



## MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE FUNGOS MICOTOXIGÊNICOS

Camila Linhares dos Santos (PIC/UEM), Natana de Souza Zampieri, Miguel Machinski Junior, Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador) e-mail: [camila\\_linhares@hotmail.com](mailto:camila_linhares@hotmail.com)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde /  
Departamento de Ciências Básicas da Saúde / Maringá, PR.

Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia e Análises Toxicológicas

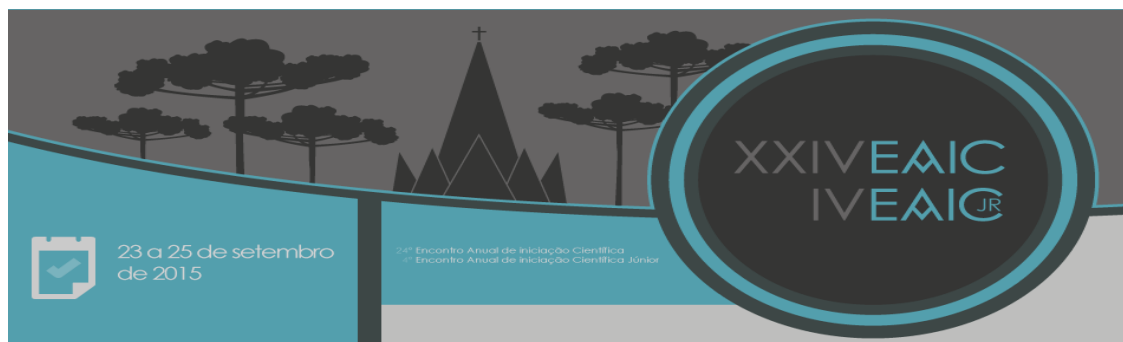
**Palavras-chave:** fungos, métodos de preservação, coleção de culturas.

### Resumo

Fungos filamentosos toxigênicos são responsáveis por prejuízos econômicos em culturas no campo, no período de armazenamento, beneficiamento ou industrialização, podendo ter reflexos na alimentação de animais ou de produtos destinados ao consumo humano, tornando inviável a exploração econômica de determinadas culturas. Estes micro-organismos precisam ser estocados em laboratório por um longo período e não devem perder a habilidade produtora de micotoxinas. Coleções de micro-organismos tendem a viabilizar a manutenção de culturas de organismos coletados, garantindo a preservação e uso em atividades de ensino e pesquisa, além de troca de informações entre centros de pesquisas e instituições de ensino. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo obter um acervo de fungos a partir da recuperação dos isolados da coleção de fungos criada inicialmente pelo Prof. Dr. Carlos Kemmelmeier e anteriormente mantida no extinto Laboratório de Química e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Bioquímica/UEM e a partir de fungos doados pelo Laboratório de Coleção de Micológica da Fundação Oswaldo Cruz. No período de desenvolvimento do trabalho foram recuperados e preservados isolados fúngicos do gênero *Fusarium* e *Aspergillus*, entre eles *F. moniliforme* e *A. flavus* inicialmente recuperados por meio de cultivo em ágar batata dextrose, seguido de caracterização cultural macroscópica, como coloração e aspecto da colônia, e caracterização microscópica com observação das estruturas fúngicas.

### Introdução

A implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos (1,2,4). O foco das metodologias de manutenção é



