.*, 2019), porém alguns fatores como o desmatamento e grandes queimadas acabam dissipando ou destruindo uma boa parte dessa biodiversidade. Em outros casos, alguns estudos indicam “que a diversidade de fungos de uma área é afetada diretamente pela idade da floresta, pela composição vegetal e pela qualidade do substrato” (MEDEIROS & CATTANIO, 2015).

Os fungos são microrganismos de grande importância biotecnológica, sendo

empregados nas indústrias farmacêuticas, na produção de alimentos e até mesmo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente (ABREU *et al.*, 2015). Os fungos filamentosos possuem uma grande diversidade de espécies, apresentando características morfológicas e fisiológicas variadas. Tais microrganismos, sob condições adequadas e controladas, são capazes de produzir substâncias desejáveis à produção de produtos comerciais e outros fins (COLEN, 2006). “Como aliados, os fungos podem ajudar a resolver problemas difíceis para a química, como a funcionalização de carbonos não ativados, a remoção sustentável de poluentes em áreas contaminadas e a produção de novos fármacos” (TAKAHASHI *et al.*, 2017). Para a obtenção de bons resultados no decorrer das produções e pesquisas envolvendo esses microrganismos, é necessário mantê-los armazenados em espaços adequados, cuja função de preservação das características da linhagem é mantida.

Fungos como os endofíticos, que habitam no interior das plantas sem causar prejuízos ao hospedeiro, podem trazer vantagens às plantas enquanto produzem seus metabólitos secundários, diminuindo a herbivoria, ataque de insetos, aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (PAMPHILE *et al.*, 2017). Segundo Mafra (2014) as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, constituindo em modelos para síntese de grande número de fármacos. Este autor também afirma que as sementes da espécie *Licaria puchury*-Major, popularmente conhecida como Puxuri, são utilizadas na medicina caseira como carminativas estomáquicas e no tratamento de insônia e irritabilidade de adultos e crianças. Já no trabalho de Azevedo *et al.* (2018) foi realizado um estudo utilizando este o óleo essencial de puxuri como pesticida natural, obtendo-se bons resultados.

Quando estes fungos estão associados a plantas medicinais, seu valor de importância aumenta significativamente em pesquisas, pois o estudo dessas associações pode minimizar o perigo de extinção de algumas espécies de plantas utilizadas para extração de produtos medicinais, garantindo a preservação destas (MUSSI-DIAS *et al.*, 2012) em coleções microbiológicas. Essas coleções de materiais biológicos dão representatividade para grandes e pequenos centros privados e de serviço, possuindo objetivos, políticas e acervos diversificados e que mantêm registros disponíveis há mais de dez anos, no qual até hoje se fazem preservados, viáveis e prontos para serem reativados para usos futuros em trabalhos de pesquisa. Em laboratórios, o uso de microrganismos preservados em coleções de cultura permite, de acordo com Finatti e Aparecido (2009),

desenvolver pesquisas básicas e aplicadas cujos resultados podem ter impactos positivos para melhoria de métodos de manejo e controle de doenças.

Segundo Aranda (2014) um dos principais objetivos de uma coleção biológica é manter a organização, qualificação e preservação dos exemplares *ex situ* e disponibilizar as informações relativas à taxonomia e biogeografia dos preservados. A preservação *ex situ* é uma “estratégia de preservação de componentes da biodiversidade ou de recursos genéticos animal, vegetal e microbiano fora de seu habitat natural, tendo sua manutenção realizada em condições artificiais na forma de bancos de germoplasma vegetal, banco de germoplasma animal e coleções de microrganismos” (JOSÉ *et al.* 2019).

Esse método de preservação é “largamente utilizada no campo da conservação da biodiversidade, sendo considerada indispensável para aumentar as chances de sobrevivência de espécies ameaçadas” (LOUREIRO, 2012), possui mais vantagens do que desvantagens, tornando-se bastante viável para a preservação de material genético de microrganismos em coleções por grandes períodos de tempo, devendo estas estarem operando “de forma controlada pela qualidade e atendendo aos padrões de qualidade exigidos pela comunidade científica” (VERO *et al.*, 2019)

As coleções biológicas contêm vários espécimes preservados em métodos diversificados de preservação *ex situ*, visando a manutenção da viabilidade celular prolongada por décadas, destacam-se a preservação em óleo mineral e água destilada autoclavada ou método Castellani, criopreservação e liofilização. O método de preservação disponibilizada nas coleções irá depender dos recursos disponíveis para tal instituição, que irão auxiliar diretamente em trabalhos de pesquisa. Dentre as técnicas de preservação, Canhos *et al.*, (2004) e Costa *et al.*, (2009) afirmaram que “a preservação em óleo proporciona uma maior longevidade às estirpes, quando comparada à repicagem periódica, bem como redução da velocidade de desidratação do meio de cultura”, porém segundo Amorim *et al.* (2016) os microrganismos preservados em óleo mineral, em comparação com o método de Castellani, tendem a apresentar mais contaminações e inviabilidade quando preservados por longos períodos sem a devida manutenção.

