

FUNGOS LEVEDURIFORMES: ÁGUA COMO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO EM LABORATÓRIO

ANNA PIRES TERRA¹; CAROLINA GONÇALVES; ISABEL DE ABREU ESTEVES; JOSIARA FURTADO MENDES REDU; PEDRO RASSIER DOS SANTOS²; PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE³

¹Universidade Federal de Pelotas – annapterra@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolina_lamg@yahoo.com.br; bel.esteves@live.com; josiara.mds@hotmail.com; rassier1907@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – patasn@bol.com.br

1. INTRODUÇÃO

O aumento da incidência das doenças imunossupressoras assim como o uso de antimicrobiano de amplo espectro e melhora nos métodos diagnósticos, tem resultado no crescimento dos números de casos de infecções fúngicas causadas por leveduras (SILVA et. al, 2008). Sendo assim há a crescente necessidade de se conhecer as formas de manutenção e principalmente preservação que devem ser realizadas com estes microrganismos, como reflexo da necessidade de utilização destes a qualquer momento, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos (SOLAL et. al, 2012).

As leveduras, em sua maioria, são microrganismos fáceis de manter, estocar, cultivar e isolar a partir de diferentes habitats. Sua estocagem, porém, apresenta algumas particularidades, como a possibilidade de pleomorfismo, e o risco de contaminação por outros fungos filamentosos ou bactérias (MARIANO et.al, 2006). Embora não se tenha pleno conhecimento dos fatores que afetam a sobrevivência das leveduras estocadas, a baixa viabilidade celular pode estar relacionada, em parte, ao grande tamanho das células em relação às células bacterianas e a ausência de esporos de resistência dos tipos encontrados nos fungos superiores. Para tanto, a sobrevivência do agente não se constitui o único objetivo. Torna-se necessário considerar a viabilidade e principalmente a escolha de métodos que não promovam em maior ou menor grau a ocorrência de mutações ou variabilidades (SILVA et. al, 2008).

A manutenção de microrganismos em micotecas é de fundamental importância para estudos retrospectivos e prospectivos, que enfoquem sua biologia, etiologia e aspectos epidemiológicos (GIRÃO et. al, 2004). Esta manutenção e estocagem vêm sendo feita através de repiques sucessivos em meios de cultivos específicos, congelamento, liofilização, entre outros, porém cada um apresenta suas limitações.

Os métodos tradicionais de conservação de leveduras, por exemplo, os repiques sucessivos em Agar Sabouraud requerem muitos cuidados, pois consomem rapidamente o meio de cultura, necessitando de repiques frequentes, possibilitando a contaminação por patógenos e ainda podendo sofrer alguma alteração fisiológica ou morfológica (SILVA et. al, 2008). O congelamento é considerado o melhor método preservação de culturas de fungos, pois se baseiam na redução do metabolismo celular até um nível de dormência artificial, além de anular o risco de contaminação por ácaros. Já a liofilização envolve seu congelamento prévio a baixíssimas temperaturas seguido da secagem da amostra a vácuo (GIRÃO et. al, 2004).

Com isto, o objetivo deste trabalho é avaliar a água destilada estéril como meio e forma de conservação de leveduras em laboratório.

2. METODOLOGIA

Foram selecionadas 26 leveduras que previamente foram identificadas pelo Sistema Vitek 2 sendo classificadas dentre as espécies: *C. albicans* (2), *C. guilliermondii* (3), *Rhodotorula spp.*(5) *C. parapsilosis* (7), *S. cerevisiae* (3), *Candida sp* (1), *C. laurentii* (2), *C. famata* (2) e *S. ciferri* (1). Todas estas leveduras foram isoladas do ambiente de Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) e então armazenadas previamente em meio de cultivo Sabouraud dextrose em temperatura de 4°C com repiques mensais para conservação.

As leveduras foram semeadas em Placas de Petri contendo Agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e incubadas em estufa por 48 horas a 36°C, para serem selecionadas colônias jovens. Cada uma das amostras foi dispensada em tubos de ensaio contendo 5mL de água destilada (ADE) previamente esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos e 1ATM.

