

PRESERVAÇÃO DE FUNGOS E ACTINOMICETOS DE INTERESSE MÉDICO EM ÁGUA DESTILADA

Elaine G. RODRIGUES⁽¹⁾, Vanda S. LÍRIO⁽¹⁾ & Carlos da S. LACAZ⁽²⁾

RESUMO

Diferentes processos têm sido utilizados para preservação de fungos, todos eles apresentando vantagens e desvantagens. A escolha do método depende das disponibilidades do laboratório, longevidade da preservação, estabilidade genética das culturas e outros fatores. Apresentamos os resultados obtidos pela utilização do método de Castellani (preservação em água destilada) na manutenção de algumas amostras (174) da Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Após 6, 12, 18 e 24 meses, essas amostras foram analisadas em relação à sua viabilidade, levando-se em consideração a taxa de crescimento e contaminação. A menor e a maior porcentagem de viabilidade foram apresentadas, respectivamente, pelos actinomicetos (aproximadamente 80%) e leveduras (em torno de 100%). Como já descrito por outros autores, o método, além de simples e economicamente viável para laboratórios de pequeno porte, apresenta bons resultados.

UNITERMOS: Método de Castellani; Preservação de fungos; Água destilada

INTRODUÇÃO

Entre os diversos processos utilizados na preservação dos fungos, destacam-se: repiques periódicos em meios sólidos, com ou sem a proteção de óleo mineral, cultivo de esporos em terra ou areia, e em sílica gel, liofilização, conservação em nitrogênio líquido⁽¹⁶⁾ e em água destilada^(5, 6, 7, 8, 9, 16).

Em meios sólidos, após a sementeira, os tubos podem ser deixados à temperatura ambiente, na geladeira ou em congelador. Ao se comparar os vários métodos de preservação dos cultivos, deve-se levar em consideração (em meses ou anos), a estabilidade genética das culturas para a manutenção das características morfológicas, metabólicas e de patogenicidade, entre outros fatores.

SMITH & ONIONS⁽¹⁶⁾, em sua excelente monografia sobre preservação e manutenção dos fungos, valendo-se da experiência do "Commonwealth Mycological Institute", referindo-se ao método da água destilada (processo de Castellani) demonstraram que, para os deuteromicetos, zigomicetos e ascomicetos ele é

de utilidade, com viabilidade dos cultivos variando de 2-5 anos, sendo "moderados" os resultados quanto à estabilidade genética das amostras. Apresenta a vantagem de evitar o desenvolvimento de acarianos. Trata-se de um processo que parece ser promissor, de fácil manuseio, mas a sobrevida dos cultivos se faz por um curto período, em relação, por exemplo, ao processo do óleo mineral, com longevidade que atinge até 32 anos. A American Type Culture Collection (ATCC), segundo BUTTERFIELD et al⁽³⁾, para a manutenção dos fungos de interesse médico utiliza a liofilização e o nitrogênio líquido, evitando a mutação dos cultivos, principalmente dos dermatófitos. GENTLES & SCOTT⁽¹³⁾ recomendam a sílica-gel, com bons resultados.

Nenhuma técnica apresenta sucesso quando aplicada a todos os fungos, de modo geral. A conservação em nitrogênio líquido parece se constituir no processo ideal de preservação, onde as culturas são mantidas em condições estáveis por períodos muito longos não se registrando limites de viabili-

(1) LIM-53 Micologia Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. (2) Chefe dos Laboratórios de Micologia Médica do IMT-SP e do LIM-53 Micologia Médica do HC-FM-USP

Endereço para correspondência: Elaine G. Rodrigues, Faculdade de Medicina da USP - Laboratório de Micologia Médica, Av. Dr. Arnaldo, 455, CEP 01246, São Paulo, Brasil.

dade. Além disso, as culturas podem ser completamente seladas, livres de quaisquer contaminações. Inconvenientes como suprimento contínuo de nitrogênio líquido e a necessidade de infra-estrutura adequada restringem bastante a utilização deste método.

Considerando-se que os métodos já descritos envolvem grande gasto de tempo e utilização de equipamentos especializados, nós da Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, que mantém 1.043 amostras de fungos, actinomicetos e algas, resolvemos trabalhar com a técnica de cultivo em água destilada, simples e pouco dispendiosa, desenvolvida por CASTELLANI^{5,6,7,8,9}, e por nós ligeiramente modificada.

