

Mixomicetos do NEDEA (Núcleo Experimental de Educação ambiental)

Luísa Aben-Athar M. Neves, Marina Serra Liuzzi e Vanessa Frajblat



Trabalho de finalização do Curso Médio Técnico de Biotecnologia (2014)

Instituto de Tecnologia ORT do Rio de Janeiro

Orientadora: Dra. Maria Antonia Malajovich



NEDEA
NÚCLEO EXPERIMENTAL
DE ESTUDOS AMBIENTAIS
PETRÓPOLIS



Educando para a vida

RESUMO

Este trabalho consiste no estudo dos mixomicetos, microrganismos do Reino Protista que despertaram nosso interesse pelo fato de ser pouco conhecidos, uma vez que está em aberto a discussão sobre a classificação dos diferentes tipos deles; o celular, o plasmodial, o ameboide, e ainda ter sido desconsiderados do Reino Fungi há não muito tempo atrás.

O projeto foi dividido em três etapas principais; a coleta das amostras, a proliferação *in vitro* e análise do crescimento. Sabendo que para o crescimento deste é preciso um ambiente úmido, foram realizadas coletas no NEDEA, em Petrópolis. A partir das amostras se iniciaram os testes laboratoriais, que previam verificar as melhores condições de cultivo, como a variação do meio a ser usado e da intensidade luminosa. Tendo um crescimento considerável, análises macro e microscópicas foram feitas para a identificação e garantia da presença de tal microrganismo.

SUMÁRIO

TEMA	PÁGINA
1. Introdução	3
2. Mixomicetos do NEDEA	4
2.1. As coletas	4
2.2. Conservação em câmara úmida	5
3. Cultivo em diferentes meios	6
3.1. O meio de ágar-água com flocos de aveia	6
3.2. Meio de cenoura	6
3.3. Inoculações das amostras	7
4. Análise do crescimento	8
4.1. Mixomiceto I	8
4.2. Mixomiceto II	10
5. Observações Microscópicas	12
5.1. Mixomiceto I	12
5.2. Mixomiceto II	14
6. Bibliografia	15

INTRODUÇÃO

Os mixomicetos são microrganismos com características semelhantes a dos fungos em relação aos estágios reprodutivos. Em função disso, eram considerados do Reino Fungi, entretanto, hoje, fazem parte do Reino Protista. Eles podem ser encontrados em diferentes locais da natureza; chão de floresta, troncos de árvores, locais úmidos e sombreados. Existem mais de 800 espécies que podem ser divididas em três principais: a celular, a plasmodial e a ameboide. O ciclo de vida completo dos mixomicetos é dividido em duas etapas, a primeira sendo a trófica que apresenta mixamebas, flagelos (células de enxame) e plasmódios, e a segunda, a dormente, é composta por esporos e outras estruturas reprodutivas. O corpo do mixomiceto é um plasmódio, uma massa ameboide de protoplasma que possui muitos núcleos e parede celular não definida. O plasmódio se transforma em corpo de frutificação que libera esporos. Estes são haploides e normalmente disseminados pelo vento, as vezes por insetos ou chuva. Quando germinam, produzem dois tipos de gametas sexuais, a mixameba ou as células de enxame. Isso porque depende do ambiente no qual o esporo eclode, se for aquático, será uma célula flagelada e se for em ambiente seco, será ameboide. Estes irão se unir a outros gametas sexualmente compatíveis, ou seja, as mixamebas se fundem apenas com as formas ameboides e as flageladas somente com as flageladas.

2. Mixomicetos do NEDEA

2.1. As coletas

Devido a umidade e temperatura de Petrópolis, no dia 16 de Agosto diversas amostras de troncos de árvores que aparentavam ter mixomicetos foram coletadas (figura 2.1).

Analizamos as amostras A e B na lupa óptica (figura 2.2).

