



BACHARELADO INTERDISCIPLINAR EM BIOSISTEMAS  
CAMPUS DE SETE LAGOAS

**ÉRICA MACIEL DELLARETTI**

**PRESERVAÇÃO DE FUNGOS EM BAIXAS TEMPERATURAS**

SETE LAGOAS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL SÃO JOÃO DEL-REI  
BACHARELADO INTERDISCIPLINAR EM BIOSISTEMAS  
CAMPUS DE SETE LAGOAS

**ÉRICA MACIEL DELLARETTI**

**PRESERVAÇÃO DE FUNGOS EM BAIXAS TEMPERATURAS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de São João Del Rei como parte das exigências do Programa de Graduação do Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas para a obtenção do título de Bacharel em Biosistemas.

**ORIENTADOR:**

**Prof. Dr. Juliano Carvalho Cury**

SETE LAGOAS

2014

*Dedico esta monografia a toda minha família, que me instruíram pelo amor e nunca deixaram que pequenos obstáculos ou ilusões me desviassem do caminho da responsabilidade e sabedoria.*

*Carla, Sebastião e Iara Dellaretti, Vovó Clara e Júlio César sem vocês não teria tido confiança, força e fé, não teria me mantido no caminho certo. É a essa base sólida chamada família, construída do mais puro amor e extrema dedicação, que dedico principalmente este trabalho.*

*Ao meu mentor, querido e amado Anjo da Guarda, que tanto batalhou para o meu crescimento, sei que essa jornada não tem sido fácil, e nem será daqui para frente, estaremos juntos nessa caminhada!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, Jesus e ao meu tão amado Mentor, que muito fizeram para que eu não desviasse do caminho do bem, e têm me dado oportunidades maravilhosas de crescimento em todos os campos da vida.

Agradeço a minha mãe que estivera tão próxima apoiando com muito amor, carinho, dedicação, vigilância e paciência todos os meus passos. Mãe, todo o seu empenho na minha instrução me deu forças para seguir, se não por você, certamente não estaria ainda nesta intensa busca do saber, construindo meu sonho dentro da Engenharia.

Ao meu pai, que desde os meus primeiros passos estive com os ouvidos bem abertos e curiosos, para compartilhar comigo cada aprendizado, nunca deixando que o orgulho do conhecimento me cegasse, fazendo com que eu buscase cada vez me instruir mais e melhor. Pai, sua amizade e exemplo significaram segurança e certeza de que eu não estou sozinha nessa caminhada. Por toda a minha vida te chamarei de meu Super Herói!

À Vovó Clara, esse tão lindo Anjo da Guarda que tenho na Terra, que me ensinou a viver com resignação, equilíbrio e bondade. Que me deu apoio nos meus momentos mais sozinhos, quando meus pais não puderam estar presentes. A esse exemplo de mulher eu dedico esta e todas às conquistas da minha vida! Agradeço também ao carinho da irmã amada e do namorado tão querido, sempre trazendo alegria e muito amor, nos momentos de estresse e turbulência, obrigada por toda paciência, obrigada pelos momentos de tranquilidade e equilíbrio que passaram no simples sorriso ou olhar.

Ao meu orientador, por toda paciência com minhas faltas, que tanto fez para que esse trabalho se concretizasse. E aos demais professores por todo conhecimento transmitido. Enfim a todos que de alguma forma tornaram este caminho mais fácil de ser percorrido.

Essa vitória é de todos nós!

## RESUMO

Os microrganismos são as entidades bióticas mais numerosas e antigas do planeta, sua presença e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas além de representarem uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e desenvolvimento econômico sustentável. Contribuem para a descoberta de novos fármacos e outras aplicações na saúde, agricultura, indústria e meio ambiente, por meio de estratégias tradicionais de isolamento e seleção. No entanto, a preservação de fungos em laboratório, com suas características inalteradas, é importante para pesquisa, uma vez que permite a disponibilidade da cepa em qualquer momento. O estocagem desses microrganismos é um processo complexo em virtude do quase inexpressivo conhecimento que se tem a respeito das reações e modificações que ocorrem nos microrganismos em condições de armazenamento e devido à emergente importância atribuída à preservação de amostras. Muitas instituições têm investido na constituição de estoques (biobancos), implementando inúmeras técnicas de preservação com a adoção de protocolos próprios e avançadas tecnologias para controle de dados. A escolha de uma técnica para conservação depende das particularidades do agente, das características do método, dos custos de manutenção, da importância do acervo e principalmente da disponibilidade de equipamentos. Não existe uma fórmula padrão e universal que determine a eficiência da preservação de microrganismos. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre os métodos de preservação de microrganismos, destacando-se a preservação de fungos, além de testar a sensibilidade de fungos de solo tropical e antártico ao resfriamento e ao congelamento com e sem a adição de glicerol no período de 6 meses e 12 meses. Foram preparados 11 conjuntos de criotubos de células vegetativas de fungos filamentosos. Após a reativação em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA), a viabilidade de cada cepa foi avaliada em relação à influência do crioprotetor, temperatura e tempo de armazenagem. Os resultados obtidos foram variados quanto à influência de cada fator na viabilidade do microrganismo, reforçando assim a importância da formulação de protocolos de conservação baseados em testes empíricos para cada espécie a ser armazenada.

**PALAVRAS-CHAVE:** criopreservação; microrganismo; coleção de culturas.

## ABSTRACT

Microorganisms are the most numerous and ancient planet biotic entities, their presence and activity are essential for the ecosystem as well as representing an important source of genetic resources for biotechnological advancement and sustainable economic development, contributing to the discovery of new drugs and applications in health, agriculture, industry and environment, through traditional isolation strategies and selection. The preservation of fungi in laboratory, with its characteristics unchanged, is important for future researches, since it allows the availability of the strain at any time. The storage of these microorganisms is a complex process because of the almost featureless knowledge we have about the reactions and changes that occur in microorganisms in storage conditions and due to the emerging importance attributed to storage of samples, many institutions have invested in setting up inventories, implementing numerous preservation techniques with the adoption of technologies and own advanced protocols on the data control. The choice of technique for conservation depends on the particularities of the agent, the method's characteristics, maintenance costs, the importance of the collection and especially the availability of equipment. There is no standard and universal formula that determines the efficiency of storage and preservation of microorganisms. The aim of this study was to review the literature on methods of preservation of microorganisms, emphasizing the preservation of fungi, besides testing the sensitivity of fungi of tropical and Antarctic soil to cooling and freezing with and without the addition of glycerol in 6 months and 12 months. Twelve sets of tubes with vegetative cells of filamentous fungi were prepared. After reactivation in SDA broth, the viability of each strain was evaluated against the influence of the presence or absence of cryoprotectants, temperature and storage time. The results were quite varied as the influence of each factor on the viability of the microorganism, thus reinforcing the importance of formulating conservation protocols based on empirical tests for each species to be stored.