Diogo *et al.* (2005) e Passador *et al.* (2010) citam que a água destilada se caracteriza como forma de preservação de fungos mais prática e barata, uma vez que exige apenas a água destilada armazenada em pequenos vidros, ocupando pouco espaço na coleção. Além disso, há garantia da manutenção das características morfológicas e fisiológicas por períodos mais prolongados, evita a contaminação por ácaros e pode ser

empregada para grande número de gêneros e espécies de fungos.

Outras técnicas para preservação de microrganismos que está sendo bastante utilizada tem como recursos principais o arroz integral e o papel filtro. A preservação em papel filtro é relatada no trabalho de Neto *et al.* (2019) como vantajosa para obtenção de maior crescimento micelial em comparação com outras técnicas como a de Castellani e óleo mineral. Essa técnica também apresenta vantagens como o baixo custo, a não exigência de equipamentos especiais, estabilidade elevada e a não ocorrência de ácaros (Botelho *et al.*, 2013). Já o arroz integral, de acordo com Muller-Fischer (2013), contém amido, proteína, lipídio e minerais, sendo um ótimo substrato capaz de fornecer suporte e nutrição aos fungos, sendo também um bom indutor de esporulação. A vantagem dessa preservação é o baixo custo e alto rendimento do arroz como material principal.

Visto que, durante o processo de preservação nos métodos citados anteriormente, é possível haver contaminação proveniente do ambiente com má esterilização, há necessidade de constante acompanhamento para a análise do estado de preservação do material em coleções, por profissionais da área, para a identificação de necessidades específicas. “O comprometimento institucional e pessoal com o sistema que envolve qualidade, biossegurança e ambiente, agrega mais valor a estes acervos, contribuindo de forma determinante na melhoria das condições de preservação e crescimento, tornando-os mais acessíveis, seguros e confiáveis” (ARANDA, 2014).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Segundo Gil (2002), considerando os procedimentos a serem utilizados, o presente trabalho é classificado como pesquisa experimental, no qual consistiu em determinar os microrganismos que foram utilizados no decorrer da pesquisa, selecionando as variáveis capazes de influenciá-los, como a presença de contaminações, o tipo de preservação e o meio de cultura de reativação e definindo formas de controle e de observação dos efeitos que tais variáveis produzem nos microrganismos.

### **4.1 Microrganismos**

Com intuito de contribuir para a identificação dos microrganismos da subcoleção, foram selecionadas 19 linhagens ainda não identificadas a nível de gênero e 6 já identificadas, totalizando 25 linhagens de fungos filamentosos que haviam sido isolados da planta *Licaria puchry*-Major (quadro 1) e conservadas na subcoleção dos Programas de

Pós graduação da Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CCM/UEA), localizada na Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA). Foram utilizados dois exemplares de cada linhagem preservados em água destilada autoclavada (método de Castellani) e em óleo mineral, totalizando 50 exemplares, que foram reativados e analisados para verificação da viabilidade celular, manutenção e reintrodução dos microrganismos na subcoleção.

Quadro 1 - Dados das linhagens preservadas no método de Castellani e em óleo mineral.

Código	Substrato de coleta	Ano de preservação		Identificação
		Castellani	Óleo	
10245	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10246	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10248	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10249	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10252	<i>Licaria puchury</i> -Major	2010	2011	NID
10261	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10263	<i>Licaria puchury</i> -Major	2010	2011	NID
10266	<i>Licaria puchury</i> -Major	2010	2011	NID
10268	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10269	<i>Licaria puchury</i> -Major	2010	2011	NID
10271	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID

10339	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10340	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10341	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10342	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10343	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10344	<i>Licaria puchury</i> -Major	2010	2011	NID
10351	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	NID
10352	<i>Licaria puchury</i> -Major	2010	2011	NID
10361	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	<i>Phomopsis</i> sp.
10362	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	<i>Phomopsis</i> sp.
10363	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	<i>Phomopsis</i> sp.
10364	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	<i>Phomopsis</i> sp.
10365	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	<i>Phomopsis</i> sp.
10366	<i>Licaria puchury</i> -Major	2011	2011	<i>Phomopsis</i> sp.

Fonte: A autora, 2022. (NID) Não identificado.

#### 4.2 Reativação de preservados em água destilada e óleo mineral

Dos fungos filamentosos preservados em água destilada e em óleo mineral, foram retirados fragmentos do micélio e reativados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose

(BDA) e mantidos a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por sete dias. Inicialmente todos os fungos foram reativados em meio de cultura BDA natural (1 litro infusão de batata, 18g de ágar e 10g de dextrose), porém posteriormente optou-se por utilizar BDA sintético para as próximas reativações e repiques.

