

Avaliação de metodologias de preservação para manutenção de microrganismos do Filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA

Oliveira L.A.¹, Cortez A.C.A.², Souza J.V.B.³

¹. INPA (airesluciana01@gmail.com); ². PPG-BIONORTE (accortez@inpa.gov.br); ³. INPA (joão.souza@inpa.gov.br)

Resumo

Os fungos têm grande importância na microbiologia, pois atuam como agentes das infecções conhecidas como micoses que acometem todos os seres vivos. Para a medicina e a indústria estes são de suma importância devido à produção de metabólitos, para o desenvolvimento e produção de medicamentos, drogas, fermentos, corantes e conservantes, e atuam também como agentes de controle biológico. O Filo Ascomycota compreende inúmeros gêneros de fungos. Entre eles estão os gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp e *Cladosporium* sp, alvos deste estudo. São encontrados na poeira e no ar e desempenham papel importante na patologia médica, como elementos alergizantes. Assim, muitas asma ditas “de clima” estão na dependência ou em relação íntima com a flora micótica do ar. O gênero *Candida* compreende leveduras que possuem um habitat bastante amplo. No homem, essa levedura habita a mucosa digestiva e a mucosa vaginal. A infecção pode atingir mucosas, tecido cutâneo e em alguns casos pode ser sistêmica. A grande diversidade genética do Reino Fungi torna relevante a conservação de suas culturas em coleções de laboratórios de microrganismos. A manutenção dos microrganismos por longos períodos é de vital importância para a utilização destes em pesquisas e na indústria. Por isso, técnicas de conservação foram desenvolvidas sendo todas alternativas plausíveis para a manutenção fúngica, embora os resultados sejam variados. Os métodos usualmente empregados em laboratórios de coleção para a manutenção de microrganismos são repique contínuo, água destilada esterilizada, liofilização, sílica gel, e os que foram avaliados neste trabalho que são óleo mineral, criopreservação a -70°C e refrigeração a 5°C. O presente trabalho consistiu em investigar qual metodologia é mais adequada para a manutenção

de microrganismos do filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* incorporados à coleção de microrganismos de interesse médico do INPA no período de janeiro de 2007 a fevereiro de 2010 que vinham sendo mantidos sob óleo mineral e repique contínuo. Da Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA, foram selecionadas 223 amostras de *Candida* sp e 250 amostras de fungos do Filo Ascomycota. Estas foram reativadas em Agar Sabouraud e submetidas aos métodos de preservação. A cada 90 dias durante 180 dias as culturas foram avaliadas quanto a sua viabilidade. As três metodologias avaliadas apresentaram resultados satisfatórios tanto para os microrganismos do Filo Ascomycota como para as leveduras do gênero *Candida*.

Palavras-chave: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*.

Introdução

Os fungos têm grande importância na microbiologia, pois atuam como agentes das infecções conhecidas como micoses que acometem todos os seres vivos (Lacaz *et al.*, 2002). Para a medicina e a indústria estes são de suma importância devido à produção de metabólitos, para o desenvolvimento e produção de medicamentos, drogas, fermentos, corantes e conservantes (Rocha *et al.*, 2009). O Filo Ascomycota compreende inúmeros gêneros de fungos. Entre eles estão os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*, alvos deste estudo. São encontrados na poeira e no ar e desempenham papel importante na patologia médica, como elementos alergizantes. O gênero *Candida* compreende leveduras que possuem um habitat bastante amplo. No homem, essa levedura habita a mucosa digestiva e a mucosa vaginal. A infecção pode atingir mucosas, tecido cutâneo e em alguns casos pode ser sistêmica. A grande diversidade genética do Reino Fungi torna relevante a conservação de suas culturas em coleções de laboratórios de microrganismos. A manutenção dos microrganismos por longos períodos é de vital importância para a utilização destes em pesquisas e na indústria. Por isso, técnicas de conservação foram desenvolvidas sendo todas alternativas plausíveis para a manutenção fúngica, embora os resultados sejam variados. Os métodos usualmente empregados em laboratórios de coleção para a manutenção de microrganismos são repique contínuo, água destilada esterilizada, liofilização, sílica gel, e os que foram avaliadas neste trabalho que são óleo mineral, criopreservação a -70° C e refrigeração a 5° C (Figueiredo, 2001; Nakasone *et al.*,