**KEYWORDS:** cryopreservation; microbial; culture collection.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
2.1 GERAIS	4
2.2 ESPECÍFICOS	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>5</b>
<b>3.1 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO</b>	<b>5</b>
3.1.1 MÉTODO DE CURTO PRAZO: REPICAGEM CONTÍNUA OU PERIÓDICA	5
3.1.2 MÉTODOS DE MÉDIO PRAZO	6
3.1.3 MÉTODOS DE LONGO PRAZO	9
<b>3.2 DANOS PROVENIENTES DA CRIOPRESERVAÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>3.3 AGENTES CRIOPROTETORES</b>	<b>13</b>
<b>3.4 CONSERVAÇÃO DE FUNGOS EM LONGO PRAZO</b>	<b>15</b>
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>19</b>
4.1. ISOLADOS UTILIZADOS	19
4.2. ESTOCAGEM	19
4.3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE RECUPERAÇÃO	20
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>21</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>24</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>25</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

Os microrganismos são as entidades bióticas mais numerosas e antigas, capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico do planeta. Sua presença e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas. Aliado a isso, os microrganismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e desenvolvimento econômico sustentável, contribuindo para a descoberta de novos fármacos e aplicações na saúde, agricultura, indústria e meio ambiente, através de estratégias tradicionais de isolamento e seleção (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O isolamento, identificação, conservação e uso de microrganismos se caracterizam como prática imprescindível para o desenvolvimento de pesquisas, processos e obtenção de produtos de interesse econômico. Para que se utilizem tais recursos, é necessário manter os microrganismos viáveis (GIRÃO *et al.*, 2004). Segundo Paoli (2005), a implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas, que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos.

Estudos com o objetivo de interromper ou pelo menos retardar o relógio biológico de microrganismos tem sido realizados desde os tempos mais remotos, tendo alcançado hoje, um potencial significativo de estocagem de amostras biológicas a curto, médio e longo prazo (SOLA, 2012).

A preservação em estoque de culturas de microrganismos é um processo complexo em virtude do quase inexpressivo conhecimento que se tem a respeito das reações e modificações morfofisiológicas que ocorrem nos microrganismos em condições de armazenamento. Estes obstáculos têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas, sobretudo, pela importância que algumas espécies vêm ganhando em virtude de enfermidades e outros prejuízos ocasionados, tanto na medicina veterinária quanto humana (GIRÃO *et al.*, 2004). Desta forma, o reconhecimento da grande relevância da biodiversidade microbiana para o desenvolvimento humano e animal tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação dos mais diversos espécimes microbiológicos. E devido à emergente importância atribuída à estocagem de amostras, muitas instituições têm investido na constituição de estoques (biobancos),



implementando inúmeras técnicas de preservação, como a criopreservação e a liofilização, com a adoção de protocolos próprios e avançadas tecnologias no controle de dados (HOLLAND *et al.*, 2003; PAOLI, 2005).

O objetivo da preservação de uma linhagem não é somente conservar o estado inicial do microrganismo evitando mutações indesejáveis, mas também alcançar a máxima preservação da vitalidade das células e o número de células viáveis (PASSADOR *et al.*, 2010). Devemos considerar que o alvo de qualquer método de manutenção é preservar a viabilidade e principalmente proporcionar estabilidade genética do microrganismo ao isolamento, pelo maior tempo possível, evitando assim a formação excessiva de mutações que alterem suas características. Algumas vezes, deseja-se conservar um microrganismo que foi selecionado e melhorado com intuito de manter sua nova identidade.

As técnicas de estoque visam também adequar o melhor método de preservação para cada microrganismo, possibilitando metodologias espécie – específicas, vislumbrando a preservação de cepas em longo prazo, seja em temperatura ambiente ou em freezer. Tais técnicas visam ainda a manutenção do seu padrão genético, morfológico, bioquímico e fisiológico, impedindo alterações nos componentes da parede celular e perda da virulência. Atualmente, boa parte dos bancos de coleções faz uso de pelo menos duas metodologias de estocagem, visando garantir a viabilidade e manutenção das cepas (GIRÃO *et al.*, 2004).

A escolha de uma técnica para conservação depende das particularidades do agente, das características do método, dos custos de manutenção, da importância do acervo e principalmente da disponibilidade de equipamentos (ABREU & TUTUNJI, 2003; GIRÃO *et al.*, 2004). Dessa forma, a maior preocupação quanto aos métodos de preservação reside nos efeitos sobre a estabilidade dos espécimes (HOLLAND *et al.*, 2003). Entre os fatores conhecidos que influenciam essa estabilidade podem-se destacar: (a) o uso e os tipos de conservantes; (b) as variações de temperatura entre a coleta e o processamento do material, bem como, no decorrer do processo de estocagem; (c) o tempo despendido entre o processamento primário e a estocagem; (d) a ausência de contaminação por ocasião da coleta e do processamento; (e) a atividade de

agentes endógenos de degradação ou de substâncias inibidoras na própria amostra (HOLLAND *et al.*, 2003).

Não existe uma fórmula padrão e universal que determine a eficiência da estocagem e preservação de microrganismos em longo prazo levando-se em consideração que essa preservação deve garantir a viabilidade, a isenção de contaminações e a estabilidade genética das células microbianas. Contudo, a eleição do procedimento mais adequado à conservação de amostras deve ser norteadas pelas características do espécime em estudo, bem como pelas vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis (QUINN *et al.*, 2005). Muitas células, tecidos e microrganismos, para os quais há uma crescente demanda, ainda esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação, fazendo da criobiologia um campo de vasto potencial para o desenvolvimento de pesquisas (COSTA, 2009).

## 2. OBJETIVOS

---

### *2.1 Gerais*

Realizar uma revisão de literatura sobre os métodos de preservação de microrganismos, destacando-se a preservação de fungos.

Realizar testes em laboratório utilizando-se algumas das técnicas de preservação de fungos filamentosos.

### *2.2 Específicos*

Disponibilizar à equipe do Laboratório de Microbiologia Molecular do Campus Sete Lagoas da Universidade Federal de São João Del-Rei (LMM-CSL-UFSJ) um material para consulta sobre técnicas disponíveis para a preservação de microrganismos.

Selecionar técnicas que possam ser testadas e utilizadas no LMM-CSL-UFSJ para a preservação de isolados de fungos filamentosos.

Testar uma técnica de preservação de fungos filamentosos comparando-se algumas variações desta.

Testar a viabilidade de diferentes isolados de fungos filamentosos submetidos à técnica selecionada e suas variações em diferentes períodos de armazenamento.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 3.1 *Métodos de conservação*

#### 3.1.1 Método de curto prazo: repicagem contínua ou periódica

O repique contínuo, também chamado de subcultivo ou repicagem periódica, é uma das mais antigas técnicas de conservação. Por ser um método simples, caracteriza-se como técnica tradicional de manutenção de culturas em laboratório, sendo bastante utilizada para se obter a viabilidade de microrganismos, principalmente de bactérias (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

O método consiste na inoculação do microrganismo em meio adequado, incubação em ambiente favorável à multiplicação e estocagem em baixas temperaturas, após sua multiplicação. Nesta situação, é aconselhável o armazenamento de culturas sob refrigeração (5°C a 8°C), em busca da redução do metabolismo do microrganismo e o aumento entre os intervalos de repiques das culturas (COSTA & FERREIRA, 1991).

ROMEIRO (2006) considera que a repetição do processo para novos meios de cultura deve ser realizada em intervalos de tempo condizentes com as necessidades e particularidades de cada microrganismo, avaliando-se as condições ótimas e período máximo de sobrevivência entre as diferentes cepas. Entretanto, é aconselhável que a transferência de culturas seja realizada antes que o substrato do meio seja totalmente consumido pelos microrganismos, ou antes, que o meio desidrate.