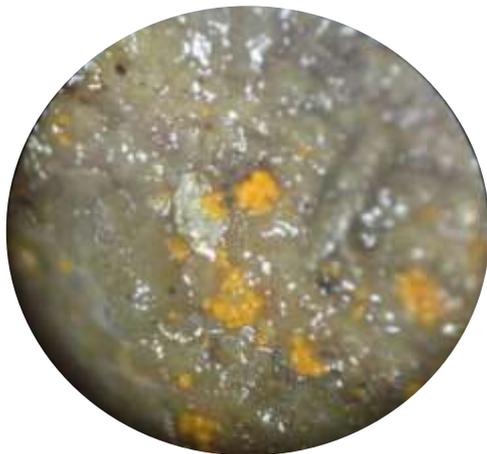
Figura 2.1.



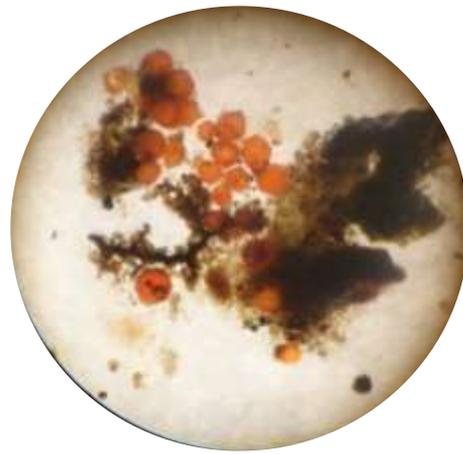
Amostra A

Amostra B

Figura 2.2.



Amostra A (x40)



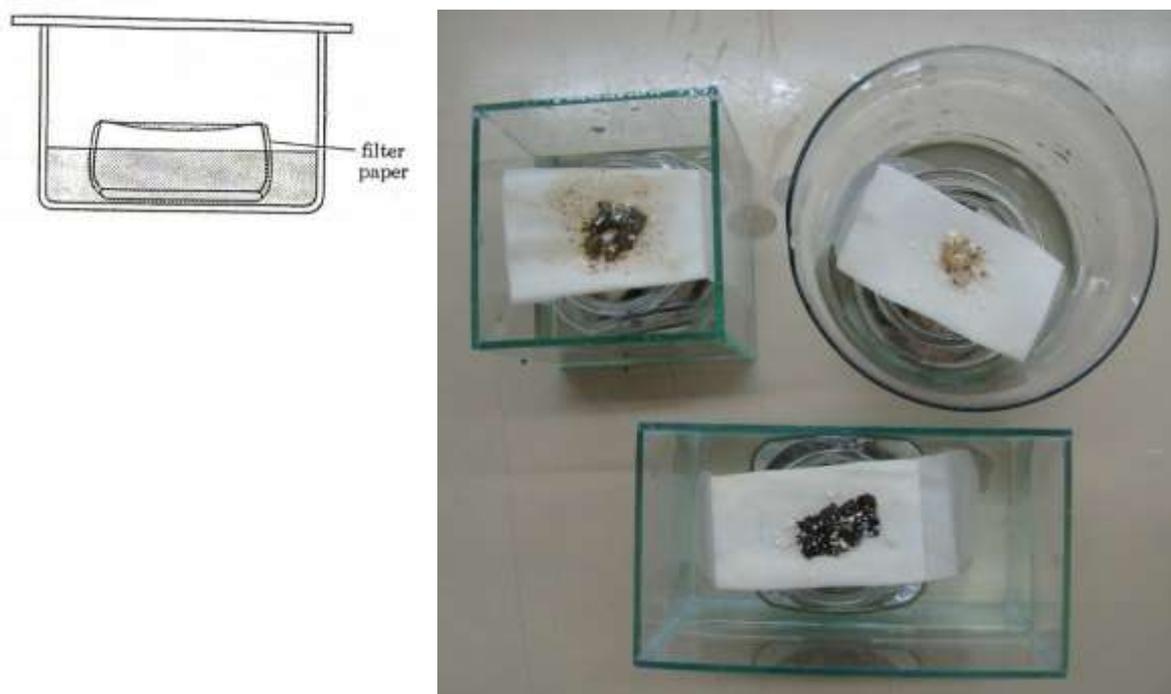
Amostra B (x40)

