



## ESTUDO DOS ESTÁGIOS DE VIDA DO FUNGO *RHIZOPUS STOLONIFER*: INICIAÇÃO A PRÁTICA LABORATORIAL DENTRO DA ENGENHARIA

Samara Rocha Mendes dos SANTOS<sup>1\*</sup>  
Keisyara Bomfim dos SANTOS<sup>1</sup>  
Darcy Ribeiro de CASTRO<sup>1</sup>

Recebido em 17/06/2019
Aceito em 20/08/2019
Publicado em 12/12/2019

**RESUMO:** O trabalho teve como objetivo descrever os estágios de vida do *Rhizopus stolonifer* e analisar da influência dos fatores ambientais (luz, temperatura, umidade e oxigênio) sobre o seu desenvolvimento. Usaram-se oito pães franceses na primeira fase do experimento que teve duração de dez dias, para proliferação do fungo. Para avaliação da umidade, luminosidade e temperatura quatro pães foram umedecidos com 5 mL de água e quatro não foram umedecidos. Esses foram distribuídos em recipientes fechados com tampa e sem tampa, mantidos em ambiente fechado e escuro, quanto em ambiente iluminado. A segunda fase do trabalho envolveu a observação de estruturas macro e microscópicas do *Rhizopus* com auxílio dos microscópios estereoscópio binocular e óptico comum. Constatou-se que meio ácido e a umidade são os fatores determinantes para a formação e germinação dos esporos e desenvolvimento do organismo estudado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bolor de pão. Fatores de crescimento. Estruturas microscópicas.

## STUDY OF THE LIFE STAGES OF THE *RHIZOPUS STOLONIFER* FUNGO: INITIATION TO LABORATORY PRACTICE WITHIN ENGINEERING

**ABSTRACT:** The objective of this work was to describe the life stages of *Rhizopus stolonifer* and analyze the influence of environmental factors (light, temperature, humidity and oxygen) on their development. Eight French loaves were used in the first phase of the experiment lasting ten days for fungus proliferation. For evaluation of humidity, luminosity and temperature four loaves were moistened with 5 mL of water and four were not moistened. These were distributed in closed containers with lid and without lid, kept in a closed and dark environment, as in an illuminated environment. The second phase of the work involved the observation of macro and microscopic structures of *Rhizopus* with the aid of common binocular and optical stereoscope microscopes. It was found that acid and moisture are the determining factors for the formation and germination of spores and development of the studied organism.

**KEYWORDS:** Bread mold. Growth factors. Microscopic structures.

<sup>1</sup>Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Ciências Humanas e Tecnologia (DCHT), Campus XXIV. Rua João Guimarães, s/n, Xique-Xique, BA, Brasil, 47400-000.

\*Autor correspondente: samara\_quixabeira2011@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A Classe Zygomycetes envolve 10 ordens, 32 famílias, mais de 120 gêneros e 800 espécies (BENJAMIN, 1979; BENNY, 2001), mas sujeito a modificações (sistema artificial) já que é uma classificação feita por razões práticas (O'DONNELL et al., 2001). A Ordem Mucorales (13 famílias) e a Família Mucoraceae (23 gêneros) abrangem a maior quantidade de representantes (BENNY, 2001). Hawksworth e Lücking (2017) afirmam que apenas 8% destes fungos são conhecidos pela ciência, principalmente devido à estrutura microscópica da maioria deles.

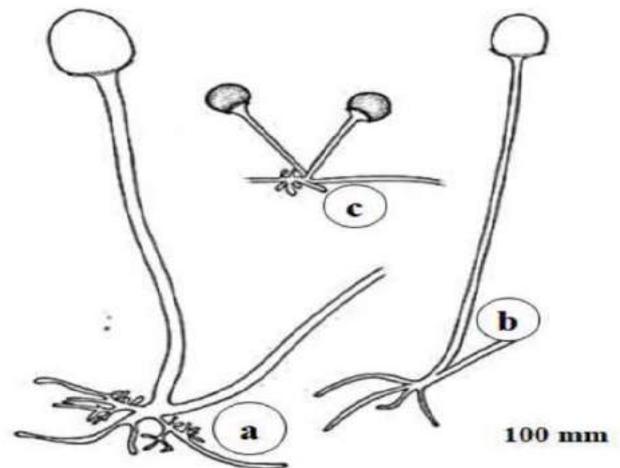
O *R. stolonifer* pertence ao Reino Fungi, Domínio Eukarya, Filo Zygomycota, Classe Zygomycetes, Ordem Mucorales, Família Mucoraceae e Gênero *Rhizopus* (ALEXOPOULOS et al. 1996). O gênero *Rhizopus* foi descrito por Ehrenberg e Fries (1818-20). Vuillemin (1902) e Lind (1913), posteriormente, descreveram a espécie *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb: Fr.) Vuill. (SCHIPPER, 1994).

Os zigomicetos compreendem cerca de 1060 espécies encontradas principalmente nos solos, onde atuam como importantes decompositores. A parede celular desses fungos é formada por quitosano e quitina. O micélio é composto por hifas cenocíticas, exibindo septos unicamente nos órgãos de reprodução ou no momento que a colônia envelhece. Estes fungos têm a aparência de um pano macio ou griscea esverdeado que se desenvolve na superfície do material orgânico em decomposição (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011; BAGGIO, 2013).

A reprodução sexuada gera estruturas designada de zoosporângios que desenvolvem os zigosporos (tipo de esporo). A reprodução assexuada ocorre por fragmentação, devido os fungos possuir grande habilidade de regeneração, ainda podem se reproduzir pela formação de estruturas como clamidósporos (estruturas de resistência, formadas de reserva nutritiva e membrana muito espessa, permitindo resistir aos fatores externos, semelhante aos esporos). Acrescenta-se que as estruturas reprodutivas dos fungos, na maioria dos casos, formam ornamentações muito usadas para identificação das espécies. Estes fungos não

formam corpo de frutificação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2004; SILVA; COELHO, 2006; MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011; BAGGIO, 2013).