Como vantagens desde método pode-se citar: simplicidade; baixo custo; não necessidade de reativação, não provocando assim estresse ou injúria celular; e a não exigência de equipamentos sofisticados. Como desvantagens: apresenta maior risco de contaminação em decorrência da constante manipulação das culturas devido aos repiques contínuos e periódicos; perdas de características genéticas decorrentes de mutações provenientes da intensa multiplicação celular; necessidade de maior espaço físico para armazenamento das culturas; logística inconveniente quanto ao transporte; variabilidade entre as cepas e conseqüentemente entre os intervalos de repiques dos microrganismos armazenados (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

A idade das culturas influencia de forma significativa o emprego deste método de manutenção, pois culturas velhas tendem a produzir culturas-filhas alteradas, tanto do ponto de vista morfológico como fisiológico. Além do risco de comprometimento da estabilidade genética, a manutenção por repicagens periódicas traz consigo outro problema considerável, a perda da patogenicidade ou virulência, mesmo permanecendo viável, daí a necessidade de verificação periódica das características de cada isolado (GIRÃO, 2004).

### **3.1.2 Métodos de médio prazo**

#### **3.1.2.1 Manutenção em óleos**

Este método de conservação consiste na aplicação de uma camada de óleo mineral esterilizado sobre a cultura do microrganismo a fim de limitar a quantidade de oxigênio disponível, causando assim uma redução no metabolismo e conseqüentemente na taxa de multiplicação do agente. Deve-se multiplicar o microrganismo em meio de cultura dentro de um frasco, por exemplo, um tubo de ensaio, e em seguida cobrir essa colônia com óleo mineral esterilizado. Posteriormente, esse frasco pode ser mantido em temperatura ambiente ou em um refrigerador (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

CANHOS *et al.*, (2004) e COSTA *et al.*, (2009) afirmaram que esta técnica proporciona uma maior longevidade às estirpes, quando comparada à repicagem periódica, bem como redução da velocidade de desidratação do meio de cultura. Porém, apresentam desvantagens equivalentes à técnica de subcultivo, como a possibilidade de contaminações, instabilidade genética e dificuldades com a utilização do óleo, sua esterilização e seu manuseio.

A manutenção de culturas submersas em óleo mineral promove a redução do consumo de oxigênio em torno de 10% em poucas horas. Porém, segundo COSTA & FERREIRA (1991) e ROMEIRO (2006), camadas de óleo superiores a um centímetro não devem ser utilizadas visto que pode ocorrer a redução da viabilidade dos microrganismos em condições de total exaustão de oxigênio.

Os óleos utilizados para a conservação de microrganismos devem ser de boa qualidade e pureza, apresentar alta viscosidade, densidade relativa entre 0,8 e 0,9 à

temperatura de 20°C e, além disso, não devem conter produtos tóxicos, sendo a parafina e a vaselina os mais recomendados (ROMEIRO, 2006).

Outra preocupação quanto ao uso de óleos neste método ocorre quanto ao processo de esterilização. Neste procedimento, deve-se evitar a formação de umidade a fim de se eliminar riscos de contaminação e se ter um controle de temperatura, pois sua elevação pode resultar na formação de produtos tóxicos aos microrganismos em estoque. ROMEIRO (2006) relatou a existência de dois procedimentos possíveis para a esterilização do óleo: autoclavagem a 1atm por 30 minutos, seguida de secagem a 150°C, ou aquecimento a 170°C por 1 hora.

Segundo PEREIRA (2008) e PASSADOR (2010), a transferência de culturas preservadas por este método deve ser feita para o mesmo meio de cultivo em que o microrganismo se encontrava durante a preservação, e a retirada do microrganismo deve acontecer após a drenagem total da camada de óleo.

Dados indicam que as bactérias podem ser conservadas por períodos de um a sete anos em óleos dependendo da espécie, enquanto fungos sobrevivem por um a cinco anos, sendo que as leveduras, especificamente, sobrevivem até sete anos (COSTA & FERREIRA, 1991).

### **3.1.2.2 Manutenção em água esterilizada**

A preservação em água destilada esterilizada também conhecida pelo método de Castellani consiste no armazenamento de microrganismos em água estéril ou solução salina, sendo indicada na preservação de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas. O método consiste na transferência de blocos de Ágar contendo os microrganismos para um frasco, com a posterior adição de uma solução de água esterilizada (COSTA & FERREIRA, 1991).

Esta técnica deve ser utilizada preferencialmente com culturas jovens, com cerca de 10 a 15 dias e visa atingir um estágio de hipobiose, com a diminuição do metabolismo e formação do estado latente da célula diante da restrição de fontes nutritivas (COSTA & FERREIRA, 1991; ABREU & TUTUNJI, 2003).

Apesar do baixo custo e reprodutibilidade, sua aplicação é restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao Agar, como nota-se em bolores e algumas leveduras. A utilização de água destilada estéril como meio de manutenção tem sido proposto com sucesso para bactérias fitopatogênicas, esporos do gênero *Bacillus* e vírus da hepatite. Considerando bolores e leveduras, resultados satisfatórios têm sido obtidos no que se refere à viabilidade (ABREU & TUTUNJI, 2003; PASSADOR, 2010).

PASSADOR *et al.* (2010) afirmam que este método além de garantir a preservação das características originais da cultura por longos períodos, pode promover a ausência de contaminação por ácaros, apresentar baixo custo por utilizar somente água destilada e a necessidade de pequeno espaço físico para acondicionar os frascos, além de poder ser empregada para grande número de gêneros e espécies de fungos.

### **3.1.2.3 Congelamento**

O congelamento consiste na conservação de microrganismos em temperaturas relativamente baixa, entre  $-4^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$ . Apresenta-se como um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, além de oferecer boa segurança para o armazenamento de diversos microrganismos por períodos de alguns meses a dois anos (TORTORA *et al.*, 2011).

Como desvantagem do método pode-se citar a possibilidade de redução da viabilidade de alguns microrganismos em função dos danos causados às células decorrentes da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada (ROMEIRO, 2006).

SILVA *et al.* (2008), buscando avaliar a viabilidade dos microrganismos presentes em uma coleção de cultura semearam um total de 328 leveduras do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodothorulla* em caldo cérebro-coração contendo glicerol, mantendo-as sob refrigeração por sete dias e posterior congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após três anos de congelamento observaram recuperação de 99% das leveduras e no ano seguinte notaram uma redução de viabilidade das culturas com 90,6% de recuperação (144 leveduras). Diante dos resultados, observou-se que o emprego de

baixas temperaturas foi vantajosa por seu baixo custo, fácil execução, além de ter favorecido a conservação de quase totalidade das leveduras por 48 meses.

### **3.1.3 Métodos de longo prazo**

#### **3.1.3.1 Liofilização**

A liofilização é considerada uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de microrganismos, justamente por garantir viabilidade dos microrganismos por longos períodos e ser aplicável para a maioria deles (COSTA & FERREIRA, 1991; CANHO *et al.*, 2004).

O controle de qualidade de um vasto número de testes utiliza cepas microbianas de referência como controle positivo. Essas cepas são distribuídas graças ao uso da técnica de liofilização que garantem maior estabilidade das culturas e possibilita o transporte a temperaturas ambientes. As desvantagens atribuídas à liofilização estão relacionadas ao tempo consumido pelo processo, ao seu custo e à necessidade da otimização de protocolos específicos para cada tipo de célula e espécie microbiana (PAOLI, 2005; MORGAN *et al.*, 2006).

A técnica se baseia na remoção da água intracelular de materiais biológicos congelados, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo, que são capazes de provocar danos às estruturas celulares, além de poder degradar as enzimas presentes no citosol, o que poderia levar à morte dos microrganismos (MORGAN *et al.*, 2006).

