AVALIAÇÃO DE DIFERENTES GÊNEROS FÚNGICOS UTILIZANDO TRÊS MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO (ÁGUA DESTILADA ESTERILIZADA, ÓLEO MINERAL E CONGELAMENTO –70ºC)

Emanuelle Stolnberger Trindade[1], Patrício Godoy [2], Maria Cecília Zorat-Yu[1], ArnaldoColombo[2], Ana Luisa Höfling-Lima[1].

[1]Departamento de Oftalmologia, Universidade Federal de São Paulo, Brasil.

[2] Laboratório Especial de Micologia, Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

Os fungos são onipresentes na natureza e suscitam problemas de importância diversa em variados setores das atividades humanas, por isso a micologia desdobrou-se em múltiplas especialidades com reflexos em vários ramos da indústria. Na agricultura ocupam lugar importante na Fitopatologia. Na veterinária, também, com produção de micoses animais. Na medicina humana, além de micoses produzidas por verdadeiros patógenos, aumenta cada vez mais o número de micoses produzidas por fungos oportunistas (Lacaz et al 2000, Sidrim, Rocha 2004, Carvalhaes 1999).

A maioria dos fungos vive nos mais diversos substratos da natureza e geralmente são isolados do solo seco, pântanos, troncos apodrecidos,frutas, poeira, etc. Os fungos são desprovidos de clorofila, assim restam duas alternativas, viverem no saprofitismo ou no parasitismo (Kown-Chung, Bennett, 1992). São normalmente aeróbios, podendo desenvolver-se em anaerobiose, sob certas condições. Quanto ao pH do meio, a sua importância é relativa, mas, em geral, está em torno de 6,0. Quanto mais saturado o ambiente estiver de umidade, é melhor para o seu desenvolvimento (Lacaz et al 2000; Sidrim, Rocha 2004).

No laboratório de diagnóstico micológico é freqüente a necessidade de manutenção dos fungos em culturas, devido à dificuldade de mante-los em boas condições, pois eles são muito variáveis. Durante a conservação dos fungos, devem ser preservadas suas características morfológicas e biológicas (estabilidade genética e patogenicidade), além disso, a conservação deverá manter também a suscetibilidade a agentes antifúngicos, sensibilidade a substâncias e a capacidade de produção de substâncias fisiologicamente ativas (Kisorp, Snell, 1984; Smith, Onions 1983).

Em resumo, os métodos de conservação desejáveis são aqueles em que, na ocasião do início da experiência com o fungo conservado, as propriedades desse fungo estejam mantidas, ou seja, da melhor forma possível, nas mesmas condições anteriores a sua conservação (Sidrim, Rocha, 1999; Vieira at al 1989).

Objetivo: Avaliar as características macromorfológicas e micromorfológicas de 40 fungos analisados durante um período de seis meses de incubação utilizando três métodos de conservação (água destilada esterilizada, óleo mineral e congelamento –70ºC).

MATERIAL E MÉTODOS

1- Escolha das amostras

Foram escolhidos 40 cultivos de fungos filamentosos armazenados no Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As cepas correspondem a 17 *Fusarium solani*, 3 *Aspergillus fumigatus*, 4 *Paecilomyces lilacinus*, 4 *Aspergillus flavus*, 1 *Mucor* spp., 1 *Paecilomyces variotii*, 1 *Aspergillus niger*, 1 *Neosartorya* spp., 1 *Scedosporium spp., 1 Rhizopus* spp., 1 *Curvularia* spp., 1 *Scopulariopsis brevicaulis*, 1 *Penicillium* spp., 1 *Aspergillus terreus*, 1 *Cladosporium* spp. *e* 1 *Fusarium dimerum*. A grande maioria das cepas analisadas eram de origem ambiental e clínicas, estas últimas obtidas no

Laboratório de Micologia pertencente ao Departamento de Oftalmologia (UNIFESP).

2. Identificação dos fungos filamentosos.

2.1 Análise macromorfológica.

Foi realizada análise descritiva das características morfológicas dos cultivos tendo em vista os seguintes aspectos: Textura, topografia, superfície, cor da colônia, pigmento, cor do pigmento, tempo de crescimento e diâmetro da colônia.