A estrutura básica do corpo de um fungo, a exemplo do zigomicota do *Rhizopus* groups são: hifas, rizoides, micélio, esporângio, esporo entre outros. O rizoide tem a função de prender a hifa (corpo alongado) ao substrato. Na sua região terminal, há o esporângio (forma de globo) que abriga os esporos (Fig. 1).



**Figura 1.** Representação esquemática do grupo dos *Rhizopus stolonifer* (a), *Rh. oryzae* (b), e grupo dos *Rh. microsporus* (c) (SCHIPPER, 1994, p. 4).

As hifas são filamentos delgados que formam o corpo dos fungos, estas podem ser cenocíticas ou septadas. As cenocíticas são compostas por inúmeros núcleos espalhados em uma massa citoplasmática comum em decorrência da divisão sucessiva do núcleo e não do citoplasma (Chytridiomycota e Zygomycotas). As hifas septadas possuem uma divisão do citoplasma em septos que possuem um ou mais núcleos (Ascomycota e Basidiomycota). Estes septos possuem perfurações que favorecem a passagem do citoplasma, mitocôndrias e ribossomos e até mesmo de núcleos de um septo para o outro, sendo essa uma exclusividade dos fungos (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011; BAGGIO, 2013). Assim, o fungo cresce com a extensão de suas extremidades que favorece a quebra de sua estrutura, a qual se alonga mediante formação de novas hifas. O fragmento do fungo responsável pela obtenção de nutrientes é chamado de vegetativo (hifa vegetativa), enquanto aquele relacionado

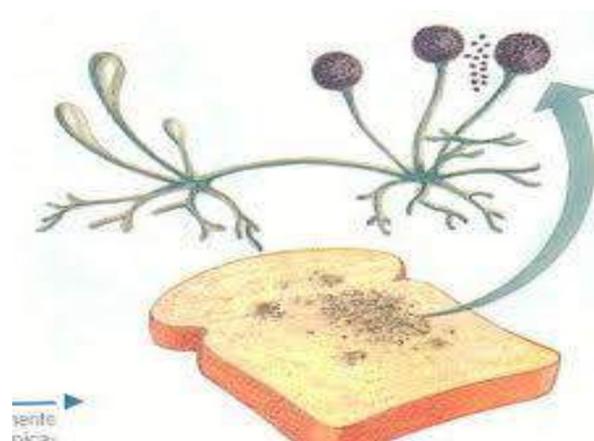
com a reprodução e denominado de hifa aérea ou reprodutiva (TORTORA et al., 2012).

O esporo é uma célula resistente haploide (célula que contém apenas um genoma, simbolizada por  $n$ ) que tem a função de disseminar a espécie, que ao germinar origina indivíduos também haploides. São desenvolvidos através das hifas aéreas de variadas formas, dependendo da espécie. Podem ser assexuais (conidiosporo e esporangiosporo) ou sexuais. Os esporos assexuais originam-se de hifas do indivíduo que ao germinarem são geneticamente iguais ao progenitor, enquanto os sexuais derivam da união de núcleos de duas linhagens opostas no cruzamento de uma mesma espécie de fungo. Este último tipo de esporo é menos comum do que os assexuais e são resistentes à desidratação, ao calor, a seca e a desinfetantes (HIPOLITO, 2009; TORTORA et al., 2012). O esporangiosporo (esporo assexual) é formado no esporângio que é uma espécie de bolsa localizada na terminação do esporangioforo (hifa aérea). Esta bolsa pode possuir uma quantidade grande de esporangiosporos, como no caso do *Rhizopus stolonifer* (TORTORA et al., 2012).

O *R. stolonifer* é um zigomiceto filamentosso composto por hifas cenocíticas, cujo micélio se espalha sobre o substrato, produzindo ocasionais esporângios. Quando os esporângios maduros se rompem, os esporos se dispersam e caso cai em um meio adequado, irão germinar, originando um novo talo de fungo (Fig. 2). Os esporos assexuais do *R. stolonifer* são esporangiosporos, geralmente com coloração preto ou verde. O *R. stolonifer* é responsável pelo bolor preto do pão que cresce em substratos com teores elevados de umidade, ricos em açúcares, como pães, frutas entre outros (CASTRO, 2014).

Os zigomicetos formam hifas largas e irregulares com espessura variável (2 a 60  $\mu\text{m}$ ), podendo se estender até alguns centímetros de comprimento. Formam colônias homogêneas, heterotáticas, sem dimorfismo aparente a não ser funcionalmente mediante reprodução sexuada (+-) com esporos haploides positivos e negativos (SCHIPPER, 1984). A maioria dos esporos mede de 1 a 100  $\mu\text{m}$ . O zigosporo, por exemplo, tem tamanho entre 50 e 100  $\mu\text{m}$  (PAIVA, 2014; ABUL et al., 2007; LIOU, 2005; GAUGER, 1997), O zigosporo maduro (diploide) tem aspecto verrugoso, cor preta e entra em estado dor-

mente num período de 1 a 3 meses (PELCZAR et al., 1996).



**Figura 2.** Reprodução assexuada do *R. stolonifer* (formação de esporos) (CASTRO, 2014, p. 114).

O *R. stolonifer* tem rizoides bem desenvolvidos. Apresenta esporangioforo com dimensões de 2000 x 20-25  $\mu\text{m}$  (comprimento x diâmetro) e agrupados de 1-3 (às vezes mais). Os esporângios são enegrecidos ou marrons com até 275  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A columela marrom em forma cônica-cilíndrica ou de guarda-chuva tem altura acima da metade do esporângio (até 140  $\mu\text{m}$  de altura). Os esporangiosporos têm forma com variação de angular-subglobosa a elipsoidal, cristas distintas na superfície e o zigosporo chega a medir 225  $\mu\text{m}$  (SCHIPPER, 1994).

