

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA)

CARGO 57: TECNOLOGISTA PLENO 2 – ESPECIALIDADE: T07

ÁREA DE ATUAÇÃO: MICOLOGIA II - MICOL-II

Prova Discursiva – Questão 1

Aplicação: 24/03/2024

PADRÃO DE RESPOSTA DEFINITIVO

O tema proposto é a preservação de culturas fúngicas pelas técnicas de liofilização e criopreservação. O(A) candidato(a) deve descrever o passo a passo para armazenar amostras do fungo *Moniliophthora roreri*, causador da doença do cacau, pelas técnicas de liofilização e criopreservação.

- Passo a passo da técnica de liofilização

Selecione as culturas-alvo e as cultive em meio de ágar adequado (PDA ou MEA ou **outro meio de cultura para fungos com características nutricionais semelhantes**) em placas de Petri. Esterilize e seque as ampolas tapadas com algodão. Inunde com água esterilizada solução de leite desnatado a placa contendo culturas recém-crescidas e esporuladas, suspendendo esporos e hifas. Transfira a suspensão de esporos para ampolas de vidro. Alternativamente, os micélios, em vez dos esporos, também podem ser liofilizados. Congele a suspensão de esporos em ampolas de vidro **ou outros recipientes adequados ao liofilizador a em torno de -70 °C em freezer ou outro método de ultrabaixa temperatura**, por 4 h a 6 h, **em média**. Coloque as ampolas congeladas/**recipientes** em um vácuo forte na máquina liofilizadora. Conclua a liofilização em dessecador a vácuo. Sele as ampolas de vidro com maçarico **ou recipientes de acordo com procedimento padrão**. Armazene a(s) ampola(s)/**recipiente(s)** liofilizada(s) em geladeira ou as armazene em temperatura ambiente. **Alternativamente, produtos comerciais para liofilização poderão ser utilizados, desde que justificados o princípio do produto na resposta.**

- Passo a passo da técnica de criopreservação

Cultive a(s) cultura(s) em meio de ágar adequado, como PDA/MEA **ou outro meio de cultura para fungos com características nutricionais semelhantes**, em placa(s) de Petri. Corte fragmentos de ágar. Transfira-os asépticamente para um frasco criogênico com glicerol a 10% e rotule esse frasco. Coloque os criotubos bem tampados em recipientes de congelamento com isopropanol. Os recipientes para congelamento devem ser mantidos em **freezer a em torno de -70 °C** por **aproximadamente 4 horas**. Transfira os criotubos congelados para uma criobox pré-resfriada (**em torno de -70 °C**) e armazene **em torno de -70 °C**. Transfira os crioboxes rotulados para os respectivos *racks* e, então, coloque-os no tambor com nitrogênio líquido. Mantenha o inventário de cepas/culturas de fungos criopreservadas.

- Vantagens e desvantagens da técnica de liofilização

A liofilização é um método tecnologicamente sofisticado de armazenamento de longo prazo para preservação da maioria dos fungos conidiais, ascomicetos e basidiomicetos. Na liofilização, o teor de água é reduzido para cerca de 2%-3% por secagem a alto vácuo e o fungo é armazenado na ausência de oxigênio e vapor de água. Os esporos/fragmentos de micélio podem ser liofilizados. A liofilização é a principal técnica usada na maioria das coleções de cultura de serviço geral e laboratório individual. Como vantagem, o método pode ser utilizado para muitos fungos e tem sido mais vantajoso para o envio de culturas por correio. **Podemos destacar, ainda, a estabilidade genética, a facilidade de manutenção e a temperatura de preservação.** Como desvantagem, o equipamento é caro e, como as ampolas liofilizadas são refrigeradas, muitos fungos não sobrevivem.