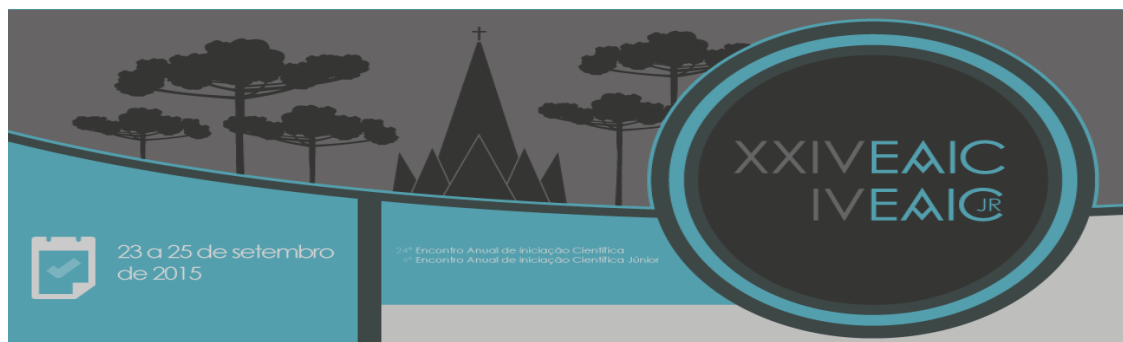
preservar a viabilidade e principalmente proporcionar estabilidade do micro-organismo, pelo maior tempo possível, conservando seu estado inicial evitando mutações indesejáveis, preservando suas características e garantindo a vitalidade e viabilidade das células. As metodologias mais adequadas para a preservação de micro-organismos por períodos prolongados baseiam-se na redução do metabolismo até um nível de dormência artificial, entretanto, a escolha da metodologia precisa considerar a estabilidade, manutenção das características morfológicas, produção de metabólitos, além da viabilidade das culturas (2-5). Diversas coleções de culturas têm utilizado metodologias de preservação em longo prazo, mas não há um método universal para todos os tipos de fungos (3,6). A técnica de repique contínuo, também chamado de subcultivo ou repicagem periódica, é um método simples e tradicional de manutenção de culturas em laboratório, e tem sido bastante utilizada para se obter a viabilidade de microrganismos. O método consiste na inoculação do microrganismo em meio adequado, incubação em ambiente favorável à multiplicação e estocagem sob refrigeração (4 - 8°C), em busca da redução do metabolismo dos microrganismos e o aumento entre os intervalos de repiques das culturas, proporcionando a conservação dos fungos em torno seis meses a um ano (6,7). Estudos sugerem que para minimizar o efeito da desidratação, os isolados devem ser conservados em tubos de ensaio com tampa rosqueável, em ambientes protegidos da luz e de variações de temperatura (8). Este método clássico apresenta como vantagens a facilidade e o baixo custo, por não provocar estresse ou injúria celular e não necessitar de reativação dos microrganismos (7).

Assim, evidencia-se a importância da manutenção de uma coleção de fungos de interesse científico e didático, adotando-se métodos de manutenção que garantam a disponibilidade de isolados fúngicos viáveis.

## **Materiais e métodos**

Isolados foram obtidos a partir da coleção do extinto Laboratório de Química e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Bioquímica/UEM, e da Coleção Micológica de *Trichocomaceae* do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental pertencente à Fundação Oswaldo Cruz. Foram selecionados as espécies dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* em função das características micotoxigênicas.

Os isolados selecionados foram inoculados em meio ágar batata dextrose (BDA), previamente preparados em tubo inclinado, incubados a temperatura ambiente (25 - 28°C) para favorecer a multiplicação e posterior estocagem sob refrigeração (4 - 8°C) (7,9). Cada ampola, contendo cultura liofilizada,



obtida da Coleção Micológica da Fiocruz foi reidratada e a suspensão transferida para tubos contendo meio BDA.

As características macro e micromorfológicas dos isolados foram analisadas de acordo com o descrito na literatura (6,10-12).

## Resultados e Discussão

Entre os fungos filamentosos a ser recuperados com aplicação da técnica de repique contínuo, inicialmente estocados em tubo inclinado contendo BDA e óleo mineral, foram selecionados os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*. A escolha ocorreu em função o uso desses gêneros em vários projetos em andamento em nosso laboratório, sendo os procedimentos realizados com cada gênero em separado para prevenir contaminações. Os micro-organismos foram então inoculados em meio BDA, incubados inicialmente a temperatura ambiente até que o início do crescimento fosse visível para posterior confirmação do gênero e estocagem em baixas temperaturas, sob refrigeração (4 - 8°C), em busca da redução do metabolismo dos microrganismos e o aumento entre os intervalos de repiques das culturas, proporcionando a conservação dos fungos em torno seis meses a um ano.