A liofilização é constituída por três etapas: congelamento, desidratação primária e desidratação secundária. Durante o processo de congelamento pode ocorrer um dano à estrutura celular relacionado com o comportamento peculiar da água sob condições de baixas temperaturas. A água congelada expande-se ao cristalizar e no processo de fusão tende a recristalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo, capazes de produzir uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos à célula (CARVALHO, 2007).

O congelamento promove a inércia do material a ser liofilizado, gerando uma interrupção das reações químicas e atividades biológicas, sendo considerada uma das etapas mais crítica. Durante essa fase, a suspensão líquida é resfriada com a formação



de cristais de gelo. À medida que o processo de congelamento avança gradativamente a água contida no líquido congela. Isso resulta no incremento da concentração do líquido remanescente. Com a suspensão tornando-se mais concentrada, a viscosidade aumenta, induzindo à inibição de nova cristalização. Esse líquido, altamente concentrado e viscoso, solidifica, produzindo uma fase amorfa, cristalina ou amorfo-cristalina combinada (PAOLI, 2005; COSTA *et al.*, 2009).

Na secagem primária a água é removida por sublimação que ocorre sob vácuo e com a adição de calor. O calor aqui fornecido deve ser apenas suficiente para gerar o calor latente de sublimação. A velocidade de secagem na liofilização é lenta, sendo em média de 0,001°C a 0,06°C por segundo. Nesta primeira fase cerca de 90% da água é retirada do produto (PAOLI, 2005; COSTA *et al.*, 2009).

A secagem secundária envolve a remoção da água absorvida pelo produto, a água que não se separou com o gelo durante o congelamento e, conseqüentemente não sublimou. A água não congelada deve ser adsorvida na superfície do produto cristalino, pois sua presença, em quantidades suficientes, pode causar a rápida decomposição do produto, quando estocado à temperatura ambiente. Neste ponto a secagem deve ser rápida para não danificar o produto. Os frascos são então fechados (PAOLI, 2005; COSTA *et al.*, 2009).

Os procedimentos de estocagem e acondicionamento influenciam significativamente na vida de prateleira dos materiais liofilizados. Desta forma, os produtos liofilizados, armazenados em ampolas ou frascos de vidro, devem ser acondicionados em ambiente com baixa umidade, baixa temperatura, abrigo de oxigênio, luz e contaminantes (MORGAN *et al.*, 2006).

Apesar de a liofilização ser amplamente empregada na manutenção de diferentes microrganismos, as etapas que compõem o processo são capazes de causar injúrias ou danos celulares, além da alteração na permeabilidade da membrana celular, levando ao aumento da sensibilidade e alguns agente seletivo, aumento da fase de latência (ou fase lag) de multiplicação celular e a necessidade de incremento nutricional (ABREU & TUNTUNJI, 2003; CANHOS *et al.*, 2004).

Considerando a ampla utilização da técnica na manutenção de microrganismos, verifica-se que o método oferece alta estabilidade do material a ser conservado, baixa taxa de mutação e contaminação, não requer monitoramento nem manutenção frequente, além de ocupar pouco espaço no armazenamento. Quanto ao transporte de culturas de referencia ou até mesmo materiais de rotina, o liofilizado pode ser transportado a longas distancias em temperatura ambiente, não havendo necessidade de refrigeração. Como desvantagem verifica-se a necessidade de equipamentos onerosos para a desidratação do material, além dos custos com o preparo das culturas (MORGAN *et al.*, 2006).

### **3.1.3.2 Criopreservação**

A criopreservação consiste na manutenção de uma variedade de tipos celulares sob baixas temperaturas, tendo como objetivo maior minimizar o dano a materiais biológicos, incluindo tecidos, células animais e vegetais, bactérias, fungos e vírus durante o processo de congelamento e estocagem a frio (WOLFE & BRYANT, 2001).

COSTA *et al.* (2009) relataram que apesar da existência de diversas técnicas de manutenção de microrganismos, o principio do congelamento-descongelamento se manteve entre os mais importantes e viáveis para a preservação celular.

Este método compreende a manutenção de materiais a baixas temperaturas, -20°C a -80°C em freezers, e a ultra-baixas temperaturas, -150°C a -196°C em containeres de nitrogênio liquido (WOLFE & BRYANT, 2001; PAOLI, 2005).

No processo de criopreservação, o material biológico deve ser primeiramente resfriado à temperatura ambiente (20°C), etapa esta que aparentemente não causa danos, desde que o material esteja diluído em meio adequado. Existe, porém, uma faixa critica de temperatura no processo de refrigeração, entre 19°C e 8°C, em que o material pode ser severamente lesado quando realizado de maneira inadequada. Pode ocorrer um choque térmico, que induz a prejuízos irreversíveis como danos à membrana plasmática, aumento da permeabilidade, com conseqüente perda de íons e moléculas intracelulares e a redução do metabolismo. O resfriamento na faixa de 19°C a 8°C faz com que os lipídios da membrana plasmática passem por uma fase de transição do estado liquido-cristalina, para o estado de gel (WATSON, 2000; OLIVEIRA, 2007; COSTA *et al.*, 2009).

De -6°C a -15°C, a água no meio começa a cristalizar e a concentração de soluto na fração descongelada aumenta, enquanto a membrana plasmática impede a formação de cristais de gelo intracelular. A água dentro da célula permanece descongelada e no momento que o material alcança a temperatura crítica de -60°C as células ficam relativamente inertes e o material pode ser imerso em nitrogênio líquido, para seu armazenamento (WATSON, 2000).

O desafio das células durante o processo de congelamento não é sua habilidade em resistir à temperatura de armazenamento de -196°C, mas sim a capacidade de suportar as possíveis alterações que ocorrem durante a dupla passagem pelas faixas intermediárias de temperatura, 19°C a 8°C e -15°C a -60°C, durante o congelamento e o descongelamento (COSTA & FERREIRA, 1991; OLIVEIRA, 2007).

A efetividade na criopreservação de microrganismos depende de uma série de fatores como a espécie à qual o microrganismo pertence, tipo de cepa, tamanho e estrutura celular, a fase e a taxa de desenvolvimento, a temperatura de incubação, a composição do meio de cultivo, o pH, a osmolaridade e aeração, o teor de água da célula, o teor lipídico e a composição do meio de congelamento, a taxa de resfriamento, a temperatura e o tempo de estocagem, a taxa de aquecimento e o meio de recuperação (COSTA *et al.*, 2009).

A estocagem a baixas temperaturas, apesar de eficiente, pode comprometer a qualidade das amostras armazenadas, visto a possibilidade de variações de temperaturas em freezers. Já os sistemas de nitrogênio líquido garantem o armazenamento a temperaturas constante e por longos períodos (WOLFE & BRYANT, 2001; PAOLI, 2005).

A elevada taxa de sobrevivência alcançada desperta o interesse de pesquisadores quanto a sua utilização, principalmente pelo aspecto prático, visto a recuperação e viabilidade de populações celulares, mas também na redução das possíveis alterações na sua composição genética. Entretanto, faz-se necessário frisar que os protocolos de criopreservação necessitam de adequação metodológica para cada tipo de microrganismo de interesse (ABREU & TUTUNJI, 2003; COSTA *et al.*, 2009).