Para alguns fungos foi preciso utilizar meios de culturas que induzissem a esporulação, como o ágar aveia e o ágar tomate, ambos bons indutores de esporulação e a exposição à luz. As culturas que apresentaram contaminações após a reativação ou repique, foram purificadas, retirando apenas o micélio da espécie de interesse e em seguida o repique para placa de Petri em meio BDA, seguido de incubação em estufa a  $25^\circ\text{C}$  por 7 dias.

#### **4.3 Autenticação de preservados em água e óleo**

A confirmação das características macro e micromorfológicas das culturas fúngicas foi realizada a nível de gênero, utilizando como chaves de identificação os trabalhos de Klich & Pitt (1988), Pitt (1985) e Watanabe (1937), Zhao et al. (2007) e Matos (2012) e Cordeiro et al. (2009).

Para a análise das características macromorfológicas foram observadas texturas do micélio, relevo, coloração das colônias tendo como referência o catálogo de cores da Suvinil Fresh utilizado como padrão da subcoleção, presença de exudatos e pigmentos. Para a confirmação das características micromorfológicas foram realizadas, primeiramente, a confecção de lâminas oriundas de microcultivo (KONEMAN, 2001) contendo azul de lactofenol e fragmentos de micélio para a verificação das estruturas reprodutivas, e em seguida a utilização das chaves de identificação. Todas as características foram registradas utilizando câmera fotográfica.

#### **4.4 Preservação dos microrganismos em água destilada e óleo mineral**

A realização da nova preservação dos fungos filamentosos que passaram pela autenticação, seguiu um protocolo já estabelecido para a subcoleção. A primeira etapa para a preservação foi desenvolvida no interior do fluxo laminar com auxílio de uma alça de inoculação para a retirada de fragmentos do micélio e lâminas de bisturi para realizar pequenos cortes nas colônias.

Para a preservação dos microrganismos em água destilada autoclavada (método de

Castellani), foram feitos cortes, com lâmina de bisturi e 10 pequenos cubos do micélio foram inseridos em frascos de vidro Penicilina de 10 mL contendo 6 mL de água destilada previamente esterilizada (CASTELLANI, 1967). Logo em seguida os frascos foram tampados e vedados com plástico filme PVC para evitar contaminações.

Para a preservação em óleo mineral, foram retirados fragmentos do micélio dos fungos e repicados para tubos de vidro contendo 10 mL de meio BDA sólido e levados para estufa a 25 °C por 7 dias. Após essas etapas, foram acrescentados 10 mL de óleo mineral esterilizado e o tubo foi fechado com a sua tampa.

No decorrer das atividades foram introduzidas duas técnicas de preservação como novos protocolos das subcoleções da Universidade do Estado do Amazonas, a preservação em arroz integral e a preservação em papel filtro. Para a primeira técnica foram preparados tubos de vidro, que em seguida foram autoclavados contendo 1 cm de arroz integral e 700µL de água destilada. Já a segunda técnica consistiu em preparar tubos *Eppendorf* de 2mL contendo 5 discos de papel filtro umedecidos com água destilada autoclavada. Em ambas as técnicas foram repicados fragmentos miceliais em cubos e em seguida depositados em estufa BOD a 25°C por aproximadamente 7 dias. Após esse período foi acrescentado óleo mineral nos tubos de vidro contendo arroz integral e o micélio do microrganismo.

#### **4.5 Inserção dos novos preservados na coleção**

A subcoleção aderiu como novo protocolo a inserção dos novos preservados em duplicata para a padronização do acervo. A partir disso, os microrganismos utilizados nesta pesquisa foram preparados conforme o novo padrão e em seguida inseridos na subcoleção.

#### **4.6 Análise de dados**

A análise dos dados foi realizada durante e após os procedimentos, para a verificação comparativa do desenvolvimento das atividades. Foram utilizadas planilhas contendo informações das primeiras coletas e conservações, cedidas pela subcoleção.

As linhagens foram consideradas positivas (+) quando viáveis, sendo considerados ótimos crescimentos com possibilidade de purificação caso houvesse contaminação. Já as linhagens registradas como negativas (-) foram consideradas inviáveis pela ausência do desenvolvimento de hifas a partir do fragmento reativado ou com impossibilidade de purificação devido alta presença de contaminações por outras espécies de fungos a partir

do fragmento reativado. Os fungos da mesma linhagem, que estavam preservados no método de Castellani e em óleo mineral, no qual apresentaram características morfológicas completamente distintas, também foram consideradas inviáveis, sendo registradas como (DIF).

#### **4.7 Atualização de informações no banco de dados**

Foi realizado um levantamento para verificar as pesquisas científicas realizadas com os fungos da subcoleção, tomando como base a relação das dissertações e teses publicadas nos Programas de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (PPGMBT/UEA) e em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, desde o início da implementação da subcoleção até os dias atuais, para que os dados obtidos fossem inseridos no banco de dados da subcoleção.