2.2. Conservação em câmara úmida.

A partir da amostra A de Petrópolis foram montadas duas câmaras úmidas e a partir da amostra B fez-se a terceira câmara. Ela tem como objetivo a proliferação de Mixomicetos, para isso, ela consiste em um sistema que manterá o ambiente úmido e nutritivo. A montagem é a seguinte:

- 1- Coletar dos frascos 1 e 5 de Petrópolis três amostras gelatinosas
- 2- Cortar três pedaços de papel de filtro
- 3- Separar seis frascos. Três grandes e três pequenos de modo que um caiba dentro do outro.
- 4- Macerar a farinha de aveia com o pistilo, para que ela ficasse bem fina.
- 5- Montar o sistema colocando as abas do papel de filtro imersas na água do pote grande, e dentro do pote pequeno colocar água para que ele não flutuasse.
- 6- Em cima do papel de filtro dos três sistemas, colocar cada uma das amostras coletadas.
- 7- Pulverizar aveia em cima das amostras e tampar o sistema com plástico PVC.

Figura 2.3.



3. O CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS

3.1. O meio de ágar-água com flocos de aveia

Composição: Água, 2% de ágar, flocos de aveia.

Preparação

- Pesar 2g de ágar e misturar no recipiente com 100 mL água.
- Esquentar em banho-maria até que o meio esteja bem dissolvido.
- Esterilizar dentro da panela de pressão e aguardar alguns minutos antes de plaquear.
- Tendo solidificado o meio na placa, inocular as amostras de mixomicetos.
- Acrescentar flocos de aveia previamente esterilizadas na extremidade contrária do inóculo.

3.2. O meio de cenoura

Composição: Suco de cenoura, 2% de ágar, água.

Preparação

Retirar a casca da cenoura. Preparar o suco de cenoura com o auxílio do Juicer. Colocar em cada frasco 100mL de solução e 2g de ágar.

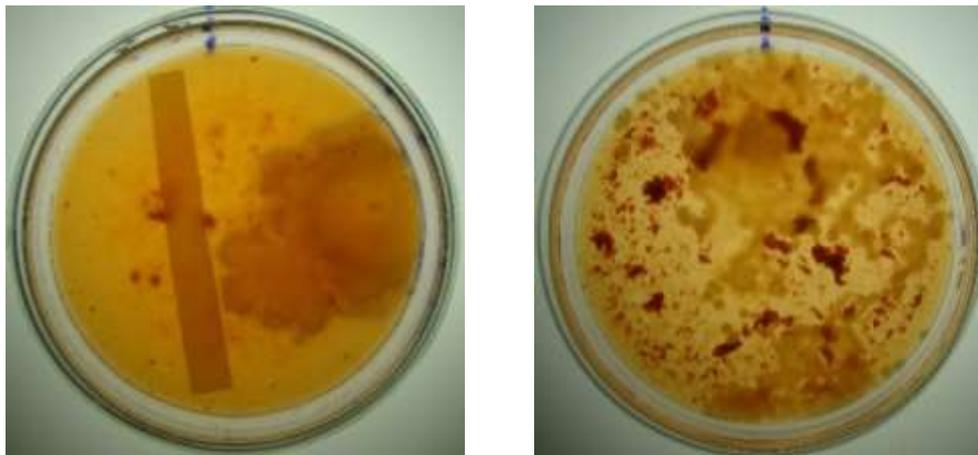
- a) Concentração 1/5: 20mL de suco de cenoura, 80mL de água e 2g de ágar
- b) Concentração 1/10: 10mL de suco de cenoura, 90mL de água e 2g de ágar
- c) Concentração 1/20: 5mL de suco de cenoura, 95mL de água e 2g de ágar

Após preparar os três meios, coloca-los em banho-maria até que estes se dissolvam por completo. Esterilizá-los com a panela de pressão e aguardar alguns minutos para plaquear.