### ***3.2 Danos provenientes da criopreservação***

Deve-se chamar a atenção ao fato de que o emprego da criopreservação exerce efeitos deletérios à maioria dos materiais biológicos, com ênfase à membrana celular. O dano à estrutura celular está relacionado com o comportamento peculiar da água sob condições de baixas temperaturas. A água congelada expande-se ao cristalizar e no processo de fusão tende a recrystalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo, capazes de produzir uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos à célula (CARVALHO 2007).

A crioinjúria é um evento letal. O congelamento é um processo probabilístico e, na maioria dos casos, a solução extracelular apresenta maior volume que a intracelular. Por essa e outras razões, o congelamento extracelular tende a ocorrer primeiro. Quando isso acontece, os solutos contidos no meio externo se concentram numa pequena fração de água em estado líquido que passa a exibir maior pressão osmótica. Esse mecanismo promove o fluxo de água para fora da célula. A alta concentração intracelular inibe a formação de gelo, contudo a desidratação e a elevada contração de íons podem ser severas o bastante para causar danos (WOLFE & BRYANR, 2001; HUBALEK, 2003).

A combinação entre os mecanismos de efluxo de água e a constituição de cristais de gelo é responsável por danos irreversíveis à membrana e à morte celular. Portanto, além da cuidadosa manipulação das variações de temperatura empregadas no processo de resfriamento e congelamento de materiais biológicos, é freqüente a inclusão de substâncias protetoras aos sistemas de criopreservação, conhecidas como agentes crioprotetores, com vistas a prevenir a cristalização, via depressão da atividade de água (HUBALEK, 2003).

### ***3.3 Agentes crioprotetores***

Agentes crioprotetores reduzem o estresse físico e químico derivado do congelamento e do degelo das células. As características físico-químicas ideais para um crioprotetor devem abranger: baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (BUENO & GALLARDO, 1998).

A presença de um agente crioprotetor apropriado, na composição do meio utilizado para o congelamento, geralmente aumenta a sobrevivência de microrganismos

mantidos a temperaturas de congelamento. Esses compostos podem ser adicionados durante o crescimento do microrganismo ou na fase anterior ao congelamento (HUBALEK, 2003).

Estes agentes têm sido classificados de formas variadas. Uma das mais tradicionais divisões aplicadas consiste na classificação desses aditivos quanto à capacidade de penetração em materiais biológicos: crioprotetores penetrantes ou intracelulares, como metanol, etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilformaldeído, metilacetamida, DMSO e glicero; e crioprotetores não penetrantes ou extracelulares, como os mono, oligo, e polissacarídeos, manitol, sorbitol, dextrana, metilcelulose, polietilenoglicol entre outros (HUBALEK, 2003).

Os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são capazes de induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo durante o congelamento. São particularmente apropriados à preservação de microrganismos por se fixarem à superfície microbiana formando uma camada viscosa capaz de proteger mais efetivamente suas paredes celulares e membranas (HUBALEK, 2003).

Entre os crioprotetores penetrantes ou intracelulares destaca-se a propriedade de realizar ligações com as moléculas de água, minimizando a formação e o tamanho dos cristais de gelo, bem como, reduzindo as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular (HUBALEK, 2003).

De uma forma geral, muitas substâncias com propriedades crioprotetoras elevam a permeabilidade da membrana celular, diminuem o ponto de congelamento da água e de fluidos biológicos por meio de ações coligativas. Portanto, reduzem a concentração de sais dissolvidos em solução e evitam assim o choque osmótico. Além, dos efeitos coligativos, a ação crioprotetora de determinados compostos pode estar relacionada com a capacidade de defender a superfície da célula do estresse hiperosmolar. Crioprotetores também podem proteger microrganismos e suas proteínas contra desidratação, destruição térmica e radiação (HUBALEK, 2003).

Apesar dos crioprotetores serem essenciais para o congelamento seguro da maioria dos sistemas biológicos, essas substâncias não permitem a sobrevivência de

todas as células, o que pode ser explicado por apresentarem efeitos tóxicos que dependem principalmente da concentração do crioprotetor utilizado bem como do tempo de exposição da célula ao mesmo (OLIVEIRA, 2006).

### ***3.4 Conservação de fungos em longo prazo***

Infecções fúngicas pouco comuns estão emergindo como importantes causas de morbidade e mortalidade em hospedeiros humanos e animais imunocomprometidos e, assim, representam problemas especiais para laboratórios de diagnóstico. Outra importância dada aos fungos são que eles possuem um enorme potencial para fornecer soluções na agricultura, meio ambiente, medicina humana e veterinária. Estas razões explicam o grande interesse na preservação desses microrganismos. Inúmeros protocolos têm sido sugeridos por serem adequados na preservação de fungos, embora nenhuma técnica de preservação individual tenha sido aplicada com sucesso para todos os fungos (SMITH & RYAN, 2003).

Das diversas metodologias de estocagem fúngica utilizadas nos centros de pesquisa em todo o mundo, algumas têm maior destaque por motivos variados, como a praticidade ou resultados satisfatórios para determinadas espécies. A escolha de um método mais adequado deve considerar parâmetros, como o objetivo do estoque e da coleção e a manutenção das estabilidades genéticas, fisiológicas e morfológicas (BUENO & GALLARDO, 1998).

Como primeiro passo para a preservação, culturas fúngicas são obtidas por técnicas de amostragem convencionais e são normalmente cultivadas em Ágar Sabouraud, porém outros meios de crescimento também estão amplamente descritos na literatura (BUENO & GALLARDO, 1998).

Para formação de biobancos de fungos, a literatura referencia métodos como estocagem em solo, em óleo mineral, em água destilada estéril, criopreservação em temperaturas variadas (-20, -70 e -196°C) e a liofilização, todos com uso ou não de agentes crioprotetores nas mais diversas concentrações e tipos (BUENO & GALLARDO, 1998).

Grande parte das coleções utiliza a liofilização como método de conservação justamente por atingirem uma manutenção de viabilidade de algumas espécies por períodos de 17 a 21 anos. Contudo, fungos não esporulados ou que possuem esporos excessivamente delicados não suportam o processo de liofilização, sendo necessário o emprego de técnicas menos impactantes (COSTA *et al.*, 2009).

O método de liofilização é utilizado para preservação de várias espécies de *Fusarium* e de *Pythium*. Desde 1978, o centro de pesquisa de *Fusarium*, na Universidade do Estado de Pensilvania, vem empregando esta técnica, sendo que das cerca de 16000 culturas, todas ainda estão viáveis. Há relato de preservação do fungo *Pythium sp.* por 5 anos ou mais quando se utilizada esta técnica em suas estruturas de resistências (SINGLETON, 1992). SMITH & RYAN, (2003) analisaram a sobrevivência de uma variedade de espécies de microrganismos submetidos à estocagem, por períodos superiores a 20 anos. Os espécimes foram liofilizados, selados à vácuo em ampolas e estocados em ambiente escuro a 5°C. A espécie de levedura testada, *Saccharomyces cerevisiae*, apresentou apenas 8% de sobrevivência, quando recuperada logo após o processo de liofilização, mas a perda subsequente à estocagem foi a menor entre todos os microrganismos testados, alcançado uma taxa de sobrevivência de 97,7% por ano. A análise desses resultados, mediante outros dados publicados sobre diferentes condições de liofilização, sugere que a sobrevivência durante o processo de estocagem é fortemente influenciada pelo grau de vácuo sobre o qual as ampolas são seladas. Assim, a sobrevivência de cada espécie pode ser atribuída ao alto nível de dissecação e à vedação sob condições de vácuo.