Os fungos têm ciclo reprodutivo de 7 a 15 dias. O *R. stolonifer* completa seu ciclo em torno de uma semana, quando em condições ambientais favoráveis. Podem liberar mais de 1.000.000 de esporos por  $\text{m}^3$ , sendo que pode mesmo em condições desfavoráveis de oxigenação, umidade e temperatura se reproduzir em menor escala. Há em atmosfera com redução de oxigênio a reprodução assexuada e crescimento vegetativo, enquanto a reprodução sexuada depende de boa disponibilidade de oxigênio. A fase assexuada é mais duradoura no ciclo de vida por conta de uma menor exigência em relação às condições mencionadas para a reprodução.

Os fungos em geral, desenvolvem-se em pH entre 4,5 a 5, mas suportam de 2 a 8,5. A concentração de açúcar aliada à sua pressão osmótica favorece o desenvolvimento deles em contato com o ar (PAIVA, 2014). O *R. stolonifer*, sendo um fungo aeróbio, tem alta capacidade de reprodução em diferentes superfícies (pão, frutas,

armários etc.). A temperatura adequada para seu crescimento e entre 15 e 30° C (SCHIPPER, 1984).

O *R. stolonifer* pode infectar vegetais (estragam grãos), animais/ser humano (zigomícoses), podendo ser através do ar ou dos alimentos utilizados por eles, contendo micotoxinas e outros compostos bioativos (terpenos e esteroides), os quais são respectivamente passivos de degradação e biotransformação a partir das enzimas sintetizadas. Esta biotransformação de substrato envolve a formação de substâncias com atividades biológicas, antimicrobiana, antiumural, antiinflamatória, analgésica, tripanosomicida e anti-HIV. Podem degradar compostos orgânicos resistentes como inseticidas, dioxinas, corantes, dentre muitos. Com isto, acredita-se na sua viabilidade na minimização impactos em diferentes ambientes poluídos (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011; BAGGIO, 2013; PAIVA, 2014).

A variação da quantidade no ar de (esporos) depende de fenômenos naturais ativos como temperatura, umidade relativa do ar, chuvas, entre outros. Assim, com o aumento da temperatura e umidade, é esperada uma quantidade maior de esporos no ar. Fatores em conjunto como luz, chuva, ventos podem também interferir na quantidade de esporos no ar e, portanto, na sua germinação. Na primavera e verão, por exemplo, há uma maior quantidade de esporos no ar do que no inverno (MEZZARI, 2002).

O objetivo do estudo foi objetivo descrever os estágios de vida do *Rhizopus stolonifer* e analisar a influência dos fatores ambientais (luz, temperatura, umidade e oxigênio) sobre o seu desenvolvimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho prático (atividade prática), sob a ótica da investigação, permite a familiarização científica significativa dos estudantes com o método científico em diferentes de níveis da formação escolar (CASTRO, 2014; JOHAN et al., 2014). Esta proposição se fundamenta em autores como Hodson, (1992), Gil-Perez, Navarro e Gonzalez (1993), Carvalho e Gil Perez (2000), Kuhn et al. (2000), Krassilchick (2005), Hansen et al. (2006), Abou Saab e Godoy (2007), Gomes, Borges e Justi (2008), entre outros, que advogam

sobre a pertinência do uso da experimentação como estratégia para o ensino de conceitos científicos na área de biologia.

Este trabalho envolve as seguintes etapas e procedimentos: 1) para coleta de dados: a) prática de campo (organização e execução do experimento fora do laboratório); b) o trabalho laboratorial. 2) análise de dados.

O experimento teve duração de 10 dias, foram realizados oito tratamentos para proliferação do bolor de pão (*R. stolonifer*) em local iluminado e sem iluminação, como pode ser visto na Tabela 1 abaixo:

**Tabela 1.** Ambiente experimental.

Local iluminado			Local sem iluminação		
Pão	não	umedecido	Pão	não	umedecido
recipiente fechado			recipiente fechado		
Pão	não	umedecido	Pão	não	umedecido
recipiente aberto			recipiente aberto		
Pão	umedecido	recipiente	Pão	umedecido	recipiente
fechado			fechado		
Pão	umedecido	recipiente	Pão	umedecido	recipiente
aberto			aberto		

Para observação acerca da estrutura macro e microscópica do *R. stolonifer* e da interferência da luminosidade no seu desenvolvimento, os pães foram submetidos a um ambiente aberto onde as mudanças de luminosidade ao longo do dia não foram controladas. Já o local sem iluminação foi dentro de um armário isolado fechado sem interferência da iluminação natural. Para análise da umidade, os dois pães foram umedecidos com 5 mL de água. Para avaliação do efeito da temperatura, dois pães foram colocados em recipientes plásticos tampados e dois em pratos de vidro sem tampa. Foram feitas observações e registros com câmera fotográfica de celular no 3°, 6° e 10° dias. As análises macroscópicas foram feitas a olho nu e com auxílio de um Microscópio Estereoscópio Binocular (MEB) ou lupa, e as microscópicas com apoio de um Microscópio Óptico Comum (MOC) sob ampliação de 20x. Todas as observações foram feitas entre os dias anteriormente estabelecidos. Para avaliar a interferência do oxigênio, consideraram-se os recipientes abertos e fechados. A descrição da estrutura do fungo *R. stolonifer* na relação com o seu desenvolvimento sob interferência das variáveis (umidade, temperatura, oxigênio e luminosidade sobre o ciclo de vida) foi realizada isoladamente e em conjunto.

Para fins de nortear o desenvolvimento da atividade prática, as seguintes questões foram levantadas: 1) Em que medida pode se relacionar a estrutura celular de fungo com a multicelularidade?; 2) Como é possível distinguir uma fase de vida macroscópica de outra microscópica no ciclo de vida do *R. stolonifer*?; 3) Qual estrutura e o tamanho do micélio, do esporângio e do esporo do *R. stolonifer*?; 4) Quais fatores são determinantes para o desenvolvimento do *R. stolonifer*?; 5) Como se combinam estes fatores e em que condições eles se interagem mais?; 6) O conhecimento sobre a estrutura e função dos organismos do *Rhizopus* pode trazer alguma contribuição socioambiental?