2.2 Análise micromorfológica (microcultivo)

Cada cepa foi semeada, com o auxílio de agulha de níquel-cromo, em três pontos sobre placa de Petri (90 X 15mm) contendo ágar batata (PDA). Os pontos feitos sobre o ágar foram cobertos com lamínula esterilizada num ângulo de 45° e incubados a 25°C durante 7 a 15 dias, as características das estruturas do micélio reprodutivo, foram descritos para posterior análise. Chaves de classificação foram utilizadas para identificar todas as espécies testadas (De Hoog et al 2000).

3- Técnicas de Conservação

Método de conservação em Água Destilada

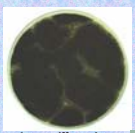
Os fungos analisados foram semeados sobre a superfície de tubos contendo ágar Sabouraud esterilizado (DIFCO) utilizando alça de platina em formato em L, e incubados a temperatura ambiente por um período de sete dias, então, foi colocada uma porção da colônia de fungo filamentoso utilizando uma alça de platina em formato L em tubos contendo 5 mL de água destilada esterilizada, posteriormente os tubos previamente identificados foram colocados em estantes e incubados a temperatura ambiente.

Método de conservação sob óleo mineral

Os fungos analisados foram semeados sobre a superfície de tubos contendo ágar Sabouraud esterilizado (DIFCO) utilizando alça de platina em formato em L, e incubados a temperatura ambiente por um período de sete dias, após este período foi adicionado óleo mineral esterilizado até a cobertura total do micélio e incubado a temperatura ambiente até sua posterior análise.

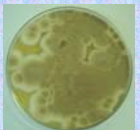
Método de conservação por Congelamento –70ºC

Os fungos analisados foram semeados sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar GPYA esterilizado utilizando alça de platina em formato em L, após crescimento satisfatório foram cortados quadrados de 3mm x 3mm de ágar sendo colocados até completar ¾ partes da capacidade de um tubo de congelamento eppendorf de 4 mL, posteriormente o tubo foi preenchido utilizando glicerol (60%), colocados em caixas de plástico e incubados a -70°C até sua posterior análise.



Aspergillus niger

Fusarium solani



Aspergillus terreus

***Curvulária* spp.**

***Cladosporium* spp.**

Paecilomyces lilacinus

RESULTADOS

Foram analisados 40 fungos filamentosos isolados de amostras clínicas e ambientais. Todas as características macromorfológicas e micromorfológicas dos fungos analisados estão descritas na tabela 2.

Nas características macromorfológicas notamos uma diversidade grande de cores e texturas, cada uma condizente com o tipo de colônia a que pertence a cepa, já com relação às características microscópicas, notamos que todas as espécies fúngicas analisadas apresentaram um micélio vegetativo com características normais ao igual que ao número tanto de microconídios como os macroconídios.

A quantidade de macroconídios, microconídios e clamidoconídios foram observados analisando 10 campos e descritos na tabela como número de cruzes.