2004). O presente trabalho consistiu em investigar qual metodologia é mais adequada para manutenção de microrganismos do filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* incorporados à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA no período de janeiro de 2007 a fevereiro de 2010 que vinham sendo mantidos sob óleo mineral e repique contínuo.

Material e Métodos

Foram selecionadas 223 amostras de *Candida* sp. e 250 amostras de fungos do Filo Ascomycota da Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. Estas foram reativadas em Agar Sabouraud e submetidas aos métodos de preservação.

Foram avaliadas três metodologias de preservação: conservação em óleo mineral, conservação em refrigeração a 5° C e Criopreservação a -70° C.

Conservação em óleo mineral: A técnica de preservação foi realizada como descrito por Braz *et al.* (2009). As culturas foram repicadas em tubos contendo meio de cultivo Agar Sabouraud com cloranfenicol. Em seguida, essas foram cobertas com uma camada de óleo mineral esterilizado. As culturas foram mantidas a temperatura ambiente.

Conservação em Refrigeração a 5° C: A técnica de preservação foi realizada como descrito por Diogo *et al.* (2005). As culturas também foram repicadas em tubos contendo meio de cultivo Agar Sabouraud. Em seguida, as culturas foram armazenadas em refrigerador com temperatura controlada em 5° C.

Criopreservação a -70° C: A técnica de preservação foi realizada como desenvolvida no Laboratório de Micologia, CSAS-INPA. Em microtubos de 2mL estéreis foram acrescentados de 0,8 mL de água destilada estéril, 0,05 mL de dimetil-sulfóxido DMSO (crioprotetor), 0,1 de glicerol (crioprotetor), 10 mg de miçangas (2mm, com orifício) estéreis e 100 mg de biomassa dos isolados fúngicos, essa última obtida como descrito nos itens anteriores. Os frascos foram armazenados a temperatura de -70° C.

Reativação dos microrganismos submetidos às metodologias de preservação: A cada 90 durante 180 dias as culturas foram reativadas como descrito por Girão *et al.* (2004), modificado para que fossem avaliadas quanto a sua viabilidade. Para as amostras submetidas às metodologias de óleo mineral e refrigeração a 5° C, uma alçada da colônia foi semeada em meio de cultivo Agar Sabouraud. Na metodologia de

criopreservação a -70°C , uma miçanga foi retirada e também semeada em meio de cultivo Agar Sabouraud.

Resultados

Das 223 amostras de leveduras preservadas, 100% apresentaram viabilidade para a metodologia de óleo mineral, 98% para a refrigeração a 5°C e 97% para a criopreservação a -70°C após 90 dias. Portanto, após 180 dias, o percentual de viabilidade para a metodologia de óleo mineral baixou para 67% e as demais metodologias permaneceram em média 97% de viabilidade. Das 250 amostras do filo Ascomycota preservadas, sendo *Aspergillus* sp. (n=58), *Penicillium* sp. (n=54), *Fusarium* sp. (n=77) e *Cladosporium* sp. (n=61), também apresentaram resultados satisfatórios quanto a viabilidade em todas as três metodologias após 90 dias. O gênero *Aspergillus* sp. apresentou um percentual de 98% tanto para a metodologia de óleo mineral quanto para a refrigeração a 5°C . E a metodologia de criopreservação teve uma viabilidade de 94% para os microrganismos deste gênero. Os demais gêneros apresentaram resultados semelhantes, onde as três metodologias tiveram um percentual em média de 95% de viabilidade para as três metodologias empregadas. Após 180 dias, o percentual de 90% se manteve para as três metodologias nos gêneros *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp. e 100% no gênero *Cladosporium* sp. Apenas o gênero *Fusarium* apresentou um percentual em média de 65% após 180 dias.