Para cada fase/momento do trabalho, fizeram-se registros com câmera de um celular digital e nota de campo. Os dados foram analisados com vistas a responder aos questionamentos ora referidos conforme os referenciais apresentados. Ressalta-se que os quesitos foram respondidos a partir da observação das etapas experimentais e à luz da teoria correspondente, ora dominado um aspecto ou outro na elaboração do conhecimento em resposta a tais itens.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto em local iluminado quando em local não iluminado todos os pães apresentaram desenvolvimento do fungo *R. stolonifer*, exceto os pães não umedecidos em frasco aberto (Fig. 3) onde se observou apenas o seu endurecimento devido à perda de umidade para o ambiente ao longo dos dias. Abstraiu-se que a luz, para essa condição experimental, foi um fator limitante para a instalação e proliferação do fungo. No último dia de observação, os demais pães ficaram completamente encobertos por fungos em diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 4), os quais podem ser agrupados nas seguintes categorias:

- 1) Os fungos acinzentados;
- 2) Os fungos em crescimento;
- 3) Os fungos com aspecto mais escuro.

### *Fungos acinzentados*

O início do ciclo *R. stolonifer* é caracterizado pela germinação dos esporos;

### *Os fungos em crescimento*

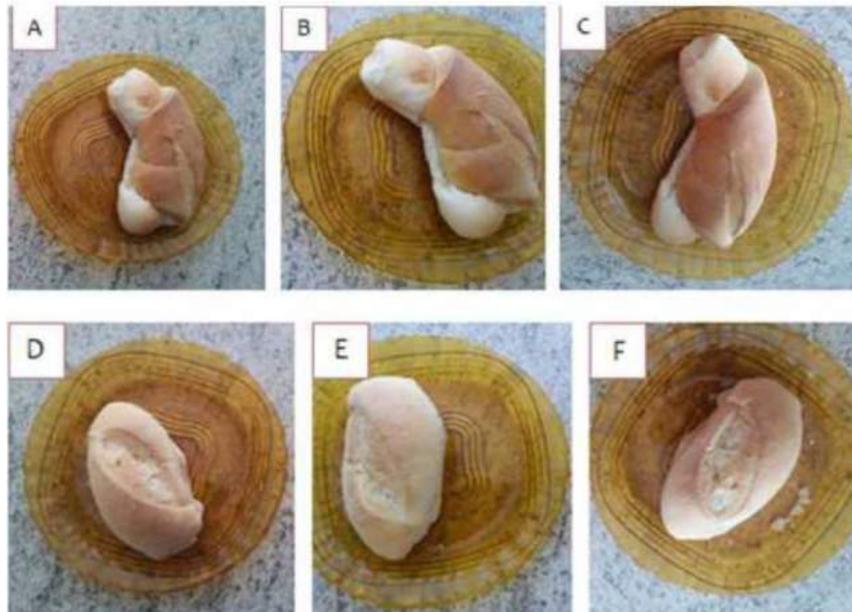
A fase de crescimento do *R. stolonifer* é favorecida pela interferência de fatores como a umidade associado à nutrição e o amadurecimento com a reprodução sexuada;

### *Os fungos com aspecto mais escuro*

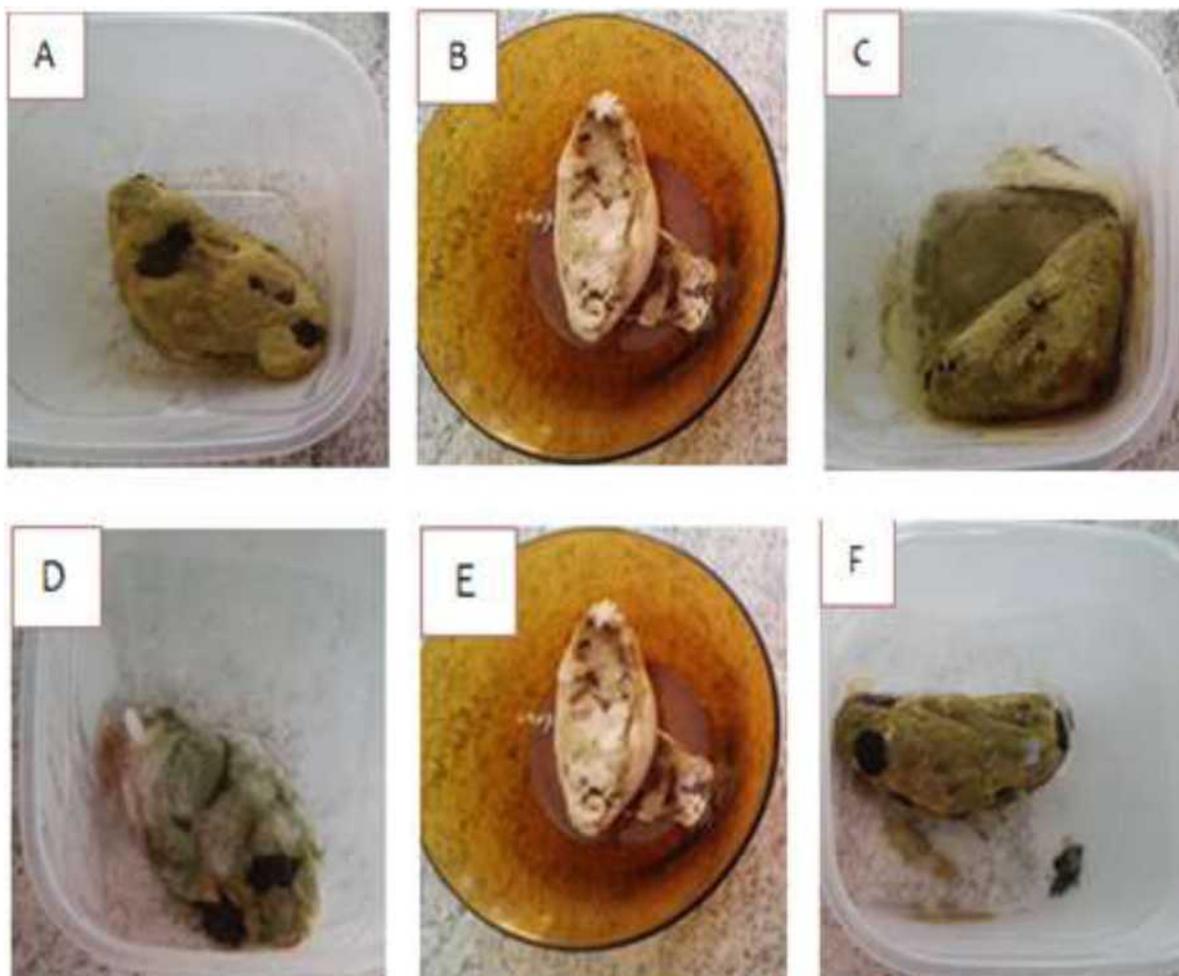
Observa-se o fechamento do ciclo de vida do *R. stolonifer* (cerca de uma semana) em que a fase de reprodução assexuada e possibilitada com a liberação dos esporos.