Para algumas espécies de *Ascomycota*, *Zigomycota* e *Basidiomycota*, a técnica de liofilização também é mais adequada, proporcionando uma boa sobrevivência por até 30 anos para alguns isolados. A principal vantagem dessa técnica é que ampolas seladas oferecem uma proteção consistente aos fungos contra a dispersão no ar durante o armazenamento ou durante o acondicionamento e transporte para laboratórios distantes. Em contra partida, a liofilização apresenta uma grande desvantagem, podendo causar danos genéticos durante as etapas de resfriamento e secagem (SMITH & RYAN, 2003).

Segundo SMITH & RYAN (2003), a criopreservação utilizando ultra-baixas temperaturas permite que a maioria das culturas permaneça estável por um grande

período, podendo chegar a até 30 anos, devido à baixa ocorrência de atividade metabólica nestas temperaturas. Tais autores identificaram genes de indução ao congelamento severo na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Um deles, o NSR1, codifica uma proteína relacionada ao processamento do RNAr e biossíntese ribossomal. Outros genes são induzidos pelo choque térmico ao frio.

O método de conservação em nitrogênio líquido é muito utilizado para fungos fitopatogênicos. Neste método, a atividade metabólica dos microrganismos é muito baixa. O nitrogênio líquido não é mutagênico e não influencia as características morfológicas e patogênicas dos fungos. Isolados de *Rhizoctonia solani*, de *Phytophthora sp.* e de *Pythium sp.* são preservados neste método por 5 a 6 anos. Nesta técnica é muito comum a adição de substâncias crioprotetoras em suspensão de micélio ou de esporos de fungos antes de colocar tais suspensões no nitrogênio líquido. No entanto, não há relatos da colocação de substâncias crioprotetoras em suspensão de estruturas de resistência de fungos de solo, o que poderia implicar em aumento no tempo de preservação e garantir ainda mais a não ocorrência de modificações genéticas (SINGLETON, 1992).

DUMONT *et al.* (2004) buscaram avaliar a viabilidade das espécies: *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*, em função das taxas de resfriamento durante a criopreservação. Classificaram a viabilidade celular em três escalas:

- Alta viabilidade para baixas taxas de resfriamento (5 a 180°C/min), permitindo o efluxo do conteúdo de água celular, prevenindo a cristalização intracelular;
- Baixa viabilidade para taxas intermediárias de resfriamento (180°C a 5000°C/min), no qual o fluxo de calor prevalece sobre o efluxo de água, propiciando a ocorrência de cristalização, no momento em que o fluxo de água esta em direção ao meio externo;
- E alta viabilidade para taxas de resfriamento muito altas, capazes de induzir um rápido fluxo de calor permitido que a vitrificação intracelular se estabeleça antes da ocorrência de qualquer efluxo de água.



Os referidos autores verificaram que para todos os tipos celulares investigados, a viabilidade mostrou-se maior nas taxas de resfriamento baixas e muito altas, fato este que pode ser explicado pela competição entre o fluxo de calor e o efluxo de água na célula, durante o processo de congelamento e descongelamento. Nas taxas mais baixas de resfriamento, o calor latente de congelamento da água permitiu a saída de água e preveniu desta forma, a formação de cristais de gelo no espaço intracelular. As taxas intermediárias de resfriamento conferiram um retardo na vitrificação intracelular, e se caracterizaram como um fator negativo para a viabilidade do espécime, levando a morte celular decorrente aos danos propiciados pela cristalização durante o efluxo de água pela membrana plasmática. Já nas altas taxas de resfriamento, as células foram capazes de se congelar, sem qualquer alteração no volume celular e apresentaram viabilidade considerável após descongelamento. Apesar do comportamento geral dos espécimes envolvidos, os resultados podem ser alterados por influência do tamanho da célula, presença de parede celular e permeabilidade à água.

Protocolos experimentais de armazenamento de culturas de fungos têm estabelecido que a viabilidade aceitável para fungos seja a germinação e desenvolvimento das células a uma taxa acima de 75%. Como visto, as técnicas de criopreservação e liofilização para a preservação de culturas fúngicas podem causar problemas de viabilidade após a reconstituição. Desta forma é de grande importância verificar a viabilidade antes e depois do armazenamento, independente da técnica utilizada (SMITH & RYAN, 2003).

## 4. METODOLOGIA

---

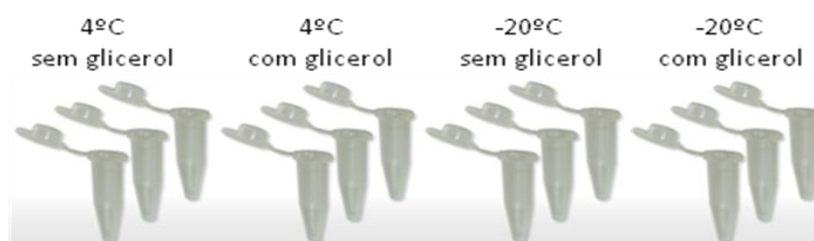
### 4.1. *Isolados utilizados*

Foram utilizados 12 fungos filamentosos ainda não identificados, que estão sendo caracterizados em outros estudos. Tal coleção possui fungos isolados de solos da Antártica, denominados provisoriamente como fungos "FA" e de solo do próprio Campus Sete Lagoas (CSL), denominados provisoriamente como fungos "F".

Os isolados que foram utilizados no estudo estão sendo mantidos em coleções no Laboratório de Microbiologia Molecular da UFSJ Campus Sete Lagoas (LMM-CSL-UFSJ).

### 4.2. *Estocagem*

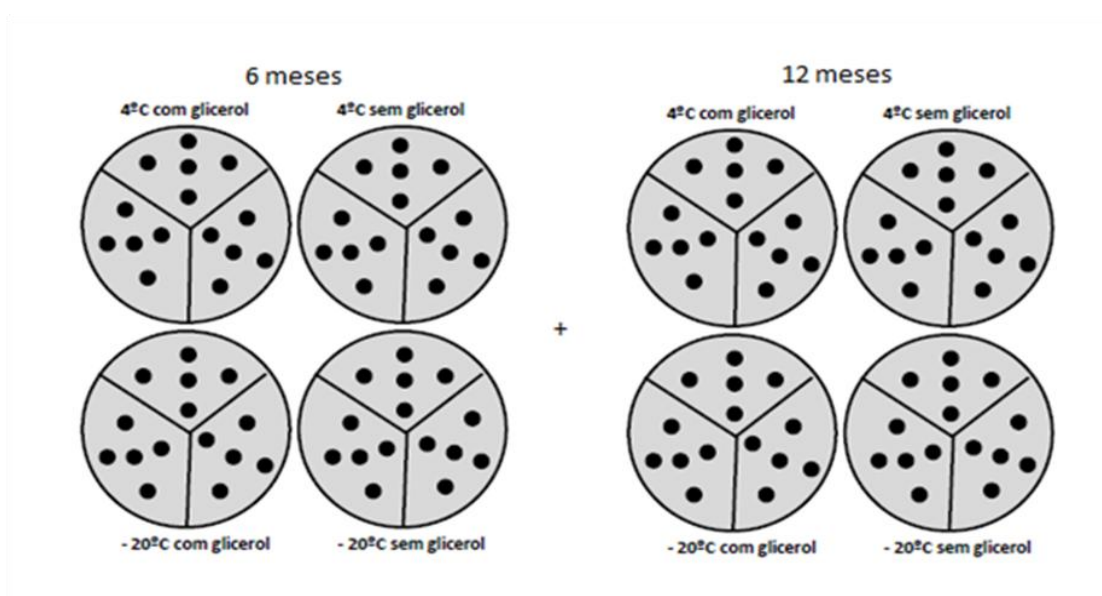
Os fungos foram crescidos previamente em meio Agar Sabouraud Dextrose (SDA - Sabouraud Dextrose Agar). Os fungos do solo da Antártica foram crescidos a 15°C, enquanto que os fungos do solo do CSL cresceram a 25°C. 120 discos de cerca de 3mm de diâmetro foram retirados da borda das colônias dos fungos miceliais de cada espécie, com parte do ágar. Esse procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar devidamente esterilizadas para minimizar a ocorrência de contaminações.