Esperamos com este estudo obter resultados como os já apresentados por outros autores^(1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,16,17), em que essa técnica proporcionou a recuperação de amostras que não sobreviveram no decorrer dos repiques consecutivos e evitar o pleomorfismo freqüentemente encontrado nos processos de conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi iniciado com 63 amostras, 3 actinomicetos aeróbios e 60 fungos. Após 12 meses o número de amostras foi aumentado para 174, sendo 16 actinomicetos e 158 fungos. Foram utilizados os substratos ágar-Sabouraud ou ágar-batata, mantidos à temperatura ambiente.

Todas as culturas pertenciam à Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. A água destilada (volume de 7 ml) foi distribuída em tubos de ensaio de 13 mm/100 mm, fechados com roscas de plástico. Para a sementeira, foi sempre utilizado um fragmento do meio de cultura com o fungo ou o actinomiceto nele desenvolvido. A manutenção dos tubos contendo água foi feita à temperatura ambiente.

Devido à não vedação dos tubos, houve redução da água destilada após 6 meses aproximadamente, o que nos levou a recompor o volume inicial com água destilada estéril. Os tubos foram depois vedados com filme transparente de P.V.C. (cloreto de polivinil).

Após 6, 12, 18 e 24 meses, foi praticada a sementeira em ágar-Sabouraud, a fim de se verificar a viabilidade das amostras. Os tubos com água

destilada eram previamente agitados, e amostras eram retiradas com alça de platina ou pipeta Pasteur.

A leitura da viabilidade foi realizada dentro de um prazo de 30 dias após a sementeira. Em algumas amostras, como o *Paracoccidioides brasiliensis*, utilizou-se a estufa a 37°C bem como o aumento do inóculo para a verificação do crescimento.

RESULTADOS

Os resultados obtidos quanto à viabilidade das amostras de fungos e actinomicetos constam na Tabela 1. Das 174 amostras de fungos estudadas após 6 e 12 meses, 119 eram "filamentosas", 5 dermatófitos, 34 leveduras e 16 actinomicetos aeróbios. Os resultados, descritos em 18 e 24 meses, referem-se a 63 amostras iniciais, sendo 3 actinomicetos aeróbios, 2 dermatófitos, 9 leveduras e 49 "filamentosos"

A Tabela 2 permite a visualização da porcentagem de viabilidade e de contaminação dos grupos de fungos estudados nos diferentes períodos de recuperação; o gráfico 1 mostra a porcentagem total de viabilidade e contaminação obtidos após 6, 12, 18 e 24 meses.

DISCUSSÃO

A porcentagem de amostras viáveis nos diferentes períodos de recuperação das amostras (gráfico 1) variou de 82 a 98%, tendo como fatores principais para sua queda a contaminação (0 a 12%) e o não crescimento de algumas delas (0 a 6%).

O grupo das leveduras foi o que apresentou melhor padrão de sobrevivência neste método, ficando a queda para 60% de viabilidade aos 18 meses, restrita a problemas de contaminação.

O grupo que apresentou menor viabilidade foi o dos actinomicetos, por mostrarem dificuldades de manterem-se viáveis quando conservados em água destilada. Uma amostra de *Nocardia rubra* não cresceu após 6 meses, embora tenha-se repetido o experimento duas vezes.

Embora tenhamos trabalhado com um pequeno número de fungos dimórficos e dermatófitos, ambos grupos mostraram boa viabilidade após 6, 12, 18 e 24 meses de conservação em água destilada.

Tabela 1

Relação do número de amostras examinadas e do número de amostras viáveis, por espécie, após o período de preservação em água destilada de 6, 12, 18 e 24 meses.

