

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências  
Mestrado em Biologia de Fungos

**KALINY BENICIO TORRES**

**VIABILIDADE E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE FUNGOS  
PRESERVADOS EM ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA NA MICOTECA URM**

Recife  
2008

**KALINY BENICIO TORRES**

**VIABILIDADE E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE FUNGOS  
PRESERVADOS EM ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA NA MICOTECA URM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Área de Concentração Micologia Básica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristina M<sup>a</sup> de Souza Motta

Recife  
2008

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Torres, Kaliny Benício**

**Viabilidade e caracterização fisiológica de fungos preservados em água destilada esterilizada na micoteca URM. / Recife: O Autor, 2008.**

**83 folhas: il., fig., tab.**

**Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, Recife, 2008.**

**Inclui referências**

- 1. Fungos 2. Enzimas 3. Fisiologia I. Motta, Cristina Maria de (orient.) II. Título**

**579.5**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2017- 512**

**KALINY BENICIO TORRES**

**VIABILIDADE E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE FUNGOS  
PRESERVADOS EM ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA NA MICOTECA URM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre(a).

Aprovada em Recife, 27 de Fevereiro de 2008

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristina M<sup>ª</sup>.de Souza Motta  
Universidade Federal de Pernambuco  
(Orientadora)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Oliane M<sup>ª</sup>. Correia Magalhães  
Universidade Federal de Pernambuco  
(Membro Titular)

---

Prf<sup>º</sup>. Dr. Nelson Lima  
Universidade do Minho  
(Membro Titular)

Dedico a meus pais, Leni e Zilton, pelo amor incondicional e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela certeza de sua presença sempre ao meu lado.

Agradeço a meus pais e meus irmãos, Leila, Janilson e Karely pelo incentivo, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Agradeço toda minha família por sempre desejarem e acreditarem no meu sucesso.

Agradeço à minha orientadora Cristina, pelos ensinamentos, orientação e dedicação na realização deste trabalho.

Agradeço às professoras Rejane, Maria, Débora, Laura e Ângela pelos incentivo, cooperação e ensinamentos, em especial a Oliane pelos incentivo, profissionalismo e “co-orientação” na realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos da Micoteca URM Eliane, Minelli, Steffânia, Liana, Marília, Polyanna, Herbert, Paula e Taísa, pela colaboração, incentivo e torcida, em especial a Hanilma, Roberta e Odacy, por além de tudo isso, terem se tornado grandes amigas.

Agradeço aos amigos do curso de mestrado pelos momentos de descontração e amizade.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelos valiosos ensinamentos.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco e ao Departamento de Micologia pela oportunidade oferecida na realização do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos.

Agradeço o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O método de água destilada esterilizada tem sido utilizado com sucesso na preservação de diferentes grupos de fungos, garantindo viabilidade, pureza e conservação de características morfofisiológicas. Este método é indicado para culturas de Oomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota, sendo comprovada a eficiência em preservar fungos patógenos. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar viabilidade e autenticar taxonomicamente 215 culturas de fungos preservadas entre 1989 e 2002 em água destilada esterilizada na Micoteca URM e caracterizar quanto ao crescimento a 37°C e atividades proteinásica, fosfolipásica, queratinásica e ureásica as culturas patogênicas. Os substratos utilizados para detecção das atividades enzimáticas foram: protease - caseína e gelatina (apenas para *Sporothrix schenckii*); fosfolipase - lecitina de soja; queratinase - crina de cavalo; e urease - uréia (apenas para *S. schenckii*). Das 215 culturas preservadas, apenas 86 (40%) estavam viáveis, nenhuma apresentou contaminação e a autenticação taxonômica só não foi possível nas culturas de *Epidermophyton*, devido à ausência de esporulação. Com relação à caracterização, todos os dermatófitos cresceram a 37°C e produziram queratinase; nenhum produziu fosfolipase e, exceto dois isolados, todos produziram protease. Os isolados de *S. schenckii* cresceram a 37°C e apresentaram atividades proteinásica e queratinásica, sendo negativos para as atividades fosfolipásica e ureásica. O método de preservação em água destilada esterilizada garante maior viabilidade para culturas de Zygomycetes preservadas por até seis anos, já para os dermatófitos e *S. schenckii*, este período pode chegar a 16 anos. Para todos os fungos testados, este método garante a pureza e conservação morfofisiológica das culturas. Isolados de dermatófitos e de *S. schenckii* podem apresentar atividades proteinásica e queratinásica após 16 anos de preservação em água destilada esterilizada.

**Palavras-chave:** Água destilada esterilizada. Viabilidade. Características morfofisiológicas. Enzimas extracelulares.

## ABSTRACT

The method of sterilized distilled water has been used with success in the preservation of different fungi groups, assuring viability, purity and conservation of morphophysiological characteristics. This method is indicated for cultures of Oomycota, Zygomycota, Ascomycota and Basidiomycota, being proven the efficiency in preserving pathogen fungi. The aims of this research were to evaluate viability and to taxonomically authenticate 215 cultures of fungi preserved between 1989 and 2002 in sterilized distilled water at the Micoteca URM and to characterize with relationship to the growth to 37°C and proteinase, phospholipase, keratinase and urease activities the pathogenic cultures. The substrates used for detection of the enzymatic activities were: proteinase - casein and gelatin (just for *Sporothrix schenckii*); phospholipase - soy lecithin; keratinase - horse mane; and urease - urea (just for *S. schenckii*). Of the 215 preserved cultures, only 86 (40%) were viable, none presented contamination and the taxonomic authentication was not only possible in the cultures of *Epidermophyton*, due to sporulation absence. With relationship to the characterization, all the dermatophytes grew to 37°C and produced keratinase; none produced phospholipase and, except two isolated, all produced protease. The isolated of *S. schenckii* grew to 37°C and presented proteinase and keratinase activities, being negative for the phospholipase and urease activities. The preservation method in water distilled sterilized assure larger viability for cultures of Zygomycetes preserved for up to six years, already for the dermatophytes and *S. schenckii*, this period can arrive at 16 years. For all the tested fungi, this method assured the purity and morphophysiological conservation of the cultures. Isolated of dermatophytes and *S. schenckii* can present proteinase and keratinase activities after 16 years of preservation by sterilized distilled water.

**Key-words:** Sterilized distilled water. Viability. Morphophysiological characteristics. Extracellular enzymes.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

- FIGURA 1 - Preenchimento de frascos de vidro com água destilada esterilizada.....16**
- FIGURA 2 - Confeção de blocos de ágar com crescimento fúngico.....16**
- FIGURA 3 - Cultura de fungo preservada em água destilada esterilizada da Coleção de Culturas, Micoteca URM, Departamento de Micologia/ UFPE.....16**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 - Técnicas de preservação para cada grupo de fungos .....</b>	<b>18</b>
<b>TABELA 2 - Número de Coleções de Culturas na África .....</b>	<b>25</b>
<b>TABELA 3 - Número de Coleções de Culturas na América.....</b>	<b>25</b>
<b>TABELA 4 - Número de Coleções de Culturas na Ásia.....</b>	<b>25</b>
<b>TABELA 5 - Número de Coleções de Culturas na Oceania .....</b>	<b>26</b>
<b>TABELA 6 - Número de Coleções de Culturas na Europa .....</b>	<b>26</b>
<b>TABELA 7 - Coleções de Culturas existentes no Brasil.....</b>	<b>27</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>14</b>
2.1 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	14
2.2 COLEÇÕES DE CULTURAS DE MICRORGANISMOS.....	22
2.3 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS.....	30
<b>3 ZYGOMYCETES PRESERVADOS EM ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA NA MICOTECA URM, BRASIL.....</b>	<b>35</b>
Resumo.....	36
Introdução.....	37
Material e métodos.....	38
Resultados e discussão.....	38
Observações finais.....	40
Agradecimentos.....	40
Referências.....	40
<b>4 VIABILIDADE E CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE DERMATÓFITOS PRESERVADOS EM ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA NA MICOTECA URM, BRASIL.....</b>	<b>49</b>
Introdução.....	50
Materiais & métodos.....	51
Resultados.....	52
Discussão.....	53
Agradecimentos.....	55
Referências.....	56
<b>5 SPOROTHRIX SCHENCKII: CARATERES MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DE CULTURAS PRESERVADAS EM ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA NA MICOTECA URM, BRASIL.....</b>	<b>66</b>
Resumo.....	67
Introdução.....	68
Materiais e métodos.....	68
Resultados.....	70
Discussão.....	71

Agradecimentos.....	73
Referências.....	73
<b>6 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de microrganismos é um elemento essencial para a produção de alimentos, fármacos e químicos; para os ensaios de qualidade, potência e segurança de produtos usados no diagnóstico e tratamento de micoses; para os estudos taxonômicos e comparativos de novos isolados e para o treinamento de pessoal especializado. Com o crescente desenvolvimento dessas atividades, faz-se necessária a preservação de amostras em bom estado (NEUFELD; SARQUIS, 2003). O principal objetivo da preservação de culturas de microrganismos é manter as amostras viáveis, sem mudanças morfológicas, fisiológicas e genéticas para futuras utilizações (SMITH; ONIONS, 1994; 1996; NAKASONE et al., 2004).

Para garantir a completa viabilidade e estabilidade dos organismos estocados, são utilizados métodos que têm basicamente o mesmo princípio: retardar ou paralisar o metabolismo celular. Dentre os mais utilizados atualmente, pode-se citar: subcultivos sucessivos, estocagem sob óleo mineral, em água destilada esterilizada, solo ou areia, sílica-gel, nitrogênio líquido, liofilização e congelamento (SMITH; ONIONS, 1994; 1996; FIGUEIREDO, 2001; NAKASONE et al., 2004).

A técnica de estocagem em água destilada esterilizada, método de Castellani (CASTELLANI, 1939; 1967), tem muitas vantagens: procedimento é simples; requer pouco trabalho; é de baixo custo e necessita de pequeno espaço para a estocagem dos frascos, que podem ser armazenados em qualquer posição e à temperatura ambiente. Além do que, assegura um bom tempo de estocagem e mantém as culturas livres de contaminação por ácaros (RODRIGUES et al., 1992; BUENO; GALLARDO, 1998; DIOGO et al., 2005).

Para Smith; Onions (1994), períodos de estocagem entre 2 a 3 anos em água destilada esterilizada garantem a preservação dos fungos sem que haja perda da viabilidade. Sendo esta técnica indicada à preservação de fungos mitospóricos; Oomycota; Zygomycota, excluindo Entomophthorales; Ascomycota, excluindo Laboulbeniales; e Basidiomycota, excluindo Uredinales e Ustilaginales.

As coleções de culturas, centros de conservação e exploração de recursos genéticos e metabólicos de microrganismos e culturas de tecidos de células, têm a função de coletar os microrganismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas e torná-los disponível aos usuários interessados (CANHOS et al., 1999; CANHOS, 2003).

O governo brasileiro, com o objetivo de elevar o nível de competitividade científica e tecnológica do país, tem desenvolvido projetos voltados à formação de uma rede nacional de recursos biológicos, que começou a ser ensaiada em 2002, através do Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICol) (BARATA, 2003).

A Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) localizada no Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas está registrada no Commonwealth Mycological Institute (CMI), sob a sigla URM (University Recife Mycologia) e conta, atualmente, com cerca de 9.000 culturas de fungos filamentosos e leveduras, mantidas em duplicata, todas identificadas ao nível de espécie e preservadas pelos métodos de liofilização, óleo mineral e/ou água destilada esterilizada (CAVALCANTI et al., 1996; MICOTECA URM, 2007).

Estudos relacionados com a habilidade de fungos produzirem enzimas extracelulares como proteases, fosfolipases e queratinases e o seu crescimento à 37°C permitem estabelecer uma relação com a patogenicidade, sendo de grande importância no diagnóstico (LACAZ et al., 2002; KUSHWAHA; GUARRO, 2000).

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Com o desenvolvimento da microbiologia, a utilização de microrganismos em áreas relacionadas à saúde humana e animal, à agricultura e alimentação, ao saneamento e à conservação do meio ambiente, entre outras, tem alcançado papel de destaque no mundo inteiro, tornando evidente a grande importância dos microrganismos, dentre eles os fungos, para o homem (FIGUEIREDO, 2001; ANDREU et al., 2005).

Contudo, para o desenvolvimento dessas atividades é necessária a preservação de culturas em bom estado. Culturas puras obtidas de coleções de referência são utilizadas em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais (CANHOS, 2003; NEUFELD; SARQUIS, 2003).

A preservação de culturas fúngicas tem como objetivo manter a completa viabilidade e estabilidade dos organismos estocados, o que é conseguido basicamente pelo retardo ou pela paralisação do metabolismo celular dos fungos. Nesse sentido, inúmeros processos físicos podem ser utilizados (NEUFELD; SARQUIS, 2003).

De acordo com Figueiredo (2001), as primeiras coleções eram, inicialmente, mantidas por repicagens periódicas e constantes, o que, sem dúvida, era um trabalho exaustivo. Além disso, problemas como perda da viabilidade; mudanças fisiológicas, de aspecto e coloração; decréscimo ou perda da capacidade de esporulação e da patogenicidade aparecem constantemente em culturas após repicagens sucessivas, em meios naturais e artificiais. Assim, para preservação desse patrimônio biológico por longos períodos de tempo, tornou-se necessário desenvolver outros métodos que fossem menos dependentes do trabalho humano e que mantivessem as culturas viáveis e menos sujeitas a variações.

Atualmente, além do uso de repicagens periódicas, outros métodos de preservação são empregados (SMITH; ONIONS, 1994; FIGUEIREDO, 2001; NAKAZONE et al., 2004). Todos os métodos apresentam variações em sua metodologia, sendo, segundo Figueiredo (2001), as mais empregadas:

Em solo ou areia - consiste na inoculação de 1mL de uma suspensão concentrada de esporos em 5g de solo seco rico em matéria orgânica, ou de solo umedecido, previamente autoclavados contidos em frascos de vidro. Seguida pela secagem do material à

temperatura ambiente e fechamento dos frascos. O armazenamento pode ser à temperatura ambiente ou em refrigerador.

Sob óleo mineral - consiste em cobrir com uma camada ( $\pm 1$ cm de altura) de óleo mineral esterilizado culturas crescidas em meio específico de esporulação contido em tubos de ensaio. O armazenamento pode ser à temperatura ambiente ou de acordo com a necessidade do fungo e os tubos devem ser mantidos permanentemente na posição vertical para que o óleo não toque o tampão de algodão.

Em sílica-gel - consiste no preenchimento parcial de pequenos frascos de vidro com sílica-gel purificada, previamente esterilizada pelo calor, seca a  $130^{\circ}\text{C}$  por 3h e então resfriada em congelador. Seguido da adição de uma suspensão de esporos, previamente resfriada e misturada com 5% de leite desnatado, em quantidade suficiente para umedecer  $\frac{3}{4}$  da sílica-gel dos frascos. Os frascos são colocados por 20min em banho frio e então são guardados à temperatura ambiente com tampas de metal não seladas, por uma ou duas semanas até que os cristais de sílica-gel se separem naturalmente. Em seguida as tampas são seladas e os frascos guardados a vácuo a  $4^{\circ}\text{C}$  ou à temperatura ambiente.

Em baixas temperaturas - consiste em submeter o material (suspensões de esporos, partes infectadas de hospedeiros ou mesmo culturas em ágar) a temperaturas de até  $-100^{\circ}\text{C}$ , sendo as mais comuns de  $-80^{\circ}\text{C}$ . O processo às vezes exige a adição de substâncias químicas ou naturais crioprotetoras como: dimetilsulfóxido 10%, glicerol 1%, soro, leite, propilenoglicol, etc. Também é chamado de "deep-freezing"

Em nitrogênio líquido - também conhecido como método criogênico, consiste resumidamente em: a) coleta de esporos ou fragmentos de micélio, por imersão das culturas desenvolvidas em ágar, em glicerol a 10% e raspagem delicada da superfície das culturas; b) pipetagem de 5mL da suspensão para ampolas esterilizadas de vidro de borossilicato que são fechados ao fogo; c) resfriamento lento na razão de  $1^{\circ}\text{C}$  por minuto até  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-30^{\circ}\text{C}$ ; d) transferência para o tanque de nitrogênio para resfriar rapidamente até  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Liofilização - consiste na desidratação das células (geralmente esporos) por congelamento e a vácuo com posterior armazenamento também sob vácuo e em condições de refrigeração. Usualmente, os esporos ou células são suspensos em um colóide que pode ser leite desnatado (10–20%); hemo-soro bovino; solução a 1% de lactose, glicose ou sacarose. Podem ser usadas também misturas de vários desses componentes como 10% de leite desnatado acrescido de 10% de inositol. Uma prática comum no processo de liofilização é colocar-se, junto com a suspensão de esporos, no interior das ampolas a

serem liofilizadas, pequenas tiras de papel absorvente esterilizado que absorvem parte da suspensão durante o processo de desidratação. As ampolas, contendo as suspensões de esporos, imersas em uma solução alcoólica, congeladora, são adaptadas a uma bomba de vácuo acoplada a um sistema coletor de vapores da água – liofilizador. Após a liofilização as ampolas são guardadas a temperatura ambiente ou em refrigerador a 4-6°C.

