

TRICHOPHYTON RUBRUM (MONILIACEAE): MANUTENÇÃO E VIABILIDADE POR CRIO E HIDROPRESERVAÇÃO

Renan Mori ROCHA¹; José Augusto Almendros de OLIVEIRA²; Ana Cláudia Alves CORTEZ³

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; ²Orientador CPCS / INPA; ³Co-orientador CPCS/ INPA

1. Introdução:

Na microbiologia os fungos têm grande importância, pois acometem todos os seres vivos e atuam como agentes das infecções conhecidas como micoses, expressão empregada pela primeira vez por Virchow em 1956 (Lacaz *et al.*, 2002). Na medicina e na indústria, lhes são atribuídos grandes valores devido a sua produção de metabólitos, medicamentos, conservantes, drogas (Smith e Onions, 1983; Sidrim e Moreira, 1999) e agente de controle biológico (Pelczar *et al.*, 1996). Para serem utilizados em pesquisas é necessário conservá-los, do contrário os fungos entram em pleomorfismo e posteriormente morrem (Lacaz *et al.*, 2002). É neste ponto que se encontram as maiores dificuldades de instituições que necessitam manter a viabilidade das cepas fúngicas. Segundo Diogo *et al.* (2005), a manutenção dos mesmos, em diferentes meios de cultura requer muitos cuidados, pois os fungos consomem os meios rapidamente e necessitam repiques freqüentes, somado ao gasto de tempo e possibilitando contaminação, modificação morfofisiológica e genética, assim como a diminuição da sua virulência. O principal objetivo da preservação de microrganismos é manter suas características biológicas (Heckley, 1978). No Laboratório de Micologia Médica do INPA utilizam-se técnicas de conservação que mantêm a viabilidade do *Trichophyton rubrum* para posteriores estudos, utilizando a técnica de criopreservação proposta por Pell e Sneath em 1991 (Day e Stacy, 2006), e hidropreservação proposta por Castellani em 1938 (Lacaz *et al.*, 2002).

Com a finalidade de encontrar um método de manutenção fúngica que proporcione melhores índices de estabilidade genética, morfofisiológicas e redução dos níveis de contaminação, foram instituídos e avaliados os métodos que submetem as cepas fúngicas a congelamento a -70°C e submersão em água destilada esterilizada.

2. Material e métodos

Da Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA, foram selecionadas 188 amostras de *T. rubrum* e cultivadas em meio de cultivo sólido Agar batata dextrose (BDA) acrescido de cloranfenicol (antimicrobiano). Para técnica de criopreservação transferiu-se através de uma alça de platina fragmentos da colônia fúngica para microtubos e levados ao agitador para desmembramento das unidades formadoras de colônias. Adicionou-se 200 µL de água peptonada (Lacaz *et al.*, 2002) e então levadas ao Deep-Freezer para congelamento a 70°C negativos. Na técnica de hidropreservação as cepas foram cultivadas em placas de Petri. Após o desenvolvimento da colônia foram cortadas e colocadas em frascos de penicilina contendo 5 ml de água destilada esterilizada. A viabilidade das amostras foi verificada por três vezes durante nove meses.

3. Resultados e discussão

A criopreservação mostrou-se eficiente para as amostras do ano de 2007, apresentando 100% de viabilidade após 9 meses. As amostras dos anos de 1992 a 2006 congeladas por 36 meses, não apresentaram viabilidade satisfatória, apenas 8% foram viáveis. Por não existirem estudos referentes à manutenção de *T. rubrum* sob congelamento e sem crioprotetores, não é possível saber por quanto tempo essa espécie pode permanecer armazenada nestas condições de temperaturas. As amostras hidropreservadas, após 9 meses, apresentou 100% de viabilidade, no entanto 50% contaminaram, provavelmente pelo manuseio durante as avaliações. A mesma metodologia segundo Oliveira *et al.* (2008), apresentou resultados satisfatórios para dermatófitos dos gêneros *Microsporium canis* e *Trichophyton tonsurans*. Outros autores citam viabilidade para dermatófitos em períodos iguais ou até 11 anos (Neufild e Oliveira, 2008).

