

Preservação de fungos em água destilada*

*Fungi preservation in distilled water**

Hilda Conceição Diogo¹Aldo Sarpieri²Mário Cezar Pires³

Resumo: FUNDAMENTOS – As micotecas são coleções de fungos conservadas para estudo futuro ou para a obtenção de extratos, drogas e outros fins. A conservação em meios de cultura por repiques sucessivos exige cuidados e nem sempre é fácil. Há necessidade de novas técnicas para a manutenção de fungos viáveis por longos períodos.

OBJETIVO – avaliar a eficácia da preservação de fungos em água destilada num período de 12 meses.

MÉTODOS – 43 espécies de fungos foram mantidas em frascos de vidro com água destilada estéril. Mensalmente eram colhidos de 200 a 250 µl do líquido e inoculado em ágar batata dextrose para avaliar o crescimento e viabilidade dos fungos.

RESULTADOS – houve crescimento dos fungos em todos os meses pelo período de um ano.

CONCLUSÕES – A preservação de cepas pelo método da água destilada possibilitou, nesse curto espaço de tempo, provar a viabilidade e a capacidade de esporulação das cepas submetidas ao estudo. A conservação de fungos em água destilada é método barato e prático para manutenção de micoteca.

Palavra-chave: Água destilada; Cultura; Fungos

Abstract: BACKGROUND - Mycology collections are used to preserve fungi for future studies or to obtain extracts, drugs and others. Fungal preservation in culture media by successive sampling requires care and is not always easy. Novel techniques are necessary to maintain viable fungi for longer periods.

OBJECTIVE - To evaluate the efficacy of preservation of fungi in distilled water for 12 months.

METHODS - 43 species of fungi were maintained in glass flasks with sterile distilled water. Two hundred to 250 µl of the liquid were monthly collected and inoculated in potato dextrose agar to evaluate growth and viability of the fungi.

RESULTS - All fungi grew every month during one year.

CONCLUSIONS - Preservation of fungal strains in distilled water allowed, in a short time interval, to prove viability and sporulation capacity of the fungi. Preservation of fungi in distilled water is a cheap and practical method to maintain a mycology collection.

Keywords: Distilled water; Culture; Fungi

INTRODUÇÃO

No campo da microbiologia os fungos têm grande importância, pois acometem todos os seres vivos. Há diversas infecções provocadas por esses agentes, das micoses superficiais até doenças com altos índices de morbidade e mortalidade.¹ Por outro lado, vários medicamentos, conservantes e outras drogas são obtidos a partir de fungos.¹ Dado o aumento das doenças com comprometimento da imunidade, como a síndrome da imunodeficiência adquirida, muitas infecções fúngicas oportunistas tornaram-se prevalentes.²

A manutenção desses fungos em certos meios de cultura requer muitos cuidados, pois os consomem rapidamente e necessitam repiques freqüentes, gastando tempo e possibilitando contaminação e diminuição da virulência.^{3,4} Devido a essas dificuldades, foram desenvolvidos outros métodos para a conservação de fungos, como óleo mineral,⁵ areia,⁶ sílica-gel,⁵ tecidos secos do hospedeiro⁵ e água destilada.^{7,8,9} A liofilização¹⁰ e a conservação em nitrogênio líquido^{11,12} são alternativas, embora os resultados sejam variados.

No setor de micologia do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos os fungos são mantidos pela técnica de repiques periódicos.² Tendo em vista as dificuldades dessa técnica, realizou-se o presente estudo em que se avaliou a viabilidade de várias colônias mantidas pelo período de um ano em água destilada.

MATERIAL E MÉTODOS

A micoteca em questão é composta por 43 cepas de fungos obtidas de doentes com diversas micoses, preservadas por repiques periódicos em ágar batata dextrose. Amostras dessas cepas foram retiradas e colocadas em frascos estéreis de vidro contendo 4ml de água destilada, também estéril, identificadas e fechadas hermeticamente com tampas especiais de borracha e cinta de alumínio (Figura 1). Os fungos coletados foram: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp*, *Aureobasidium sp*, *Aureobasidium hediomar*, *Basidiobolus ranarum*, *Circella sp.*, *Cladosporium*

Recebido em 16.02.2005.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 20.10.2005.

* Trabalho realizado no Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos e Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil

¹ Bióloga, técnica em micologia do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos; Mestranda da Coordenadoria dos Institutos de Pesquisa do Estado de São Paulo (SP), Brasil.

² Dermatologista, Chefe do Laboratório de Micologia do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos.

³ Diretor do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos, Mestre e Doutor pelo Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo.

bantianum, *Cladosporium carrionii*, *Conidiobolus coronatus*, *Cunninghamella* sp, *Epidermophyton floccosum*, *Exophiala dermatitides*, *Exophiala jeanselmei*, *Fonsecaea compacta*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fusarium* sp, *Geotrichum candidum*, *Histoplasma capsulatum*, *Madurella grisea*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Mucor* sp, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium nonatum*, *Penicillium* sp, *Phialophora verrucosa*, *Phaeoannellomyces werneckii*, *Scopulariopsis* sp, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Rhizopus* sp, *Scedosporium aptiospermum*, *Scytalidium hialinum*, *Scytalidium lignicola*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *Trichophyton raubitschekii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*.

