SEFIC2019
UNIVERSIDADE LA SALLE

Ocorrência de fungos filamentosos no ambiente da seção de coleções especiais da Biblioteca La Salle

Mayara Karsburg Agertt
Universidade La Salle
Anelise Beneduzi da Silveira
Universidade La Salle

Anelise Beneduzi da Silveira (Orientadora)

Tipo do trabalho
Pôster
Tema
Ciências Biológicas
Palavras-chave
Acervo bibliográfico, qualidade ambiental, microrganismos.

OBJETIVO

A pesquisa em questão teve como objetivo quantificar e identificar a nível de gênero e/ou espécie, bactérias e fungos filamentosos coletados em diferentes ambientes da Seção de Coleções Especiais da Biblioteca La Salle/Canoas-RS.

MATERIAL

Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Plate Count Agar (PCA). O micélio das colônias foi raspado e colocado em microtubos contendo 700 μl de solução tampão de extração CTAB 2% (20 Mm EDTA, 0.1 M Tris-HCL pH 8.0, 1.4 M NaCL, 2% CTAB) e 5 μl de proteinase K (20mg). Após homogeneizar os microtubos foi adicionado 500 μl de álcool isoamílico, de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1). O sobrenadante, foi transferido para microtubos e foram adicionados 500 μl de isopropanol gelado. Um fragmento do ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal foi amplificado das amostras em um termociclador Veriti 96 Thermal Cycler (Applied Biosystem) em 25 μl de reação contendo 1 μl de DNA; 2,5 μl de tampão de PCR; 0,1 μl de cada primer BaC; 1 μl de MgCl2 (Invitrogen), 1 μl de DMSO; 1 μ l de cada dNTP (Amersham Biosciences) e 0,2 μl Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia).

METODOLOGIA

As amostras foram coletadas no dia 15/08/2017 no ambiente da Seção de Coleções Especiais da Biblioteca La Salle, de acordo com a metodologia de Abreu et al. (2015). Os pontos específicos do acervo utilizados para a coleta foram: a mesa de leitura (ML), as saídas de ar-condicionado (AC1, AC2 e AC3), os corredores entre as estantes de livros (denominados divisórias D1 a D7) e como controle o lado externo da Seção (LE). As placas com meio de cultura foram deixadas abertas em cada ponto referenciado acima utilizando o método

gravitacional, durante 60 minutos. Continham os meios Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Plate Count Agar (PCA) em triplicatas para contagem de colônias fúngicas e bacterianas, respectivamente. Após a amostragem, as placas foram levadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade La Salle e incubadas por 7 dias em estufa a 28ºC para o crescimento fúngico e por 48 horas em estufa a 35ºC para crescimento bacteriano. Ao término da incubação, foram feitas contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) utilizando-se o método de Contagem Padrão em Placas (CPP) (DOWNES; ITO, 2001) e os resultados expressos em UFC/m3. O Teste ANOVA fator único foi calculado no programa Excel para verificação de diferenças significativas da contagem de fungos entre os locais de coleta, porém o resultado não foi relevante. Foi calculada também a relação entre as contagens de fungos nos ambientes Interno/Externo (I/E) em cada área de acordo com Abreu et al. (2015). Após a contagem, foram selecionadas 45 colônias com diferentes morfologias para a posterior identificação do gênero e/ou espécie a que pertencem. Foram selecionadas 45 colônias com diferentes morfologias para a extração de DNA conforme metodologia de Abreu et al. (2015). O micélio das colônias foi raspado e colocado em microtubos contendo 700 μl de solução tampão de extração CTAB 2% (20 Mm EDTA, 0.1 M Tris-HCL pH 8.0, 1.4 M NaCL, 2% CTAB) e 5 μl de proteinase K (20mg). Após homogeneizar os microtubos foi adicionado 500 μl de álcool isoamílico, de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) e em seguida, o tubo foi homogeneizado novamente no vórtex por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante, foi transferido para microtubos e foram adicionados 500 μl de isopropanol gelado. Um fragmento do ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal foi amplificado das amostras em um termociclador Veriti 96 Thermal Cycler (Applied Biosystem) em 25 μ l de reação contendo 1 μl de DNA; 2,5 μl de tampão de PCR; 0,1 μl de cada primer BaC; 1 μ l de MgCl2 (Invitrogen), 1 μl de DMSO; 1 μl de cada dNTP (Amersham Biosciences) e 0,2 μ l Taq DNA polimerase (Invitrogen). A sequência ITS (aproximadamente 800 pb) foi amplificada utilizando os primers descritos por White et al. (1990): ITS1 (5´TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3´) e ITS4 (5´TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3´). As reações foram realizadas com um ciclo inicial de desnaturação a 94ºC por 5 min, seguido por 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por: 1 fase de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 54°C por 1 min e extensão a 72°C por 45s. A extensão final foi de 72ºC por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia). Os fragmentos obtidos foram sequenciados em uma orientação no laboratório ACTGene do Centro de Biotecnologia/UFRGS/RS, no sequenciador automático ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank através do programa BLASTN (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). As sequências de quatorze isolados fúngicos obtidos neste estudo foram depositadas no banco de dados com os números de acesso MK158297 a MK158310.

RESULTADOS

No total, foram contabilizadas 844 colônias fúngicas, e destas, foram selecionadas 45 com morfologias diferentes. A amostra ML (mesa de leitura) e a divisória D2 tem o maior número de colônias (3,5 e 3,2 x 105 UFC/m3, respectivamente), possivelmente, devido ao fato de ambas estarem próximas a uma parede que contém mofo. Não houve diferença significativa na quantidade de colônias fúngicas encontradas entre os diferentes locais amostrados. O Valor Máximo Recomendável (VMR), para contaminação microbiológica deve ser ? 750 UFC/m³ de fungos de acordo com a Resolução-RE nº 9/2003 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003). Portanto a Seção de Coleções Especiais da Biblioteca La Salle não se encontra dentro das normas para os níveis de contaminação microbiológica. Também foi calculada a relação entre as contagens de fungos nos ambientes Interno/Externo (I/E) em cada área. Valores de I/E acima do 1,5 indicam que a troca de ar do ambiente não está sendo adequada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), portanto, os valores da relação I/E obtidos neste estudo estão favoráveis, entre 0,5 a 1,3, e encontram-se dentro das normas estabelecidas para a preservação de acervos.

CONCLUSÃO

A quantificação de colônias fúngicas realizadas em diferentes pontos no ambiente interno da Seção de Coleções Especiais da Biblioteca La Salle apresentou resultados que não estão de acordo com a legislação vigente no que se refere à qualidade do ar de acervos bibliográficos, apesar do comparativo das contagens dos pontos internos com o externo estarem dentro dos padrões, o que evidencia uma boa troca de ar entre os ambientes. Os microrganismos predominantes nestes ambientes foram os fungos, não havendo uma detecção significativa de bactérias. A maior frequência de isolados foi do gênero Alternaria. De modo geral, os isolados fúngicos encontrados neste estudo são patógenos oportunistas causadores de doenças em indivíduos imunocomprometidos. Entretanto, estes microrganismos podem causar sérios danos aos materiais de acervos bibliográficos que são utilizados como fonte de nutrientes para os fungos. Um diagnóstico de fontes poluentes para uma intervenção corretiva deverá ser realizado, a fim de amenizar a incidência fúngica. Sendo assim, o monitoramento microbiológico de ambientes contendo acervos é de extrema importância, não só para a preservação e conservação dos patrimônios culturais, mas também para manter um bom ambiente à saúde do ser humano.