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A partir das reativações dos microrganismos em placas de Petri contendo BDA natural observou-se que a esporulação dos fungos foi lenta, sendo necessário aguardar mais de 20 dias para começar a observar as primeiras esporulações de algumas colônias. Desta forma, optou-se por avaliar a reativação dos fungos em BDA sintético. Essa alteração do meio de cultura reduziu o tempo de esporulação de alguns fungos e foi observado que a presença de contaminações diminuiu.

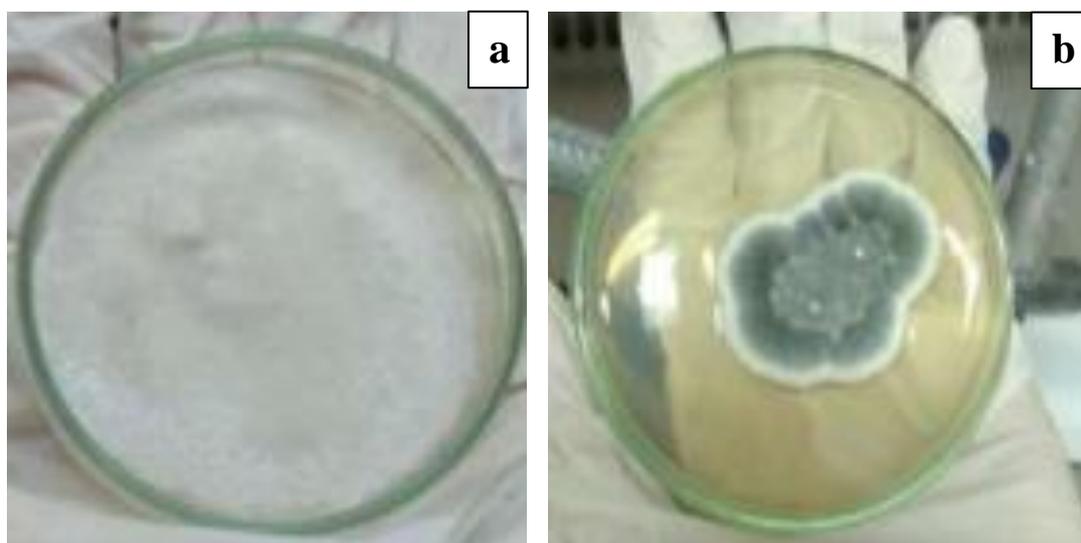
As linhagens que apresentaram esporulação e/ou crescimento micelial muito lento foram MBT 10252, MBT 10246, MBT 10263, MBT 10266, MBT 10268, MBT 10351. Para essas linhagens foi preciso aplicar técnicas que induzissem a esporulação, como exposição à luz, repique para os meios de cultura ágar aveia e ágar tomate (Silva e Teixeira, 2012; Pulz e Júnior, 2009). Os fungos que obtiveram melhores resultados foram os cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar aveia, pois as colônias cujo micélio aparentava uma densidade baixa passou a apresentar uma densidade mais alta. A linhagem MBT 10344 esporulou apenas no meio de cultura ágar tomate. De acordo com o trabalho de Souza e Boava (2018) fungos repicados para o meio de cultura ágar aveia também apresentaram resultados mais promissores em comparação com o ágar tomate.

No decorrer da pesquisa notou-se que durante as primeiras reativações utilizando BDA natural nem todos os fungos estavam apresentando viabilidade, principalmente os que estavam preservados em óleo mineral. Quando essas situações eram registradas,

posteriormente outro fragmento era retirado do mesmo frasco para ser reativado novamente. Quando a inviabilidade do micélio preservado era confirmada, outra reativação da mesma linhagem e mesmo método de preservação era executada, porém utilizando outro frasco com micélio preservado. Ao trocar a utilização do BDA natural para o BDA sintético foi possível obter sucesso de 100% de crescimento micelial após as reativações e os frascos cujo micélio não apresentou crescimento após três reativações foi demarcado como inviável.

Outra marcação em relação a sua inviabilidade ocorreu com a linhagem MBT 10340, no qual todos os fragmentos que foram reativados dos 3 diferentes frascos com microrganismos preservados no método de Castellani apresentaram colônias com características completamente distintas dos fragmentos reativados dos 3 frascos de preservação em óleo mineral (Figura 1).

**Figura 1:** Linhagem MBT 10340 reativada a partir do método de Castellani (a) e óleo mineral(b)



Fonte: A autora, 2022.

A Figura 1(a) apresenta um micélio na cor areia com textura veludosa enquanto a figura 1(b) apresenta um micélio de relevo rugoso na cor verde militar com bordas brancas e textura pulvurulenta. O mesmo ocorreu com as linhagens MBT 10343, MBT 10361, MBT 10362, MBT 10366. Após 3 reativações dos mesmos frascos foi confirmado que houve falhas durante as primeiras preservações, prejudicando a identificação da espécie do

fungo pertencente à linhagem. Para tais microrganismos os responsáveis pela subcoleção tomarão providências para uma nova preservação. Como os 5 fungos apresentaram características macromorfológicas bastante distintas, suas lâminas oriundas de microcultivo não foram preparadas, sendo as linhagens registradas como inviáveis (Quadro 2).