Fungos	Número de Amostras			
	6m	12m	18m	24m
Dimórficos				
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	4/4	3/1***	-	-
<i>Chrysosporium parvum</i> var. <i>crescens</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Histoplasma capsulatum</i>	3/3	3/2**	1/1	1/1
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	5/5	5/5	1/1	1/1
Actinomicetos				
<i>Actinomadura madurae</i>	2/2	2/1*	-	-
<i>Actinomadura pelletieri</i>	2/1**	1/1	1/0**	-
<i>Micromonospora</i> sp	1/1	1/1	-	-
<i>Nocardia asteroides</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Nocardia brasiliensis</i>	3/3	3/2**	-	-
<i>Nocardia caviae</i>	2/2	2/2	-	-
<i>Nocardia rhodnii</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Nocardia rubra</i>	1/0**	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp	3/3	3/2**	1/1	1/1
Dermatófitos				
<i>Microsporium distortum</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Microsporium fulvum</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Microsporium persicolor</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Trichophyton soudanense</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Trichophyton violaceum</i>	1/1	1/0*	-	-
Leveduras				
<i>Aureobasidium pullulans</i>	4/4	4/4	1/0*	-
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Candida albicans</i>	3/3	3/3	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Candida krusei</i>	2/2	2/2	-	-
<i>Candida macedoniensis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Candida parapsilosis</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Candida pseudotropicalis</i>	2/2	2/2	-	-
<i>Candida rugosa</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Candida stellatoidea</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	5/5	5/5	-	-
<i>Debaryomyces tyrocola</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Endomycopsis platypodis</i>	1/1	1/1	1/0*	-
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	1/1	1/1	1/0*	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Rhodotorula graminis</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1/1	1/1	1/1	1/1

<i>Torulopsis glabrata</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Trichosporon beigelii</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Trichosporon capitatum</i>	1/1	1/1	1/0*	-
Fungos Filamentosos				
<i>Acremonium falciformis</i>	2/2	2/2	-	-
<i>Acremonium potronii</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Acremonium sp</i>	2/2	2/2	1/1	1/1
<i>Alternaria citri</i>	1/1	1/1	1/0*	-
<i>Aspergillus clavatus</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	3/3	3/3	1/1	1/0*
<i>Aspergillus niger</i>	2/2	2/2	-	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Aspergillus sp</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	2/2	2/2	-	-
<i>Basidiobolus haptosporus</i>	2/2	2/1*	-	-
<i>Basidiobolus ranarum</i>	1/0**	-	-	-
<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Ceratocystis sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Chaetomium globosum</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Chaetomium perpulchrum</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Chaetosphaeronema larense</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Circinella sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Cladosporium bantianum</i>	1/1	1/0**	-	-
<i>Cladosporium carrionii</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Cladosporium elatum</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Cladosporium sp</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Conidiobolus coronatus</i>	2/2	2/2	1/0**	-
<i>Cunninghamella sp</i>	2/1**	1/1	1/1	1/1
<i>Curvularia lunata</i>	2/2	2/2	1/1	1/1
<i>Drechslera sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Epicoccum sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Exophiala gougerotii</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Exophiala jeanselmei</i>	3/3	3/3	-	-
<i>Exophiala spinifera</i>	3/3	3/3	-	-
<i>Exophiala werneckii</i>	3/3	3/3	-	-
<i>Fonsecaea compacta</i>	2/2	2/2	-	-
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	5/5	5/5	1/1	1/1
<i>Fusarium sp</i>	3/3	3/3	1/1	1/1
<i>Fusidium sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Geotrichum sp</i>	2/2	2/2	1/1	1/1
<i>Hemispora sp</i>	1/0	1/0**	-	-
<i>Leptosphaeria senegalensis</i>	2/2	2/1*	-	-
<i>Madurella grisea</i>	6/6	5/4**	1/0*	-
<i>Madurella mycetomatis</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Mucor sp</i>	2/2	2/2	1/1	1/1
<i>Neotestudina rosatii</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Nigrospora sp</i>	2/2	1/0*	-	-
<i>Paecylomyces sp</i>	1/1	1/1	-	-

<i>Paecylomyces variotii</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Penicillium lilacinum</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Penicillium notatum</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Phialophora parasitica</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Phialophora richardsiae</i>	1/1	1/1	-	-
<i>Phialophora verrucosa</i>	2/2	2/2	-	-
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	1/1	1/0*	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Scedosporium apiospermum</i>	3/3	3/3	1/1	1/1
<i>Scolecobasidium sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Scopulariopsis sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Scytallidium lignicola</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Sepedonium ampullosporum</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Sordaria sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Spiegazzinia tessarthra</i>	1/1	1/0**	-	-
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Syncephalastrum sp</i>	3/3	3/3	-	-
<i>Trichoderma sp</i>	2/2	2/2	1/1	1/1
<i>Trichothecium sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Zygorrhynchus sp</i>	1/1	1/1	1/1	1/1

