

Cultivo e preparação de Solução de Esporos de Fungos Filamentosos para serem Aplicados no Desenvolvimento de Biocatalisadores para Produção de Biocombustíveis

Elen Monteiro Macêdo Santos¹, Ellen de Oliveira Santos², João Victor de Oliveira Moura², Eliane Moreira Lima de Almeida³, Kátia Iro Altidis Mota⁴

RESUMO

Quando um aluno do ensino médio tem a oportunidade de iniciar projetos de pesquisa em uma universidade, ele ganha uma série de benefícios que vão além do aprendizado escolar tradicional. Além disso a participação em projetos de pesquisa na universidade proporciona formação científica, amadurecimento pessoal e vantagem acadêmica, preparando o aluno tanto para a vida universitária quanto para o mercado de trabalho. No projeto de pesquisa, *Desenvolvimento de Biocatalisadores, a Base de Células de Fungos Filamentosos*, o aluno trabalhou com o desenvolvimento de quatro soluções de esporos e a quantificação de esporos. No entanto, precisou aprender trabalhar com assepsia; esterilizar meios e materiais; preparar meio de cultura DBA (Ágar Dextrina de Batata); favorecer e acompanhar o crescimento dos 4 tipos de fungos filamentosos: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Rhizopus* e *Aspergillus niger*. Aplicar as técnicas do processo de raspagem do fungo para preparar a solução de esporos para fazer a contagem esporos. Essa experiência permitiu compreender, na prática, conceitos essenciais relacionados à microrganismos, biossegurança e aplicação biotecnológica dos fungos filamentosos. Desenvolvendo maior interesse do aluno do ensino médio em cursar o ensino superior. Formando de competências científicas (curiosidade, investigação, pensamento crítico), aproximação da escola com universidades e institutos de pesquisa e estímulo à democratização da ciência e inclusão social.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia, Microbiologia, aluno do ensino médio.

Cultivation and preparation of filamentous fungal spore solutions for application in the development of biocatalysts for biofuel production.

SUMMARY

When a high school student has the opportunity to initiate research projects at a university, they gain a series of benefits that go beyond traditional academic learning. Participating in university research projects provides scientific training, personal growth, and an academic advantage, preparing students for both university life and the job market. In the research project, "Development of Biocatalysts Based on Filamentous Fungal Cells," the student worked on developing four spore solutions and quantifying them. However, they needed to learn how to work with asepsis; sterilize media and materials; prepare DBA (Potato Dextrin Agar) culture medium; and promote and monitor the growth of four types of filamentous fungi: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Rhizopus*, and *Aspergillus niger*. Apply the techniques of the fungus scraping process to prepare the spore solution for spore counting. This experience provided a practical understanding of essential concepts related to microorganisms, biosafety, and the biotechnological application of filamentous fungi. This increased the interest of high school students in pursuing higher education. It fostered scientific skills

(curiosity, inquiry, critical thinking), fostered closer ties between the school and universities and research institutes, and encouraged the democratization of science and social inclusion.

KEYWORDS: Biotechnology, Microbiology, high school student.

INTRODUÇÃO

O incentivo aos alunos do ensino médio a fazerem parte das pesquisas desenvolvidas na universidade é uma forma de aproxima-los a novas possibilidades de mudança na sua vida, tanto de forma acadêmica como de forma social. As universidades públicas ainda desenvolvem excelência no ensino acadêmico, nos projetos de pesquisa e nos projetos de extensão; transformando a realidade de muitos estudantes e suas famílias. Baseado nisto, introduzir os alunos na pesquisa incentivando a novas descobertas que não são possíveis no ensino médio, os tornam mais preparados para ingressar na universidade e poderem desenvolver o potencial específico de cada um. Há muitos alunos do ensino médio que não tem uma visão positiva de continuar “os estudos”, pois muitos estudantes do ensino médio não têm clareza sobre as oportunidades do ensino superior. Os projetos de iniciação científica podem despertar a curiosidade, desenvolver habilidades de pesquisa e aproximar o aluno do ambiente universitário. Além de estimular o ingresso na universidade, esses projetos ajudam na formação crítica, criativa e cidadã.

Nesse projeto, *Desenvolvimento de Biocatalisadores, a Base de Células de Fungos Filamentosos, para serem Aplicados na Produção de Biocombustíveis*, o aluno pode entender e aplicar o potencial da microbiologia no desenvolvimento de um biodiesel com um processo de produção mais ecológico utilizando os recursos disponíveis no Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia Ambiental (LABIMICRO) do Departamento Ciências Exatas e Naturais (DCEN) no campus Juvino Oliveira da UESB em Itapetinga-Ba, cultivando fungos filamentosos para serem aplicados no desenvolvimento de biocatalisador para produção da enzima lipase.