Quadro 2 - Dados obtidos após a reativação das linhagens preservadas no método de Castellani e em óleo mineral.

Código	Método de preservação		Identificação	Preservados e inseridos na coleção
	Castellani	Óleo mineral		
MBT 10245	+	+	<i>Helicomyces</i> sp.	NPR
MBT 10246	+	+	<i>Colletotrichum</i> sp.	NPR
MBT 10248	+	+	<i>Helicomyces</i> sp.	OK
MBT 10249	-	-	NID	NPR
MBT 10252	+	+	NID	NPR
MBT 10261	+	+	NID	OK
MBT 10263	+	+	NID	OK
MBT 10266	+	+	<i>Acremonium</i> sp.	OK
MBT 10268	+	+	NID	OK

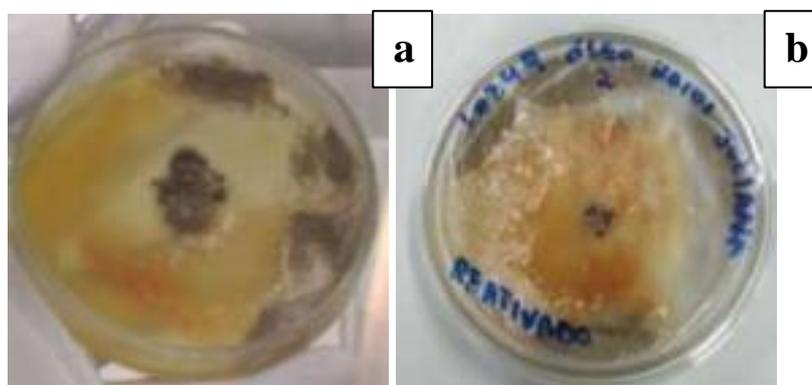
MBT 10269	+	+	NID	OK
MBT 10271	+	+	<i>Helicomyces</i> sp.	OK
MBT 10339	+	+	<i>Helicomyces</i> sp.	OK
MBT 10340	DIF	DIF	NID	NPR
MBT 10341	+	+	<i>Trichoderma</i> sp.	OK
MBT 10342	+	+	NID	OK
MBT 10343	DIF	DIF	NID	NPR
MBT 10344	+	+	NDI	NPR
MBT 10351	+	+	<i>Helicomyces</i> sp.	OK
MBT 10352	+	+	NDI	OK
MBT 10361	DIF	DIF	NID	NPR
MBT 10362	DIF	DIF	NID	NPR
MBT 10363	+	+	<i>Colletotrichum</i> sp.	OK
MBT 10364	+	+	NID	OK
MBT 10365	+	+	NID	OK

MBT 10366	DIF	DIF	NID	NPR
-----------	-----	-----	-----	-----

Fonte: A autora, 2022. (+) Viável; (-) Inviável; (DIF) Mesma linhagem com características diferentes; (NID) Não identificado; (NPR) Não preservado.

Na subcoleção só havia 1 frasco com micélio preservado no método de Castellani e 3 frascos com micélio preservado em óleo mineral da linhagem MBT 10249. Isso dificultou o processo de purificação do micélio reativado do método de Castellani, pois havia contaminação com duas espécies de fungos filamentosos partindo do mesmo fragmento em ambas as conservações. Essa linhagem foi reativada 3 vezes não obtendo sucesso de viabilidade (Figura 2).

**Figura 2:** Linhagem MBT 10249 reativada a partir do método de Castellani (a) e óleo mineral (b).



Fonte: A autora, 2022.

Com relação a identificação micromorfológica, apenas 9 fungos puderam ser identificados em nível de gênero, enquanto 10 fungos não puderam ser identificados devido a ausência de estruturas reprodutivas, apresentando apenas hifas vegetativas na lâmina preparada, com 7 dias de crescimento (Quadro 2). Como as colônias dessas 10 linhagens estavam puras e com características semelhantes entre os reativados das conservações em água destilada e óleo mineral, optou-se por adiantar suas novas conservações para posteriormente serem identificadas com base nas características genéticas. Essa etapa será posteriormente realizada na subcoleção.

As linhagens MBT 10245, MBT 10248, MBT 10271, MBT 10351 e MBT 10339 (Quadro 2) foram identificadas como *Helicomyces* spp., pois apresentaram características semelhantes ao gênero como estruturas reprodutivas em forma helicoidal, hifas septadas (Figura 3). Esses fungos, conforme o trabalho de ZHAO et al. (2007) e MATOS (2012), podem ser comumente encontrados em substratos como madeira em decomposição, no

solo e na água.