3.3. Inoculações das amostras

Todas as amostras da câmara úmida foram inoculadas com intervalo de dois dias, em diferentes placas. Tendo completado uma semana desde a última placa inoculada, selecionamos as que apresentavam um crescimento semelhante a dos mixomicetos para repicar. O repique foi feito em ambiente estéril para placas com um meio mais nutritivo que as primeiras (ao invés da cenoura ser cozida ela foi triturada no *juicer*). Ao observar que o microrganismo se adaptou ao novo meio, começamos os testes com diferentes variáveis para concluir as condições favoráveis a sua propagação. Observação: As duas formas de crescimento foram muito diferentes (figura 3.1), porem ambas são características dos mixomicetos, logo havia duas espécies distintas. Por não saber com exatidão quais eram, as nomeamos como Mixomicetos I e Mixomicetos II.

Figura 3.1



4. ANÁLISE DO CRESCIMENTO

Para observar o crescimento utilizamos as seguintes variáveis:

- O meio de cenoura com três concentrações (concentrado, médio e diluído) comparado ao meio de ágar-água com flocos de aveia.
- A intensidade luminosa, placas que foram submetidas ao escuro por inteiro, pela metade e placas ao claro.

4.1 Mixomicetos I

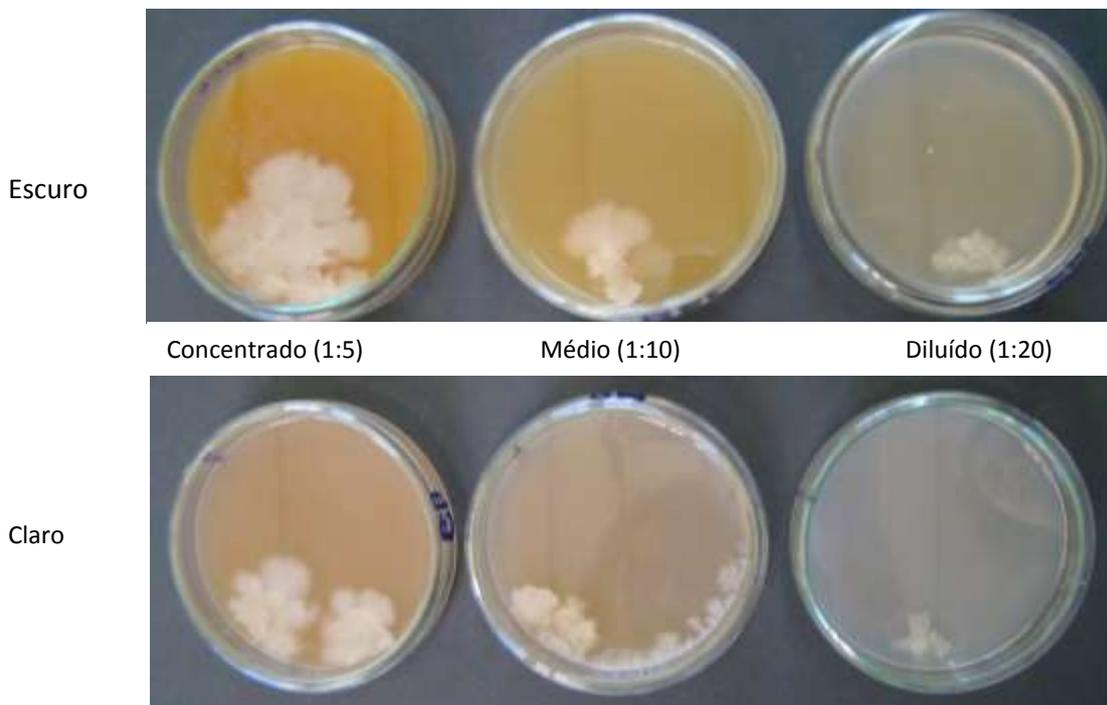
- *Placas de cenoura no escuro:*

O crescimento no escuro também foi de forma proporcional, diminuindo conforme a concentração (Figura 4.1).