Os fungos (*R. stolonifer*) têm ciclo de vida curto e estrutura celular simples (hifas cenocíticas e ausência de corpo de frutificação) em relação a outros fungos que tem hifas septadas e presença de corpo de frutificação. Tal caracterização pode contribuir para se compreender sobre a origem dos indivíduos multicelulares com atenção voltada para estudos que envolvem animais, já que se trata de evento biológico que remete a um tempo histórico relativamente equiparável. Neste sentido, foi levantado o seguinte questionamento (questão 1): "Em que medida pode se relacionar a estrutura celular de fungo com a multicelularidade?": Para isto, fez-se alusão a evolução da estrutura celular cenocítica das hifas para a septada na sua relação com desenvolvimento da multicelularidade. Uma hifa cenocítica indica estágios primeiros do desenvolvimento dos organismos em que forma tecidos sem a separação das células, enquanto a septada já possibilita uma estruturação melhor dos tecidos com a separação das células por septos, que facilita uma melhor organização e distinção do material celular. Esse fato despertou nos participantes a curiosidade e a necessidade de compreender melhor como e quando foram desenvolvidas as primeiras formas de vida multicelular. Então se fez menção às teorias desenvolvidas no século XIX e início do século XX, sobre origem da vida multicelular (metazoários e dos metáfitos).

Outra questão que se aproxima do excerto anteriormente discutido é a questão 2 ("Como é possível distinguir uma fase de vida macroscópica de outra microscopia no ciclo de vida do *R. stolonifer*?"). Para explicar tal quesito, houve uma descrição acerca da estrutura e tamanho dos esporos, com elucidação da distinção de tamanho entre este o micélio observado a olho nu e das mudanças ocorridas com o fungo no ciclo reprodutivo (pontos escuros iniciais pequenos, cres-



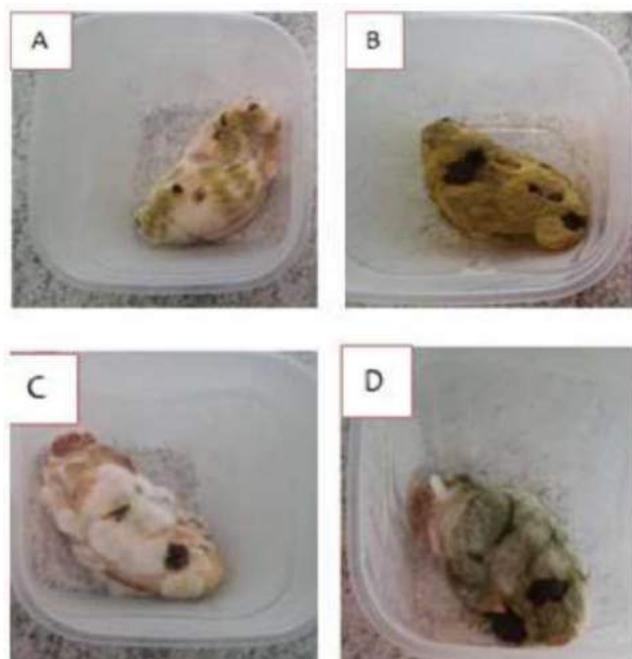
**Figura 3.** Pão não umedecido em frasco aberto. A – Em local iluminado no 3° dia; B – local iluminado no 6° dia; C – local iluminado no 10° dia; D – local não iluminado no 3° dia; E – local não iluminado no 6° dia; F – local não iluminado no 10° dia.



**Figura 4.** Desenvolvimento do fungo *R. stolonifer* no 10º dia de observação em pão. A – umedecido local iluminado frasco fechado; B – umedecido local iluminado frasco aberto; C – não umedecido local iluminado frasco fechado; D – umedecido local não iluminado frasco fechado; E – umedecido local não iluminado frasco aberto; F – não umedecido local não iluminado frasco fechado.

cimento, formação de amontoados parecendo fios de algodão, escurecimento total do pão e fechamento do ciclo). Destingiu-se uma fase de duração curta (a formação das hifas) e a formação de esporos que podem ficar latentes por dias, meses ou anos, a depender das condições exigidas para a germinação. Levantou-se uma hipótese para a qual se remete a um estudo mais acurado sobre o núcleo central da biologia (um gene, uma proteína e uma enzima) que se relaciona a determinação e controle de cada momento no ciclo reprodutivo.

Em relação à luminosidade, comparando os pães que foram umedecidos em frascos fechados (Fig. 5), notou-se que no ambiente sem interferência da luminosidade o micélio do *R. stolonifer* teve maior crescimento, desde a primeira observação, o qual foi mantido constante ao longo do experimento. O *R. stolonifer* observado em de local iluminado teve crescimento gradativo e evidenciou um micélio com coloração esverdeada



**Figura 5.** Desenvolvimento do fungo *R. stolonifer* em pães umedecidos frasco fechado. A – 3º dia local iluminado; B – 10º dia local iluminado; C – 3º dia local não iluminado; D – 10º dia local iluminado.

Evidenciou-se que a redução do oxigênio em frasco fechado (aberto somente para os registros fotográficos), o aumento da temperatura e a atividade respiratória do *R. stolonifer* interferem diretamente na redução do pH. Isto ocorre devido o aumento nas concentrações de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) que acidifica o ambiente. Acrescenta-se

que temperatura tem papel fundamental no processo de acidificação, quando se considera principalmente o frasco vedado num armário fechado no local não iluminado.