**Figura 3:** Microscopia óptica (aumento 40x) da linhagem MBT 10245.



Fonte: Arquivo pessoal.

As linhagens MBT 10246 e MBT 10363 foram identificadas como *Colletotrichum* sp., apresentando conídios cilíndricos, retos com extremidade obtusa, como descrita no trabalho de Cordeiro et al. 2009 (Figura 4).

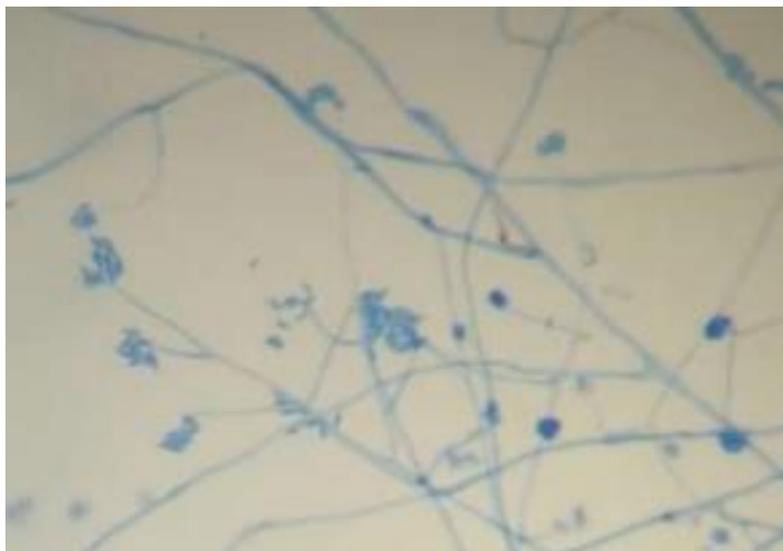
**Figura 4:** Microscopia óptica (aumento 40x) da linhagem MBT 10246.



Fonte: Arquivo pessoal.

Já a linhagem MBT 10266 apresentou características de *Acremonium* como hifas septadas hialinas e conidióforos com conídios aglomerados na extremidade (Oliveira, 2015) (Figura 5).

**Figura 5:** Microscopia óptica (aumento 40x) da linhagem MBT 10266.



Fonte: Arquivo pessoal.

A linhagem MBT 10341 foi identificada como *Trichoderma* sp. Apresentando conidióforos bastante ramificados em vários níveis, onde as divisões primárias originam secundárias menores. As fiáldes encontram-se dispostas em verticilos terminais sobre a ramificação do conidióforo (Figura 6) (Bisset, 1991; Corabi-Adell, 2004).

**Figura 6:** Microscopia óptica (aumento 40x) da linhagem MBT 10341.



Fonte: A autora, 2022.

As linhagens MBT 10252, MBT 10261, MBT 10263, MBT 10268 e MBT 10269, MBT 10342, MBT 10344, MBT 10352, MBT 10364 e MBT 10365 não puderam ser identificadas em nível de gênero, pois só foram encontradas hifas vegetativas impossibilitando encontrar estruturas reprodutivas. Para tais microrganismos será realizada a extração de DNA para identificação em nível molecular.

Após as identificações macro e micromorfológicas, as linhagens MBT 10248, MBT 10261, MBT 10263, MBT 10266, MBT 10268, MBT 10269, MBT 10271, MBT 10339, MBT 10341, MBT 10342, MBT 10344, MBT 10351, MBT 10352, MBT 10363, MBT 10364 e MBT 10365 foram preservados em duplicata nos métodos de Castellani, óleo mineral, papel filtro e arroz integral (Figura 7). Ao aguardar o período de incubação em BOD dos fungos repicados para o arroz integral, notou-se o início da esporulação em um período de aproximadamente 7 dias, sendo mais acelerado em comparação com o repique para o meio de cultura ágar aveia.

No decorrer da pesquisa foi realizado um levantamento para verificar as pesquisas científicas realizadas com os fungos da subcoleção, tomando como base a relação das dissertações e teses publicadas nos Programas de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (PPGMBT/UEA) e em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, desde o início da implementação da subcoleção até os dias atuais, para que os dados obtidos fossem inseridos no banco de dados da subcoleção, mas não foram encontrados trabalhos publicados envolvendo os microrganismos citados nesta pesquisa no site do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

**Figura 7:** Preparo das preservações em óleo mineral, água destilada, arroz integral e em papel filtro



respectivamente.

Fonte: Arquivo pessoal.

## 6 CONCLUSÃO

É de grande valor a contribuição para o enriquecimento de próximas pesquisas o conhecimento das linhagens depositadas na subcoleção da UEA que apresentam uma esporulação lenta no meio de cultura mais utilizado no laboratório do PPGMBT, o BDA sintético, e saber os substratos que induzem a rápida esporulação, para que o pesquisador possa ter grandes sucessos na etapa de reativação e repique.