- *Placas de cenoura ao claro:*

Foi observado um crescimento proporcional, ou seja, conforme a concentração de nutrientes diminuía o crescimento também (Figura 4.1).

Figura 4.1



- Placas de ágar-água com flocos de aveia:
Não apresentaram crescimento algum (figura 4.2)

Figura 4.2



Conclusão

Analisando a tabela 4.1 e a figura 4.4, é notado que o meio concentrado apresenta um maior crescimento em ambas intensidades luminosas e o diluído, um menor, portanto pode-se pensar que o crescimento é linear. Quando comparadas as placas do escuro e do claro, é visto que o Mixomiceto I se adapta melhor quando não exposto à luz. Os resultados da contagem da superfície coberta (Figura 4.3), que se encontram na Tabela 4.1, confirmam nossas observações.

Figura 4.3

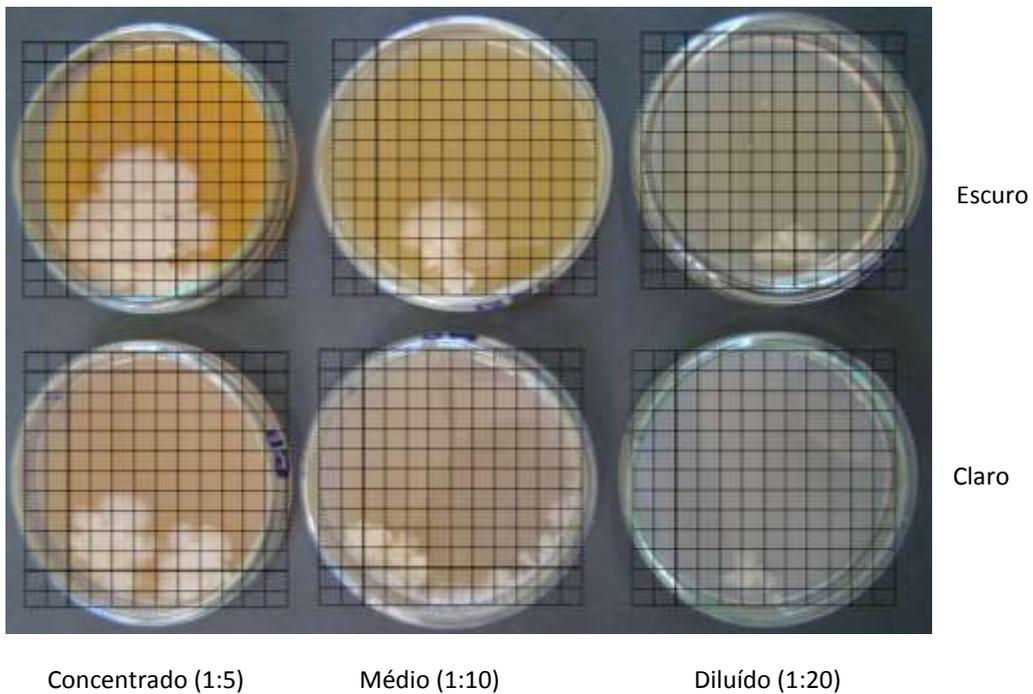


Tabela 4.1: Crescimento do Mixomiceto I nas placas incubadas no escuro e no claro

Superfície coberta (unidades arbitrárias)		
Meio	Escuro	Claro
Concentrado	64	48
Médio	30	26
Diluído	12	8