O desenvolvimento do *R. stolonifer* no pão úmido pode ser explicado por sua forma de reprodução. Este fungo possui esporangiosporos com esporos assexuais que são espalhados com a abertura do esporângio em diferentes ambientes. Caso o meio ofereça condições favoráveis (luz, umidade e temperatura) ocorrerá a germinação dos esporos e posterior desenvolvimento de um novo talo ou micélio do fungo (TORTORA et al., 2012).

Na ausência de condições favoráveis para a reprodução assexuada, o *R. stolonifer* realiza a reprodução sexuada. Para isto, as hifas (as positivas e as negativas) dos micélios precisam estar próximas. Estas hifas formam extensões laterais que permitem que uma cresça uma em direção a outra, mediante atração por substâncias químicas. Neste processo, formam-se os septos laterais que isolam um segmento multinucleado chamado gametângio (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011; BAGGIO, 2013).

O *R. stolonifer* desenvolveu nos pães umedecidos em frascos abertos sob ambas às condições de luminosidade (com iluminado/sem iluminação), no terceiro dia de observação. No sexto dia de observação, percebeu-se o início do desenvolvimento do fungo na porção do pão que estava em contato com o vidro do frasco, com mais evidência no pão colocado no local iluminado (Fig. 6). Provavelmente, nessa região ocorreu a conservação da umidade pelo vidro e as outras regiões perderam-na para o ambiente, o que ocasionou ao longo dos dias o endurecimento do pão. O menor desenvolvimento do fungo no pão em local não iluminado pode estar associado a maior temperatura do ambiente fechado ao qual foi submetido à amostra, mesmo encontrando-se em um frasco aberto.

Segundo Tortora et al. (2012), os fungos possuem a capacidade de se desenvolverem em meios com baixa umidade. Para este autor, as baixas umidades associadas às condições ácidas permitem o crescimento dos fungos. Isto explica a razão de grãos e frutos serem deteriorados por fungos e não por bactérias.

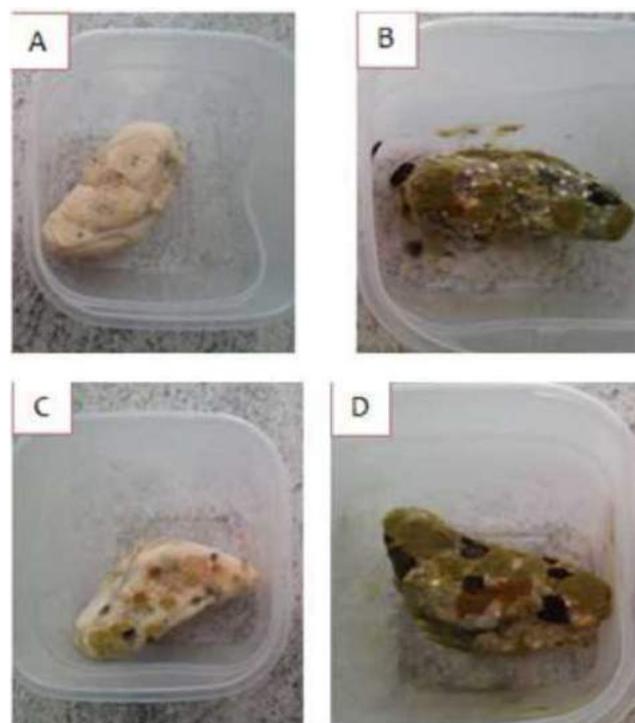


**Figura 6.** Desenvolvimento do fungo *R. stolonifer* em pão umedecido local iluminado. Observação de *R. stolonifer* no 6º dia em MEB (à esquerda, em círculo inferior, a área em contato com o vidro; à direita, as hifas maduras).

No primeiro dia de observação dos pães não umedecidos em recipiente fechado, notou-se que o de ambiente não iluminado não apresentava fungos (*R. stolonifer*) em desenvolvimento, já a amostra exposta ao ambiente iluminado apresentava fungos iniciando seus ciclos de vida (Fig. 7). No sexto dia de análise, evidenciou-se a presença do *R. stolonifer* em diversos estágios de desenvolvimento nos pães de ambos os ambientes (com iluminado/sem iluminação). Percebeu-se que alguns desses fungos finalizaram o seu ciclo com a produção de esporos (fase assexuada), entretanto, ressalta-se que o desenvolvimento/proliferação deles em pães em ambiente iluminado foi mais intenso porque iniciara primeiro o seu ciclo de vida.

Diante disto, pode-se inferir que mesmo não umedecendo o pão existe a umidade por conta da presença de água na sua composição. De acordo com a ANVISA (2012), a água é um dos ingredientes essenciais para a produção do pão francês, sendo importante para a formação da massa, controle da temperatura e o desenvolvimento da fermentação do pão.

Nessas condições, acredita-se que fatores como luminosidade, temperatura, oxigênio e pH possuem maior influência na propagação do *R. stolonifer*. A ausência de luz não impediu o desenvolvimento dos fungos apenas retardou seu ciclo de vida, o aumento da temperatura e a redução das concentrações de oxigênio e, conseqüentemente, do pH proporcionadas pela vedação do recipiente propiciaram condições ideais, a exemplo da conservação da umidade interna do pão que dificulta a perda de água para o ambiente.