Para cada fungo micelial, conjuntos de cinco discos contendo hifas acondicionadas em microtubos de polipropileno de 1,5µl foram submetidos, em triplicata, aos tratamentos de preservação, que consistiram na ausência ou presença de crioprotetor (glicerol 50% v/v, autoclavado), e nas temperaturas de 4°C (geladeira) e -20°C (freezer), sendo os microtubos contendo o crioprotetor preenchido com o glicerol até cobrir os discos contendo as hifas. Esta etapa foi realizada duas vezes, para obtenção de conjuntos de microtubos a serem analisados após 6 meses e 12 meses de armazenagem, para cada espécie de fungo.

### 4.3. Avaliação da viabilidade de recuperação

Após estocagem por 6 e 12 meses, nas condições pré estabelecidas, os microrganismos previamente alocados nos microtubos foram novamente plaqueados em meio Agar Sabouraud Dextrose (SDA - Sabouraud Dextrose Agar), e mantidos a temperatura ambiente para avaliação da viabilidade de recuperação, como mostrado na Figura 5.



Esquemática da montagem dos experimentos de conservação.

Os fungos tiveram sua reativação avaliada quantitativamente, baseada em seu crescimento micelial. Foram contados os discos que obtiveram uma reativação satisfatória dentro de até 15 dias, à temperatura ambiente, e foi feita a proporção levando em consideração o crescimento dos outros discos dentro de cada uma das triplicatas. Os dados obtidos foram organizados em uma tabela para análise e comparação da viabilidade do método.



A recuperação foi de 100% após seis e doze meses de tratamento para todas as condições de temperatura (4°C ou -20°C) e presença ou ausência do crioprotetor (glicerol) para os fungos: F1, F3, F5, F8, F9, F15 e FA7, comprovando assim a viabilidade da técnica de conservação por resfriamento e congelamento para tais isolados por pelo menos 12 meses.

Apesar da boa recuperação após os períodos de armazenamento, os fungos F8 e F15 apresentaram variações morfológicas após 12 meses de conservação (Figuras 1 e 2 do anexo).

Já o fungo FA12 não apresentou crescimento em nenhum dos tratamentos para todas as condições utilizadas, mostrando a sensibilidade do fungo ao armazenamento a baixas temperaturas, mesmo na presença de um crioprotetor (Tabela 1).

Para os outros fungos, houve variação quanto à eficiência de reativação.

O fungo F7 não obteve crescimento no tratamento a 4°C sem glicerol em ambos os períodos de 6 e 12 meses. No tratamento a 4°C com glicerol observou-se um crescimento de 100%, 100% e 0% nas triplicatas de 6 meses, enquanto que para o mesmo tratamento no período de 12 meses não foi observado crescimento. Nos tratamentos sem glicerol a -20°C por 6 e 12 meses, foram obtidos os seguintes resultados das triplicatas, respectivamente: 40%, 40% e 20%; 100%, 100% e 100%. Os tratamentos com glicerol a -20°C foram ainda menos satisfatórios e estão representados em triplicatas respectivamente por 6 e 12 meses: 100%, 0% e 0%; 20%, 20% e 0% (Tabela 1). O fungo F7 se mostrou melhor preservado quando empregada a temperatura mais baixa, -20°C, mas ainda assim não obteve uma conservação satisfatória, mostrando assim a inviabilidade da aplicação desta técnica para este fungo.

O fungo F17 apresentou uma boa taxa de recuperação, sendo de 100% a 60% em todas as condições de tratamento, com exceção do tratamento a 4°C com glicerol, onde não foi observado crescimento para nenhum dos dois períodos de tempo estudados, e no tratamento de -20°C com glicerol no período de 12 meses, onde o R1 obteve 100% de crescimento, enquanto o R2 e R3 obtiveram 0% de crescimento (Tabela 1). Desta forma, observa-se que a presença do crioprotetor diminuiu a viabilidade das células para

todas as diferentes condições de tratamento e tempo, mostrando-se assim possivelmente tóxico para este microrganismo.

O fungo FA3 obteve recuperação em todas as condições de tratamento no período de 6 meses. Porém, nos tratamentos a 4°C sem glicerol e a -20°C sem glicerol, ambos no período de 12 meses, não foi observado crescimento quando se tentou recuperar o fungo. E quando tratado por 12 meses a 4°C com glicerol observamos o resultado de 20%, 20% e 0% de crescimento, enquanto a -20°C ainda com glicerol observamos o resultado de 80%, 20% e 20%. A viabilidade foi baixa, mas ainda assim observou-se crescimento após um período de 12 meses quando tratado na presença do glicerol como crioprotetor.

O FA4 obteve 100% de recuperação nos tratamentos a 4°C e -20°C com e sem glicerol para o período de 6 meses. No tratamento durante o período de 12 meses a 4°C sem glicerol as triplicatas tiveram um crescimento observado de respectivamente: 60%, 60% e 0%. Já nos tratamentos também para 12 meses a 4°C com glicerol e -20°C sem e com glicerol, não foram observados crescimentos quando se tentou recuperar os fungos. Conclui-se que esta técnica não é eficaz no armazenamento deste fungo em períodos superiores a 6 meses.

Foi observada contaminação dos fungos com outros fungos no crescimento durante a reativação principalmente após 12 meses de estocagem. Não foi possível identificar ao certo se a contaminação ocorreu no momento da estocagem e se desenvolveu durante os 12 meses de armazenagem ou se houve alguma contaminação proveniente do ambiente ou contaminação cruzada entre os fungos que estavam sendo reativados na desmontagem dos experimentos. Este fato indica uma possível limitação para estas técnicas de conservação utilizadas.

## 7. CONCLUSÕES

---

Os resultados deste trabalho confirmam que a escolha de uma técnica para conservação depende de várias particularidades, não existindo, desta forma, uma fórmula padrão e universal para a estocagem e preservação de fungos, levando-se em consideração que essa preservação deve garantir a viabilidade, a isenção de contaminações e a estabilidade genética das células.

Os resultados confirmaram que a definição da técnica a ser utilizada para a preservação depende também do isolado que será preservado. Sendo assim, deve-se definir qual a melhor metodologia para cada isolado através de testes.

Considerando a vasta diversidade microbiana e que muitos microrganismos ainda esperam pela definição da metodologia mais adequada à sua conservação, podemos concluir que este ainda é um tema que demanda ainda muita pesquisa.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de Culturas de microorganismos do UniCEUB**. Brasília, Universitas Ciências da Saúde, v.02 n.2, p. 236-25, 2003. Disponível em: <<http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/viewFile/535/356>> Acesso em: 01 out. 2013.