4.2. Mixomiceto II

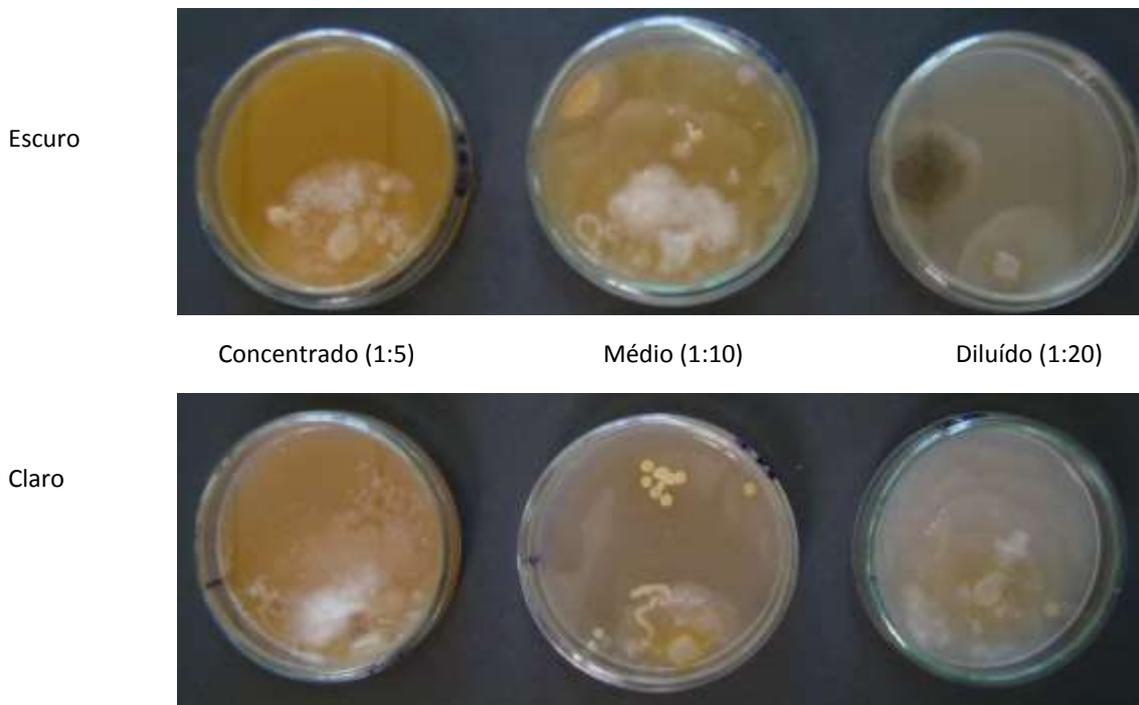
- *Placas de cenoura no escuro:*

Na placa de concentração média foi onde ocorreu o maior crescimento, seguida pela concentrada e por fim a diluída. Houve uma contaminação nas placas médio e diluído (figura 4.6)

- *Placas de cenoura ao claro:*

O meio em que houve o maior crescimento foi o concentrado, seguido pelo diluído e por último, o médio. Na placa concentrada ocorreu uma contaminação (figura 4.5).

Figura 4.5



- Placas de ágar-água com flocos de aveia

Houve crescimento porém em baixa quantidade e este localiza-se em volta dos únicos focos de nutrientes, os flocos de aveia (figura 4.6).