Em intervalos de 30 dias, após assepsia com álcool 70% e em presença de chama, amostras do líquido contendo o fungo foram obtidas com seringas de insulina (200 a 250µl), semeadas em ágar batata dextrose e colocadas em estufa à temperatura variável de 25 a 30° C. O crescimento das colônias foi observado semanalmente e realizada a coleta de material para análise microscópica mensalmente (coloração pelo lactofenol azul algodão). Mensalmente era realizado o microcultivo em lâmina, conforme técnica padrão.¹³ A identificação dos fungos seguiu as normas internacionais para cada gênero e espécie.¹³ As culturas e os microcultivos foram fotografados para acompanhamento. Esse procedimento prosseguiu por 12 meses.

RESULTADOS

Todos os 43 fungos conservados em água destilada foram recuperados nas coletas para culturas. A tabela 1 mostra os fungos identificados nas culturas obtidas a partir do líquido dos frascos com água destilada nas 12 coletas.



FIGURA 1: Conjunto completo da micoteca em água destilada

Na figura 2 podem ser observados exemplos de culturas em ágar batata dextrose de alguns dos fungos recuperados a partir da água destilada. As características morfológicas macro e microscópicas dos fungos foram mantidas.

DISCUSSÃO

Os fungos, ao contrário da maioria das bactérias, são seres com velocidade de crescimento lento em meios de cultura. Por outro lado, muitas vezes há contaminação bacteriana ou por outros fungos, o que prejudica a conservação das colônias. As técnicas existentes para a manutenção de micotecas são trabalhosas, dispendiosas e muitas vezes ineficientes. O desenvolvimento de novas formas de preservação de fungos por períodos prolongados faz-se necessário.³

Os laboratórios de micologia são responsáveis pelo diagnóstico das infecções fúngicas, assim como conservação de cepas padrão. Sabe-se que existem provas bioquímicas para fungos mais primitivos, como as leveduras.² No entanto, para a identificação de fungos filamentosos até o presente momento não há método bioquímico específico. Ela é feita através da observação macro e microscópica, quando se observam: crescimento da colônia; cor; textura; pulverulenta ou não, cotonosa, filamentosa; corpo de frutificação; micro ou macroconídio e outras características.¹³ Como os fungos diferem entre si, faz-se necessária uma micoteca nos laboratórios de micologia. Essas micotecas são constituídas por espécimes de fungos e têm levado muitos estudiosos a aperfeiçoarem técnicas para a preservação das espécies de interesse em cada área específica, criando-se assim coleções mundiais como IMI (*International Mycological Institute*) Kew Inglaterra; a ATCC (*American Type Culture Collection*) Maryland, EUA; o CBS (*Centraalbureau Voor Schimmelcultures*) Baar – Delft, Holanda; Institute For Fermentation (IFO), Osaka, Japão; *Japan Collection of Microorganisms* (JMC) Wako, Saitama, Japão; *Mycothèque de L'Université Catholique de Luvain*



FIGURA 2: Culturas de fungos obtidas a partir da água destilada

TABELA 1: Fungos recuperados a partir de esporos conservados em água destilada em período de 12 meses

Preservação - água destilada	Período de agosto de 2002 a julho de 2003 - preservação pelo método de água destilada											
	Período de Estudo	Ago-02	Set-02	Out-02	Nov-02	Dez-02	Jan-03	Fev-03	Mar-03	Abr-03	Jun-03	Jul-02
microorganismo em estudo												
<i>Aspegillus fumigatus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Aspergillus niger</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Aspergillus sp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Aureobasidium sp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Aureobasidium bediomas</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Basidiobolus ranarum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Circinella</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Cladosporium bantianum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Cladosporium carrionii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Conidiobolus coronatus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Cunninghamella sp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Exophiala jeanselmei</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Fonsecaea compacta</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Fonsecaea predosoi</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Fusarium sp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Geotrichum candidum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Histoplasma capsulatum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Madurella grisea</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Microsporium canis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Microsporium gypseum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Mucor sp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Penicillium nonatum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Penicillium sp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pbialophora verrucosa</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Phaeoannellomyces werneckii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Scopulariopsis sp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Rhinochadiella aquaspersa</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Rhizopus sp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Scedosporium apiospermum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Scytalidium hialinum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Scytalidium ligbiniicola</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Sporothrix schenckii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichosporon beigeli</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichophyton mentagrophytes interdigitale</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichophyton mentagrophytes var. mentagrophytes</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichophyton raubitschekii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichophyton rubrum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichophyton verrucosum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichophyton violaceum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(MUCL) Luvain-le-Nueve, Bélgica e outras.^{5,13}