Em água destilada esterilizada - também chamado de método de Castellani, porque foi idealizado por este pesquisador para evitar o problema do pleomorfismo em fungos de interesse para a medicina – os dermatófitos. É um processo que consiste no seguinte: preenchimento de frascos de vidro, do tipo empregado para antibióticos, com 4-5mL de água destilada esterilizada, conforme apresenta a Figura 1; repicagens dos fungos para os frascos com água em câmara asséptica, transferindo-se pedaços de 1cm<sup>2</sup> de meio de cultura contendo micélio dos fungos a serem preservados, conforme apresenta a Figura 2. Há necessidade de que a cultura transferida seja jovem (8 a 10 dias). Deve-se dar preferência a repicar a parte periférica das culturas onde as hifas estão em franco desenvolvimento; os frascos são fechados com rolhas de borracha também previamente esterilizadas e, em seguida, lacrados com tampas de alumínio hermeticamente fechadas para evitar contaminação e a perda de água, conforme apresenta a Figura 3; armazenamento dos vidros à temperatura de aproximadamente de 12-24°C com aparelhos condicionadores de ar ou à temperatura ambiente.

Figura 1 - Preenchimento de frascos de vidro com água destilada esterilizada



Fonte: Torres (2007).

Figura 2 - Confeção de blocos de ágar com crescimento fúngico



Fonte: Torres (2007).

Figura 3 - Cultura de fungo preservada em água destilada esterilizada da Coleção de Culturas, Micoteca URM, Departamento de Micologia/UFPE



Fonte: Torres (2007).

A escolha do método de estocagem a ser utilizado leva em conta vários fatores, de acordo com o objetivo da coleção. Assim, uma pequena coleção docente difere daquelas que são depositárias nacionais. Se o objetivo é classificar taxonomicamente os cultivos, necessita-se de métodos que garantam a estabilidade morfológica dos microrganismos. Do mesmo modo, uma coleção de interesse para a indústria deve dar ênfase aos métodos que mantenham a estabilidade genética (BUENO; GALLARDO, 1998).

Do mesmo modo, a seleção de cepas para uma coleção é determinada pelos objetivos da coleção, os quais são avaliados pelo curador, pessoa responsável pela coleção, por exemplo: promover uma coleção de referência para serviços de identificação, dar suporte a projetos de pesquisa particulares ou ser uma coleção de ensino em universidades ou escolas (SMITH; ONIONS, 1994).

Apesar do progresso alcançado na conservação de microrganismos, a conservação em água destilada esterilizada continua ocupando um lugar de preferência, por ser este um método simples, econômico e seguro, capaz de garantir a sobrevivência dos cultivos de fungos por períodos prolongados, ao mesmo tempo em que evita o pleomorfismo e a contaminação por ácaros (PASARELL; MCGINNIS, 1992; MALIK; HOFFMANN, 1993).

Segundo Smith; Onions (1994), o método de Castellani é indicado, com maior ou menor eficiência, à preservação de muitos grupos de fungos, conforme apresentado na Tabela 1.

Muitas coleções de culturas no Brasil fazem uso do método de água destilada esterilizada como método de preservação: Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), Paulínia, SP; Coleção de Culturas de Basidiomicetos, São Paulo - SP; Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ; Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB), Feira de Santana - BA; Coleção de microrganismos entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu", Campinas - SP; Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Professor Lacaz, São Paulo - SP; Coleção de Microrganismos de Interesse Agrosilvicultural, Manaus - AM; Banco de Culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco), Recife - PE; Coleção de Culturas - Micoteca URM (Universidade Recife Micologia), Recife - PE (CRIA, 2007).

Tabela 1.- Técnicas de preservação para cada grupo de fungos

	Transferência sobre ágar					Solo	Sílica Gel	Liofilização	Nitrogênio Líquido
	Temperatura Ambiente	Refrigerador	Óleo Mineral	Água	Ultra congelamento				
<b>CHYTRIDIOMYCOTA</b>	Regular	Regular*	Regular	Fraco	Fraco	Regular	Falho	Falho	Falho
<b>OOMYCOTA</b>	Fraco	Fraco	Regular/ Bom	Bom	Fraco	Regular	Falha	Fraco**	Bom
<b>ZYGOMYCOTA</b> (excl. <i>Entomophtorales</i> )	Bom	Regular*	Regular	Bom	Regular	Bom	Bom	Muito bom	Muito bom
<i>Entomophtorales</i>	Fraco	Fraco	Bom	Regular	Fraco	Regular	Falho	Falho	Bom
<b>ASCOMYCOTA</b> (excl. <i>Laboulbeniales</i> )	Bom	Bom	Regular	Bom	Bom	Bom	Muito bom	Muito bom	Muito bom
<i>Laboulbeniales</i>	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Falho	Fraco	Bom
<b>BASIDIOMYCOTA</b>									
<i>Uredinales</i>	Falho	Falho	Falho	Falho	Fraco	Fraco	Falho	Fraco	Bom
<i>Ustilaginales</i>	Regular	Regular	Regular	Falho	Fraco	Fraco	Falho	Regular	Bom
<b>FUNGOS</b>	Regular	Bom	Fraco/ Bom	Bom	Bom	Bom	Muito bom	Muito bom	Muito bom
<b>ANAMORFOS</b>			(variação)						

a) \* : falho para algumas espécies; b) \*\* : alguma espécie de *Pythium* e *Phytophthora* sobrevivem

Fonte: Smith; Onions (1994).

Muitas coleções de culturas no Brasil fazem uso do método de água destilada esterilizada como método de preservação: Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), Paulínia, SP; Coleção de Culturas de Basidiomicetos, São Paulo - SP; Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ; Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB), Feira de Santana - BA; Coleção de microrganismos entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu", Campinas - SP; Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Professor Lacaz, São Paulo - SP; Coleção de Microrganismos de Interesse Agrosilvicultural, Manaus - AM; Banco de Culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco), Recife - PE; Coleção de Culturas - Micoteca URM (Universidade Recife Micologia), Recife - PE (CRIA, 2007).

Sobre o método de Castellani, muitos estudos são realizados para provar sua eficiência na preservação de culturas, permitindo na maioria das vezes, a obtenção de resultados positivos (PASSADOR et al., 2004)

Períodos de estocagem de 2-3 anos garantem a preservação dos fungos sem que haja perda da viabilidade ou alterações morfológicas (SMITH; ONIONS, 1994). Embora,

entre outros autores, não haja um consenso sobre qual o tempo de estocagem máximo para este método.

Castellani (1939) afirma não ter observado perda de viabilidade, nem alterações morfológicas, após ter preservado, durante o período de 1 ano, alguns fungos dermatófitos em tubos de cultura comuns, contendo água e tapados com algodão em rama.

McGinnis et al. (1974) encontraram percentuais de viabilidade de 92% a 94% e nenhuma contaminação por fungos ou bactérias ao avaliar 417 isolados de fungos filamentosos, leveduras e actinomicetes preservados de 1-5 anos em água destilada esterilizada.

Boesewinkel (1976) conseguiu estocar com sucesso 650 culturas de Ascomycetes, Basidiomycetes, Phycomycetes e “Fungus Imperfect” em água destilada à temperatura ambiente por 7 anos, sem que houvesse diminuição da viabilidade ou mudanças nos caracteres morfológicos.

Capriles et al. (1989) estudando 594 cepas de diversos grupos de fungos preservadas em água destilada por períodos que variaram de 1 a 20 anos, obtiveram um percentual de viabilidade de 62%, sendo mantidas as características morfológicas das culturas. Sendo que para as cepas com 20 anos de estocagem, o percentual foi de 90%.

Rodrigues et al. (1992) ao avaliarem viabilidade de 174 culturas de actinomicetes e fungos (leveduras, dimórficos, dermatófitos e outros fungos filamentosos) preservados em água destilada por 6, 12, 18 e 24 meses, obtiveram percentuais que variaram de 82% a 100% nos períodos de estocagem, com 0% a 12% de contaminação. O grupo que apresentou melhor sobrevivência foi o das leveduras, com 100% aos 6, 12 e 24 meses e 60% aos 18 meses, e o grupo que apresentou menor viabilidade foi o dos actinomicetes, com 88%, 79%, 50% e 100% aos 6, 12, 18 e 24 meses, respectivamente.

Burdsall; Dorworth (1994) relataram 94% de viabilidade ao estudarem 151 isolados de Basidiomycotina mantidos por até 7 anos em água destilada esterilizada e a não interferência do método nas taxas de crescimento dos isolados viáveis.

Smith; Onions (1994) demonstraram que 50 culturas de espécies de *Phytophthora* e *Pythium* conservados em água destilada por períodos que variaram de 2 a 5 anos não apresentaram nenhuma diminuição da viabilidade. E que, embora algumas culturas tivessem patogenicidade diminuída, a maioria foi capaz de infectar o hospedeiro.

Bueno; Gallardo (1998) estudando 26 cepas de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Syncephalastrum* e *Trichoderma*, conservadas em água

destilada esterilizada por 2 anos, obtiveram uma viabilidade de 100%, não sendo observadas variações nas características macro e micromorfológicas, nem contaminação por ácaros, bactérias ou outros fungos.

Passador et al. (2000), avaliando 11 culturas de *Verticillium fungicola* conservadas pelo método de Castellani durante 15 anos quanto a viabilidade, esporulação e patogenicidade frente a cogumelos, concluíram que as culturas permaneceram viáveis e as características morfológicas e de patogenicidade estavam mantidas.

Santos et al. (2000) examinaram a viabilidade e características morfológicas de 23 subculturas de *Absidia corymbifera*, 7 de *Absidia ramosa* e 7 de *Absidia blakesleeana* preservadas sob óleo mineral esterilizado à temperatura ambiente na Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz por períodos que variam de 3 a 44 anos. Eles obtiveram 81% de viabilidade, 5% de culturas inviáveis e 14% de culturas contaminadas. Concluíram assim, que a manutenção sob óleo mineral é uma técnica eficiente por assegurar viabilidade; estabilidades morfológicas e formação de esporos de isolados *Absidia* spp. a longo prazo em coleções de cultura.

Boro et al. (2003) constataram que apenas 15% de 85 diferentes isolados preservados pelo método de Castellani, por períodos que variaram de 5 a 41 anos, não estavam viáveis. *Trichophyton*, *Microsporum* e *Chyso sporium* foram estocados satisfatoriamente sem nenhuma alteração morfológica.

Deshmukh (2003) demonstrou em seu estudo com 239 culturas pertencentes a 9 gêneros de fungos queratinofílicos e dermatófitos que 94% e 93% das culturas preservadas por 7 e 10 anos, respectivamente, apresentaram ótimo ou moderado crescimento após os períodos de estocagem.

Pérez et al. (2003) estudando 26 cepas de *Cryptococcus neoformans* isoladas de diversas amostras clínicas e conservadas pelo método de Castellani (1 cepa por 40 anos, 4 cepas por 33 anos, 12 cepas por 16 anos, 3 cepas por 9 anos, 3 cepas por 6 anos, 2 cepas por 2 anos e 1 cepa por 1 ano), puderam observar que, independente do tempo que estavam estocadas, as cepas conservaram a viabilidade, sem alterar a morfologia e propriedades bioquímicas como produção de urease e fenoloxidase e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio.

Passador et al. (2004) verificaram que o método de Castellani é eficiente na preservação das características morfofisiológicas e de patogenicidade de culturas pertencentes a três diferentes gêneros de fungos fitopatogênicos: *Mycosphaerella melonis*,

*Ascochyta phaseolorum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, preservadas neste método há 24, 6 e 9 anos, respectivamente.

Diogo et al. (2005) avaliaram a eficácia da preservação de 43 cepas de fungos isoladas de amostras clínicas de pacientes com diferentes micoses, as quais foram preservadas em água destilada por um período de 12 meses. Obtiveram 100% de viabilidade e de conservação das características macro e microscópicas, mesmo para aquelas cepas que haviam perdido suas características morfológicas por repiques sucessivos. Concluíram, então, que o método de preservação utilizado possibilitou, em curto espaço de tempo, a manutenção da viabilidade e da capacidade de esporulação das cepas submetidas ao estudo.

Mendoza et al. (2005) compararam viabilidade, velocidade de crescimento, características morfológicas e fisiológicas e sensibilidade *in vitro* a antifúngicos de 5 isolados de *Sporothrix schenckii* preservados pelos métodos de Castellani e repicagens sucessivas durante 18 anos. Os autores obtiveram 100% de viabilidade e de conservação das características morfológicas nos dois métodos, com diminuição da velocidade de crescimento nos isolados preservados em água. Quanto a fisiologia e sensibilidade, variações entre os isolados do mesmo método e dos dois métodos foram detectadas.

Panizo et al. (2005) avaliaram viabilidade, pureza e estabilidade morfológica de 170 leveduras e 241 fungos filamentosos preservados sob óleo mineral e pelo método de Castellani por períodos de 2 a 48 anos. Foi observado que 100% das leveduras conservaram-se viáveis, puras e estáveis morfolologicamente após preservação em ambos os métodos e que, também em ambos os métodos, 100% dos fungos filamentosos mantiveram-se viáveis e puros, entretanto, 5% (5 isolados de *Epidermophyton floccosum* e 6 de *Microsporum gypseum*) não conservaram suas características microscópicas, devido a perda da capacidade de esporulação.

Borman et al. (2006) trabalharam com 179 isolados de 45 espécies de fungos filamentosos patogênicos estocados pelo método de Castellani durante 2 meses a 21 anos na Coleção Nacional de Fungos Patogênicos (NCPF) do Reino Unido. 90% dos isolados foram cultivados com sucesso após a estocagem. Efetivamente, os percentuais de viabilidade foram: 100% (14/14) para os isolados estocados até 1 ano, 100% (20/20) para os estocados entre 1–5 anos, 91% (49/54) para os estocados de 6–10 anos, 83% (50/60) para os estocados de 11–15 anos e 96% (25/26) para os estocados de 16–20 anos. Com base em seus resultados, os autores sugeriram que a viabilidade está relacionada ao

organismo particularmente envolvido e é pré-determinada pela idade do inóculo utilizado para preservação. Alterações morfológicas foram encontradas em menos de 10% dos isolados, sendo a produção de micélio estéril e diminuição da conidiogêneses as mais comumente observadas.

## 2.2 COLEÇÕES DE CULTURAS DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos são essenciais para o meio ambiente, contribuindo para a estabilidade de ecossistemas, atuando em diferentes níveis tróficos, em interações bióticas e abióticas, e na biogeosfera, alterando os constituintes atmosféricos gasosos. Eles constituem a principal forma de ciclagem de compostos químicos na biosfera, incluindo a degradação e a transformação de poluentes industriais (TIEDJE, 1994). Nas indústrias, a grande maioria dos processos biotecnológicos empregados na produção de compostos comerciais ou na transformação de substratos em produtos de maior valor agregado emprega linhagens microbianas (BULL et al., 1992).

A compreensão do papel de microrganismos no meio ambiente fornece subsídios para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas, além de ser fundamental no estabelecimento de políticas de biossegurança, de projetos em agricultura sustentável e de programas de desenvolvimento industrial (CANHOS, 1994).

Culturas puras obtidas de coleções de referência são utilizadas em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais (CANHOS, 2003; NEUFELD; SARQUIS, 2003).

De acordo com Barata (2003), é possível descrever duas grandes categorias de preservação do patrimônio genético:

- a) preservação *in-situ* (no local de origem) - onde se encontram as áreas selecionadas por conterem alta biodiversidade ou populações ameaçadas de desaparecimento;
- b) preservação *ex-situ* (fora do local de origem) - que se subdivide em,

- de material biológico morto - nessa subdivisão se enquadram os herbários (acervo de plantas secas), além de microrganismos conservados em lâminas de microscópio e animais mantidos em álcool, formol ou taxidermizados (conservação da carapaça, empalhamento). O objetivo principal de guardar organismos dessa forma é a pesquisa.