- Vantagens e desvantagens da técnica de criopreservação

A criopreservação em nitrogênio líquido (LN) é o método mais confiável para armazenamento de microrganismos a longo prazo. Os períodos críticos na criopreservação ocorrem durante os processos de congelamento e descongelamento. Os danos por congelamento podem ser evitados usando-se alguns compostos denominados crioprotetores, também conhecidos como agentes crioprotetores (CPA). A preservação de fungos filamentosos em níveis ultrabaixos de temperatura (-196 °C na fase líquida ou de vapor) foi considerada segura e um dos melhores métodos. A criopreservação de fungos está em prática em muitas das principais coleções de culturas do mundo, sendo um dos métodos mais confiáveis. **A inativação metabólica e a redução de mutações são algumas das vantagens do método.** Como condição mais preferida, uma taxa de resfriamento de -1 °C min⁻¹ com uso de 10% (v/v) de glicerol como CPA é aplicado e relatado como gerador de bom impacto sobre os principais grupos de fungos. **Alternativamente, outros crioprotetores podem ser utilizados, desde que justificada sua utilização na resposta.** O armazenamento

de culturas em nitrogênio líquido, embora simples, envolve relativamente elevados custos de funcionamento, devido à necessidade de enchimento regular dos tambores com nitrogênio líquido.

QUESITOS AVALIADOS

QUESITO 2.1 Descrição do procedimento da técnica de preservação de fungos por liofilização

Conceito 0 – Não descreveu o procedimento da liofilização.

Conceito 1 – Descreveu o procedimento de forma incompleta e com muitos equívocos, deixando de mencionar importantes passos da liofilização.

Conceito 2 – Descreveu o procedimento de maneira incompleta, mas sem equívocos.

Conceito 3 – Descreveu o procedimento de maneira completa, sem equívocos.

QUESITO 2.2 Descrição do procedimento da técnica de preservação de fungos por criopreservação

Conceito 0 – Não descreveu o procedimento da criopreservação.

Conceito 1 – Descreveu o procedimento de forma incompleta e com muitos equívocos, deixando de mencionar importantes passos da criopreservação.

Conceito 2 – Descreveu o procedimento de maneira incompleta, mas sem equívocos.

Conceito 3 – Descreveu o procedimento de maneira completa, sem equívocos.

QUESITO 2.3 Vantagens e desvantagens da técnica de preservação de fungos por liofilização

Conceito 0 – Não apresentou nenhuma vantagem nem desvantagem da liofilização.

Conceito 1 – Apresentou somente vantagem(ns) ou desvantagem(ns) da liofilização.

Conceito 2 – Apresentou somente uma vantagem e uma desvantagem da liofilização.

Conceito 3 – Apresentou pelo menos duas vantagens e duas desvantagens da liofilização.

QUESITO 2.4 Vantagens e desvantagens da técnica de preservação de fungos por criopreservação

Conceito 0 – Não apresentou nenhuma vantagem nem desvantagem da criopreservação.

Conceito 1 – Apresentou somente vantagem(ns) ou desvantagem(ns) da criopreservação.

Conceito 2 – Apresentou somente uma vantagem e uma desvantagem da criopreservação.

Conceito 3 – Apresentou pelo menos duas vantagens e duas desvantagens da criopreservação.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA)

CARGO 57: TECNOLOGISTA PLENO 2 – ESPECIALIDADE: T07 ÁREA DE ATUAÇÃO: MICOLOGIA II - MICOL-II

Prova Discursiva – Questão 2

Aplicação: 24/03/2024

PADRÃO DE RESPOSTA DEFINITIVO

Muitas vezes um único critério não é suficiente para uma caracterização consistente e efetiva de fungos. A abordagem da taxonomia polifásica consiste na utilização de diferentes técnicas baseadas na sistematização do conhecimento científico.

Diferentes metodologias utilizadas nessa abordagem podem e devem incluir a junção de caracteres fenotípicos e genotípicos, ou seja, o uso da taxonomia clássica, química e biomolecular para definição de um táxon.

Assim, existem métodos que auxiliam os taxonomistas no estabelecimento de um conceito consolidado de espécie, dentre eles: caracteres de micro e macromorfologia, análises químicas (perfil de metabólitos, compostos voláteis), bioquímicas e de biologia molecular.

QUESITOS AVALIADOS

QUESITO 2.1 Caracterização morfológica, (tipo / tamanho de esporo, cor da colônia, crescimento da cultura)

Conceito 0 – Descrever sobre o fenótipo e as características fenotípicas de fungos;

Conceito 1 – Descrever quais as principais características fenotípicas utilizadas na classificação de um determinado fungo;

Conceito 2 – Abordar como estes caracteres podem ser utilizados na classificação micológica;

Conceito 3 – Falar sobre a instrumentação utilizada para mensurar as características fenotípicas;

Conceito 4 – Evidenciar as características fenotípicas mais proeminentes na separação de fungos filamentosos e leveduras.