Figura 4.6



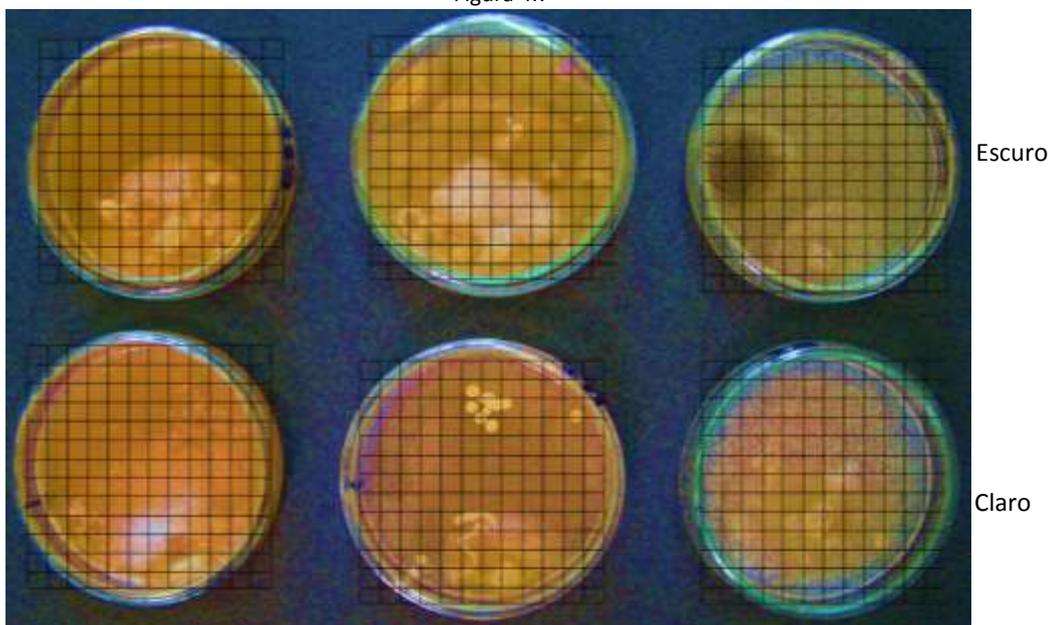
Claro

Escuro

Conclusão

Analisando a tabela 4.2 e a figura 4.7, as placas incubadas no escuro apresentaram um crescimento desregular, tendo como a maior superfície coberta a média, seguida da concentrada e por último a diluída. Comparando as do escuro com as do claro, podemos concluir que no diluído o crescimento é sempre inferior aos outros. E outra importante observação é a enorme diferença entre o crescimento nos meios concentrados, uma vez que o claro obteve mais do que o dobro da superfície coberta no escuro, porém isso não significa que ele se adapte melhor ao claro porque a área ocupada na placa de concentração média, incubada no escuro, é a maior.

Figura 4.7



Escuro

Claro

Tabela 4.2: Crescimento do Mixomiceto II nas placas incubadas no escuro e no claro

Superfície coberta (unidades arbitrárias)		
Meio	Escuro	Claro
Concentrado	49	110
Médio	132 (*)	108
Diluído	30	48

(*) Este valor discordante pode ser devido a uma contaminação ou à disseminação em uma placa úmida.

5. Observações Microscópicas

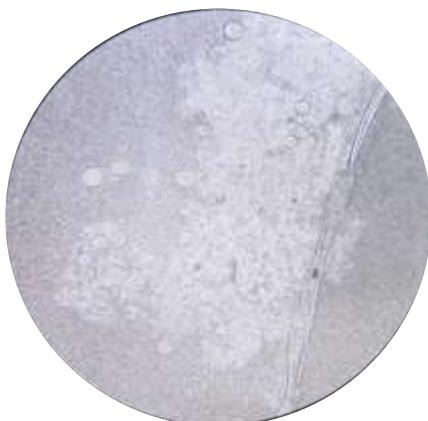
Concluído o crescimento, foram preparadas lâminas para a confirmação da estrutura acelular ou celular no microscópio óptico e as placas foram analisadas no estereomicroscópio.

5.1. Mixomiceto I

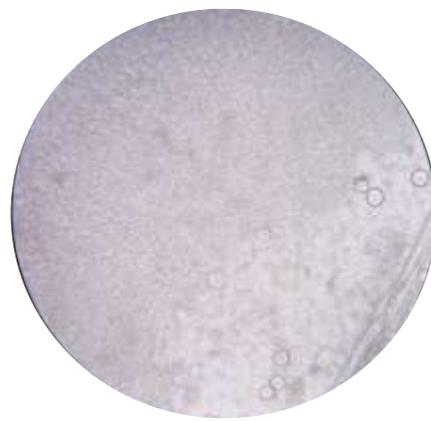
Microscópio óptico

A partir das imagens abaixo podemos concluir que o microrganismo é acelular devido a sua e parede celular não definida (figura 5.1).