Com o presente trabalho foi possível contribuir para a ampliação do banco de dados da subcoleção utilizando os resultados obtidos como a identificação a nível de gênero, registros das características macro e micromorfológicas e realização de manutenções, recuperando linhagens inviáveis e inserindo novas preservações no acervo da subcoleção, assegurando o sucesso de futuras pesquisas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S. de; ROVIDA, A. F. S; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, [S.l.], v. 21, n. 1, jan. 2015. ISSN 2178-2571. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1613>. Acesso em: 17 set. 2020.
- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB**. Universitas Ciência da Saúde- vol. 02 n.02 - pp.236-251, 2004. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/271299709\\_Implantacao\\_e\\_manutencao\\_da\\_colecao\\_de\\_culturas\\_de\\_microorganismos\\_do\\_UniCEUB](https://www.researchgate.net/publication/271299709_Implantacao_e_manutencao_da_colecao_de_culturas_de_microorganismos_do_UniCEUB). Acesso em: 17 set. 2020.
- ALBUQUERQUE, Patrícia M. **Ampliação da Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CCM/UEA)**, 2020. Disponível em: <https://www.bionorte.org.br/bionorte/curriculo.html?idc=32796>. Acesso em: 17 set. 2020.
- AMORIM, M. C. O. *et al.* Seminário de iniciação científica da UEFS. **Manutenção e revisão da micoteca do programa de pesquisa de biodiversidade do semiárido brasileiro - PPBIO 2011-2012**, Feira de Santana, BA, 2016.
- APARECIDO, C C; CAMILO, C; LOBO, R S Vaz. **Preservação de Pythium e Phytophthora a -80° C**. São Paulo, p. 6, 2013.
- ARANDA, Arion T. **Coleções Biológicas: Conceitos básicos, curadoria e gestão, interface com a biodiversidade e saúde pública, [...]**. [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: <http://www.sambio.org.br/simbioma/simbioma%20iii/03.pdf>. Acesso em: 01 out. 2020.

AZEVEDO, S. G. *et al.* **Bioactivity of *Licaria puchury*-major Essential Oil against *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*.** Rec. nat. Product 12:3 (2018) 229-238. 2017.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany, v.69, p.2357-72, 1991.

SPCB - SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, VIII., 2013, Salvador, BA. **Avaliação de dois métodos de preservação de *Cercospora coffeicola* [...]**. Salvador, BA: [s. n.], 2013. 4 p.

CANHOS, V. P. *et al.* Diretrizes e Estratégias para a Modernização de Coleções Biológicas Brasileiras e a Consolidação de Sistemas Integrados de Informações sobre Biodiversidade. **Coleções de Culturas e Serviços e Centros de Recursos Biológicos**, São Paulo, 2005.

CASTELLANI, A. A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene, Mclean**, v.70, p.181-184, 1967.

COLEN, Gecernir. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**, 2006. Tese (Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

CORABI-ADELL, Carlo. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. Rio Claro, 2004.

CORDEIRO, A. B. *et al.* **Caracterização morfológica e cultural de isolados de *Colletotrichum spp.*** In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, IV., 2009, Paraná. [...]. [S. l.: s. n.], 2009.

CORRÊA, Wallace R. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%**. São José dos Campos, SP., 2003.

COSTA, E. C. *et al.* **Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas**. Ciência Animal, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

DELLARETTI, Érica Maciel. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. 2014. Monografia (Graduação em Biosistemas) - Universidade Federal de São João Del Rei. Sete Lagoas, 2014.

DIOGO, H. C. *et al.* Investigação Clínica, Epidemiológica, Laboratorial e Terapêutica: **Preservação de fungos em água destilada**, São Paulo, 2005.

MATOS, F. B. **Isolamento e caracterização de fungos isolados de ambiente marinho.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, p.55. 2012.

FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL, P.V.C.; PITTA, G.B.P. Preservação da patogenicidade de alguns fungos conservados em água destilada. **O Biológico**, São Paulo, v.46, p.279-308, 1980

FINATTI, D.; APARECIDO, C.C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação, em laboratório, de isolados do gênero *Verticillium*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.715-720, 2009.

GIL, Antônio C., 1946. **Como elaborar projetos de pesquisa**/Antônio Carlos Gil. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2002, p. 41-55.

GUEDES, A. C. *et al.* Estratégia Nacional de Diversidade Biológica. **Convenção Sobre Diversidade Biológica: Conservação Ex Situ**, Brasília, Outubro 1998.

HOLLAND, N. T. *et al.* Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research**, California, p. 217-234, 2003. Disponível em:

<<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.61.4481&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 18 set. 2020.

OLIVEIRA, Jeferson Carvalhes. **Micologia Médica ao Microscópio – Respostas.** v.4, p.68. Rio de Janeiro, 2015.

JOSÉ, S. C. B. R. *et al.* **Recursos Genéticos: O produtor pergunta, a Embrapa responde.** 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 2019. 304 p.