- de material biológico (organismos ou células) mantido vivo - nessa subdivisão se enquadram os zoológicos, os jardins botânicos e os bancos de germoplasma (bancos de qualquer material biológico que possa ser reproduzido ou reativado). É o caso dos bancos de sementes, das coleções de cultura de microrganismos, dos bancos de sêmen de animais, dos bancos de células-tronco e tecidos humanos e dos bancos de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) ou de fragmentos de DNA - plasmídeos). Essa forma de preservação tem grande importância estratégica na pesquisa e no desenvolvimento biotecnológico e é nela que o material biológico adquire mais importância como patrimônio genético.

Coleções de culturas são centros de excelência de conservação *ex-situ*, que mantêm e estudam um *pool* genético para gerações futuras, oferecendo serviços fundamentais para a comunidade científica e tecnológica (CANHOS et al., 1999). Essas coleções podem ser classificadas como coleções de serviço, de trabalho ou institucionais. As coleções de serviço, fundamentadas na conservação e distribuição de recursos genéticos e com a finalidade de pesquisa e desenvolvimento, merecem atenção especial e contam com financiamento a longo prazo em países industrializados. Já as coleções de trabalho e as institucionais, embora também valiosas, não contam com o respaldo financeiro necessário para assegurar a sua perenidade, sendo normalmente mantidas pelo esforço individual de pesquisadores (CANHOS, 2003).

As coleções de culturas têm como funções (CANHOS et al., 1999):

- a) preservação e manutenção de culturas - Esta função garante a sobrevivência, a estabilidade e a pureza das culturas durante períodos prolongados de tempo.
- b) distribuição de culturas - A distribuição de culturas é sob demanda, sem discriminação, havendo restrições técnicas ou legais nos casos da distribuição de linhagens patogênicas ou associadas a processos de patentes. Coleções de acesso restrito devem seguir as regras e servir aos interesses e necessidades das instituições que as mantêm.
- c) serviços de identificação de culturas - A identificação pode ser realizada pela própria equipe da coleção, ou ser terceirizada, o que é mais barato e cria um elo de ligação muito interessante entre a coleção e seus usuários, sejam de instituições de pesquisa ou do setor industrial.

- d) informação - São informações sobre atividades de rotina e pesquisas aplicadas às culturas. Devem estar organizadas e serem fornecidas, quando não forem confidenciais, (gratuitamente ou não) juntamente com a cultura.
- e) patente - As coleções de culturas podem atuar como centros depositários de culturas patentes ou envolvidas com processos de patentes. Elas se credenciam a escritórios nacionais ou regionais de patentes e tornam-se responsáveis pela aceitação, preservação, manutenção e distribuição da cultura de acordo com as normas estabelecidas no país e/ou normas internacionais sob responsabilidade da Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI).
- f) treinamento - Os programas de treinamento são realizados principalmente em áreas como preservação, manutenção e identificação de linhagens.
- g) pesquisa - As pesquisas são realizadas geralmente nos campos de preservação e taxonomia, que são de interesse das coleções de culturas. Ou, dependendo do perfil da equipe, desenvolvem-se projetos ou contratos com outras instituições de pesquisa ou do setor industrial.

A primeira coleção de serviço que se tem registro é a Coleção Kral, estabelecida em Praga, República Tcheca, em 1890, com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas. No início do século XX, outras coleções de serviço foram estabelecidas na Europa, Estados Unidos e Japão. Estas coleções passaram por um contínuo processo de evolução, visando atender demandas especializadas decorrentes dos avanços na microbiologia industrial, na biotecnologia e na engenharia genética e genômica (CANHOS, 2003).

Organizações internacionais como o World Data Centre for Microorganisms (WDCM), a Organization for Economical Cooperation and of Development (OECD) e a Common Access to Biological Resources Information (CABRI) da Comunidade Européia têm como objetivo formar redes de centros de recursos biológicos para que seus membros tenham acesso a materiais biológicos com o mesmo padrão de qualidade, com intercâmbio de informações e materiais facilitado por regras que garantam a repartição de benefícios, além de ter a propriedade intelectual e a biossegurança garantidas. A formação dessas redes permite também minimizar os investimentos, uma vez que evita a formação de centros semelhantes (BARATA, 2003).

Atualmente, existem no mundo 524 coleções de culturas registradas no World Data Center for Microorganisms (WDCM), distribuídas irregularmente em 67 países. A

distribuição dessas coleções de culturas nos países de cada continente pode ser vista nas Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 (WDCM, 2007a).

Tabela 2 - Número de Coleções de Culturas na África

<b>País</b>	<b>Nº de coleções de culturas</b>
África do Sul	2
Egito	2
Marrocos	1
Nigéria	2
Senegal	1
Uganda	1
Zimbábue	2
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>

Fonte: World Data Center of Microorganisms (2007).

Tabela 3 - Número de Coleções de Culturas na América

<b>País</b>	<b>Nº de coleções de culturas</b>
Argentina	8
Brasil	50
Canadá	18
Chile	1
Colômbia	2
Cuba	5
Estados Unidos da América	21
México	14
Venezuela	2
<b>TOTAL</b>	<b>121</b>

Fonte: World Data Center of Microorganisms (2007).

Tabela 4 - Número de Coleções de Culturas na Ásia

<b>País</b>	<b>Nº de coleções de culturas</b>
China	20
Cingapura	2
Coréia	13
Filipinas	5
Hong Kong	1
Índia	16
Indonésia	16
Irã	3
Israel	3
Japão	24
Malásia	5
Paquistão	5
Sri Lanka	4
Tailândia	58
Taiwan	2
<b>TOTAL</b>	<b>177</b>

Fonte: World Data Center of Microorganisms (2007).

Tabela 5 - Número de Coleções de Culturas na Oceania

<b>País</b>	<b>Nº de coleções de culturas</b>
Austrália	35
Nova Zelândia	7
Papua-Nova Guiné	1
<b>TOTAL</b>	<b>43</b>

Fonte: World Data Center of Microorganisms (2007).

Tabela 6 - Número de Coleções de Culturas na Europa

<b>País</b>	<b>Nº de coleções de culturas</b>
Alemanha	11
Armênia	1
Áustria	2
Bélgica	5
Bielorrússia	1
Bulgária	3
Dinamarca	2
Eslováquia	3
Eslovênia	2
Espanha	4
Estônia	2
Finlândia	2
França	30
Grécia	5
Hungria	6
Irlanda	1
Itália	7
Iugoslávia	2
Kasaquistão	2
Latívia	1
Noruega	2
Países Baixos	5
Polônia	8
Portugal	5
Romênia	1
Rússia	13
Suécia	3
Suíça	1
Reino Unido	18
República Tcheca	12
Turquia	6
Ucrânia	3
Usbequistão	3
<b>TOTAL</b>	<b>172</b>

Fonte: World Data Center of Microorganisms (2007).

Cerca de 1.756.173 culturas estão preservadas pelas coleções no mundo todo, sendo 557.663 culturas de bactérias, 456.053 culturas de fungos, 14.570 culturas de vírus, 11.327 culturas de células e 716.560 culturas de outros Reinos microbianos (WDCM, 2007b).

As 50 coleções de culturas brasileiras (Tabela 7) preservam em torno de 34.400 culturas de diversos microrganismos como algas, protozoários, bactérias e fungos. Destas 50 coleções, 24 (CBMAI, CCB, CCT, CEMM, CG, DPUA, ESAP, FTI, IAL, IALMIC, IGESALQ735, IGESALQ902 IMT, INCQS, INPA, IOC, IPT, ITAL, ITALSM, IZ, IAL, UFPEDA, UFRJIM, URM) preservam, aproximadamente, 17.000 culturas fúngicas, estando 35% no Nordeste, sendo a Micoteca URM, a coleção de maior representatividade (WDCM, 2007b).

Tabela 7 - Coleções de Culturas existentes no Brasil (continua)

<b>Sigla</b>	<b>Nome completo</b>	<b>Cidade</b>	<b>Estado</b>
BCCUSP	Brazilian Cyanobacteria Collection - University of São Paulo	Piracicaba	SP
BCRJ	Rio de Janeiro Cell Bank (Banco de Células do Rio de Janeiro)	Rio de Janeiro	RJ
BMBC	Brazilian Marine Bacteria Collection	Florianópolis	SC
BR	Embrapa Agrobiology Diazotrophic Microbial Culture Collection	Seropédica	RJ
CBMAI	Brazilian Collection of Microorganisms from the Environment and Industry (Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria)	Paulínia	SP
CCB	Coleção de Culturas de Basidiomicetos	Água Funda	SP
CCGB	Coleção de Culturas do Gênero <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatos	Rio de Janeiro	RJ
CCIAL	Cultures Cells for Institute Adolfo Lutz	São Paulo	SP
CCT	Coleção de Culturas Tropical	Campinas	SP
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica	Fortaleza	CE
CETESB	Setor de Pesquisa Tecnológica de Sistemas de Tratamento de Efluentes Domésticos	São Paulo	SP
CG	Embrapa Genetic Resources and Biotechnology Collection of Fungi of Interest to Biological Control	Brasília	DF
CLIOC	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz	Rio de Janeiro	RJ
CNEN-LABPC	Laboratório de Poços de Caldas	Poços de Caldas	MG
CPAC	Cpac-Embrapa	Planaltina	DF
CPRR	Laboratório de Doença de Chagas	Belo Horizonte	MG
DPUA	Departamento de Patologia/ICB	Manaus	AM
EMPARN	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte	Natal	RN

(conclusão)

<b>Sigla</b>	<b>Nome completo</b>	<b>Cidade</b>	<b>Estado</b>
ESAP	Instituto Zimotécnico-Z	Piracicaba	SP
FTI	Centro de Biotecnologia e Química-CEBIQ	Lorena	SP
IAL	Seção de Coleção de Cultura	São Paulo	SP
IALCEL	Seção de Culturas Celulares	São Paulo	SP
IALMIC	Micoteca do Instituto Adolfo Lutz	São Paulo	SP
IBSBF	Biological Institute Culture Collection of Phytopathogenic Bacteria	Campinas	SP
IEAPM	Instituto de Estudos do Mar "Almirante Paulo Moreira"	Arraial do Cabo	RJ
IGESALQ735	Coleção Microorganismos	Piracicaba	SP
IGESALQ902	Coleção Microorganismos	Piracicaba	SP
IMT	Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo	São Paulo	SP
INCQS	Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ	Rio de Janeiro	RJ
INPA	Laboratório de Micologia Medica Divisão de Microbiologia e Nutrição	Manaus	AM
IOC	Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz	Rio de Janeiro	RJ
IOUSP	Marine Microalgae Culture Collection	São Paulo	SP
IPT	Agrupamento de Biotecnologia, Culture Collection of Microorganisms	São Paulo	SP
ITAL	Banco de Fermentos Lácticos	Campinas	SP
ITALSL	Seção de Leite e Derivados	Campinas	SP
ITALSM	Seção de Microbiologia	Campinas	SP
IZ	Departamento de Tecnologia Rural	Piracicaba	SP
LBM	Laboratório de Biologia Molecular Departamento de Biologia Celular	Brasília	DF
LE	Serviço de Microbiologia e Imunologia	Rio de Janeiro	RJ
LGM-USP	Departamento de Microbiologia Laboratório de Genética de Microrganismos	São Paulo	SP
Micoteca IAL	Micoteca do Instituto Adolfo Lutz	São Paulo	SP
SEMIA	Coleção de Culturas de <i>Rhizobium</i> da Fepagro	Porto Alegre	RS
SMIP	Seção de Maricultura	Santos	SP
SVIEC	Seção de Vírus	Belém	PA
TCC/USP	Trypanosomatid Culture Collection	São Paulo	SP
UFPEDA	Universidade Federal de Pernambuco	Recife	PE
UFRJIM	Departamento de Microbiologia Médica	Rio de Janeiro	RJ
UFScarCC	Freshater Microalgae Collection Cultures	São Carlos	SP
URM	Universidade Federal de Pernambuco	Recife	PE
VTB	Banco de Células Humanas e Animais Laboratório de Patologia Celular e Molecular	Rio de Janeiro	RJ

Fonte: World Data Center of Microorganisms (2007).

O governo brasileiro está destinando mais investimentos às coleções de materiais biológicos vivos que, embora não sejam novidades no país, passaram a ter um lugar de destaque na política científica e tecnológica em julho de 2002, com o lançamento do “Sistema de Avaliação da Conformidade de Material Biológico” pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT). Este programa visa a certificação de material biológico (bactérias; fungos filamentosos; vírus; leveduras; células vegetais, animais e humanas; fragmentos de DNA clonado (plasmídeos); entre outros) usado no campo da biotecnologia (BARATA, 2003).

Outro importante projeto do MCT, fruto do Programa Nacional de Biotecnologia e Recursos Genéticos, é o Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICol), que integra as várias coleções de interesse biotecnológico, econômico e de aplicações industriais em uma rede de informações que facilita o acesso dos usuários, além se servir como subsídio para os formuladores de políticas públicas. Disponibilizado no final de 2002, o SICol reúne informações de 17 coleções de culturas e bancos do Brasil em um sistema de informação on-line através do qual o usuário pode localizar linhagens de microrganismos e cruzar dados taxonômicos (Species 2000), dados de literatura científica (SciELO e PubMed) e informações de genomas (GenBank), agregando valor ao material biológico das coleções brasileiras (CANHOS, 2003; BARATA, 2003).

A Coleção de Culturas, Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco foi fundada em 1954 pelo Professor Augusto Chaves Batista e está registrada no Commonwealth Mycological Institute (CMI) sob a sigla URM (University Recife Mycologia). É filiada ao World Federation for Culture Collections (WFCC) sob o número 604, sendo citada em vários catálogos, destacando-se os do American Type Culture Collection (ATCC) nos Estados Unidos, do Institute for Fermentation em Osaka no Japão (IFO) e do World Data Center for Microorganisms (WDCM) no Japão (CAVALCANTI et al., 1996).

O acervo da Micoteca URM consta de aproximadamente 9.000 culturas de fungos, sendo cerca de 1.600 leveduras e 7.400 fungos filamentosos, todas identificadas ao nível de espécie e mantidas em duplicata por dois métodos de preservação. Inicialmente o método de preservação utilizado era apenas o método do óleo mineral, porém, em 1988, houve a implantação de mais dois métodos: liofilização e água destilada esterilizada. Atualmente, o método de preservação em óleo mineral está sendo utilizado para todas as amostras (fungos filamentosos e leveduras), enquanto que o de água destilada esterilizada, apenas

para os Zygomycetes e para as espécies patogênicas ao homem, aos animais e aos vegetais, e liofilização para aquelas amostras com boa capacidade de esporulação (CAVALCANTI et al., 1996; MICOTECA URM, 2007).

Além de receber culturas de fungos para fazer parte do acervo, os taxonomistas da Micoteca URM atende a pedidos de fornecimento de amostras, isolamento e identificação de fungos, liofilização e treinamento de estudantes e profissionais na área de taxonomia de fungos. Estes pedidos são procedentes de instituições de ensino e/ou pesquisa, nacionais e internacionais; de laboratórios que utilizam amostras de fungos em testes para fabricação de medicamentos e dos que realizam diagnóstico de micoses; e da comunidade científica em geral. Sendo uma coleção de referência, a Micoteca URM está caracterizando as amostras estocadas, quanto a aspectos biotecnológicos, tais como, produção de enzimas, ácidos orgânicos, utilização no controle biológico de pragas de plantas; caracterização molecular e quanto a características de patogenicidade, através de projetos desenvolvidos por alunos de graduação e pós-graduação do país (CRIA, 2007; MICOTECA URM, 2007).

### 2.3 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

Fungos secretam várias enzimas hidrolíticas como proteinases, fosfolipases, lipases e ureases em meio de cultura. Estas enzimas têm um papel chave no metabolismo dos fungos e podem estar envolvidas na patogênese de infecções, causando dano às células do hospedeiro e fornecendo nutrientes ao parasita. Além disso, a habilidade de sobreviver e se reproduzir a 37°C também parece ser uma característica comum aos fungos patogênicos. Este fenômeno, conhecido como termotolerância, é observado principalmente em *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii* (KWON-CHUNG, 1979; RHODES, 1988; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995, KUSASHWAHA; GUARRO, 2000).

Fosfolipases e proteinases extracelulares são secretadas primariamente para garantirem nutrientes para as células; entretanto, nos fungos patogênicos, além disso, facilitam a adesão e invasão no tecido hospedeiro, adquirindo papel significativo na destruição de membranas celulares que são compostas, principalmente, de lipídios e proteínas (GHANNOUM, 2000).

Fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas que compartilham a habilidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster presentes nos glicerofosfolídeos. As ações de

fosfolipases produzidas por microrganismos podem resultar na desestabilização das membranas celulares e lise das células do hospedeiro infectado (COX et al., 2001).

De acordo com Lacaz et al. (2002) e Sidrim; Rocha (2004), proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas e sua ação é importante tanto para o crescimento do fungo quanto para a invasão do tecido hospedeiro, bem como para sua disseminação após ruptura da barreira de proteção tecidual.

A atividade enzimática de fungos através de métodos semiquantitativos é interpretada pela hidrólise do substrato específico, facilmente evidenciada pela formação de halos transparentes ou opacos ao redor das colônias (NEDER, 1992). Diversos substratos são utilizados em testes de detecção de proteases, como gelatina, soro albumina bovina, caseína, entre outros (LACAZ et al., 2002). Já no caso da detecção de fosfolipases, o substrato mais utilizado em trabalhos científicos (PRICE et al., 1982, ASSIS et al., 1999, MAIA et al., 2001, SANTOS et al., 2001), é a gema de ovo podendo ser substituída pela lecitina de soja (COX et al., 2001).

A ação de queratinases produzidas por fungos tem sido sugerida com tendo de grande importância no desenvolvimento do processo infeccioso, uma vez que degradam a queratina dos tecidos queratinizados, permitindo a invasão dos mesmos pelo agente etiológico (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; TORTORA et al., 2002).

O termo "fungos queratinofílicos" é usado para todos os fungos para os quais substratos queratinizados são o hábitat natural e "fungos queratinolíticos" para fungos nos quais a degradação de queratina dura nativa foi experimentalmente provada (KUSHWAHA; GUARRO, 2000).

Silva et al. (1999) testaram 19 amostras de fungos filamentosos isoladas de aveia processada quanto a fatores de patogenicidade (crescimento a 37°C, atividades fosfolipásica e ureásica). Os resultados obtidos mostraram que 7 isolados à 37°C e que 10 isolados apresentaram atividade fosfolipásica quando o substrato foi lecitina de soja e apenas 2 quando o substrato foi lecitina de soja. *Sporothrix cianescens*, *Aspergillus niveus* e *Oidiodendron gryseum* apresentaram características de patogenicidade nos três parâmetros realizados, sendo que *O. gryseum* mostrou resultado positivo nos quatro testes. Os demais isolados apresentaram características de patogenicidade somente em um ou dois destes parâmetros.

Muhsin et al. (1997) avaliaram a atividade de elastase, queratinase, protease, lipase e fosfolipase em meio sólido de 123 isolados de dermatófitos e leveduras e encontraram

resultados variáveis na produção dessas enzimas, sendo a protease (gelatinase) produzida apenas pelos dermatófitos.

Assis et al. (1999) investigaram a produção de protease e fosfolipase em 20 isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, utilizando soro albumina bovina e gema de ovo, respectivamente, como substratos. Seus resultados mostraram que todos os isolados tiveram a capacidade de produzir proteinase e fosfolipase, apesar de variabilidade na enzima produção foi observado entre os diferentes isolados de *P. brasiliensis*.

Mushsin; Salih (2000) estudaram a atividade de quatro enzimas (queratinase, proteinase, lipase e amilase) em 182 isolados de fungos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Curvularia*, *Dreschlera*, *Epidermophyton*, *Geotrichum*, *Microsporum*, *Paecilomyces*, *Scytalidium* e *Trichophyton*. Seus resultados revelaram que queratinase foi produzida por todos os dermatófito e não-dermatófitos, com exceção de *P. variottii* e *Scytalidium lignicola*. Sendo altamente expressada pelas espécies *T. mentagrophytes* e *M. gypseum*. A maioria das espécies não-dermatofíticas revelaram atividade proteásica maior que a dos dermatófitos, sendo as espécies de *Curvularia*, as que mostraram atividade mais alta.

Kushwaha; Guarro (2000) destacaram os dermatófitos e seus correlatos como os mais ativos fungos queratinolíticos, em especial *Microsporum*, *Trichophyton*, *Aphanoascus*, *Chrysosporium*, *Geomyces*, *Gymnoascus*, *Malbranchea* e *Myceliophthora*. Também mencionaram espécies de *Alternaria*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Scopulariopsis* com esta mesma atividade, porém não sendo uma característica constante.

Okafor; Ngwogu (2000) estudando diferenças na atividade queratinofílica de cinco espécies de dermatófitos (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum audouinii* e *M. gypseum*), isoladas de crianças de uma escola primária, utilizando cabelo humano como substrato, observaram que todas as espécies testadas apresentaram atividade queratinofílica, sendo *T. rubrum* a espécie que apresentou maior atividade queratinofílica.

Observaram ainda que apenas *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* apresentaram atividade queratinolítica, causaram danos estruturais na haste do cabelo.

Cox et al. (2001) contruíram cepas mutantes de *Cryptococcus neoformans* à partir do gene codificador de fosfolipase desse fungo e observaram que a atividade das três fosfolipases mutantes produzidas era notadamente menor quando comparadas com as selvagens. O teste *in vivo* demonstrou que o isolado mutante era significativamente menos

virulento que o isolado controle em ambos os modelos: inalatório no rato e meningite no coelho. Com isso, concluíram que a secreção de fosfolipase é um fator de virulência para *C. neoformans*.

Maia et al. (2001) visando a caracterização de 30 isolados de *Microsporium canis* quanto à assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, susceptibilidade a toxinas de levedura e antifúngicos e secreção de protease e fosfolipase, encontraram 70% deles com atividade proteásica e 73% com atividade fosfolipásica. E afirmaram que nenhuma conclusão definitiva pode ser tirada com relação ao papel dessas duas enzimas como fator de virulência ou marca epidemiológica.

Muhsin; Hadi (2001) testaram a habilidade de degradação de três tipos de substratos queratinosos (cabelo humano, penas de galinha e lã) por *Aspergillus flavus*, *Chrysosporium pannicola*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Seus resultados mostraram que todos os isolados degradaram os três substratos e sendo que *A. flavus* apresentou melhor desempenho (48%) na degradação de cabelo humano; *C. pannicola* (62%) na degradação de pena de galinha, *M. gypseum* (48%) na degradação de cabelo humano e *T. mentagrophytes* (38%) na degradação de cabelo humano.

Santos et al. (2001) caracterizaram quanto à produção de fosfolipase, protease e queratinase, dentre outras enzimas, 53 isolados de *Trichophyton rubrum* de duas regiões do Brasil (São Paulo e Florianópolis). Eles observaram que todos os isolados produziram queratinase, alguns produziram protease e nenhum produziu fosfolipase. E constataram que as variações fenotípicas existem entre isolados de *T. rubrum* não estavam relacionadas à origem geográfica dos isolados.

Ghosh et al. (2002) avaliaram a morfologia e a fisiologia das formas miceliais e leveduriformes de 49 isolados clínicos de *Sporothrix schenckii* e observaram que: não houve diferença morfológica entre os isolados; o crescimento de todos os isolados foi bom a 30°C e 37°C e inibido a 40°C; as formas leveduriformes foram mais tolerantes que as miceliais a altas pressão osmótica e concentrações de sais e a pHs ácidos; as duas formas foram positivas para fenol oxidase e assimilação de KNO<sub>3</sub>; nenhuma das formas apresentou atividade caseinásica ou gelatinásica e apenas as formas miceliais mostraram atividade ureásica.

Kantarcioglu; Yücel (2002) com o intuito de determinar atividades fosfolipásica e proteásica em 95 isolados clínicos de várias espécies de *Candida* e encontraram 62,1% dos isolados positivos para atividade fosfolipásica e 78,9% positivos para proteásica.

Vidoto et al. (2004) testaram as atividades proteásica, fosfolipásica e de outras 19 enzimas extracelulares e a capacidade de produção de tubo germinativo de 26 culturas de *Candida dubliniensis* e 27 culturas de *C. albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) da Itália. Eles observaram que todas as culturas das duas espécies foram positivas tanto para a atividade proteásica quanto para a fosfolipásica.

Alves et al. (2005) avaliaram a capacidade de produção de proteases extracelulares em 13 isolados de *Mucor* distribuídos em oito espécies, em três diferentes faixas de pH (ácido, neutro e básico). Eles conseguiram detectar elevada atividade proteolítica em todos os isolados. Em cada faixa, um grupo de isolados obteve maior produção.

Mendoza et al. (2005) observaram em seu estudo que todos os 5 isolados de *Sporothrix schenckii* preservados pelos métodos de Castellani e repicagens sucessivas durante 18 anos apresentaram atividade  $\beta$ -glicosidásica e ureásica, 2 deles apresentaram atividade gelatinásica e apenas os isolados preservados por repicagens sucessivas apresentaram atividade amilásica.

Apprich et al. (2006) a fim de melhorar a compreensão de mecanismos patogênicos em onicomicoses equina, examinaram as propriedades queratinolíticas de *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum* isolados de equinos doentes utilizando como única fonte de carbono e nitrogênio chifre-casco e couro equinos, bem como a queratina extraída de casco e couro. Os resultados revelaram *M. gypseum* com a melhor espécie queratinolítica, seguida por *T. mentagrophytes* e *S. brevicaulis* e, considerando a taxa de crescimento, apontaram *M. gypseum* preferindo o material chifre-casco, *S. brevicaulis* e *G. candidum* preferindo o couro e *T. mentagrophytes* e *A. alternata* não demonstrando preferência clara quanto à fonte queratinosa.

### **3 ZYGOMYCETES PRESERVADOS EM ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA NA MICOTECA URM, BRASIL**

Artigo submetido a JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY

\*Kaliny Benicio Torres, Lidiane Roberta Cruz da Silva, Cristina Maria de Souza-Motta

Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

**Palavras-chave:** preservação, viabilidade, método de água destilada esterilizada, Zygomycetes.

\*Autor correspondente: Kaliny Benicio Torres, Especialista em Micologia.

Endereço: Rua Gervásio Pires, nº 436, Bloco-B, Aptº 110, Boa Vista, Recife, Pernambuco, Brasil. Cep 50050-070.

Telefone: (+5581) 2126-8948

Fax: (+5581) 2126-8480

E-mail: kalinytorres@ig.com.br, smotta@ufpe.br

## Resumo

As viabilidade, morfologia e pureza de 86 culturas de Zygomycetes, pertencentes a 15 gêneros, preservados pelo método de água destilada esterilizada entre 6 e 17 anos na Micoteca Universidade Recife Micologia, Brasil, foram avaliadas. Apenas 35%, das 86 culturas preservadas, permaneciam viáveis após os tempos de estocagem. Não foram observadas contaminações nas culturas viáveis e todas elas conservação suas características macro e micromorfológicas. Apenas *Absidia*, *Chaetostylum*, *Circinella*, *Cunninghamella*, *Gongronella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Syncephalastrum* apresentaram culturas viáveis, com percentuais de viabilidade indo de 33% a 100%. Os percentuais de viabilidade em relação aos tempos de preservação variaram de 20% a 56%. O método não assegurou viabilidade da maioria das culturas após cinco anos de preservação, indicando que tempos menores devem ser utilizados para os Zygomycetes, porém, foi capaz de manter a estabilidade morfológica e eliminar os riscos de contaminação.

## **Introdução**

A classe Zygomycetes compreende fungos caracterizados pela formação de esporos sexuais (zygosporos) e micélio que carece de septos exceto para delimitar hifas velhas ou danificadas ou estruturas reprodutivas em Mucorales e Zoopagales, mas septos fechados são formados regularmente em Dimargaritales e Kickxellales. Reprodução assexuada acontece comumente pela formação de esporangiosporos não móveis, unicelulares em esporângios ou merosporângios uni ou multiesporados [1].

A participação dos fungos na produção de alimentos, fármacos e químicos; em ensaios usados no diagnóstico e tratamento de micoses; em estudos taxonômicos e comparativos de novos isolados e no treinamento de pessoal especializado, tem revelado a grande importância destes microrganismos para o homem [2]. Com isso, a preservação de culturas de fungos tornou-se uma necessidade.

O principal objetivo da preservação de culturas é manter as amostras viáveis e sem alterações morfológicas, fisiológicas e genéticas para que possam ser utilizadas futuramente [3-4], o que é conseguido basicamente pelo retardo ou pela paralisação do seu metabolismo celular [2].

Neste intuito, vários métodos de preservação foram desenvolvidos: repicagens sucessivas, óleo mineral esterilizado, solo esterilizado, sílica gel, deep freezing, liofilização, nitrogênio líquido e água destilada esterilizada. E a escolha do método a ser utilizado dependerá dos fungos e do tempo que são pretendidos [3, 5-7].

O método de preservação em água destilada esterilizada, ou método de Castellani [8-9], é um dos mais utilizados por coleções de culturas de pequeno e grande porte. É indicado à preservação de Oomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes e Anamorfos [3, 10], além de evitar o pleomorfismo e a contaminação por ácaros e possuir

uma técnica de fácil manuseio e baixo custo [6, 11-12]. Este estudo examinou a viabilidade, a morfologia e a pureza de isolados de Zygomycetes preservados em água destilada esterilizada na Micoteca Universidade Recife Micologia (URM), Brasil.

### **Material e métodos**

Foram utilizadas 86 culturas de Zygomycetes, pertencentes a 15 gêneros (*Absidia*, *Backusella*, *Chaetostylum*, *Circinella*, *Cunninghamella*, *Gilbertella*, *Gongronella*, *Helicostylum*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Thamnostylum* e *Zygorhynchus*) preservadas em água destilada esterilizada entre 1989 e 2002 na coleção de culturas Micoteca URM, Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (Tabela 1). Os blocos de meio de cultura com os fungos preservados foram assepticamente retirados dos frascos de penicilina e transferidos para placas de Petri contendo batata dextrose ágar (BDA). As placas foram mantidas à temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por até 15 dias para observação de crescimento, conforme Castellani [8-9]. Em seguida, a morfologia das culturas foi avaliada observando-se características macroscópicas (coloração e aspecto das colônias), através de colônia central em BDA, e características microscópicas (hifas, diferenciações de hifas, esporóforos e esporos), através da técnica de microcultivo, também em BDA, de acordo com literatura especializada.

### **Resultados e discussão**

Apenas 30 (35%), das 86 culturas preservadas, estavam viáveis (Tabela 2). A Tabela 1 mostra a viabilidade de cada cultura. Os percentuais de viabilidade em relação aos anos de estocagem foram (Tabela 2): 56% (14/25) em 2002 (6 anos), 44% (4/9) em 1995 (11 anos), 33% (1/3) em 1994 (12 anos), 100% (1/1) em 1991 (15 anos), 22% (5/23) em 1990 (16 anos) e 20% (5/25) em 1989 (17 anos). Os gêneros com melhor viabilidade foram

*Chaetoslyum* e *Rhizomucor* com 100% (1/1), entretanto foram representados por apenas uma cultura. Os demais gêneros que apresentaram culturas viáveis foram: *Cunninghamella* com 67% (6/9), *Gongronella* e *Rhizopus* com 50% (1/2 e 10/20, respectivamente), *Absidia* com 40% (8/20) e *Circinella* e *Syncephalastrum* com 33% (1/3 e 2/6, respectivamente). *Backusella*, *Gilbertella*, *Helicostylum*, *Mortierella*, *Mucor*, *Thamnostylum* e *Zygorhynchus* não apresentaram nenhuma cultura viável.

O método de Castellani tem sido utilizado com sucesso para preservar Actinomycetes [6] e diferentes grupos de fungos: Oomycetes [13], Basidiomycetes [14], Ascomycetes [15], fitopatógenos [11, 16], dermatófitos [17], dimórficos [18] e outros patógenos humanos e de outros animais [19-20]. Entretanto, o mesmo não aconteceu em nosso experimento, que mostrou resultados muito inferiores aos dos autores mencionados acima. Quando comparado com trabalhos que envolveram Zygomycetes preservados pelo mesmo ou por outro método, este estudo também apresenta percentuais menores. No estudo de McGinnis *et al.* [5], 80% de Zygomycetes form viáveis depois de 1-5 anos de preservação em água destilada esterilizada, porém, apenas 10 isolados pertenciam a esta Classe. No estudo de Rodrigues *et al.* [6], 33 isolados eram Zygomycetes preservados de 2 meses a 6 anos pelo mesmo método e a viabilidade encontrado foi de 97%. Santos *et al.* [21] obteve 81% de viabilidade trabalhando com 37 isolados de *Absidia* estocados de 3 a 44 anos, mas o método de preservação utilizado foi o óleo mineral esterilizado.