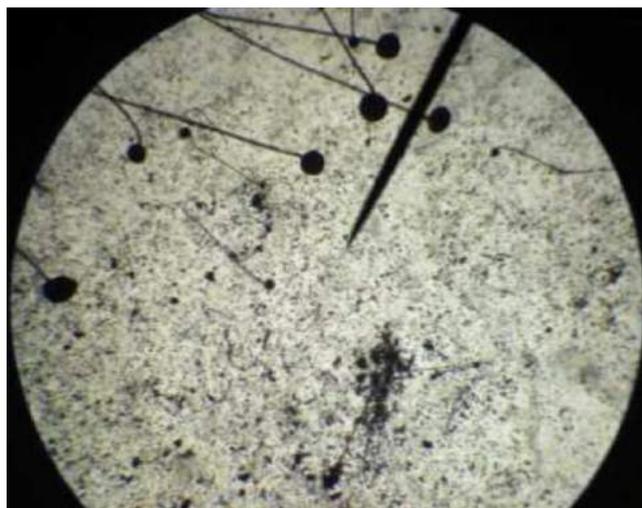


**Figura 7.** Desenvolvimento do fungo *R. stolonifer* em pão não umedecido frasco fechado. A – 3º dia local não iluminado; B – 6º dia local não iluminado; C – 3º dia local iluminado; D – 6º dia local iluminado.

Quanto aos fatores que interferem no ciclo de vida dos fungos, a partir da discussão anteriormente estabelecida, explanou-se resumidamente sobre as seguintes questões: 3) Quais fatores são determinantes para o desenvolvimento do *R. stolonifer*?; 4) Como se combinam estes fatores e em que condições eles se interagem mais? Para estas questões, evidenciou-se que fatores que envolvidos no ciclo de vida dos fungos são a temperatura, a luz, o oxigênio, a umidade e o pH. Destacou-se que o meio ácido é ideal para a formação

dos esporos e a umidade é um fator determinante para a germinação dos referidos gametas.

As estruturas observadas macro e microscopicamente foram o micélio, as hifas, os esporângios e os esporos (Fig. 8). A germinação do esporo no esporângio dá origem às hifas que formam o micélio cuja variedade de cores evidenciada durante o seu ciclo de vida se deve a forma de alimentação do *R. stolonifer*. De acordo com Massola Júnior e Krugner (2011), este organismo absorve os nutrientes do meio orgânico e se proliferam através da produção de enzimas que são liberadas para fora de seus corpos.



**Figura 8.** Esporos e hifas do *R. stolonifer* observados em MEB sob ampliação de 10x.

Segundo Silva e Coelho (2006), as hifas do *R. stolonifer* crescem de forma apical e mesmo pequena porção de hifa é capaz de dar origem a um novo organismo. As hifas possuem a capacidade de manter interações entre si, mesmo sendo originadas de esporos ou micélios diferentes, que crescem em relação à superfície do substrato ao qual estão vinculados. Devido à estrutura filamentosa da hifa e possível a existência de uma grande área em relação ao volume, o que favorece a absorção do fungo (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011; BAGGIO, 2013).

Os esporos que compunham o esporângio do *R. stolonifer* são pretos, grandes e possuem cerca de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Esses, quando se encontram em substrato favorável, germinam produzindo novos micélios que em cerca de 72 horas se tornam maduros e produzem novos esporos (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011).

Em relação à questão 5 (“Qual estrutura e o tamanho/diâmetro do micélio, do esporângio e do esporo do *R. stolonifer*?”); nota-se que esporângio tem tamanho por volta de 0,25 mm ou 250  $\mu\text{m}$  (ampliado em MEB para 0,25 cm (Fig. 9), que pode com atenção ser visualizado a olho nu. Essa estrutura pode abrigar cerca de 5.000 esporos. As hifas têm tamanho/diâmetro a partir de 0,5 mm e o seu conjunto forma o micélio (SCHIPPER, 1994).



**Figura 9.** Estrutura reprodutiva - Esporângios do *R. stolonifer* (ampliação de 20x).

Para o quesito 6 “(O conhecimento sobre a estrutura e a função dos organismos do *Rhizopus*) pode trazer alguma contribuição sócio-ambiental?” relatou-se que o conhecimento sobre as hifas do *Rhizopus* (cenocíticas), os esporângios, os esporos, a nutrição e à forma como os fatores ambientais interferem no seu ciclo de vida pode trazer implicações, por exemplo, para uso destes organismos para despoluição de ambiente natural antropizado. Acrescenta-se que as enzimas produzidas por estes organismos podem ser usadas para destruir diferentes elementos orgânicos e patógenos em presentes em diferentes meios. Tal fato pode favorecer a construção de “ambientes” artificialmente favoráveis para criação e produção de animais aquáticos.

Vale ressaltar que o presente experimento investigativo tem a contribuir com a aprendizagem de termos científicos cujos significados se enriquecem à medida que os estudantes observam e relacionam diferentes aspectos biológicos com as condições ambientais necessárias para o desenvolvimento do *R. stolonifer*, tais como: hifas, micélios, esporos, esporângios, esporo assexual, es-

poro sexual, reprodução assexuada e sexuada, nutrição, crescimento, temperatura, luz, oxigênio umidade e pH. Favorece ainda à elaboração de hipóteses ou questões, bem como a busca de provas e resposta por parte dos estudantes envolvidos, fato que suscita neles a necessidade de conhecimento acerca do objeto/evento pesquisado (CASTRO, 2014).

Assim, pelo exposto, outras questões levantadas durante o trabalho de laboratório doravante exigem uma explicação que demandam uma investigação mais acurada, tanto no nível teórico como prático sobre o *R. stolonifer*, a exemplo de: Como é feito o controle do ciclo de vida dele; Por que o seu ciclo de vida é diferente das demais classes de fungos? Como a alimentação interfere na sua coloração? Como esse fungo resiste aos fatores ambientais? Como diferenciar os esporos sexuais dos assexuais no seu ciclo de vida a partir da observação prática? Por que a fase sexuada é mais curta? Quais as singularidades da sua célula? Em que medida essas singularidades podem ser observadas em MOC e MEB? Quais estruturas podem ser usadas como base para sua classificação em gênero e espécie? Por que a sua multiplicação é mais lenta do que as bactérias e protozoários? Quais as variedades patogênicas do *Stolonifer* groups e como afetam os organismos? Como se explica o seu processo de crescimento e de herança? E o seu dimorfismo em relação às demais classe de fungos? De que forma pode ser usado no combate de impactos ambientais?

