

## ATUALIZAÇÃO EM MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE FUNGOS APLICADOS ÀS COLEÇÕES MICROBIOLÓGICAS

Vinicius Alexandre (PIBIC/CNPq), Marina Cristina Gadêlha, Pamela Stephani Tymniak Rezende, Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi (Orientadora), e-mail: ra122234@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

### Área 21200009 e sub-área 21201030

**Palavras-chave:** micologia, coleções microbiológicas, métodos de conservação.

### Resumo:

Coleções microbiológicas são essenciais para a preservação e manutenção de microrganismos, assegurando um patrimônio genético e morfofisiológico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos de conservação fúngica. Foi realizada uma revisão bibliográfica e selecionadas as melhores técnicas de conservação para fungos: congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e a  $-80^{\circ}\text{C}$ , método Castellani, repique contínuo e óleo mineral. Foi observado que a eficiência do método está relacionada as características fisiológicas de cada fungo. Os métodos que propiciaram condições adequadas de conservação e recuperação foram: método de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  para leveduras; método Castellani para *Fusarium oxysporum*; óleo mineral para *Microsporium canis*. Assim, destaca-se a importância das coleções microbiológicas juntamente com os métodos de conservação adequados para a preservação fúngica.

### Introdução

Coleções microbiológicas são recursos chave para a preservação e manutenção de microrganismos, assegurando um patrimônio genético com preservação da morfologia e fisiologia, bem como sua associação à patogenia e infectividade, no caso de agentes patogênicos. Assim, devem ser aplicados métodos para a conservação que melhor se adequem às características do agente de estudo, levando em consideração os pontos positivos e negativos de cada técnica (SOLA *et al.*, 2012; FELIPE *et al.*, 2019). O objetivo deste trabalho foi avaliar os métodos mais adequados de conservação fúngica com aplicabilidade à Rede de Coleções Microbiológicas do Paraná da Universidade Estadual de Maringá (CRMP-UEM).

### Materiais e Métodos

Primeiramente, foi realizado um levantamento bibliográfico dos métodos de conservação de fúngica e na sequência, foram selecionadas técnicas visando uma

maior aplicabilidade para a Rede de Coleções Microbiológicas Paranaense (CMRP-UEM).

A partir do levantamento bibliográfico, foram selecionados quatro isolados fúngicos, dentre eles dois leveduriformes e dois filamentosos, gentilmente cedidos pela CMRP-UEM: *Candida albicans* (CMRP 3480), *Cryptococcus neoformans* (3931), *Fusarium oxysporum* (2925) e *Microsporum canis* (3004). A escolha destes isolados foi feita com o objetivo de se estudar fungos com diferentes morfologias e por consequência, contemplar mais métodos de conservação. Na sequência, foram selecionados cinco métodos de conservação, a partir do levantamento bibliográfico e, realizados conforme DELLARETTI, 2014 e SOLA *et al.*, 2012.

**Congelamento a -20°C:** foram preparados criotubos contendo caldo glicerinado, semeados com levedura e, por conseguinte, foram incorporadas miçangas estéreis. Em seguida, estes foram incubados a 35°C por 24h, no dia seguinte mantidos no refrigerador a 5°C por 24h e por fim armazenados em freezer a -20°C por 180 dias. **Congelamento a -80°C:** preparados em tubos de penicilina contendo ágar Sabouraud com carvão ativado e realizada a cultura fúngica durante 7 dias. Após, os tubos foram refrigerados a 5°C durante 24h, depois em freezer a -20°C por 24h e finalmente encaminhados para armazenamento em freezer a -80°C por 180 dias.

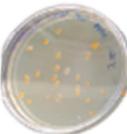
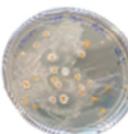
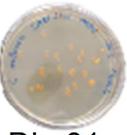
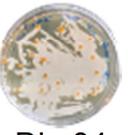
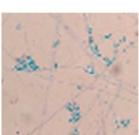
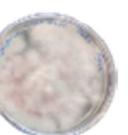
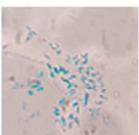
**Método Castellani:** em microtubos contendo água destilada estéril, foi acrescentado culturas de fungos filamentosos previamente cultivados em meio ágar Sabouraud. Em seguida, os microtubos foram armazenados em refrigerador a 5°C durante 180 dias. **Repicagem contínua:** os isolados fúngicos foram cultivados em tubos em meio ágar Sabouraud inclinado por aproximadamente 30 dias e realizados repiques contínuos até completar o período de 180 dias. **Óleo mineral:** realizou-se a cultura de fungos filamentosos em tubos com ágar Sabouraud inclinado durante 7 dias, adicionou-se óleo mineral até atingir o volume máximo do recipiente, vedados e mantidos em temperatura ambiente durante 180 dias.