Gráfico 01: Viabilidade das amostras criopreservadas ao final de 9 meses de preservação

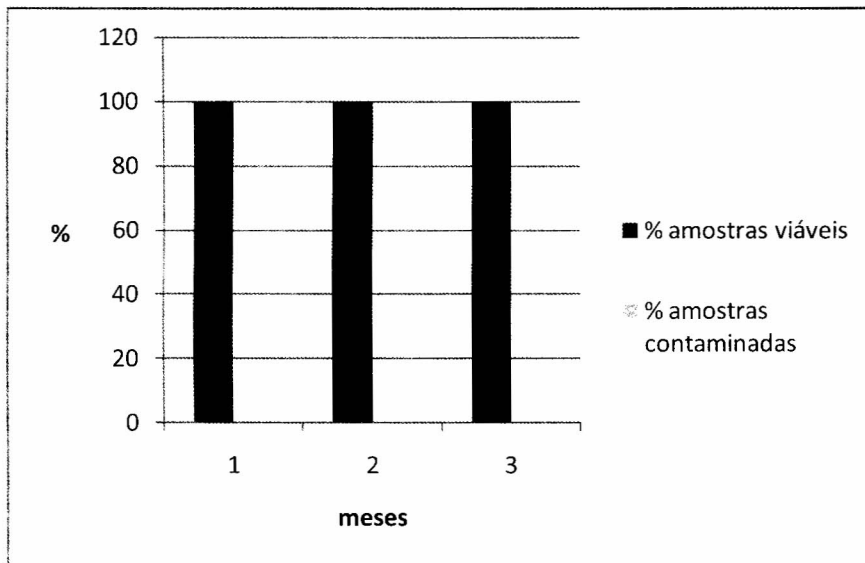
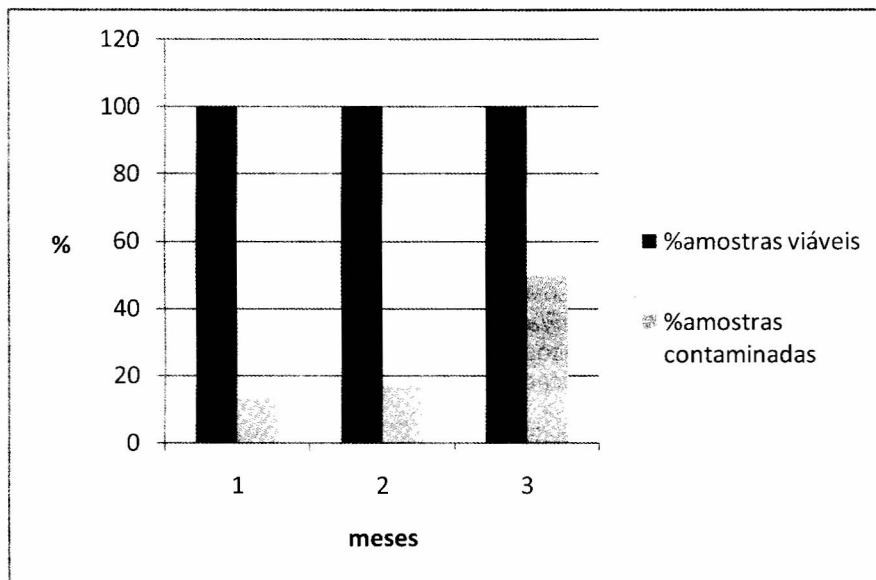


Gráfico 02: Viabilidade das amostras hidropreservadas ao final de 9 meses de preservação



4. Conclusão:

Constatou-se que a conservação a -70°C sem utilização de substância criopreservante apresentou resultados satisfatórios para o *T. rubrum* em 9 meses de preservação acontecendo o mesmo com as amostras submetidas à hidropreservação.

5. Referências:

Day, J.G.; Stacey, G.N. 2006. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. 2. ed. New Jersey - Springe: Humana Press. p.186

Diogo, H.C.; Sarpieri, A.P.; Mário, C. 2005. *Preservação de fungos em água destilada*. An. Bras. Dermatol, 80(6): 591-594.

Heckley, R.J. 1978. *Preservation of microorganism*. Adv. Appl. Micorbiol. 24: 1-53

Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-Vaccari, E.M.; Melo, N.T.; Dupont, B. 2002. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9. ed. São Paulo: Sarvier. p. 252, 307, 335, 336, 948, 949.

Neufild, P.M.; Oliveira, P.C. 2008. *Preservação de Dermatófitos pela Técnica da Água Destilada Estéril*. RBAC, vol. 40(3): 167-169.

Oliveira, R.U.; Oliveira, J.A.A.; Cortez, A.C.A. 2008. *Alternativas de Manutenção das Cepas Dermatofíticas da Coleção de Microorganismos de Interesse Médico do INPA*. Anais/ XVII Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/CNPQ/FAPEAM/INPA; Resumos expandidos, 21 a 25 de julho de 2008, Manaus, AM. – Manaus: INPA.

Pelczar Junior, M.J.; Cham, E.C.S.; Krieg, N.R.1996. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. 2.ed. vol-1. São Paulo: Makron Books. p. 324

Sidrim, J.J.C.; Moreira, J.L.B. 1999. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 109, 110, 120.

Smith, D.; Onions, A.H.S. 1983. *The Preservations and Maintenance of Living Fungi*. 2.ed. International Center for Agriculture and Bioscience – CAB International. p. 51.