Todas as culturas cresceram sem contaminação por outros fungos, bactérias ou ácaros e conservaram suas características morfológicas macroscópicas e microscópicas, similarmente a maioria dos trabalhos que avaliam este método de preservação [5, 12, 16, 18, 20]. Todavia, alguns autores mencionam porcentagens mínimas de contaminação [6, 21] e diminuição da estabilidade morfológica [17].

### **Observações finais**

Os resultados mostraram que a manutenção em água destilada esterilizada não foi eficiente para assegurar viabilidade da maioria das culturas de Zygomycetes, indicando que tempos de preservação menores que 6 anos devem ser usados para este grupo de fungos. Porém, este método mostrou conservar estabilidade morfológica das culturas preservadas e para eliminar os riscos de contaminação.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq, pelo apoio financeiro, e a Micoteca URM por fornecer as culturas.

### **Referências**

1. Benny, G.L., 2001. Zygomycota: Trichomycetes. In: McLaughlin D.J., McLaughlin E.G. and Lemke P.A. (Eds.), *The Mycota - Systematics and Evolution*. Springer, Berlin, pp. 147–160.
2. Neufeld, P.N., Sarquis, M.I.M., 2003. Preservação em laboratório de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral. *Rev. Bras An. Clin.* 35, 147-150.
3. Smith, D., Onions, A.H.S., 1994. *The preservation and maintenance of living fungi*. IMI, Technical Handbooks N° 2. CAB International, Egham.
4. Smith, D., Kolkowski, J., 1996. *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. Academic Press, London.
5. McGinnis, M.R., Padhye, A.A., Ajello, L., 1974. Storage of stock of filamentous fungi, yeasts and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Appl. Microbiol.*, 28, 218-222.
6. Rodrigues, E.G., Lírio, V.S., Lacaz, C.S., 1992. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 34, 159-165.

7. Figueredo, M.B., 2001. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*, 63, 73-82.
8. Castellani, A., 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.*, 42, 225-226.
9. Castellani, A., 1967. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J Trop Med Hyg*, 70, 181-184.
10. Nakasone, K.K., Peterson, S.W., Jong, S-C., 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. (Eds.), *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, London, pp. 37-47.
11. Boesewinkel, H.J., 1976. Storage of fungal cultures in water. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 66, 183 -185.
12. Bueno, L., Gallardo, R., 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev. Iberoam. Micol.*, 15, 166-168.
13. Smith, D., Onions, A.H.S., 1983. *The preservation and maintenance of living fungi*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
14. Burdsall, H.H., Dorworth, E.B., 1994. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia*, 86, 275-280.
15. Johnson, G.C., Martin, A.K., 1992. Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under oil. *Can. J. Microbiol.*, 38, 861-864.
16. Passador, M.M., Boro, M.C., Figueiredo, M.B., 2004. Estudo sobre a patogenicidade de três culturas fúngicas preservadas pelo método de Castellani. *Arq. Inst. Biol.*, 71, 138-140.
17. Deshmukh, S.K., 2003. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. *Mycoses*, 46, 203-207.

18. Mendoza, M., Alvarado, P., Torres, E.D., Lucena, L., Albornoz, M.C., 2005. Comportamiento fisiológico y de sensibilidad in vitro de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. *Rev. Iberoam. Micol.*, 22, 151-156.
19. Pérez, C., Mata-Essayag S., Capriles, C.H., Roselló, A., Colella, M.T., et al., 2003. Mantenimiento de *Cryptococcus* sp. con el método de Castellani. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.*, 23, 153-157.
20. Diogo, H.C., Sarpieri, A., Pires, M.C., 2005. Preservação de fungos em água destilada. *An. Bras. Dermatol.*, 80, 591-594.
21. Santos, M.J.S., Trufem, S.F.B., Oliveira, P.C., 2000. Viability and morphological stability of *Absidia* strains during long-term maintenance under mineral oil. *J. Basic Microbiol.*, 40, 133-136.

**Tabela 1.** Espécies de Zygomycetes preservadas em água destilada esterilizada na Micoteca URM entre 1989 e 2002.

<b>Espécie</b>	<b>Nº de Registro URM</b>	<b>Ano de estocagem</b>	<b>Viabilidade</b>
<i>Absidia blakesleana</i> Lendner	2202	1990	-
<i>A. blakesleana</i> Lendner	288	1989	-
<i>A. blakesleana</i> Lendner	2076	1989	-
<i>A. coerulea</i> Bainier	2073	1990	-
<i>A. coerulea</i> Bainier	4429	2002	-
<i>A. corymbifera</i> (Cohn) Saccardo & Trotter	2081	1989	-
<i>A. corymbifera</i> (Cohn) Saccardo & Trotter	4559	2002	+
<i>A. corymbifera</i> (Cohn) Saccardo & Trotter	4564	2002	+
<i>A. cuneospora</i> Orr. & Plunkett	2074	1989	-
<i>A. cylindrospora</i> Hagem	2078	1990	-
<i>A. cylindrospora</i> Hagem	4476	2002	+
<i>A. cylindrospora</i> Hagem	4482	2002	+
<i>A. cylindrospora</i> Hagem	4519	2002	+
<i>A. glauca</i> Hagem	2072	1989	-
<i>A. hialospora</i> (Saito) Lendner	4561	2002	+
<i>A. orchidis</i> (Vuillenin) Hagem	511	1989	-
<i>A. ramosa</i> (Lindt) Lendner	2075	1989	-
<i>A. ramosa</i> (Lindt) Lendner	759	1989	-
<i>A. ramosa</i> (Lindt) Lendner	4556	2002	+

**Tabela 1.** (Cont.)

Espécie	Nº de Registro URM	Ano de estocagem	Viabilidade
<i>A. ramosa</i> (Lindt) Lendner	4558	2002	+
<i>Backusella circina</i> Hesseltine & Ellis	2277	1990	-
<i>B. lamprospora</i> (Lendner) Benny & Benjamin	2500	1990	-
<i>Chaetostylum fresenii</i> Van Tieghem	1180	1990	+
<i>Circinella simplex</i> Van Tieghem	2007	1990	+
<i>C. simplex</i> Van Tieghem	4427	2002	-
<i>C. umbellata</i> Van Tieghem & Le Mon.	4430	2002	-
<i>Cunninghamella blakesleana</i> Lendner	168	1989	+
<i>C. elegans</i> Lendner	1591	1989	+
<i>C. elegans</i> Lendner	2497	1989	-
<i>C. elegans</i> Lendner	3172	1990	-
<i>C. elegans</i> Lendner	3173	1990	-
<i>C. elegans</i> Lendner	4428	2002	-
<i>C. elegans</i> Lendner	4473	2002	+
<i>C. equinulata</i>	2136	19/89	+
<i>C. ramosa</i> Pispek	1918	1989	+
<i>Gilbertella parsicaria</i> (Eddy) Hesseltine	2213	1990	-

**Tabela 1.** (Cont.)

<b>Espécie</b>	<b>Nº de Registro URM</b>	<b>Ano de estocagem</b>	<b>Viabilidade</b>
<i>Gongronella butleri</i> (Lendner) Peyronel & Valdesco	1369	1990	+
<i>G. homothallicus</i> Upadhyay	2151	1990	-
<i>Helicostylum pyriforme</i> Bainier	2247	1990	-
<i>Mortierella alliacea</i> Linnemann	1941	1989	-
<i>M. alpina</i> Peyronel	1928	1989	-
<i>M. ambigua</i> Mehrotra	2019	1989	-
<i>M. debilis</i> Wolf.	1943	1990	-
<i>M. isabellina</i> Oudemans	3534	1995	-
<i>M. polycephala</i> Coemans	1200	1990	-
<i>M. subtilissima</i> Oudemans	1930	1990	-
<i>Mucor bacilliformis</i> Hesseltine	233	1989	-
<i>M. bacilliformis</i> Hesseltine	4563	2002	-
<i>M. circinelloides</i> Van Tieghem	3485	1994	-
<i>M. circinelloides</i> Van Tieghem	4425	2002	-
<i>M. globosus</i> Fischer	1950	1989	-
<i>M. hiemalis</i> Wehmer	4560	2002	-
<i>M. hiemalis</i> Wehmer	4562	2002	-
<i>M. racemosus</i> Fres.	432	1989	-
<i>M. ramannianus</i> Moller	485	1990	-

**Tabela 1.** (Cont.)

<b>Espécie</b>	<b>Nº de Registro URM</b>	<b>Ano de estocagem</b>	<b>Viabilidade</b>
<i>M. ramannianus</i> Moller	580	1990	-
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper	4567	2002	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> Fischer	1523	1989	-
<i>R. arrhizus</i> Fischer	2816	1989	-
<i>R. microsporus</i> Van Tieghem	2901	1990	-
<i>R. microsporus</i> Van Tieghem	3388	1995	+
<i>R. microsporus</i> Van Tieghem	3409	1995	+
<i>R. microsporus</i> Van Tieghem	3526	1995	-
<i>R. microsporus</i> Van Tieghem	4568	2002	+
<i>R. nigricans</i> Ehrenberg	223	1990	-
<i>R. oryzae</i> Went. & Prinsen Geere	2829	1989	-
<i>R. oryzae</i> Went. & Prinsen Geere	3174	1990	-
<i>R. oryzae</i> Went. & Prinsen Geere	3518	1995	-
<i>R. oryzae</i> Went. & Prinsen Geere	4359	2002	-
<i>R. oryzae</i> Went. & Prinsen Geere	4518	2002	-
<i>R. oryzae</i> Went. & Prinsen Geere	4525	2002	+
<i>R. oryzae</i> Went. & Prinsen Geere	4557	2002	+
<i>R. oryzae</i> Went. & Prinsen Geere	4565	2002	+
<i>R. oryzae</i> Went. & Prinsen Geere	4566	2002	-
<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb:Fres) Vuillenin	3427	1995	+

**Tabela 1.** (Cont.)

<b>Espécie</b>	<b>Nº de Registro URM</b>	<b>Ano de estocagem</b>	<b>Viabilidade</b>
<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb:Fres) Vuillenin	3482	1994	+
<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb:Fres) Vuillenin	3525	1995	+
<i>Syncephalastrum fuliginosum</i> Bainier	1493	1989	-
<i>S. nigricans</i> Vuillenin	1886	1989	+
<i>S. racemosum</i> Cohn	784	1989	-
<i>S. racemosum</i> Cohn	3384	1995	-
<i>S. racemosum</i> Cohn	3398	1995	-
<i>Syncephalatrums</i> sp. Schröt	4426	2002	+
<i>Thamnostylum piriforme</i> (Bain.) von Arx et Upadhyay	3489	1994	-
<i>Zygorhynchus exponeus</i> Burgeff	1960	1990	-
<i>Z. moelleri</i> Vuillenin	779	1990	-

a) +: Cultura viável, b) -: Cultura inviável

**Tabela 2.** Número de culturas preservadas de Zygomycetes (P) em água destilada esterilizada na Micoteca URM e de culturas viáveis (V), por gênero e ano de preservação.

Gênero	1989		1990		1991		1994		1995		2002		TOTAL	
	P	V	P	V	P	V	P	V	P	V	P	V	P	V
<i>Absidia</i>	8	0	3	0	0	0	0	0	0	0	9	8	20	8
<i>Backusella</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Chaetostylum</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Circinella</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	3	1
<i>Cunninghamella</i>	5	4	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1	9	6
<i>Gilbertella</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Gongronella</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
<i>Helicostylum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Mortierella</i>	3	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	7	0
<i>Mucor</i>	3	0	2	0	0	0	1	0	0	0	4	0	10	0
<i>Rhizomucor</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Rhizopus</i>	3	0	3	1	0	0	1	1	6	4	7	4	20	10
<i>Syncephalastrum</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	6	2
<i>Thamnostylum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Zygorhynchus</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>23</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>25</b>	<b>14</b>	<b>86</b>	<b>30</b>

#### **4 VIABILIDADE E CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE DERMATÓFITOS PRESERVADOS EM ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA NA MICOTECA URM, BRASIL**

Artigo submetido a MYCOPATHOLOGIA

\*Kaliny Benicio Torres, Oliane Maria Correia Magalhães, Odacy Camilo de Sousa, Hanilma da Silva Rodrigues & Cristina Maria de Souza-Motta

*Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil*

\* Autor correspondente

Endereço: Rua Gervásio Pires, nº 436, Bloco-B, Aptº 110, Boa Vista, Recife, Pernambuco, Brasil. Cep 50050-070.

Telefone: (+5581) 2126-8948

Fax: (+5581) 2126-8480

E-mail: kalinytorres@ig.com.br, smotta@ufpe.br

## Introdução

A preservação de culturas de fungos é elemento essencial para assegurar estudos e pesquisas futuras com esses microrganismos. Devido a isso, são propostos vários métodos de preservação (subcultivo, óleo mineral esterilizado, solo esterilizado, sílica gel, deep freezing, liofilização, nitrogênio líquido e água destilada esterilizada), todos com o mesmo objetivo: assegurar viabilidade e estabilidade morfológica, fisiológica e genética das culturas [1-4]. O método de preservação em água destilada esterilizada [5-6] é um dos mais utilizados por coleções de culturas por causa de vantagens como baixo custo, técnica simples e segura e eliminação da contaminação por ácaros. Além disso, o espaço de estocagem requerido pelos frascos é mínimo e eles podem ser mantidos à temperatura ambiente [7-8]. Alguns autores [9-12] afirmam que o potencial patogênico de um agente fúngico depende de algumas características fisiológicas, como crescimento na temperatura corpórea do hospedeiro e habilidade para produzir enzimas extracelulares como proteinases e fosfolipases. Queratinases são produzidos por todas as espécies de dermatófitos estudadas [9] e participam do processo infeccioso degradando a queratina dos tecidos queratinizados [13-14]. Dermatófitos são um grupo de fungos relacionados que tem habilidade para digerir queratina em seu estado saprofítico e utilizá-la como um substrato, podendo invadir tecidos queratinizados (pele, cabelo e unhas) de humanos e outros animais no estado parasitário para produzir infecções bem definidas: dermatofitoses (tineas ou ringworm). Eles compreendem três gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* [9-12]. Este estudo examinou viabilidade, morfologia, capacidade de crescimento à 37°C, detecção de proteinase e fosfolipase e atividade queratinofílica/queratinolítica de 79 isolados de dermatófitos preservados em água destilada esterilizada.

## **Materiais & métodos**

Um total de 79 culturas de dermatófitos (4 *Epidermophyton*, 36 *Microsporum* e 39 *Trichophyton*) armazenadas na coleção de culturas Micoteca Universidade Recife Micologia (URM), Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, em 1990 e 1991 em água destilada esterilizada e mantidas à temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) foram utilizadas. A determinação da viabilidade ocorreu segundo a metodologia descrita por Castellani [5-6]. Os blocos com os fungos preservados foram assepticamente retirados dos frascos de penicilina e transferidos para placas de Petri contendo ágar Sabouraud Extrato de Levedura (ágar S+YE). As placas foram mantidas à temperatura ambiente por até 15 dias para observação de crescimento. A morfologia foi avaliada pela observação de características macroscópicas e microscópicas. Para determinação das características de fisiológicas (crescimento à  $37^{\circ}\text{C}$ , detecção de fosfolipase e proteinase e atividade queratinofílica/queratinolítica), apenas as culturas viáveis e autenticadas taxonomicamente foram utilizadas. Os testes foram realizados em triplicata. O crescimento à  $37^{\circ}\text{C}$  foi realizado de acordo com Lacaz et al. [12]. As culturas foram inoculadas em tubos contendo ágar S+YE e incubadas à  $37^{\circ}\text{C}$  em *Biological Oxygen Demand* (BOD) por 15 dias para observação de crescimento. Para cada cultura testada, um tubo foi mantido à temperatura ambiente para servir de controle. Para detecção de fosfolipase, a metodologia modificada de Price et al., [15], trocando gema de ovo por lecitina de soja, foi utilizada. As culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio e mantidas à temperatura ambiente por 10 dias, quando a presença (teste positivo) ou ausência (teste negativo) de halo opaco ao redor da colônia foi detectado. Para detecção de protease, a metodologia de Lacaz et al. [12] foi utilizada. As culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio caseína e mantidas à temperatura ambiente por 10 dias. Sobre as colônias que apresentaram halo transparente ao seu redor, uma solução ácida de

cloreto de mercúrio foi adicionada e se aguardou 5min. A diminuição/desaparecimento do halo indicou teste negativo e a permanência indicou teste positivo. A atividade queratinofílica/queratinolítica foi baseada nas metodologias Vanbreusegegham [16] e English [17]. Suspensões das culturas em 9mL de solução salina com 0,1g de Tween 80 ( $10^6$  esporos  $\text{ml}^{-1}$ ) foram preparadas e distribuídas em placas de Petri contendo 25g de solo e 5 pontos de pedaços de crina de cavalo (2cm de extensão), todo conjunto esterilizado previamente. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 dias, sendo removidas 5 crinas a cada 10 dias e preparadas lâminas com uma gota de lactofenol azul de algodão para observação sob microscópio ótico de colonização (atividade queratinofílica) e colonização/perfuração (atividade queratinolítica) da crina. Cada isolado crescido em crina foi inoculado em ágar S+YE contido em placas de Petri, mantido à temperatura ambiente e seu crescimento foi acompanhado durante 10 dias. As características macroscópicas e microscópicas foram observadas novamente para autenticação taxonômica.