QUESITO 2.2 Caracterização química (perfil de compostos voláteis/aromas, micotoxinas e demais produtos do metabolismo secundário), focra na segurança do microrganismo

Conceito 0 – Conceituar quimiotaxonomia. Abordar os aspectos químicos e bioquímicos de fungos;

Conceito 1 – Descrever sobre os metabólitos fúngicos primários e secundários;

Conceito 2 – Descrever como estes metabólitos podem ser utilizados na taxonomia;

Conceito 3 – Abordar como estes metabólitos podem ser identificados / detectados (Cromatografia líquida e gasosa, TLC, Maldi-TOF, ELISA);

Conceito 4 – Abordar como as enzimas, micotoxinas e outros metabólitos podem contribuir para identificação de fungos.

QUESITO 2.3 Caracterização molecular (sequenciamento de gene de interesse, hibridização, marcadores moleculares, etc..)

Conceito 0 – Definição sobre características genotípicas de microrganismos;

Conceito 1 – Como as características genotípicas, podem ser utilizadas na discriminação de táxons;

Conceito 2 – Marcadores moleculares utilizados na discriminação de fungos o que são e pra que servem. Exemplificar alguns marcadores (ITS, LSU);

Conceito 3 – Que equipamentos são utilizados para análises moleculares de fungos

Conceito 4 – Fazer uma conclusão sobre como a junção de todas as abordagens utilizadas (clássica, química e molecular) podem contribuir para a identificação de espécies.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA)

CARGO 57: TECNOLOGISTA PLENO 2 – ESPECIALIDADE: T07 ÁREA DE ATUAÇÃO: MICOLOGIA II – MICOL-II

Prova Discursiva – Questão 3

Aplicação: 24/03/2024

PADRÃO DE RESPOSTA DEFINITIVO

Reativação, identificação e seleção

A reativação consiste na inoculação do fungo em meio líquido ou sólido para verificar a viabilidade e confirmar características morfológicas.

Na identificação, utilizam-se métodos de análise morfológica, análise macromorfológica, como cor, textura e produção de pigmento, e análise micromorfológica, pela produção de estruturas reprodutivas e comparação com literatura específica. Deve-se complementar com a utilização de métodos moleculares, **com** sequenciando de **pelo menos** a região ITS1-5.8S rRNA-ITS2.

Para a seleção, podem ser utilizados os métodos de difusão em ágar (**difusão em poço/disco ou pareamento**) ou microdiluição.

Purificação e caracterização da biomolécula

A purificação diz respeito à utilização de cromatografia em camada delgada biodirecionada, cromatografia líquida de alta eficiência. Caracterização: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

Otimização e produção em larga escala

A otimização consiste na avaliação de diferentes fontes de carbono, nitrogênio, aeração, pH e temperatura de cultivo, ao passo que a produção em larga escala envolve a produção de pré-inóculo, fermentação, filtração e recuperação do antibiótico.

QUESITOS AVALIADOS

Quesito 2.1

Conceito 0 – Não abordou nenhum dos aspectos do quesito.

Conceito 1 – Abordou corretamente apenas um dos aspectos do quesito.

Conceito 2 – Abordou corretamente apenas dois dos aspectos do quesito.

Conceito 3 – Abordou corretamente a reativação, a identificação e a seleção.

Quesito 2.2

Conceito 0 – Não abordou nenhum dos aspectos do quesito.

Conceito 1 – Abordou corretamente apenas um dos aspectos do quesito.

Conceito 2 – Abordou corretamente a purificação e a caracterização da biomolécula.

Quesito 2.3

Conceito 0 – Não abordou nenhum dos aspectos do quesito.

Conceito 1 – Abordou corretamente apenas um dos aspectos do quesito.

Conceito 2 – Abordou corretamente a otimização e a produção em larga escala.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA)

CARGO 57: TECNOLOGISTA PLENO 2 – ESPECIALIDADE: T07 ÁREA DE ATUAÇÃO: MICOLOGIA II - MICOL-II

Prova Discursiva – Questão 4

Aplicação: 24/03/2024

PADRÃO DE RESPOSTA DEFINITIVO

Os meios de cultura podem ser sintéticos ou não definidos. Os meios não definidos contêm substâncias como extrato de carne e levedura, cuja composição química não é conhecida. Já os meios sintéticos são formulados com compostos químicos de boa qualidade e alto grau de pureza.