MATERIAIS E MÉTODOS

O aluno teve noções básicas de assepsia e biossegurança (uso de EPI: jaleco e luvas, máscara). Foi necessário introduzi-lo nos conceitos de trabalho em condições estéreis e saber identificar os materiais de laboratório (autoclave, balança, pHmetro, estufa, capela de fluxo laminar, micropipetas, entre outros).

A primeira prática para quem começa no laboratório foi a instrução sobre o que é um meio de cultura, que é uma solução nutritiva usada para crescimento de um grupo de microrganismos. Foi introduzido os tipos de meios: Sólidos (com ágar) para o isolamento de colônias; os líquidos para o crescimento em massa e os seletivos/diferenciais para selecionam ou distinguem microrganismos.

O trabalho na pesquisa desenvolvido pelo aluno foi a obtenção da solução de esporos e a quantificação de esporos. No entanto, precisou preparar meio de cultura DBA (Ágar Dextrina de Batata), preparado com três partes de ágar, que tem como função conferir maior consistência ao meio e facilitar a raspagem do fungo, para o crescimento de 4 tipos de fungos filamentosos: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Rhizopus* e *Aspergillus niger*. O crescimento do fungo foi realizado em Erlenmeyer de 500 mL com 60 mL para cada. Utilizou-se os Erlenmeyers em triplicata para cada fungo. Além de preparar placas para fazer novos estoques. O meio foi preparado e esterilizado em autoclave por 15 minutos. Ainda quente é distribuído nas placas de Petri e nos Erlenmeyers na câmara de fluxo biológica. Após os meios estarem a temperatura ambiente ocorreu a inoculação dos fungos. Em seguida, o material foi incubado em estufas com temperatura controladas (Tabela 01) para cada tipo de fungo por 8 dias para desenvolvimento dos fungos e formação dos esporos. Na Figura 01 apresenta as placas com os fungos após o crescimento.

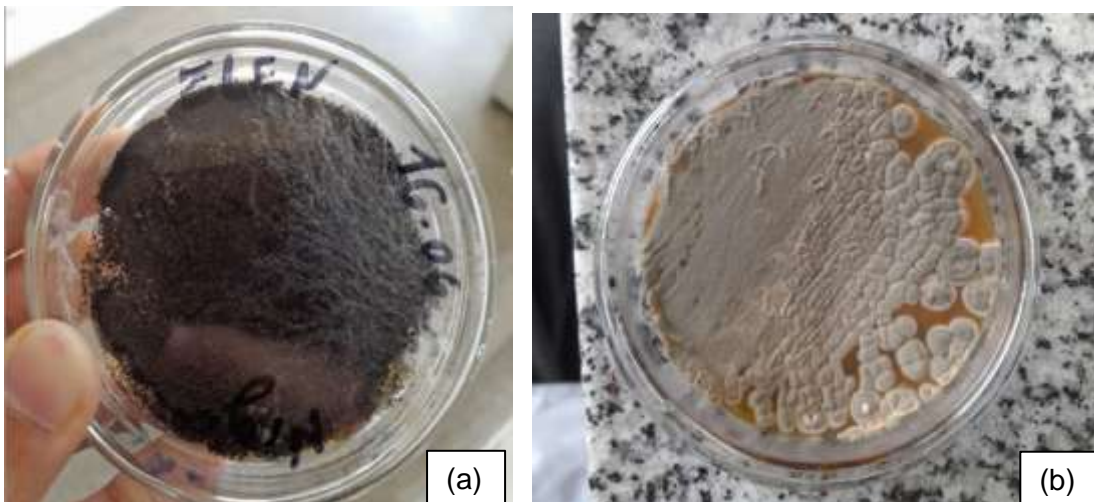


Figura 01: Crescimento dos fungos em placas de Petri desenvolvidos para o estoque da pesquisa (a) Fungo *Aspergillus Niger*. (b) Fungo *Penicillium roquefortii*

Tabela 01: Condições de crescimento dos fungos filamentosos

Fungo	Temperatur a °C	Tempo	Lote da FRIOCRUZ
<i>Aspergillus niger</i>	26°C	10 dias	68840018

<i>Rhizopus microsporus</i> <i>var. oligosporus</i>	25 °C	5 dias	C11240290N
<i>Penicillium camembertii</i>	25 °C	8 dias	079840075
<i>Penicillium roquefortii</i>	24 °C	10 dias	041140074

Após o crescimento dos fungos no Erlenmeyers, os foram levados para a cabine de fluxo onde foi adicionado pérolas de vidro e água estéril para realizar o processo de raspagem do micélio fungico através de movimentos circulares. O atrito gerado entre as pérolas e a estrutura fúngica aderida ao meio promoveu a liberação dos esporos, originando assim a solução de esporos.