Nº	Nome	Características Macromorfológicas				
		Colônias	Hifas	Microconídios	Macroconídios	Clamidoconídios
1	Fusarium solani	Aveludado, branco + lilas escuro	+++	+++	+	Neg
2	Fusarium solani	Aveludado, branco + lilas escuro	+++	+++	++	Neg
3	Mucor spp.	Colonias, Cinza escuro	+++	+++	Neg	Neg
4	Paecilomyces variotii	Granular, Amarelado	+++	+++	Neg	Neg
5	Paecilomyces lilacinus	Aveludado, Lilás	+++	+++	Neg	Neg
6	Aspergillus niger	Rubro-escuro, Preto	+++	+++	Neg	Neg
7	Neosartorya spp	Branco + enverdeado	+++	+++	Neg	Neg
8	Paecilomyces lilacinus	Aveludado, Lilás	+++	+++	Neg	Neg
9	Paecilomyces lilacinus	Aveludado, Lilás	+++	+++	Neg	Neg
10	Aspergillus flavus	Rubro-escuro, verde claro	+++	+++	Neg	Neg
11	Fusarium solani	Aveludado, branco + lilas escuro	+++	+++	++	Neg
12	Fusarium solani	Aveludado, amarelo, marrom	+++	+	+++	Neg
13	Fusarium solani	Aveludado, branco + lilas escuro	+++	+++	++	Neg
14	Scedosporium	Colonias, Cinza claro	+++	+++	Neg	Neg
15	Fusarium solani	Branco + marrom	+++	+	+++	Neg
16	Fusarium solani	Branco + lilas escuro	+++	++	++	+++
17	Fusarium solani	Amarelado	+++	+++	++	Neg
18	Aspergillus flavus	Verde claro	+++	+++	Neg	Neg
19	Rhizopus spp.	Branco	+++	+++	Neg	Neg
20	Curvularia spp.	Gliva escuro e claro	+++	++	+++	Neg
21	Scopulariopsis brevicaulis	Branco + marrom	+++	+++	Neg	Neg
22	Aspergillus fumigatus	Rubro-escuro, verde, azul	+++	+++	Neg	Neg
23	Penicillium spp.	Rubro-escuro, verde	+++	+++	Neg	Neg
24	Fusarium dimerum	Aveludado Lilás	+++	+++	+	+
25	Aspergillus flavus	Rubro-escuro/verde claro	+++	++	Neg	Neg
26	Fusarium solani	Aveludado, branco + lilas escuro	+++	+++	+	Neg
27	Paecilomyces lilacinus	Aveludado, Lilás	+++	+++	Neg	Neg
28	Aspergillus flavus	Rubro-escuro, verde claro	+++	++	Neg	Neg
29	Fusarium solani	Aveludado, branco + lilas escuro	+++	++	+	+++
30	Aspergillus terreus	Rubro-escuro, Cor da terra + purpurina dourada	+++	+++	Neg	Neg
31	Cladosporium spp	Aveludado, verde escuro	+++	+++	Neg	Neg
32	Aspergillus fumigatus	Rubro-escuro, verde, azul	+++	+++	Neg	Neg
33	Fusarium solani	Aveludado, branco + lilas escuro	+++	+++	+	Neg
34	Fusarium solani	Aveludado, branco, marrom	+++	++	+	+++
35	Fusarium solani	Aveludado, branco + lilas escuro	+++	+++	++	+
36	Fusarium solani	Aveludado, branco, lilás, amarelado	+++	+	+++	Neg
37	Fusarium solani	Aveludado, branco, roseo	+++	+	+	+++
38	Fusarium solani	Aveludado, esverdeado, rósea	+++	+++	+	Neg
39	Aspergillus fumigatus	Rubro-escuro, verde, azul	+++	+++	Neg	Neg
40	Fusarium solani	Aveludado, branco + lilas escuro	+++	+	+++	Neg

CONCLUSÕES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Andrade A J M, Vieira L A, Lima A L H, Yu M C Z, Gompertz O F, Freitas D, et al. **Laboratorial analyses of fungal keratitis in a University Service**. Arq. Bras. Oftalmol. 2000; 63(1):59-63.

De Hoog G S, Guarro J, Gené J, Figueras M J. **Atlas of Clinical Fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira Virgili, Reus, Spain. 2000;

Deacon J W. Introduction. In: Deacon J, editor. **Modern Mycology**. Oxford: Blackwell Science; 1997. p. 6-13.

Kirsop, B E, Snell J J S. **Maintenance of microorganisms – A manual of laboratory methods**. Academic Press, London (UK). 1984;

Kwon-Chung K J, Bennett J E . **Medical Mycology.** Philadelphia: ed Lea & Febiger, 1992.

Lacaz C S, Porto C, Martins J E C - **Guia para Identificação. Fungos Actinomicetos e Algas**, São Paulo, Sarvier, 1998.

Sidrim J J C, Rocha M F G. **Micologia Médica À Luz de Autores Contemporâneos**. Ed Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

Sidrim J J C, Rocha M F G. **Biologia dos fungos**. In: SIDRIM JJC, J.L.B. M, editors. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 20-9.

APOIO

Departamento de Oftalmologia e Laboratório Especial de Micologia.

Agradeço Viviane Reis e Thelma Alves pela colaboração na execução de todas as etapas do projeto.