KLICK, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs.** North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1988. 116 p.

KONEMAN, E *et al.*, **Diagnóstico microbiológico.** Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.p. 996- 1020.

KURY, Adriano B. **Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade,** 2006.

LOUREIRO, M. L. N. M. **Preservação in situ X ex situ: reflexões sobre um falso dilema.** Museu de Astronomia e Ciências Afins. Asensio, Moreira, Asenjo & Castro (Eds.) (2012) SIAM. Series Iberoamericanas de Museología. Vol. 7, 2012.

MAFRA, Eduardo de Souza. **Análise experimental do processo de extração do óleo**

**essencial de puxuri** [*Licaria puchury-major*(Mart.), Kosterm., Lauraceae] **por arraste com vapor**. 2014. Tese (Pós-graduação em engenharia de recursos naturais da Amazônia. Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará. Belém. 2014

MAGALHÃES, Célio *et al.* **Automação de coleções biológicas e informações sobre a biodiversidade da Amazônia**, 2001. Disponível em: [http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias\\_estrategicas/article/viewFile/184/178](http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias_estrategicas/article/viewFile/184/178). Acesso em: 17 set. 2020.

MEDEIROS, P.; CATTANIO, J. H. **Riqueza e relação dos fungos poroides lignolíticos (Agaricomycetes) com o substrato em floresta da Amazônia brasileira**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais, 10(3), 423-436, 2015.

MULLER-FISCHER, N. *et al.* Nutrient-focused Processing of Rice. *In*: BHULLAR, G. S.; BHULLAR, N. K. **Agricultural sustainability: - Progress and Prospects in Crop Research**. [S. l.]: Elsevier Inc, 2013. cap. 10, p. 197-220.

MUSSI-DIAS, V. *et al.* Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.2, p.261-266, 2012.

NETO, José Roberto Chaves; MAZUTTI, Marcio Antonio; ZABOTC, Giovani Leone; *et al.* **Avaliação de diferentes métodos de preservação do fungo *Phoma dimorpha*. Colloquium Agrariae**. v. 15, n. 4, p. 1–10, 2019.

OPLUSTIL, C. P. *et al.* **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 340 p.

PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. **Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”**. *Biológico*, São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010.

PHAMPHILE, J. A. *et al.* Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Revista UNINGÁ**. Vol.53, n.1, pp.113-119. 2017.

PITT, J. I. *et al.* **A laboratory guide to common penicillium species**. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research, 1985. 184 p.

PRODANOV, C. C.; FREITAS, E. C. **Metodologia do trabalho científico: Métodos e Técnicas da Pesquisa e do Trabalho Acadêmico**. 2. ed. Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul: Feevale, 1985. 276 p.

PULZ, P.; JÚNIOR, N. S. M. Efeitos de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. *Summa Phytopathol.*

Botucatu, v. 35, n. 2, p. 121-126, 2009.

RAPER, K. B. *et al.* **The genus *Aspergillus***. Huntington, NY: Robert E. Krieger Pub. Co, 1977. 686 p.

RAPER, K. B. *et al.* **A manual of the *penicillia***. Baltimore MD: Williams & Wilkins, 1949. 874 p.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SAMSON, R. A. *et al.* ***Aspergillus* systematics in the genomic era**. 59. ed. Utrecht, The Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. 210 p.

SHARMA, Avinash; SHOUCHE, Yogesh. Microbial culture collection (MCC) and international depositary authority (IDA) at national centre for cell science, Pune. **Indian journal of microbiology**, v. 54, n. 2, p. 129-133, 2014.

SILVA, J. L. e TEIXEIRA, R. N. V. **Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade**. Revista Agro@mbiente on-line, v. 6, n.1, p. 47-52. Boa Vista, 2012.

SOLA, M. C. *et al.* **Manutenção de Microrganismos: Conservação e Viabilidade**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. – 2012.

SOUZA, A. C.; BOAVA, L. P. **Uso de Diferentes tipos de meio de cultura para esporulação e crescimento micelial de *Alternaria Alternata***. Revista Científica UNAR, Araras,SP, v. 17, n. 2, p. 35-47, 2018.

TAKAHASHI, Jacqueline Aparecida *et al.* Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TIAGO, M. R. N. **Microbiota fúngica cultivável associada às colmeias e castas de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* (Apidae, Meliponini)**. Orientador: Gislene Almeida Carvalho Zilse. 2017. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 2017.

VERO, L. *et al.* **Preservation, Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity: The Perspective of the Italian Network of Culture Collections**. Microorganisms, v.7, n.12, p.685, 2019.

WATANABE, Tsuneo. **Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species**. 2. ed. [S. l.]: CRC Press, 2002. 504 p.

ZHAO, G. Z.; LIU, X. Z.; WU, W. P. **Fungal Diversity. *Helicosporous hyphomycetes from China*** , Beijing, CHINA, v. 26, p. 313-524, 2007.