O subcultivo das amostras de fungos, a partir do frasco com as cepas de primo-isolamento, foi de encontro ao objetivo desejado, mostrando-se ativo quando, com ajuda de uma seringa de insulina, retiravam-se alíquotas contendo quantidade equivalente a quantidade variável de 200 a 250µl da água destilada que continha a suspensão de esporos. A quantidade mencionada foi inoculada em substrato de escolha e apropriado para cultivo (ágar batata dextrose). Utilizando-se a metodologia proposta, constatou-se que a cepa acondicionada no frasco tipo penicilina ocupa um espaço mínimo para ser acomodada (Figura 1) em comparação com o acondicionamento de tubos de ensaio no método de repiques periódicos, além do fato de os tubos de ensaio serem frágeis, podendo a qualquer impacto sofrer avarias, ocasionando disseminação do microorganismo e contaminação do ambiente ou mesmo do profissional.

Com o armazenamento pelo método de água destilada, o procedimento para se obter o microorganismo preservado pode ser realizado várias vezes, utilizando sempre o mesmo frasco, até o aproveitamento total do líquido. O espaço ocupado pelo conjunto de frascos foi otimizado em relação ao necessário para micotecas tradicionais de repiques sucessivos em tubos de ensaio. Foi observado que não há necessidade de esgotar-se o líquido e retirar a cepa preservada, para seu subcultivo, conforme a metodologia original de Castellani.⁷

A micoteca transformou-se num simples kit contendo os microorganismos necessários para estudo ou interesse clínico, acondicionados em frascos tipo penicilina e ao lado as lâminas preparadas em microcultivo (Figura 1) com suas respectivas cepas, demonstrando os micélios e corpo de frutificação.

A preservação das cepas pelo método da água destilada possibilitou, em 12 meses, a manutenção da

viabilidade e a capacidade de esporulação.

A observação macroscópica da cepa em estudo foi possível utilizando o método acima mencionado. As cepas conservaram as características descritas na literatura,^{2,5} mesmo aquelas que já haviam perdido suas propriedades por repiques sucessivos.

Em relação às análises microscópicas das cepas em estudo, quanto à viabilidade do micro e macroconídios, corpo de frutificação e micélios, notou-se que mesmo com muitos repiques apresentaram qualidade inerente às cepas virgens ou selvagens. Para confirmar essas características, usou-se a técnica do microcultivo, que mostrou as microestruturas do organismo em estudo típicas de acordo com os métodos usados para identificação.

CONCLUSÕES

Com base no experimento realizado, pode-se concluir que:

1. A preservação de cepas pelo método da água destilada possibilitou, em curto espaço de tempo, provar a viabilidade e a capacidade de esporulação das cepas submetidas ao estudo.
2. A técnica de manutenção em frascos lacrados contendo água destilada mostrou-se eficaz para preservar as características de esporulação de fungos filamentosos de interesse médico.
3. A conservação de fungos em frascos com água destilada é de fácil manejo, armazenamento e transporte, além de mais econômica do que o método tradicional de repiques sucessivos. □

AGRADECIMENTOS

Márcia Carvalho de Souza Melhem, pelo auxílio na identificação de algumas culturas.
João Maurício A. Martins, pela fotos das culturas.
Cláudio Talarico, pelo auxílio no laboratório.

REFERÊNCIAS

1. Costa AR. Micoses superficiais e profundas. In: Sittart JAS, Pires MC. Dermatologia para o clínico. São Paulo: Lemos Editorial; 1998.
2. Lacaz CS. Candidíases. São Paulo: EDUSP; 1980.
3. Costa CP, Ferreira MC. Preservação de microrganismos. Rev Bras Microbiol. 1991;22:263-8.
4. Kirsop BE, Doyle A. Maintenance of microorganisms and cultured cells – A manual of laboratory methods. 2ª ed. London: Academic Press Inc; 1984.
5. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 44 – 71.
6. Bakerpiegel A. Soil as a storage medium for fungi. In: Bakerpiegel A, editor. Mycology. Berlin: Springer;1953. p. 596-604.
7. Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. J Trop Med Hyg. 1939;24:270-6.
8. Figueiredo MB, Pimentel CPV. Métodos de preservação de fungos em água destilada. J Biol.1989;55:27-33.
9. Odds FC. Long-term laboratory preservation of pathogenic

- yeasts in water. J Med Vet Mycol. 1991;29:413-5.
10. Ashcar H. Manutenção de culturas de *Microsporum canis* por liofilização (Observação após 20 anos). Rev Inst Adolfo Lutz. 1973;33:7-11.
11. Hoffmann P. Cryopreservation of fungi. W J Microbiol Biotech. 1999; 7:92-4.
12. Nery SA, Melhem MSC, Gomes AML. Manutenção da levedura *Cryptococcus* por congelamento. Laes-Haes. 2001;129:194-8.
13. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para identificação “Fungos Actinomicetos e Algas” de interesse médico. São Paulo: Savier; 1998.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Hilda Conceição Diogo

Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulbos
Rua Diogo Feijó, 258/135
07055-170 Guarulbos SP