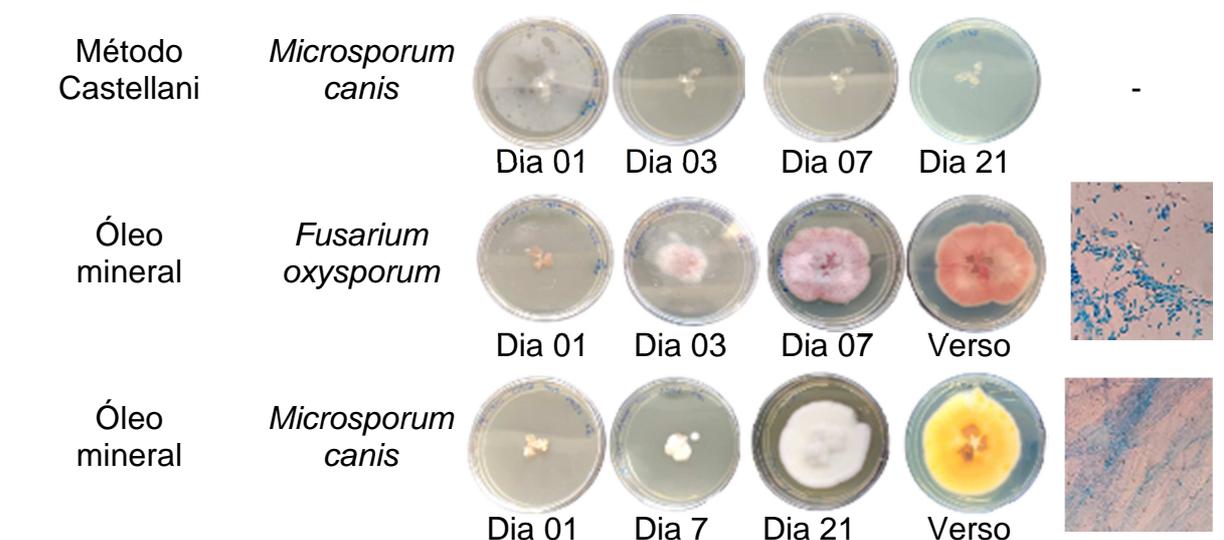
## Resultados e Discussão

Todas as técnicas testadas proporcionaram a conservação e recuperação dos isolados, exceto o método Castellani para *M. canis* (Tabela 1). A técnica de repique contínuo foi efetiva sem a presença de contaminantes, no entanto, comparada aos outros métodos exige maior atividade laboral, risco de contaminação e mudança na morfologia, corroborando com DELLARETTI (2014). Em relação aos métodos de criopreservação, o congelamento a -20°C foi eficiente para conservação de *C. albicans* e *C. neoformans*, de simples execução, menor custo e facilidade no armazenamento. Esta técnica tem se mostrado eficiente na criopreservação e recuperação dos isolados por longos períodos (SOLA *et al.*, 2012). No que se refere aos fungos filamentosos, o método Castellani teve maior eficiência para *F. oxysporum*, no entanto, para *M. canis* não houve crescimento, sendo para este fungo o congelamento -80°C e o óleo mineral técnicas de maior êxito. Apesar de ambos serem fungos filamentosos, *F. oxysporum* é um fungo ambiental, mas que também é capaz de causar infecção em animais. Já *M. canis* é um dermatófito

zoofílico, mas capaz de causar doença em humanos (MOLINARO *et al.*, 2009). Tais características podem influenciar na eficiência do método de conservação corroborando com os nossos achados.

**Tabela 1:** Conservação dos quatro isolados fúngicos através dos métodos de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ , Método Castellani e óleo mineral no período de 180 dias.

Método	Fungo	Reativação após 180 dias				Microcultivo
Congelamento a $-20^{\circ}\text{C}$	<i>Candida albicans</i>					
		Dia 01	Dia 02	Dia 04	Dia 07	
Congelamento a $-20^{\circ}\text{C}$	<i>Cryptococcus neoformans</i>					
		Dia 01	Dia 02	Dia 04	Dia 07	
Congelamento a $-80^{\circ}\text{C}$	<i>Candida albicans</i>					
		Dia 01	Dia 02	Dia 04	Dia 07	
Congelamento a $-80^{\circ}\text{C}$	<i>Cryptococcus neoformans</i>					
		Dia 01	Dia 02	Dia 04	Dia 07	
Congelamento a $-80^{\circ}\text{C}$	<i>Fusarium oxysporum</i>					
		Dia 01	Dia 04	Dia 07	Verso	
Congelamento a $-80^{\circ}\text{C}$	<i>Microsporium canis</i>					
		Dia 01	Dia 04	Dia 21	Verso	
Método Castellani	<i>Fusarium oxysporum</i>					
		Dia 01	Dia 03	Dia 07	Verso	



## Conclusões

Levando em consideração o baixo custo, a simplicidade técnica e tempo de armazenamento, conclui-se que a conservação a  $-20^{\circ}\text{C}$  foi a mais vantajosa para os fungos leveduriformes e para os fungos filamentosos o método Castellani teve maior êxito para o isolado de *F. oxysporum* e o óleo mineral para o *M. canis*. Por isso, destaca-se a importância das coleções microbiológicas que necessitam de maiores estudos e criação de protocolos padronizados para a preservação e a conservação de fungos.

## Agradecimentos

Agradeço à professora orientadora por todo o auxílio durante a pesquisa, ao laboratório de micologia médica, às técnicas da CMRP-UEM e ao CNPq por financiar o projeto.

## Referências

- FELIPE, M. T. de C.. **Efeito da preservação pelo método de liofilização sobre a estabilidade fenotípica de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae***. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.
- SOLA, M. C. *et al.* Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.
- DELLARETTI, E. M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. Monografia (Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas). 2014.36 f Universidade Federal São João del-Rei, Sete Lagoas, MG.
- MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**, v. 4. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2009.