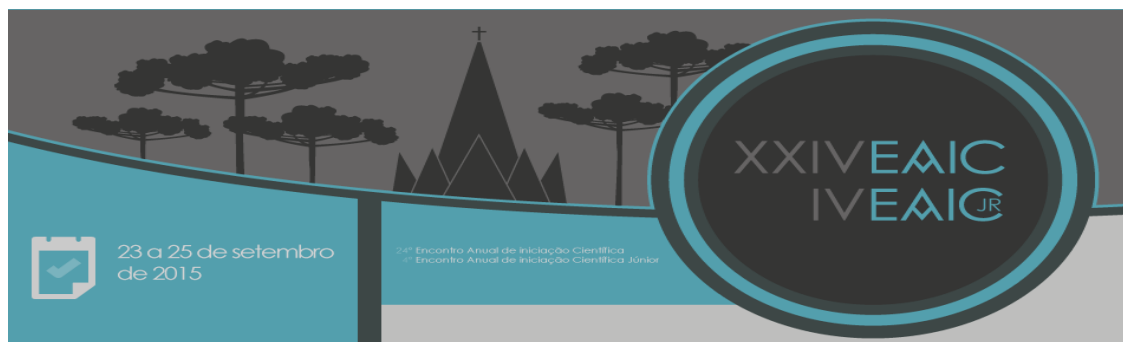
A partir das linhagens obtidas da coleção micológica da Fiocruz (Tabela 1) as culturas foram reidratadas e repicadas em meio BDA. A ausência de crescimento de algumas linhagens a erros durante o processo de reidratação.

**Tabela 1** – Linhagens da Coleção Micológica de *Trichocomaceae* utilizadas para o processo de reidratação e repique em meio BDA

| Nome científico                 | Nº de acesso na Coleção | Presença de Crescimento | Ausência de Crescimento |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Aspergillus parasiticus</i>  | 00334                   |                         | X                       |
| <i>Aspergillus flavus</i>       | 00335                   | X                       |                         |
| <i>Fusarium verticillioides</i> | 00161                   | X                       |                         |
| <i>Fusarium verticillioides</i> | 00168                   | X                       |                         |
| <i>Fusarium verticillioides</i> | 00174                   |                         | X                       |
| <i>Fusarium verticillioides</i> | 00177                   |                         | X                       |

## Conclusões

A preservação de micro-organismos é um recurso prático e necessário para a atividade didática e de pesquisa. Pensar em manter, estocar e preservar coleções significa assegurar um patrimônio de culturas e bancos de isolados



com atenção à morfologia, fisiologia, características toxigênicas. Entretanto, diferenças e características próprias de cada gênero e espécie, determinam as condições específicas da metodologia de preservação a ser empregada. O presente projeto continuará em execução para que o maior número possível de isolados seja recuperado e passe a fazer parte do banco de isolados do Laboratório de Toxicologia.

### **Agradecimentos**

A Fundação Oswaldo Cruz pela doação de linhagens por intermédio do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental – LAPSA.

### **Referências**

1. DEACON, J. W. Introduction to Modern Mycology. John Wiley & Sons, 19974.
2. SOLA, M. C. *et al.* Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 1398 – 2012.
3. CAVALCANTI, S. D. B. Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2010. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
4. ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de micro-organismos do UniCEUB. Universitas Ciências da Saúde, 2: 236-51, 2005.
5. SMITH D. Culture collection over the world. Inst Microbiol., 6:95-100, 2003.
6. SMITH, D.; ONIONS, A. G. H. The preservation and maintenance of living fungi. *Commonwealth Mycological Institute*, Page Bros Ltd. Great Britain, 1983
7. COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. Revista de Microbiologia, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.
8. MURRAY, P. R. *et al.* Manual of clinical microbiology. 8th ed., ASM Press, Washington DC, 2113p., 2003.
9. GREEN, L. H. Practical handbook of microbiology. CRC: London, 2 ed. 2008.
10. MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. Toxigenic *Fusarium* species. Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press. U.S.A., 328p., 1984.
11. GRIFFIN, D. H. Fungal Physiology, Second edition. Pp.247-251. Wiley-Liss, Inc. New York, 1994.
12. PITT, J. I., HOCKING, A. D. (Eds), 1997. Fungi and Food Spoilage. 2nd ed. Blackie Academic & Professional. London UK, 592p.