Cada espécie de levedura ficou disposta em um tubo de ensaio com ADE para armazenamento. Durante nove meses após esse preparo das amostras, foi realizado repiques em diferentes períodos para verificar a viabilidade de cada levedura armazenada naquelas condições.

Os períodos de armazenagem em que se realizou semeadura da água em meio de cultivo foram: 1 mês, 2 meses, 3 meses, 6 meses e 9 meses totalizando 5 repiques.

A semeadura em cada um dos períodos foi realizada no mesmo meio de isolamento Agar Sabouraud dextrose e estas placas foram incubadas a 36°C por 48 horas para verificação da viabilidade da levedura após armazenagem em água.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as semeaduras realizadas, com todas as amostras de leveduras, no período de nove meses, as leveduras cresceram nos meios propícios. Apenas uma amostra da *C. ciferri* foi contaminada no repique realizado no nono mês.

Diante da necessidade de desenvolvimento biotecnológico e científico, a preservação e a manutenção de materiais biológicos vêm ganhando destaque no cenário mundial. Os métodos ideais de armazenamento de leveduras e outros microrganismos necessitam promover a sobrevivência das células, bem como a pureza da cultura e a estabilidade de suas características. Alguns artigos, no entanto, têm mencionado a ocorrência de alterações fenotípicas e/ou genotípicas em amostras mantidas em laboratório, as quais podem influenciar estudos, tipagem e a aplicabilidade destes microrganismos. Ao longo dos anos, vários métodos de preservação têm sido desenvolvidos, visando à eliminação dos problemas encontrados em transferências seriadas (ASHCAR et al., 1988; GIRÃO et al. 2004; KWON – CHUNG e BENNETT, 1991; ODDS, 1991; RODRIGUES et al., 1992). Os métodos anteriormente descritos porém com diferentes resultados são: transferências seriadas em meio sólido, óleo mineral, água destilada, congelamento em glicerol a -70°C e liofilização. Métodos que têm apresentado maior sucesso são aqueles que reduzem o metabolismo a ponto de induzir latência artificial. Isso pode ser conseguido através da desidratação ou congelamento, onde se utiliza meios pobres para o desenvolvimento dos fungos, incubando-se em baixas temperaturas ou em baixa tensão de oxigênio (KIRSOP

e SNELK, 1984). No âmbito da ciência, a implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos (GIRÃO et al., 2004).

Conforme se verificou na literatura, há poucos relatos de uso da água destilada estéril como forma de conservação de leveduras. Entretanto, o armazenamento em água destilada esterilizada, além de ser um procedimento rápido e relativamente fácil, também é menos oneroso e produz bons resultados (GIRÃO et. al, 2004).

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir através desta metodologia que a Água Destilada Estéril utilizada como método de manutenção para leveduras de diferentes origens foi eficiente por no mínimo nove meses.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SOLAL, M. Cristina; OLIVEIRA, A. P.; REZENDE, C. S. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer**. Goiânia, v.8, n.14, 2012.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C . **RBAC**. Ribeirão Preto, vol. 40, 73-74, 2008.

MARIANO, P. L. S. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade Fenotípica e Genotípica**. 2006. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Fortaleza, vol.37, 2004.

ASHCAR, H.; PAULA, C. R.; PETROCINI, V. R. Manutenção de fungos por processo de liofilização após período prolongado de tempo – 34 anos. **Revista de Microbiologia**; 19(4): 422-424, 1988.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 37(3):229-233; 2004.

KWON – CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger: 1991. p. 44-71.

ODDS, F. C. Long- term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**; 29: 413-415; 1991.

RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservation de fungos e actinomicetos de Interesse médico em água destilada. **Rev Inst Méd Trop. S Paulo**; 34(2):159-165; 1992.

KIRSOP, B. E.; SNELL, J.J.S. Maintenance of microorganisms. A manual of Laboratory Methods. London: **Academic Press Inc**; 1984.