*no período de recuperação mencionado, apresentou-se contaminado

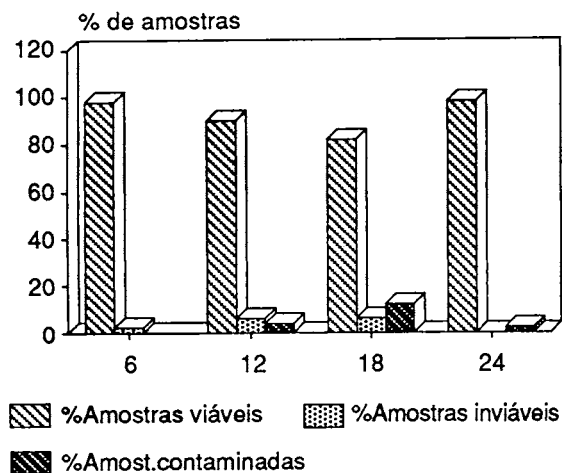
**não apresentou crescimento após o período de recuperação mencionado
m - meses

Tabela 2

Porcentagem total de viabilidade e contaminação dos grupos de fungos estudados por período de recuperação.

Grupo	Período	Nº Isolados TESTADOS/VIÁVEIS	% VIÁVEIS	% CONTAMINAÇÃO	% NÃO viáveis
LEVEDURAS	6m	34/34	100	0	0
	12m	34/34	100	0	0
	18m	10/06	60	40	0
	24m	06/06	100	0	0
ACTINOMICETOS	6m	16/14	88	0	12
	12m	14/11	79	7	14
	18m	02/01	50	0	50
	24m	01/01	100	0	0
DERMATÓFITOS	6m	05/05	100	0	0
	12m	05/04	80	0	20
	18m	02/02	100	0	0
	24m	02/02	100	0	0
FUNGOS FILAMENTOSOS	6m	103/101	98	0	2
	12m	99/91	92	4	4
	18m	33/30	91	6	3
	24m	30/29	97	3	0
DIMÓRFICOS	6m	16/16	100	0	0
	12m	15/11	73	7	20
	18m	04/03	75	0	25
	24m	03/03	100	0	0

Grafico 1:
Demonstração dos totais obtidos em viabilidade e contaminação após 6, 12, 18 e 24 meses.



Preservação de fungos em água destilada

da. Uma amostra respectivamente de *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Trichophyton violaceum* não cresceram após 12 meses de conservação, apesar de terem apresentado crescimento com 6 meses.

Quando se verifica a viabilidade de fungos filamentosos, observam-se altas taxas de sobrevivência (91 a 98%). Neste grupo, observou-se a maior porcentagem de contaminação. Após 6 meses, somente duas amostras não cresceram: *Basidiobolus ranarum* e *Cunninghamella* sp; após 12 meses, *Cladosporium bantianum*, *Hemispora* sp, *Madurella grisea* e *Spegazzinia tessartha*; e, em 18 meses, uma amostra de *Conidiobolus coronatus* não apresentou crescimento.

Como já discutido por diversos autores (1, 2, 4, 10, 11, 12, 14, 16, 17), o método de preservação de culturas em água destilada (método de Castellani) apresenta vantagens em relação a outros processos, tais como seu baixo custo e a capacidade de evitar o pleomorfismo das amostras, tão comum nos repiques sucessivos; sabe-se, também, que amostras já pleomorfizadas não reverterem essa condição quando preservadas por esse método. Todavia, no decorrer do nosso trabalho, observamos que muitas amostras que haviam perdido algumas das suas ca-

racterísticas macroscópicas após repiques sucessivos, voltaram a apresentá-las depois de serem preservadas em água destilada.

Durante nosso estudo, mantiveram-se as culturas preservadas em água destilada e, paralelamente, em repiques sucessivos. Algumas amostras que não apresentaram crescimento neste último processo, mantiveram sua viabilidade em água destilada e puderam ser novamente recuperadas.