## **Resultados**

A tabela 1 mostra os resultados obtido com relação a viabilidade, crescimento à 37°C, detecção de fosfolipase e proteinase e atividade queratinofílica/queratinolítica para cada cultura. Das 79 culturas preservadas, apenas 39 (49%) foram viáveis e 36 (92%) mantiveram suas características morfológicas estáveis. *Epidermophyton* obteve o melhor percentual de viabilidade, 75% (3/4). Porém, embora as culturas viáveis deste gênero tivessem mantido suas características macroscópicas, nenhuma delas foi capaz de esporular. Para *Microsporum*, o percentual de viabilidade foi 55% (20/36), estando todas as culturas viáveis deste gênero conservadas morfológicamente, tanto nas características macroscópicas quanto nas microscópicas. Para *Trichophyton*, o percentual foi 41% (16/39) e, igualmente as culturas de *Microsporum*, todas as culturas viáveis mantiveram estáveis sua morfologia macro e microscópica. Com relação ao ano de preservação, os percentuais

de viabilidade foram de 46% (31/67) para 1990 e 67% (8/12) para 1991. Correlacionando gênero e ano de preservação, tivemos: 75% (3/4) de viabilidade para *Epidermophyton* em 1990, 50% (14/28) para *Microsporum* em 1990, 40% (14/35) para *Trichophyton* em 1990, 75% (6/8) para *Microsporum* em 1991 e 50% (2/4) para *Trichophyton* em 1991. Os melhores resultados foram obtidos em 1990 e com *Epidermophyton* e *Microsporum*.

Todas as 36 culturas testadas foram capazes crescer à 37°C, crescendo tão bem quanto à temperatura ambiente. Por outro lado, nenhuma delas foi positiva para detecção de fosfolipase. No teste de detecção de proteinase, 18 das 20 culturas de *Microsporum* e todas as 16 culturas de *Trichophyton* foram positivas (Figura 1), sendo as duas culturas negativas, *Microsporum gypseum* URM2876 e *Microsporum racemosum* URM2731. O experimento realizado para avaliar a atividade queratinofílica/queratinolítica mostrou que *Trichophyton rubrum* URM2669 (Figura 2) e *Microsporum fulvum* URM2710 foram capazes apenas de colonizar a crina de cavalo, sendo considerados queratinofílicos, enquanto o restante das culturas (19 *Microsporum* e 15 *Trichophyton*) foram capazes de colonizar e degradar a crina de cavalo em até 30 dia, apresentando atividade queratinolítica (Figura 3).

## **Discussão**

O método de água destilada esterilizada tem sido usado com sucesso para preservar patógenos do homem e de outros animais, mantendo suas viabilidade, morfologia e patogenicidade [7-8]. Dermatófitos são agentes etiológicos de infecções superficiais de tecidos queratinizados, com unhas, cabelo e pele, chamadas dermatofitoses ou tineas [12-13]. O tipo e o aspecto da lesão dermatofítica depende da resposta imune do hospedeiro, da localização anatômica da lesão, do tipo de tecido invadido e da virulência do dermatófito [14]. Encontramos apenas 49% de culturas viáveis. Taxas de viabilidade diferentes para fungos preservados em água foram previamente descritas por Borman et al. [18] que

reativou com sucesso 81% de isolados preservados por 15-16 anos e Qiangqiang et al. [19] que informaram 89% viabilidade para 78 isolados após 12 anos de estocagem. Não obstante, a viabilidade total obtida neste estudo foi compatível com os 50% obtidos por Schonborn [20] quando avaliou dermatófitos mantidos por mais de 10 anos em óleo mineral, embora alguns autores [1,3-4] afirmem que o tempo de preservação em água destilada esterilizada deva ser menor que em óleo mineral. Os percentuais de viabilidade em relação ao ano de preservação (46% para 1990 e 67% para 1991) foram menores que os encontrados em outros estudos que utilizaram o mesmo grupo de fungos e o mesmo método de estocagem, entretanto, esses trabalhos apresentaram tempos de preservação muito inferiores aos nossos (15-16 anos). Por exemplo, Rodrigues et al. [8], que conseguiram 80-100% de viabilidade trabalhando com dermatófitos com 6 meses a 2 anos de preservação, e McGinnis et al. [7], que conseguiram 80-93% para dermatófitos com 1-5 anos de preservação.

*Epidermophyton* e *Microsporum* apresentaram melhor viabilidade, entretanto, poucas culturas de *Epidermophyton* foram testadas. Apenas as culturas de *Epidermophyton* perderam a capacidade de esporular depois de serem preservadas, fato também observado por Panizo et al. [19] e atribuído por eles à preservação da cultura sem esporulação apropriada. Dermatófitos produzem fosfolipases [22-23], proteases [22, 24] e queratinases [22, 24-25], e sua patogenicidade tem sido relacionada ao seu crescimento na temperatura corpórea do hospedeiro e à atividade destas enzimas [9-12]. O presente trabalho mostra que *Microsporum* e *Trichophyton* são capazes de crescer bem à 37°C e de produzir queratinase e protease após preservação em água, embora a detecção dessa última enzima tenha apresentado resultados variados para a *Microsporum gypseum* e *M. racemosum*. No entanto, não se observou atividade fosfolipásica em nenhuma das culturas. Santos et al. [22] em seu estudo com isolados de *T. rubrum*, observaram que todos produziram

queratinase, alguns produziram protease e nenhum produziu fosfolipase. Por outro lado, Maia et al [25] em seu trabalho com isolados de *M. canis*, encontraram 70% deles com atividade proteásica e 73% com atividade fosfolipásica. Estudos de queratinases produzidas por fungos e bactérias são primeiramente necessários porque elas podem ser importantes como determinante patogênico[11]. O teste de perfuração de cabelo humano, *in vitro*, permite diferenciar a maioria dos isolados de *T. mentagrophytes*, capazes de perfurar o cabelo, dos isolados de *T. rubrum*, incapazes de perfurar o cabelo [12, 14], o que foi confirmado neste trabalho, onde o único *T. rubrum* testado (URM2669) apenas colonizou a crina de cavalo, enquanto todos os *T. mentagrophytes* perfuraram-na. Todas as culturas foram capazes de colonizar a crina de cavalo, conseqüentemente, produziram queratinase, e exceto *T. rubrum* URM2669 e *M. fulvum* URM2710, todas as culturas conseguiram degradá-la. Okafor Ngwogu [26] estudando atividade queratinásica de dermatófitos, observou que todas as espécies testadas mostraram atividade queratinofílica e só *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* mostraram atividade de queratinolítica, causando dano estrutural à haste do cabelo. Baseados nesses resultados, podemos concluir que o método de preservação em água destilada esterilizada foi efetivo na preservação das culturas de *Microsporum* e *Trichophyton*, mostrando resultados inferiores na preservação das culturas de *Epidermophyton*. Além disso, este método manteve as características morfológicas e as capacidades de crescimento a 37°C e de produção de queratinase e protease da maioria das culturas preservadas. Crescimento a 37°C e produção de queratinase e protease podem estar relacionados à patogenicidade de dermatófitos, porém, nenhuma conclusão pode ser tirada com relação a produção de fosfolipase.

### **Agradecimentos**

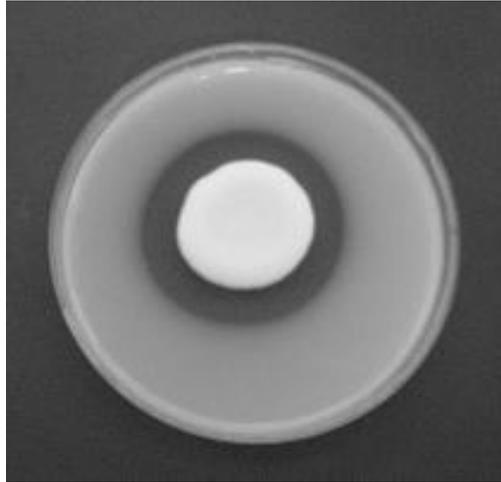
Os autores agradecem ao CNPq, pelo apoio financeiro, e a Micoteca URM por fornecer as culturas.

## Referências

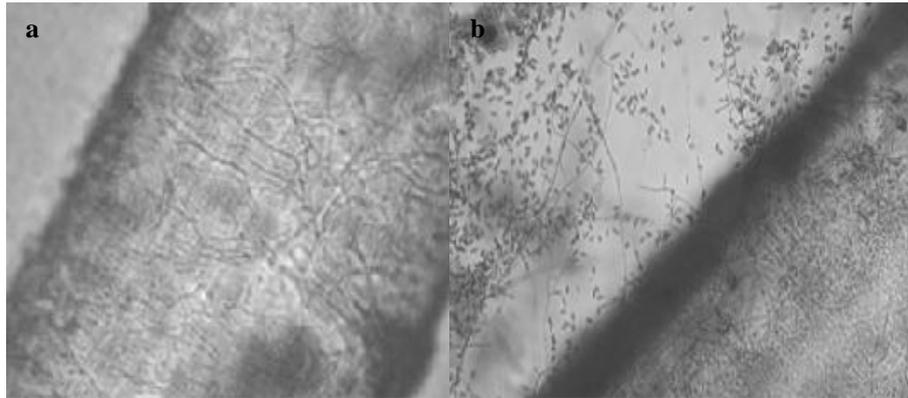
1. Smith D, Onions AHS. The preservation and maintenance of living fungi. IMI, Technical Handbooks N° 2. Egham: CAB International, 1994.
2. Smith D, Kolkowski J. Maintaining cultures for biotechnology and industry. London: Academic Press, 1996.
3. Figueiredo M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico* 2001; 63: 73-82.
4. Nakasone KK, Peterson SW, Jong S-C. Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS, eds. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, London, 2004: 37-47.
5. Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg* 1939; 42: 225-226.
6. Castellani A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J Trop Med Hyg* 1967; 70: 181-184.
7. McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeast, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Appl Microbiol* 1974; 28: 218-222.
8. Rodrigues EG, Lírio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1992; 34: 159-165.
9. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 240-259.
10. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.
11. Kushwaha RKS, Guarro J. *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*. Bilbao: *Rev Iberoam de Micol*, 2000.

12. Lacaz C S, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacarri EM, Melo NK. Tratado de Micologia Médica. São Paulo: Editora Savier, 2002.
13. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2002.
14. Fisher F, Cook NB. Micologia: Fundamentos e Diagnóstico. Rio de Janeiro Revinter, 2002.
15. Price MF, Walkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Saboraudia 1982; 20: 7-14.
16. Vanbreuseghem, R. Keratin digestion by dermatophytes: a specific diagnostic method. Mycologia 1952; 44: 176-182.
17. English MP. Destruction of the hair by two species of *Chrysosporium*. Trans Br Mycol Soc 1976; 66: 357-358.
18. Borman AM, Szekely A, Campbell CK, Johnson EM. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. Mycopathologia 2006; 161: 361–368.
19. Qiangqiang Z, Jiajun W, Li L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilisation: comparison after 12 years. Mycoses 1998; 41: 255–257.
20. Schonborn C. The long-time survival of dermatophytes and moulds under paraffin oil. Mycoses, v. 39, p. 349-353, 1989.
21. Panizo MM, Reviákina V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservacion de hongos en agua destilada y aceite mineral. Rev Soc Venezol Microbiol 2005; 25: 35-40.
22. Santos JI, Vicente EJ, Paula CR, Gambale W. Phenotypic characterization of *Trichophyton rubrum* isolates from two geographic locations in Brazil. Europ J Epidemiol 2001; 17: 729-735.

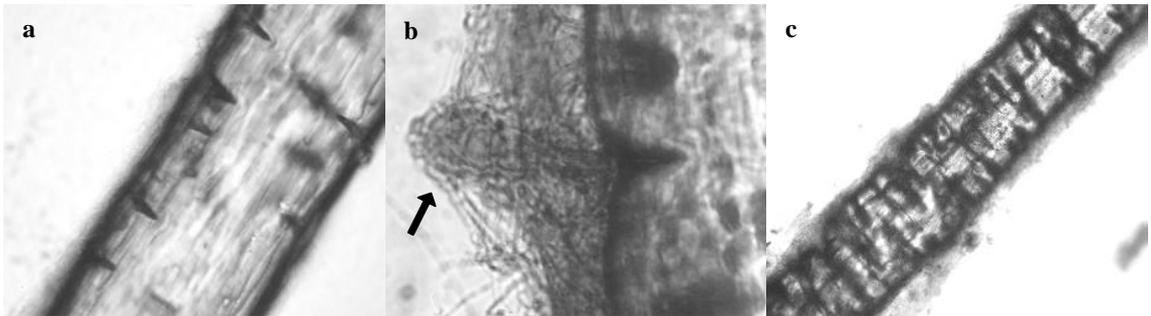
23. Viani FC, Santos JI, Paula CR, Larson CE, Gambale W. Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. *Med Mycol* 2001; 39: 463–468.
24. Muhsin TM, Salih TH. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. *Mycopathologia* 2000; 150: 49–52.
25. Maia MLS, Santos JI, Viani JC, Larson CE, Paula CR, Gambale W. Phenotypic characterization of *Microsporum canis* isolated from cats and dogs. *Mycoses* 2001; 44: 480-486.
26. Okafor JI, Ngwogu A. Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. *Journal of Communicable Diseases* 2000; 32: 300-305.



*Figura 1.* Cultura de *Trichophyton tonsurans* URM731 positiva para detecção de protease em meio caseína após 10 dias de crescimento.



*Figura 2.* Atividade queratinofílica de *Trichophyton rubrum* URM2669 em crina de cavalo. **a.** Crina colonizada após 10 dias de crescimento do fungo (2400X). **b.** Crina colonizada após 30 dias de crescimento do fungo (1600X).



*Figura 3.* Atividade queratinolítica de *Microsporum gypseum* URM2738 em crina de cavalo. **a.** Crina perfurada após 10 dias de crescimento do fungo (1600x). **b.** Órgão de perfuração na crina após 10 dias de crescimento do fungo (2800X). **c.** Crina degradada após 30 dias de crescimento do fungo (600x).

Tabela 1. Viabilidade e características fisiológicas de culturas de dermatófitos preservados em água destilada esterilizada nos anos de 1990 e 1991 na Micoteca URM.

Espécies	Número de registro URM	Ano de preservação	Viabilidade	37°C	DF	DP	AQF/QL
<i>Epidermophyton floccosum</i> (Hartz) Lang & Miloch	2668	1990	+	nt	nt	nt	nt
<i>E. floccosum</i> (Hartz) Lang & Miloch	2873	1990	+	nt	nt	nt	nt
<i>E. floccosum</i> (Hartz) Lang & Miloch	3182	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>E. floccosum</i> (Hartz) Lang & Miloch	3195	1990	+	nt	nt	nt	nt
<i>Microsporium canis</i> Bodin	2660	1990	+	+	-	+	+
<i>M. canis</i> Bodin	2877	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>Microsporium fulvum</i> (Bodin) Guiart	2710	1990	+	+	-	+	KP
<i>M. fulvum</i> (Bodin) Guiart	2740	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>Microsporium gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	342	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1614	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1750	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1751	1991	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1752	1991	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1753	1991	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1754	1991	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1756	1991	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1757	1991	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1759	1991	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1760	1991	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1775	1990	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1793	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	1794	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	2482	1990	+	+	-	+	KL

Tabela 1.(Cont.)