A solução obtida foi armazenada em frascos previamente esterilizados por autoclavagem e mantida sob refrigeração, que tem validade da solução é de 30 dias. A contagem dos esporos, utilizou-se a câmara de Neubauer em conjunto com o microscópio óptico. Suspensão diluída a 10^{-1} de esporos foi aplicada sobre a câmara e coberta com lamínula, concentrando a amostra no espaço de 0,1 mm entre a superfície da câmara e a lamínula. Em seguida, procedeu-se à contagem microscópica dos esporos nas áreas delimitadas da grade. Depois da contagem é feita os cálculos conforme a equação:

$$\text{(Média do nº Esporos dos 4 quadrantes)} \times \text{(Diluição da Solução Esporos)}^{-1} \times 10^{+4} = \text{Concentração nº Esporos por ml}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aluno conseguiu desenvolver as técnicas microbiológicas e compreendeu de forma mais aprofundada os conceitos de biotecnologia e sua importância, além de aprender a manipular corretamente fungos filamentosos em ambiente laboratorial. Conseguindo preparar os meios de cultura microbiológica sob orientação adequada para ter rigor e desenvolveu o trabalhar dentro das normas de biossegurança.

Os fungos inoculados foram *Aspergillus niger*, *Rhizopus Penicillium*, *camemberti* e *Penicillium roqueforti* tiveram crescimento adequado para fazer o processo de raspagem e fazer a solução de esporos, que obteve o seguinte resultados tabela 02:

Tabela 02: Apresenta os resultados da contagem de esporos nas 4 (quatro) soluções de esporos dos fungos filamentosos.

Fungo	Contagem esporos em cada quadrante na câmara de Neubauer	Média de Esporos nos 4 quadrantes	Concentração nº Esporos por mL
<i>Aspergillus niger</i>	1º Quadrante=188 esporos	260 esporos	2,6 x 10 ⁵ esporos/mL
	2º Quadrante= 283 esporos		
	3º Quadrante= 266 esporos		
	4º Quadrante= 303 esporos		
<i>Rhizopus microsporus var. oligosporus</i>	1º Quadrante= 390 esporos	332 esporos	3,32 x 10 ⁵ esporos/mL
	2º Quadrante= 308 esporos		
	3º Quadrante= 364 esporos		
	4º Quadrante= 266 esporos		
<i>Penicillium camembertii</i>	1º Quadrante= 545 esporos	475 esporos	4,75 x 10 ⁵ esporos/mL
	2º Quadrante= 542 esporos		
	3º Quadrante= 402 esporos		
	4º Quadrante= 412 esporos		
<i>Penicillium roquefortii</i>	1º Quadrante= 411 esporos	355 esporos	3,55 x 10 ⁵ esporos/mL
	2º Quadrante= 361 esporos		
	3º Quadrante= 373 esporos		
	4º Quadrante= 276 esporos		

CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES

Esse projeto me proporcionou uma experiência ótima de aproximação ao meio científico, me fazendo desenvolver conhecimentos práticos e teóricos nas áreas da microbiologia e da biotecnologia. Essa experiência permitiu compreender, na prática, conceitos essenciais relacionados à microrganismos, biossegurança e aplicação biotecnológica dos fungos filamentosos. Desenvolvendo maior interesse dos estudantes em cursar o ensino superior, formação de competências científicas (curiosidade, investigação, pensamento crítico), aproximação da escola com universidades e institutos de pesquisa e estímulo à democratização da ciência e inclusão social.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Microbiologia de Brockpor Madigan, Martinko e outros (Ed. Artmed, 14^a ed., 2016).
 Microbiologiapor Tortora, Funke, e Case (Ed. Artmed, 12^a ed., 2017).
 Microbiologiapor Trabulsi e Althertum (Ed. Atheneu, 6^a ed., 2015). Biotecnologia microbiana ambientalpor Azevedo, Pamphile, Quecine-Verdi, e Lacava (Ed. Eduem, 2018).
 Microbiologia e Biotecnologia Ambiental in foco – Volume 1(Editora Poisson, 2018).
 Biotecnologia: fundamentos e aplicações por Lima e Mota (Ed. Lidel, 2003).

XXIX Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica 2025

Entidade financiadora da pesquisa: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Campus Itapetinga.