Figura 5.1



X400



x400

Estereomicroscópio

Conforme o tempo passou, foi percebida uma mudança de aspecto, a olho nu, sobre o Mixomiceto I. Entretanto, quando visto no estereomicroscópio, essa modificação fica muito mais evidente. Conforme a placa era percorrida, era possível perceber duas fases principais; a que estava mais próxima ao inoculo era formada estruturas parecidas ar vênulas (Figura 5.2, à esquerda) que cresciam uma em cima da outra e a mais distante aparentava ser porosa (Figura 5.2, à direita).

Figura 5.2.



40x



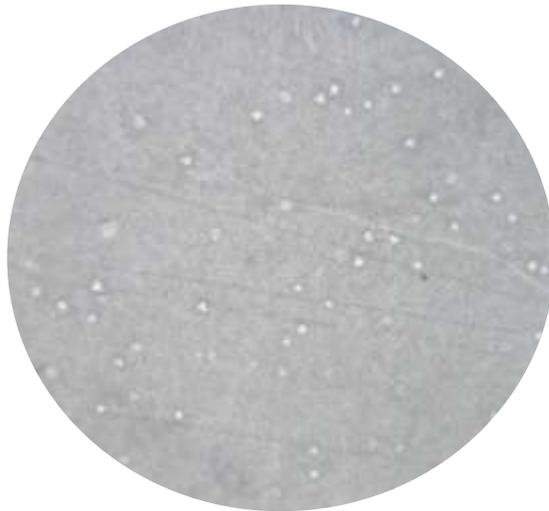
40x

5.2. Mixomiceto II

Microscópio óptico

Com a visualização do microscópio se conclui que a espécie analisada não possui parede celular definida, como pode ser visto na Figura 5.3.

Figura 5.3.



Estereomicroscópio

O Mixomiceto II aparentou ser gelatinoso (Figura 5.4) com a presença de movimentos do plasma, que possivelmente foi visto devido ao calor gerado pela luz da lupa sobre o meio.

Figura 5.4



BIBLIOGRAFIA

CAMPBELL, Neil. **Biologia**, 8ª edição, 2010.

Este link é de onde as instruções para preparação do meio de cultura dos mixomicetos foi retirada: <http://slimemold.uark.edu/pdfs/TheMixomicetos.pdf>

KELLER, Harold W. Mixomiceto Plasmodia and Fruiting Bodies: Unusual Occurrences and User-friendly Study Techniques

Link com informações sobre os Mixomicetos:

http://www.rymich.com/girraween/index.php?section=other&sub=fungi&d1=mixomicetos&page=gi_mixomicetos

MALAJOVICH, Maria Antonia. **Guias de Atividades. Biotecnologia: ensino e divulgação** . Guia 001. <http://bteduc.com>

RAVEN, EVERT, CURTINS. **Biologia Vegetal**, 2ª edição, 1978.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a nossa professora e orientadora Dra. Maria Antonia Malajovich por orientar em toda a confecção do projeto final durante todo o ano de 2014. Também agradecemos ao professor Vitor Soares Mann por nos auxiliar durante as idas ao NEDEA. Queremos agradecer ao Instituto de Tecnologia ORT por nos fornecer os laboratórios com todos os materiais necessários para a realização do projeto.



INSTITUTO DE TECNOLOGIA



EDUCANDO PARA A VIDA

INSTITUTO DE TECNOLOGIA ORT

Rua Dona Mariana 213 - Botafogo

CEP 22280-020 - RJ - BRASIL

Tel. (021) 2539-1842 / FAX (021) 2527-0843

<http://www.ort.org.br>