Salienta-se que a partir destas questões, em conjunto com as primeiras (itens discutidos anteriormente), favorecem uma abordagem de conhecimento que transversalisa os conteúdos dentro do Reino Fungi com seus ancestrais protozoa, plantas e animais. Neste sentido, poderá se considerar a estrutura e a função das células (revestimento, membrana celular, organelas, citoesqueleto etc.), reprodução, nutrição, crescimento, dentre outras questões.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho prático com o bolor de pão (*R. stolonifer*) possibilitou o contato dos estudantes com os recursos de laboratório, incluindo sua manipulação, o que facilita a visualização e compreensão acerca de estruturas como hifas, micélio, esporângios, esporangioforo e esporos. Amplia a

distinção entre estas estruturas, considerando a noção de escala, entre os aspectos micro e macroscópicos que fazem parte do ciclo de vida do fungo e a compreensão sobre os fenômenos vitais envolvidos.

Evidenciou-se que *R. stolonifer* tem crescimento acentuado com aumento da temperatura, presença de luminosidade e umidade, redução do oxigênio e pH. Destacou-se que a ausência de luz não impediu o desenvolvimento dos fungos, apenas retardou seu desenvolvimento, e que o meio ácido é ideal para a formação dos esporos, enquanto a umidade é um fator determinante para a germinação dos referidos gametas.

## REFERÊNCIAS

- ABOU SAAB, L.A.; GODOY, M.T. **Experimentação nas aulas de biologia e a apropriação do saber**. 2007. Disponível em: <<http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/446-4.pdf>>. Acesso em: 5 de maio de 2018.
- ABBAS, A.K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Patologia-bases patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/osaude/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/osaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf)>. Acesso em: 18 de abril de 2017.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, 1996. 865 p.
- BAGGIO, J.S. Penetração de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos não injuriados e progresso espaço-temporal da podridão mole. 2013. **Dissertação** (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo (USP). Piracicaba.
- BENJAMIN, R.K. Zygomycetes and their spores. In: Kendrick, B. (Ed.) **The whole fungus**. Vol. 2. Ottawa: National Museum of Canada and the Kananaskis Foundation, 1979. p. 573-616.
- BENNY, G.L. Zygomycetes: Trichomycetes. In: McLaughlin; McLaughlin; Lenke (Eds.) **The Mycota VII, Part A. Systematics and Evolution**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. p. 147-160.
- CARVALHO, A.M.P.; GIL-PÉREZ, D. **Formação de professores de ciências**. São Paulo: Cortez, 2000. 120p.
- CASTRO, D.R. Estudo de conceitos de estrutura e funcionalidade de seres vivos no Ensino Fundamental I. 2014. **Tese** (doutorado)- Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2014.

- GAUGER, W.L. Meiotic gene segregation in *Rhizopus stolonifer*. **Journal of General Microbiology**, 101(21): 1-217, 1977.
- GIL-PÉREZ, D.; NAVARRO, J.; GONZÁLEZ, E. Las prácticas de laboratorio en la formación del profesorado (II). Una experiencia de transformación de las prácticas del ciclo básico universitario. **Revista de Enseñanza de la Física**, 7: 33-47, 1993.
- GOMES, A.D.T.; BORGES, A.T.; JUSTI, R. Processos e conhecimentos envolvidos na realização de atividades práticas: revisão da literatura e implicações para a pesquisa, v. 13, n. 02, pp.187-207, 2008. Disponível em: <[http://www.if.ufrgs.br/ienci/artigos/Artigo\\_ID194/v13\\_n2\\_a2008.pdf](http://www.if.ufrgs.br/ienci/artigos/Artigo_ID194/v13_n2_a2008.pdf)>. Acesso em janeiro de 2018.
- HAWKSWORTH, D.L.; LÜCKING, R. **Fungal Diversity Revisited**: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**: Berlin: American Society for Microbiologist Press, 2017.
- HIPOLITO, M. **Fungos em peixes e anfíbios: diagnóstico, prevenção e tratamento**. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_2/FungosPeixes/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/FungosPeixes/index.htm)>. Acesso em: 18 de Agosto de 2015.
- HODSON, D. In search of a meaningful relationship: an exploration of some issues relating to integration in science and science education. **International Journal of Science Education**, 14(5): 541-566, 1992.
- LIOU, G.; CHEN, S.; WEI, Y.; LEE, F.; FU, H.; YUAN, G.; STALPERS, J.A. Polyphasic Approach to the Taxonomy of the *Rhizopus Stolonifer* Group. **Mycol. Res.**, 111: 196-203. 2007.
- HANSEN, K.S.; HOFFMAN, M.B.; RODRIGUES, T.L.; FLORES, M.L.T. Fórum Internacional Integrado de Cidadania: Educação, Cultura, Saúde e Meio Ambiente. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Santo Ângelo/RS, 26 a 29 abr, 2006.
- JOHAN, C.S.; CARVALHO, M.S.; ZANOVELLO R.; OLIVEIRA, R.P.; GARLET, T.M.B.; BARBOSA, N.B.V.; MORESCO, T.R. Promovendo a aprendizagem sobre fungos por meio de atividades práticas. **Ciência e Natura**, 36: 798-805, 2014.
- KRASILCHIK, M. **Prática de Ensino de Biologia**. 4ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005. p 85-87.
- KUHN, D.; BLACK, J.; KESELMAN, A.; KAPLAN, D.; The Development of Cognitive Skills to Support Inquiry Learning. **Cognition and Instruction**, 18(4): 495-523, 2000.
- MASSOLA JUNIOR, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, 2011.
- MEZZARI, A. Fungos Anemofilos em Porto Alegre, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2002.
- O'DONNELL, K; LUTZONI, L.M., WARD, T.J; BENNY, L. Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. **Mycologia**, 93: 286-296, 2001.
- PAIVA, J.R. Estudo do potencial biocatalítico do fungo *Rhizopus stolonifer* na biotransformação de produtos naturais. **Dissertação** de mestrado 73 p. Universidade Federal do Ceara (UFCE), Fortaleza, 2014.
- PELCZAR JR, J.M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524 p.
- SCHIPPER, M.A. A Revision of the Genus *Rhizopus*. **Studies in Mycology**. Série No. 25. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, The Netherlands. 1984. 34 p.
- TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.