Em relação aos casos de contaminação, nas amostras do gênero *Candida*, a metodologia que apresentou maior frequência foi a conservação sob óleo mineral. Porém, a frequência dos casos não foi significativa, sendo apenas 0,6% e 0,5% após 90 e 180 dias, respectivamente. Nas amostras do Filo Ascomycota, as três metodologias apresentaram casos de contaminação, mas também não foram tão significativos.

Nas amostras de leveduras, os casos de inviabilidade celular foram observados nas três metodologias de preservação. Porém, a metodologia de óleo mineral obteve um percentual de 31, 6% após a segunda recuperação (180 dias). Nas amostras do Filo Ascomycota, as três metodologias também apresentaram casos de inviabilidade celular.

Discussão

Lima (1991) obteve 98,7 % de viabilidade na preservação de espécies de *Fusarium sp.* sob óleo mineral durante períodos de 4 a 35 anos. No estudo realizado por Da Silva *et al.* (2010), a viabilidade de culturas de espécies de *Penicillium sp.* também preservadas sob óleo mineral foi de 43,3 %. Segundo o autor, a inviabilidade foi observada somente nas culturas estocadas por 12 a 16 anos.

Em trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2010) utilizando a técnica de criopreservação a -70° C em amostras de leveduras do gênero *Malassezia* obteve-se 100% de viabilidade entre as amostras.

Conclusões

As três metodologias avaliadas neste estudo apresentaram resultados satisfatórios tanto para os microrganismos do Filo Ascomycota como para as leveduras do gênero *Candida*. Porém, verificou-se que a metodologia de criopreservação a -70° C foi a que obteve melhores resultados tanto em relação a contaminação, uma vez que as amostras se apresentaram com maior pureza, como a inviabilidade celular das amostras, pois foi a que demonstrou melhor crescimento fúngico.

A metodologia de conservação sob óleo mineral foi a que esteve mais relacionada com contaminação e inviabilidade celular. Apenas o gênero *Fusarium* apresentou casos significativos de inviabilidade celular em todas as metodologias após 180 dias de conservação.

Referências

- Braz SCM, Motta CMS, Massa DML, Neves RP, Magalhães OMC (2009) Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas University Recife Mycology. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.42, p.63.
- Da Silva JC, Fernandes OCC, Martins MS, Rodrigues AC, Teixeira MFS (2010) Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 30: 48-54.
- Diogo HC, Sarpleri A, Pires MC (2005) Fungi preservation in distilled water. An Bras Dermatol, 8: 591- 4.
- Figueiredo MB (2001) Métodos de preservação de fungos patogênicos. Biológico. 63: 73-82.
- Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG (2004) Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes

métodos de conservação. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 37: 229-233.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, De Melo NT (2002) *Tratado de Micologia Médica*. 9. ed. São Paulo: Sarvier. Lima, D.M.M. 1991. Preservação de espécies de *Fusarium* sob óleo mineral. Pesq. agropec. bras., Brasília, 26: 853-855.

Lima DMM (1991) Preservação de espécies de *Fusarium* sob óleo mineral. Pesq. agropec. bras, 26: 853-855 p.

Nakasone KK, Peterson AW, Jong S (2004) Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller G.M, Bills, G.F, Foster, M.S. Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, 37-47.

Oliveira ACP, Oliveira JAA, Cortez ACA (2010) *Malassezia* spp. (Cryptococcaceae) Identificação e Criopreservação das amostras conservadas na Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA do ano de 2006. XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA.

Rocha RM et al (2009) *Trichophyton rubrum*: manutenção e viabilidade por crio e hidropreservação.