As dificuldades apresentadas por alguns fungos em sobreviverem durante longos períodos em água destilada podem ser devidas ao período de crescimento escolhido para o inóculo e talvez também por inóculos constituídos por células inviáveis. BENEDEKE⁽¹⁾, segundo FIGUEIREDO⁽¹¹⁾, apresentou uma modificação do método, considerando que a água destilada, hipotônica para todos os fungos, poderia ser substituída por solução fisiológica salina para que haja equilíbrio na pressão osmótica. Essa poderia ser uma tentativa para os fungos que, em nosso experimento, não apresentaram boa viabilidade. Tais estudos poderiam contribuir para o aprimoramento de uma técnica tão simples e economicamente viável.

SUMMARY

Preservation of Fungi and actinomycetes in distilled water

Several methods have been used for the preservation of fungi, all of them presenting advantages and disadvantages. The choice of the methods depends upon the laboratory availabilities, time of preservation, genetic stability of the cultures and other factors. In this work the results obtained through the utilization of Castellani's method (preservation in distilled water) for the maintenance of 174 strains belonging to the "Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo" are presented. These strains were analyzed after 6, 12, 18 and 24 months, with regard to the percentage of viability taking into consideration the rates of growth and contamination. The smallest percentage of viability occurred in the group of the actinomycetes (50 to 100%) and the largest one in the group of the yeasts (near 100%). According to other authors, the Castellani's method, besides being simple and economically feasible for small size laboratories, yields good results.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Natalina Takahashi de Melo, Elizabeth Maria Heins Vaccari e Edward Porto, pela colaboração na análise das culturas, e ao Dr. Gildo Del Negro, pela tradução do resumo para o inglês.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENEDEK, T. - *Fragmenta Mycologica. II. On Castellani's and Benedek's "Mycotheca" in chlorallactophenol. Mycopathologia (Den Haag)*, 17:255-260, 1961.
2. BOESEWINKEL, H.J. - Storage of fungal cultures in water. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 66: 183-185, 1976.
3. BUTTERFIELD, W.; JONG, S.C. & ALEXANDER, M.T. - Preservation of living fungi pathogenic for man and animals. *Canad. J. Microbiol.*, 20: 1665-1673, 1974.
4. CASTAGNETTA, E. & MUNGELLUZZI, C. - Sulla conservazione per lungo tempo dei lieviti, dei dermatofiti e altri funghi in acqua distillata secondo il metodo di Castellani per evitare fenomeni pleomorfici. *Arch. ital. Sci. med. trop.* 43: 73-78, 1962.
5. CASTELLANI, A. - Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. trop. Med. Hyg.*, 42: 225-226, 1939.
6. CASTELLANI, A. - A brief note on the viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water and a simple method to maintain fungal strains in mycological collections, preventing pleomorphism. *Impr. méd. (Lisboa)*, 24: 270-272, 1960a.
7. CASTELLANI, A. - Persistency and variations in the cultural and biochemical characters of certain fungi of human origin isolated two, three, four and five decades ago. *Impr. méd. (Lisboa)*, 24:392-396, 1960b.
8. CASTELLANI, A. - The "water cultivation" of pathogenic fungi. *J. trop. Med. Hyg.*, 66: 283-284, 1963.
9. CASTELLANI, A. - Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J. trop. Med. Hyg.*, 70: 181-184, 1967.
10. ELLIS, J.J. - Preserving fungus strains in sterile water. *Mycologia*, 71: 1072-1075, 1979.
11. FIGUEIREDO, M.B. - Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. *O Biológico*, 33: 9-13, 1967.
12. FIGUEIREDO, M.B. & PIMENTEL, C.P.V. - Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopath.*, 1: 299-302, 1975.
13. GENTLES, J.C. & SCOTT, E. - The preservation of medically important fungi. *Sabouraudia*, 17: 415-418, 1979.
14. MCGINNIS, M.R.; PADHYE, A.A. & AJELLO, L. - Storage and stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Appl. Microbiol.*, 28: 218-222, 1974.
15. RESTREPO M., A. - The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*, 23: 323-334, 1985.
16. SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. - **The preservation and maintenance of living fungi.** Kew (UK), Commonwealth Mycological Institute, 1983.
17. URDANETTA, M.S. & LACAZ, C.S. - Preservation of fungi in distilled water. Preliminary results. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 7: 24-26, 1965.

Recebido para publicação em 13/8/1991
Aceito para publicação em 10/1/1992