Espécies	Número de registro URM	Ano de preservação	Viabilidade	37°C	DF	DP	AQF/QL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	2708	1990	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	2730	1990	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	2738	1990	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	2739	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	2741	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	2771	1990	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	2779	1990	+	+	-	+	KL
<i>M. gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigoraki	2876	1990	+	+	-	-	KL
<i>Microsporium racemosum</i> Borelli	2711	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. racemosum</i> Borelli	2712	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. racemosum</i> Borelli	2728	1990	+	+	-	+	KL
<i>M. racemosum</i> Borelli	2729	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. racemosum</i> Borelli	2731	1990	+	+	-	-	KL
<i>M. racemosum</i> Borelli	2733	1990	+	+	-	+	KL
<i>M. racemosum</i> Borelli	2735	1990	+	+	-	+	KL
<i>M. racemosum</i> Borelli	2736	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>M. racemosum</i> Borelli	2742	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>Trichophyton gloriae</i> Ajello	2798	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>Trichophyton mentagrophyte</i> (Robin)	260	1990	+	+	-	+	KL
Blanch							
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	469	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	676	1990	+	+	-	+	KL
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	724	1990	+	+	-	+	KL
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	2240	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	2772	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	2774	1990	-	nt	nt	nt	nt

Tabela I. (Cont.)

Espécies	Número de registro URM	Ano de preservação	Viabilidade	37°C	DF	DP	AQF/QL
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	2777	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	2781	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	2782	1990	+	+	-	+	KL
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	2784	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	2785	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	2875	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	3238	1991	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanch	3239	1991	+	+	-	+	KL
<i>Trichophyton phaseoliforme</i> Borelli	2082	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>Trichophyton proliferans</i> English & Stockdale	2709	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>Trichophyton rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	179	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	596	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	607	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	719	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	1666	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T.n rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	2236	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	2669	1990	+	+	-	+	KP
<i>T. rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	2874	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>Trichophyton tonsurans</i> Malmsten	437	1991	+	+	-	+	KL
<i>T. tonsurans</i>	450	1990	+	+	-	+	KL
<i>T. tonsurans</i>	610	1990	-	nt	nt	nt	nt
<i>T. tonsurans</i>	691	1990	+	+	-	+	KL
<i>T. tonsurans</i>	700	1990	+	+	-	+	KL
<i>T. tonsurans</i>	731	1990	+	+	-	+	KL

Tabela 1.(Cont.)

<b>Espécies</b>	<b>Número de registro URM</b>	<b>Ano de preservação</b>	<b>Viabilidade</b>	<b>37°C</b>	<b>DF</b>	<b>DP</b>	<b>AQF/QL</b>
<i>T. tonsurans</i>	735	1990	+	+	-	+	KL
<i>T. tonsurans</i>	769	1990	+	+	-	+	KL
<i>T. tonsurans</i>	771	1990	+	+	-	+	KL
<i>Tr. tonsurans</i>	2822	1990	+	+	-	+	KL
<i>T. tonsurans</i>	3237	1991	-	nt	nt	nt	nt
<i>Trichophyton violaceum</i> Sabouraud	1842	1990	-	nt	nt	nt	nt

a) 37°C: Crescimento a 37°C, b) DF: Detecção de fosfolipase, c) DP: Detecção de proteinase, d) AQF/QL: Atividade queratinofílica/queratinolítica, e) +: Teste positivo, ÷: Teste negativo, g) QF: Queratinofílico, h) QL: Queratinolítico, i) nt: Não testado.

**5 *SPOROTHRIX SCHENCKII*: CARATERES MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DE CULTURAS PRESERVADAS EM ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA NA MICOTECA URM, BRASIL**

Artigo a ser submetido a MYCOSES

\*Kaliny Benicio Torres, Oliane Maria Correia Magalhães, Hanilma da Silva Rodrigues,  
Cristina Maria de Souza-Motta

Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de  
Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

\* Autor correspondente

Endereço: Rua Gervásio Pires, nº 436, Bloco-B, Aptº 110, Boa Vista, Recife, Pernambuco,  
Brasil. Cep 50050-070.

Telefone: (+5581) 2126-8948

Fax: (+5581) 2126-8480

E-mail: kalinytorres@ig.com.br, smotta@ufpe.br

**Resumo**

Viabilidade, pureza e caracteres morfológicos e fisiológicos, como crescimento a 37°C e atividades queratinofílica/queratinolítica, ureásica, fosfolipásica e proteinásica de 9 isolados de *Sporothrix schenckii* preservados na Micoteca Universidade Recife Micologia, Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, por 16 anos em água destilada esterilizada foram avaliados. Oito das 9 estavam viáveis e conservaram suas características morfológicas típicas. Todos os isolados foram capazes de crescer a 37°C e apresentaram atividade queratinofílica, entretanto, nenhum apresentou atividade fosfolipásica ou ureásica. Para atividade proteinásica, todos foram positivos quando o substrato utilizado foi gelatina e foram negativos quando o substrato foi caseína. Isolados de *S. schenckii* são preservados satisfatoriamente pelo método de preservação em água destilada esterilizada por até 16 anos, mantendo seus caracteres morfológicos e fisiológicos.

**Palavras chave:** *Sporothrix schenckii*, preservação, viabilidade, morfologia, fisiologia

## Introdução

*Sporothrix schenckii* (Hektoen & Perkins) é um fungo dimórfico cosmopolita já relatado em vários países: México, Uruguai, Brasil, E.U.A., Japão e Índia [1]. É o agente etiológico da esporotricose, uma infecção subaguda ou crônica da pele e tecidos subcutâneos com várias formas clínicas e cujo diagnóstico é feito por exames micológicos, histopatológicos e imunológicos [2-3].

A preservação de culturas de fungos assegura a viabilidade e integridade morfológica, fisiológica e genética das culturas até serem requerido para estudos e pesquisas futuras [4-6]. O método de Castellani [7-8] foi usado prosperamente para preservar fungos patogênicos humanos e animais [4, 9-10], entre eles os dimórficos.

O potencial patogênico de alguns fungos foi relacionado com a capacidade de produzir enzimas extracelulares e de crescimento na temperatura corpórea do hospedeiro, o que favoreceria a adesão e invasão do tecido, bem como a disseminação do agente etiológico após a ruptura da barreira de proteção tecidual [3, 11].

Este paper visa verificar a viabilidade, pureza, estabilidade morfológica e caracteres fisiológicos de isolados de *S. schenckii* preservados em água destilada esterilizada na Micoteca Universidade Recife Micologia (URM), Brasil.

## Materiais e Métodos

Isolados - 9 isolados de *Sporothrix schenckii* preservados em água destilada esterilizada em 1991 (16 anos) e mantidos a temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) na coleção de culturas Micoteca URM, Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, foram utilizados.

Viabilidade, pureza e estabilidade morfológica - As culturas foram transferidas dos frascos de penicilina para placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar

(BDA), no qual foram preservados e mantidos a temperatura ambiente por até 15 dias [7-8]. Após o crescimento, a pureza e a estabilidade morfológica foram avaliadas observando-se caracteres macroscópicos através de colônia central em BDA e caracteres microscópicos através de técnica de microcultivo, também em BDA, e preparação de lâminas com lactophenol azul de algodão, visualizadas sob microscópio ótico [3, 12].

Caracteres fisiológicos - Todos os testes foram realizados em triplicata.

Crescimento a 37°C - Este teste foi realizado conforme Lima & Borba [13]. Os isolados foram inoculados em caldo *Brain Heart Infusion* (caldo BHI) e incubados a 37°C em *shaker* a 120 rpm por 7 dias.

Atividade queratinofílica/queratinolítica - Suspensões em 9mL de solução salina com 1,0g de Tween 80 ( $10^6$  esporos  $\text{ml}^{-1}$ ) foram preparadas e distribuídas em placas de Petri contendo 25g de solo e 5 pontos de pedaços de crina de cavalo de aproximadamente 2cm de comprimento. Todo conjunto previamente esterilizado. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 30 dias, removendo-se 5 crinas a cada 10 dias e lâminas foram feitas com uma gota de lactophenol azul de algodão para observação sob microscópio ótico. A colonização da crina indicou atividade queratinofílica e a colonização/perfuração indicou atividade queratinolítica [14-15]. Cada isolado crescido na crina foi colocado em BDA contido em placas de Petri, mantido a temperatura ambiente e seu crescimento foi acompanhado durante 10 dias para autenticação taxonômica [3, 12].

Atividade ureásica - O teste foi baseado na metodologia de metodologia de Lacaz [3]. Os isolados foram inoculados em tubos contendo ágar Urease Christenson e mantidos a temperatura ambiente por 3 dias. A mudança do meio de amarelo para rosa intenso indicou teste positivo.

Atividade fosfolipásica - A metodologia modificada de Price *et al.* [16], trocando gema de ovo por lecitina de soja, foi utilizada. Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo o meio e mantidos a temperatura ambiente por 10 dias, quando a presença (teste positivo) ou a ausência (teste negativo) de halo opaco ao redor da colônia foi detectada.

Atividade proteínásica - Dois substratos foram utilizados: caseína e gelatina [3]. Quando o substrato foi a caseína, os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura e mantidos a temperatura ambiente por 10 dias. Nas colônias que apresentaram halo transparente ao seu redor, foi adicionada uma solução ácida de cloreto de mercúrio e se esperou 5min para conferir diminuição/desaparecimento (teste negativo) ou permanência (teste positivo) do halo. Quando o substrato foi a gelatina, os isolados foram inoculados em tubos contendo o meio de cultura e mantidos a temperatura ambiente por 10 dias. Em seguida, os tubos inoculados foram refrigerado a 4°C por 30min para observar a liquefação (teste positivo) ou solidificação (teste negativo) do meio (gelatina).

## **Resultados**

Os resultados das experiências estão expostos na Tabela 1.

Os resultados mostraram que 8 (89%) dos 9 isolados foram mantidos satisfatoriamente após 16 anos de preservação. Os isolados reativados foram examinados macro e microscopicamente para avaliar a pureza e a conservação de caracteres morfológicos. Nenhum deles apresentou contaminação ou mudanças de caracteres morfológicos, conservando-se a morfologia e a capacidade de esporular observadas antes da preservação. As culturas apresentaram, quando jovens, colônias membranosas brancas e, quando velhas, colônias filamentosas com ou sem pigmento escuro. Foram observadas, microscopicamente, hifas hialinas septadas, conidióforos ramificados e conídios hialinos esféricos a piriformes que surge em buquê ao topo de conidióforos (Figs 1a, b).

Com relação aos caracteres fisiológicos, os resultados mostraram que todos os isolados cresceram a 37°C. O crescimento dos isolados mantidos a 37°C foi evidenciado já ao 3º dia, enquanto a temperatura ambiente (28°C ± 2°C), este só foi evidenciado à partir do 5º dia. Todos os isolados avaliados foram capazes de colonizar a crina de cavalo e esporularam bem já nos primeiros 10 dias. A colonização foi observada tanto na superfície quanto no interior da crina e uma grande quantidade de micélio e esporos foi produzida (Figs 2a, b). Nenhum dos isolados perfurou a crina ao final dos 30 dias. As atividades ureásica e fosfolipásica não foram detectadas nos isolados. Todos os isolados apresentaram atividade proteínásica, entretanto, apenas quando o substrato utilizado foi a gelatina. Não foi observado formação de halo transparente ao redor das colônias nas placas contendo meio de cultura com caseína.

### **Discussão**

Taxas de viabilidade de 90% a 100% para grupos de fungos diferentes preservados em água destilada esterilizada foram descritos por muitos autores [4-10, 13, 17-22]. Dos 9 isolados utilizados neste trabalho, only 1 não foi viável, o que confirma a eficiência do método na preservação de *Sporothrix schenckii*. Resultados similares com este mesmo fungo foram obtidos por Diogo *et al.* [10] que reativaram 100% de 12 isolados preservados de 6 meses a 1 ano e por Mendoza *et al.* [6] que reativaram com sucesso 5 isolados após 18 anos de estocagem.

Além de assegurar a viabilidade das culturas preservadas, o método de Castellani as mantém puras e sem alterações morfológicas [5], porém, contaminação e diminuição de capacidade de esporular podem acontecer, o que é mais freqüente em culturas de dermatófitos [21-22]. Neste trabalho todos os isolados viáveis estavam puros e morfologicamente estáveis. Os caracteres macroscópicos e microscópicos observados foram os mesmos apresentados antes da preservação das culturas. Resultados semelhantes foram encontrados na maioria dos trabalhos que avaliaram este método [4-5, 7-10, 18], contudo, Mendoza *et al.* [6], trabalhando

com isolados de *Sporothrix schenckii*, observaram uma grande variedade de formas de conídios e contaminação em 20% deles.

A habilidade de sobreviver e se multiplicar a 37°C parece ser uma propriedade comum a fungos patogênicos [3, 12]. Lima & Borba [13] e Mendoza *et al.* [6] verificaram que este carácter fisiológico é conservado em isolados de *S. schenckii* preservados sob óleo mineral e em água destilada, respectivamente. Igualmente aos resultados obtidos por Lima & Borba [13] e Mendoza *et al.* [6], Os isolados deste estudo também foram capazes de crescer a 37°C após serem preservados. Estudos com *S. schenckii* relatam que isolados ambientais crescem melhor a 30°C e isolados clínicos crescem melhor a 37°C [23-24], entretanto, neste estudo não foram observadas diferenças significativas entre o crescimento dos isolados clínico e ambientais. Todos eles cresceram mais rapidamente a 37°C que a temperatura ambiente (28°C ± 2°C).

A determinação da atividade queratinásica pode ser realizada com diferentes substratos: cabelo, unha, crina, pena, lã, etc. O substrato queratinoso pode ser colonizado e/ou degradado pelos fungos. Aqueles que apenas colonizam tal substrato são definidas como queratinofílicos, enquanto aqueles capazes de destruir a queratina são definidos como queratinolíticos [3, 25]. No presente estudo, todos os isolados foram capazes apenas de colonizar a crina de cavalo, sendo portanto considerados queratinofílicos.

Nenhum isolado apresentou atividade ureásica ou fosfolipásica, contudo, diferentes resultados foram relatados com relação a detecção de urease em *S. schenckii*. Singler *et al.* [24], mostraram que a fase leveduriforme deste fungo hidrolisa uréia, no entanto, Ghosh *et al.* [1] observaram em seu trabalho que a fase leveduriforme de seus isolados não degradou a uréia, enquanto a fase micelial degradou. Mais tarde, Mendoza *et al.* [6] observaram que todos os seus isolados apresentaram atividade ureásica a temperatura

ambiente (fase micelial). Não foi encontrado nenhum estudo sobre atividade fosfolipásica de *S. schenckii*.

Diversos substratos são utilizados em testes de detecção de proteases: gelatina, soro albumina bovina, caseína, entre outros [3]. Neste estudo foram utilizados caseína e gelatina para testar atividade proteinásica, porém, só com gelatina foram observados resultados positivos. Ghosh *et al.* [1] revelou em seu estudo que nenhum isolados (fases micelial e leveduriforme) hidrolisou caseína ou (fase micelial) gelatina, enquanto, Mendoza *et al.* [6] obteve 25% de seus isolados capazes de hidrolisar a gelatina a temperatura ambiente.

Estes dados demonstram que culturas de *S. schenckii* podem ser mantidas durante 16 anos em água destilada esterilizada sem prejuízos para viabilidade, pureza e caracteres morfológicos e sem perder suas atividades queratinofílica e proteinásica. Com relação às atividades ureásica e fosfolipásica, não é possível concluir sobre perda destes caracteres fisiológicos, porque estes não foram avaliados antes da preservação dos isolados.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq, pelo apoio financeiro, e a Micoteca URM por fornecer as culturas.

### **Referências**

- 1 Ghosh A, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 2002; 45: 449-454.
- 2 Albornoz MC. Sporotrichosis. In: Hay RJ. (ed) *Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases*. London: Baillière Tindall, 1989: 71-96.
- 3 Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica.*, São Paulo: Sarvier, 2002.

- 4 Rodrigues EG, Lírio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1992; 34: 159-165.
- 5 Smith D, Onions AHS. *The preservation and maintenance of living fungi*. IMI, Technical Handbooks N° 2. Egham: CAB International, 1994.
- 6 Mendoza M, Alvarado P, Torres ED, Lucena L, Albornoz MC. Comportamiento fisiológico y de sensibilidad in vitro de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 151-156.
- 7 Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg* 1939; 42: 225-226.
- 8 Castellani A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J Trop Med Hyg* 1967; 70: 181-184.
- 9 Pérez C, Mata-Essayag S, Capriles CH, Roselló A, Colella MT, Olaizola C, Landaeta ME. Mantenimiento de *Cryptococcus* sp. con el método de Castellani. *Rev Soc Ven Microbiol* 2003; 23: 153-157.
- 10 Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. *An Bras Dermatol* 2005; 80: 591-594.
- 11 Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2004.
- 12 Hoog GS, Guarro J. *Atlas of clinical fungi*. Utrech/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili, 2001.
- 13 Lima RF, Borba CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 191-196.