Os fatores físicos que impactam o crescimento fúngico são: temperatura, pH, atividade de água, luminosidade e radiação.

Os fungos não conseguem produzir o próprio alimento e necessitam do processo de absorção ou osmotofia.

Os componentes necessários são:

- 1 – Água;
- 2 – Fonte de carbono – carboidratos;
- 3 – Fonte de nitrogênio – peptona e fontes inorgânicas;
- 4 – Minerais como enxofre e fósforo;
- 5 – Pequenas quantidades de minerais específicos, como, por exemplo, potássio, magnésio, cobre e ferro;
- 6 – Vitaminas, por exemplo, tiamina, biotina e riboflavina etc.;
- 7 – Aminoácidos essenciais e não essenciais e purinas;
- 8 – Aeração.

Os métodos de preservação de fungos nem sempre são eficientes e precisam ser adaptados a cada gênero e espécie. Os métodos utilizados podem ser de curto, médio ou longo prazo de manutenção.

Os principais métodos conhecidos na preservação de isolados fúngicos são:

- 1 – Manutenção de colônias em baixa temperatura (4, -20 e -80 graus Celsius);
- 2 – Armazenamento em nitrogênio líquido;
- 3 – Sílica-gel;
- 4 – Óleo mineral;
- 5 – Terriço (solo);
- 6 – Tecidos secos de hospedeiros;
- 7 – Repicagem periódica ou subcultivos;
- 8 – Método de Castellani (água destilada estéril);
- 9 – Liofilização; incluindo Vaccum-drying;
- 10 – Papel de filtro;
- 11 – Liquid-drying (para microrganismos sensíveis ao congelamento) e Spray-drying (secagem por pulverização).

A biorremediação, ou remediação biológica, é uma técnica pautada no redirecionamento do processo de decomposição mediado, em geral, por microrganismos ou plantas para total ou parcial remoção de poluentes. É de conhecimento geral que fungos apresentam uma grande diversidade metabólica e são utilizados para este propósito. Os fungos utilizam dois mecanismos principais para acumular metais pesados: bioadsorção (acúmulo na superfície celular, processo de adsorção físico-químico), e bioacumulação (metais ficam bioacumulados em organelas ou ligados a proteínas intracelulares). Sabe-se que tanto fungos filamentosos (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. etc.) quanto levedura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp. etc.) são utilizados na biorremediação. Uma forma de implementar o processo de biorremediação é o isolamento de novos microrganismos capazes de degradar ou absorber poluentes. Existe uma grande quantidade de fungos, ainda não estudados, provenientes de ambientes degradados e adaptados a esta condição ambiental extrema. As coleções de cultura são essenciais para triagem de fungos com este propósito e, ainda, podem ser manipuladas geneticamente com a introdução de genes para melhoria da eficiência e da resistência.

QUESITOS AVALIADOS

QUESITO 2.1 Principais tipos e constituintes necessários para manter viável a maioria dos fungos cultiváveis

Conceito 0 – Não abordou o tema ou o fez de forma totalmente equivocada.

Conceito 1 – Abordou o tema apenas de forma superficial sem desenvolvê-lo.

Conceito 2 – Abordou o tema de forma inconsistente.

Conceito 3 – Abordou o tema de forma consistente, mas cometeu algum erro conceitual.

Conceito 4 – Abordou o tema de forma adequada e consistente.

QUESITO 2.2 Técnicas utilizadas na preservação de coleção de cultura fúngica aplicadas à saúde e à indústria

Conceito 0 – Não abordou o tema ou o fez de forma totalmente equivocada.

Conceito 1 – Abordou o tema apenas de forma superficial sem desenvolvê-lo.

Conceito 2 – Abordou o tema de forma inconsistente.

Conceito 3 – Abordou o tema de forma consistente, mas cometeu algum erro conceitual.

Conceito 4 – Abordou o tema de forma adequada e consistente.

QUESITO 2.3 Impacto das coleções fúngicas na biorremediação de áreas degradadas por metais pesados

Conceito 0 – Não abordou o tema ou o fez de forma totalmente equivocada.

Conceito 1 – Abordou o tema apenas de forma superficial sem desenvolvê-lo.

Conceito 2 – Abordou o tema de forma inconsistente.

Conceito 3 – Abordou o tema de forma consistente, mas cometeu algum erro conceitual.

Conceito 4 – Abordou o tema de forma adequada e consistente.