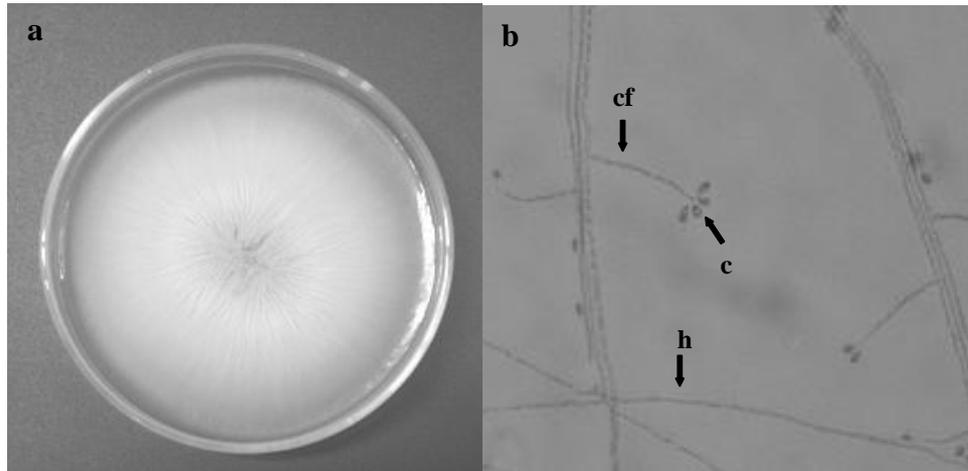
- 14 Vanbreuseghem, R. Keratin digestion by dermatophytes: a specific diagnostic method. *Mycologia* 1952; 44: 176-182.
- 15 English MP. Destruction of the hair by two species of *Chrysosporium*. *Trans Br Mycol Soc* 1976; 66: 357-358.
- 16 Price MF, Walkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Saboraudia* 1982; 20: 7-14.
- 17 Burdsall HH, Dorworth EB. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia* 1994; 86: 275-280.
- 18 Capriles CH, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia* 1989; 106: 73-79.
- 19 Johnson GC, Martin AK. Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under oil. *Can J Microbiol* 1992; 38: 861-864.
- 20 Capriles CH, Mata ES, Lander A, Camabho R. Experimental pathogenicity of *Sporothrix schenckii* preserved in water (Castellani). *Mycopathologia* 1993; 122: 129-133.
- 21 Qiangqiang Z, Jiajun W, Li L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilisation: comparison after 12 years. *Mycoses* 1998; 41: 255-257.
- 22 Panizo MM, Reviákina V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservacion de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev Soc Ven Microbiol* 2005; 25: 35-40.
- 23 Howard D H, Orr G. Comparison of strains of *Sporotrichum schenckii* isolated from nature. *J Bacteriol* 1963; 85: 816-821.
- 24 Sigler L, Harris JL, Dixon D M, Flis AL, Salkin IF, Duncan RA. Microbiology and potential virulence of *Sporothrix schenckii*, a fungus rarely isolated from blood and skin. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1009-1015.

25 Kushwaha RKS, Guarro J. *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*.  
Bilbao: Rev Iberoam Micol, 2000.

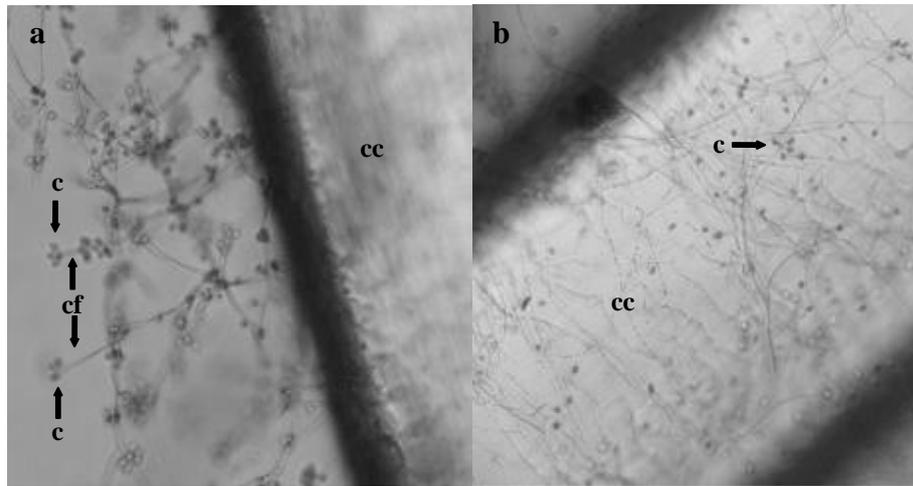
**Tabela 1.** Viabilidade e caracteres fisiológicos de isolados de *Sporothrix schenckii* preservados por 16 anos em água estilada esterilizada na Micoteca URM, Brasil.

Número de registro URM	Origem do isolado	Viabilidade	Crescimento a 37°C	AQF/QL	AU	AF	APC	APG
301	ni	+	+	QF	-	-	-	+
434	IC	+	+	QF	-	-	-	+
435	IC	+	+	QF	-	-	-	+
592	ni	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt
1013	IC	+	+	QF	-	-	-	+
2439	ni	+	+	QF	-	-	-	+
2848	IA	+	+	QF	-	-	-	+
2865	IC	+	+	QF	-	-	-	+
4291	IC	+	+	QF	-	-	-	+

a) AQF/QL: Atividade queratinofílica/queratinolítica, b) AU: Atividade ureásica, c) AF: Atividade fosfolipásica, d) APC: Atividade proteinásica com caseína como substrato, e) APG: Atividade proteinásica com gelatina como substrato, f) ni: Origem do isolado não informada, g) IC: Isolado clínico, h) IA: Isolado ambiental, i) +: Teste positivo, j) -: Teste negativo, k) nt: Não testado, l) QF: Queratinofílico.



**Figura 1.** Cultura of *S. schenckii* URM1013 com 15 dias de crescimento em BDA a temperatura ambiente. a) Macroscopia mostrando colônia membranosa branca. b) Microscopia mostrando hifa hialina (h), conidióforo (cf) e conídios hialinos piriformes (c) surgindo em forma de buquê no topo do conidióforo (4000X).



**Figura 2.** Colonização de crina de cavalo (cc) por *S. schenckii* após 10 dias de crescimento. a) *S. schenckii* URM1013 (2400X), b) *S. schenckii* URM435 (400X). Conidióforo (cf) e conídios (c).

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) O percentual de viabilidade de culturas preservadas em água destilada esterilizada varia de acordo com o isolado preservado e com o tempo de preservação;
- b) O método de preservação em água destilada esterilizada é eficiente para estocagem de culturas de Zygomycetes por até seis anos; já para culturas de dermatófitos e *Sporothrix schenckii*, este período pode chegar a 16 anos;
- c) O método de preservação em água destilada esterilizada garante a pureza das culturas preservadas e mantém as características morfológica das culturas viáveis, com exceção das culturas de *Epidermophyton*;
- d) Dermatófitos podem crescer a 37°C e apresentar atividades proteinásica e queratinolítica após 16 anos de preservação em água destilada esterilizada;
- e) *S. schenckii* podem crescer a 37°C e apresentar atividades proteinásica e queratinofílica após 16 anos de preservação em água destilada esterilizada
- f) A detecção de proteinase em *S. schenckii* varia de acordo com o substrato utilizado, sendo a gelatina melhor substrato que a caseína.

## REFERÊNCIAS

- Alves, M.H., Campos-Takaki, G.M., Okada, K., Pessoa, I.H.F., Milanez, A.V. 2005. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. *Revista Iberoamericana de Micologia* 22: 114-117.
- Andreu, C.M.F., Machín, G.M.M., Lancha, M.R.P., Zaragoza, M.T.I., Hernández, I.V. 2005. La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”: funciones y restos. *Revista Cubana Medicina Tropical* 57: 1-7.
- Apprich, V., Spargser, J., Rosengarten, R., Stanek, C. 2006. In vitro degradation of equine keratin by dermatophytes and other keratinophilic fungi. *Veterinary Microbiology* 114: 352–358.
- Assis, C.M., Gambale, W., Paula, C.R. 1999. Production of proteinase and phospholipase by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 146: 13-17.
- Barata, G. 2003. Patrimônio genético é estocado para aplicações futuras. *Com Ciência: Revista Eletrônica de Jornalismo Científico* 41: 4.
- Boesewinkel, H.J. 1976. Storage of fungal cultures in water. *Transactions of the British Mycological Society* 66: 183 -185.
- Borman, A.M., Szekely, A., Campbell, C.K., Johnson, E.M. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* 161: 361–368.
- Boro, M.C., Aparecido, C.C., Figueiredo, M.B. 2003. Estudo dos métodos de preservação utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico* 70: 23.
- Bueno, L., Gallardo, R. 1998. Preservación de hongos filamentosos en água destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micologia* 15: 166-168.
- Bull, A.T., Goodfellow, M., Slater, J.H. 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Review of Microbiology* 46: 219-252.
- Burdsall, H.H., Dorworth, E.B. 1994. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia* 86: 275-280.
- Canhos, V.P. 1994. Views of a developing country. In: Kirsop, B., Hawksworth, D.L. (eds.) *The biodiversity of microorganisms and the role of microbial resource centers*. Japan, World Federation for Culture Collections, pp. 45-52.
- Canhos, V.P. 2003. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. *Ciência e Cultura* 55: 27-29.
- Canhos, V.P., Umino, C.Y., Manfio, G.P. 1999. Coleções de culturas de microrganismos. In: Brito, M.C.W., Joly, C.A., (eds.) *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese*

*do conhecimento ao final do século XX, Volume 7: Infra-estrutura para conservação da biodiversidade.* São Paulo, FAPESP, pp. 82-101.

- Capriles, C.H., Mata, S., Middelveen, M. 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia* 106: 73-79.
- Castellani, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 225-226.
- Castellani, A. 1967. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70: 181-184.
- Cavalcanti, M.A., Souza-Motta, C.M., Nogueira, E.B.S. 1996. *Catálogo da coleção de culturas da Micoteca URM.* Recife, Editora Universitária da UFPE.
- Cox, M.G., McDade, H.C., Chen, S.C.A., Tucker, S.C., Gottfredsson, M., Wright, L.C., Sorrell, T.C., Leidich, S.D., Casadevall, A., Ghannoum, M.A., Perfect, J.R. 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* 39: 166-175.
- CRIA, 2007. *Levantamento Preliminar das Coleções Microbiológicas nacionais.* Disponível em: <<http://www.cria.org.br/cgee/documentos/cadastro.doc>>. Acesso em: 05 novembro 2007.
- Deshmukh, S.K. 2003. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. *Mycoses* 46: 203-207.
- Diogo, H.C., Sarpieri, A., Pires, M.C. 2005. Preservação de fungos em água destilada. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 80: 591-594.
- Figueredo, M.B. 2001. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Arquivos do Instituto Biológico* 63: 73-82.
- Ghannoum, M.A. 2000. Potential role of phospholipase in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 122-143.
- Ghosh, A., Hemashettar, B.M., Sharma, V.K., Chakrabarti, A. 2002. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 45: 449-454.
- Kantarcioglu, A.S., Yücel, A. 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45: 160-165.
- Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. 2000. *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi.* Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia.
- Kwon-Chung, K.J. 1979. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. *Journal of Infection Diseases* 139: 424-431.

- Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M., Melo, N.T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. São Paulo, Sarvier.
- Maia, M.L.S., Santos, J.I., Viani, J.C., Larson, C.E., Paula, C.R., Gambale, W. 2001. Phenotypic characterization of *Microsporum canis* isolated from cats and dogs. *Mycoses* 44: 480-486.
- Malik, K.A., Hoffmann, P. 1993. Long-term preservation of yeast culture by liquid drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 372.
- McGinnis, M.R., Padhye, A.A., Ajello, L. 1974. Storage of stock of filamentous fungi, yeasts and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology* 28: 218-222.
- Mendoza, M., Alvarado, P., Torres, E.D., Lucena, L., Albornoz, M.C. 2005. Comportamiento fisiológico y de sensibilidad in vitro de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. *Revista Iberoamericana de Micología* 22: 151-156.
- Mushin, T.M., Aubaid, A.H., Al-Duboon, A.H. 1997. Extracellular enzymes activities of dermatophytes and yeast isolates on soil media. *Mycoses* 11: 465-469.
- Micoteca URM. Disponível em: <<http://www.ufpe.br/micoteca/historico.html>>. Acesso em: 05 novembro 2007.
- Muhsin, T.M., Hadi, R. 2001. B. Degradation of keratin substrate by fungi isolated from sewage sludge. *Mycopathologia* 154: 185-189.
- Muhsin, T.M., Salih, T.H. 2000. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. *Mycopathologia* 150: 49-52.
- Nakasone, K.K., Peterson, S.W., Jong, S-C. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. (eds.) *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*. London, Elsevier Academic Press, pp. 37-47.
- Neder, R.N. 1992. *Microbiologia: manual de laboratório*. São Paulo, Nobel.
- Neufeld, P.N., Sarquis, M.I.M. 2003. Preservação em laboratório de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 35: 147-150.
- Okafor, J.I., Ngwogu, A. 2000. Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. *Journal of Communicable Diseases* 32: 300-305.
- Panizo, M.M., Reviákina, V., Montes, W., González, G. 2005. Mantenimiento y preservacion de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 25: 35-40.
- Pasarell, L., McGinnis, M.R. 1992. Viability of fungal culture maintained at -70 °C. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 1000-1004.

- Passador, M.M., Boro, M.C., Figueiredo, M.B. 2004. Estudo sobre a patogenicidade de três culturas fúngicas preservadas pelo método de Castellani. *Arquivos do Instituto Biológico* 71: 138-140.
- Passador, M.M., Coutinho, L.N., Figueiredo, M.B. 2000. Avaliação da viabilidade, esporulação e patogenicidade de culturas de *Verticillium fungicola* conservadas pelo método de Castellani. *Arquivos do Instituto Biológico* 67: 134.
- Pérez, C., Mata-Essayag, S., Capriles, C.H., Roselló, A., Colella, M.T., Olaizola, C., Landaeta, M.E. 2003. Mantenimiento de *Cryptococcus* sp. con el método de Castellani. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 23: 153-157.
- Price, M.F., Walkinson, I.D., Gentry, L.O. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Saboraudia* 20: 7-14.
- Rhodes, J.C. 1988. Virulence factors in fungal pathogens. *Microbiology Science* 5: 252-254.
- Rodrigues, E.G., Lírio, V.S., Lacaz, C.S. 1992. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 34: 159-165.
- Santos, J.I., Vicente, E.J., Paula, C.R., Gambale, W. 2001. Phenotypic characterization of *Trichophyton rubrum* isolates from two geographic locations in Brazil. *European Journal of Epidemiology* 7: 729-735.
- Santos, M.J.S., Trufem, S.F.B., Oliveira, P.C. 2000. Viability and morphological stability of *Absidia* strains during long-term maintenance under mineral oil. *Journal of Basic Microbiology* 40: 133-136.
- Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2004. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.
- Silva, E.N.B., Cavalcanti, M.A.Q., Souza-Motta, M.C. 1999. Pathogenicity characteristics of filamentous fungi strains isolated from processed oat. *Revista de Microbiologia* 30: 377-380.
- Smith, D., Kolkowski, J. 1996. *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. London, Academic Press.
- Smith, D., Onions, A.H.S. 1994. *The preservation and maintenance of living fungi*. IMI, Technical Handbooks N° 2. Egham, CAB International.
- Tiedje, J.M. 1994. Microbial diversity: of value to whom? *ASM News* 60: 524-525.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2002. *Microbiologia*. Porto Alegre, Artmed.
- Vidotto, V., Pontón, J., Aoki, S., Quindós, S., Mantoan, B., Pugliese, A., Ito-Kuwa, S., Nakamura, K. 2004. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Revista Iberoamericana de Micología* 21: 70-74.

WDCM, 2007a. Disponível em: <<http://wdcn.nig.ac.jp/hpcc.html>>. Acesso em: 05 novembro 2007.

WDCM, 2007b. Disponível em: <http://wdcn.nig.ac.jp/statistics.html>. Acesso em: 05 novembro 2007.

Weitzman, I., Summerbell, R.C. 1995. The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 240-259.