BUENO, L; GALLARDO, R. **A conservação de fungos filamentosos em água destilada estéril**. Revista Iberoam. Micol. p. 166-168, 1998.

CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. **Coleções de culturas de microrganismos**. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA, 2004.

CARVALHO, F. D. **Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos**. Ciência Agrotécnica, v. 31, n. 3, p. 814-820, 2007.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. **Preservação de microrganismos: revisão**. Revista de Microbiologia, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. C. *et al.* **Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas**. Ciência Animal, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009. Disponível em: <[http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10\\_2009.pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10_2009.pdf)> Acesso em 19 nov. 2013.

DUMONT, F.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. **Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates**. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 3, p. 268-272, 2004.

GIRÃO, M. D. *et al.* **Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p. 229-233, maio-junho, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v37n3/20300.pdf>> Acesso em 19 nov. 2013.

HOLLAND, N. T. *et al.* **Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies**. Mutation Research, California, p. 217-234, 2003. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.61.4481&rep=rep1&type=pdf>>

HUBÁLEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms**. Cryobiology, New York, v. 46, p. 205-229, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/128182>> Acesso em 28 set. 2013.



MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. **Preservation of microorganisms by drying – a review**. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v.66, n. 2, p.183-193, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632005>> Acesso em 02 out. 2013.

OLIVEIRA, V.M., SETTE, L.D., FANTINATTI-GARBOGGINI, F. **Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos**. Divisão de Recursos Microbianos. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p.1-19, 2006.

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais 87p. 2007. Disponível em: <[http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA7UDHRY/1/camila\\_haddad\\_de\\_oliveira.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA7UDHRY/1/camila_haddad_de_oliveira.pdf)> Acesso em 23 out. 2013.

PAOLI, P. **Biobancos microbiológicos a partir de coleta de amostras para a epidemiologia, diagnóstico e pesquisa**. FEMS Microbiol Rev. v. 29, pg. 897-910, 2005.

PASSADOR, M. M. *et al.* **Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”**. São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v72\\_1/passador.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v72_1/passador.pdf)> Acesso em 14 out. 2013.

PEREIRA, N. J.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**. Séries em Biotecnologia. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, p. 62, v. 1, 2008. Disponível em: <<http://www.eq.ufrj.br/vestibular/nukleo/pdfs/series-em-biotecnologia-vol-itecnologia-de-bioprocessos.pdf>> Acesso em 03 out. 2013.

QUINN, P.J. *et al.* **Microbiologia e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre, Artmed, p.512, 2005.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni11.pdf>> Acesso em 15 dez. 2013.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. **Manutenção de leveduras por congelamento a - 20°C**. Revista Brasileira Análises Clínicas, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008. Disponível em: <[http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac\\_40\\_01/15.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_40_01/15.pdf)> Acesso em 20 set. 2013.

SMITH, D.; RYAN, M.J. **Situação atual das coleções de fungos e seu papel na biotecnologia**. Handbook of fungal biotechnology, Marcel Dekker, New York, p. 527-538, 2003.

SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 265p, 1992.

SOLA, C.M. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 1398, 2012. Disponível em:  
<<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/manutencao.pdf>> Acesso em 20 out. 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 964, 2011.

WATSON, P. F. **As causas da redução da fertilidade com sêmen criopreservado**. Animal Reproduction Science, London, v.60/61, p.481-492, 2000. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844218>.> Acesso em 01 nov. 2013.

WOLFE, J.; BRYANT, G. **Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects**. International Journal of Refrigeration, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.

## ANEXOS

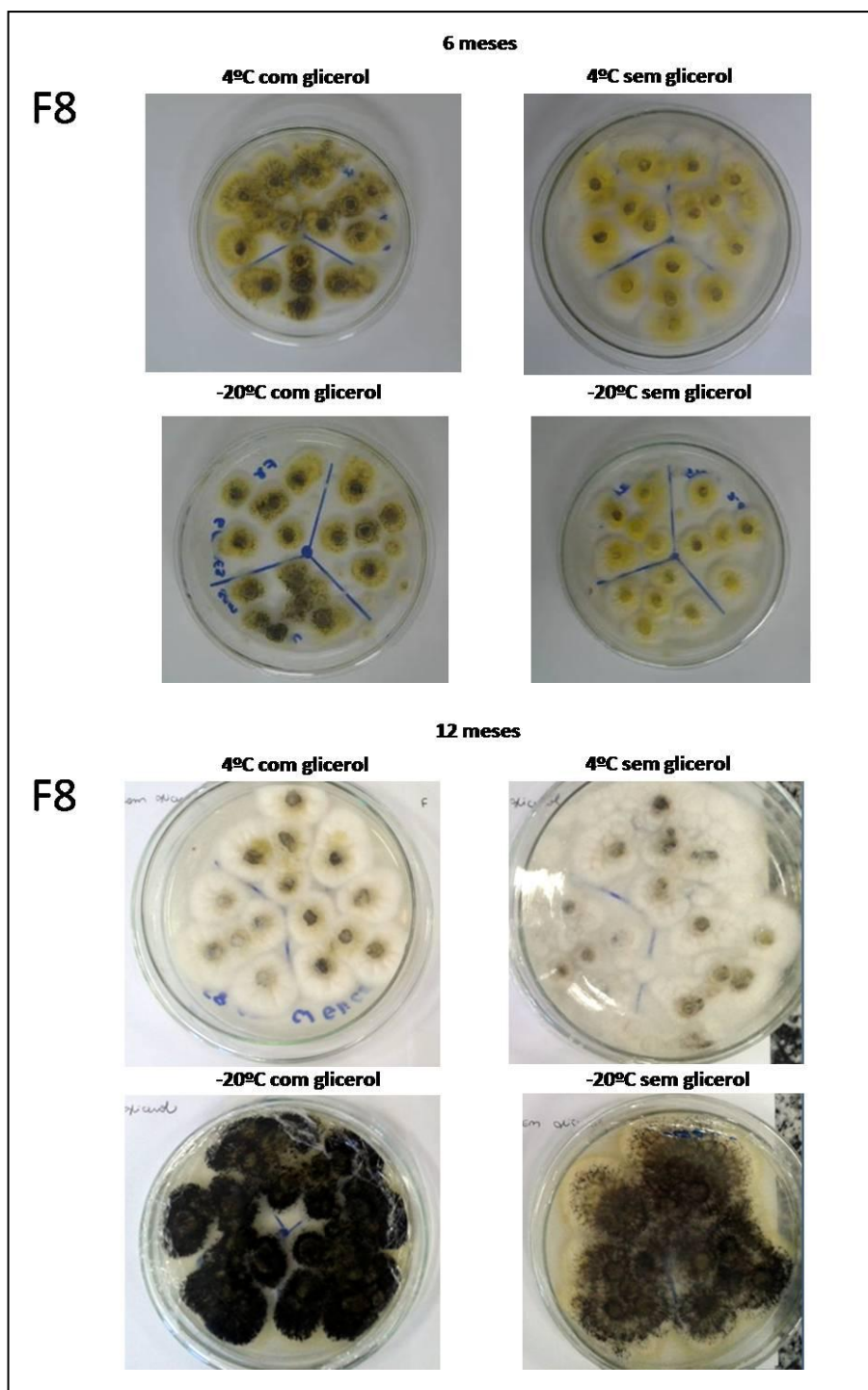


Figura 1. Reativação do fungo F8 após período de preservação de 6 e 12 meses sob diferentes condições de temperatura e adição ou não de crioprotetor.

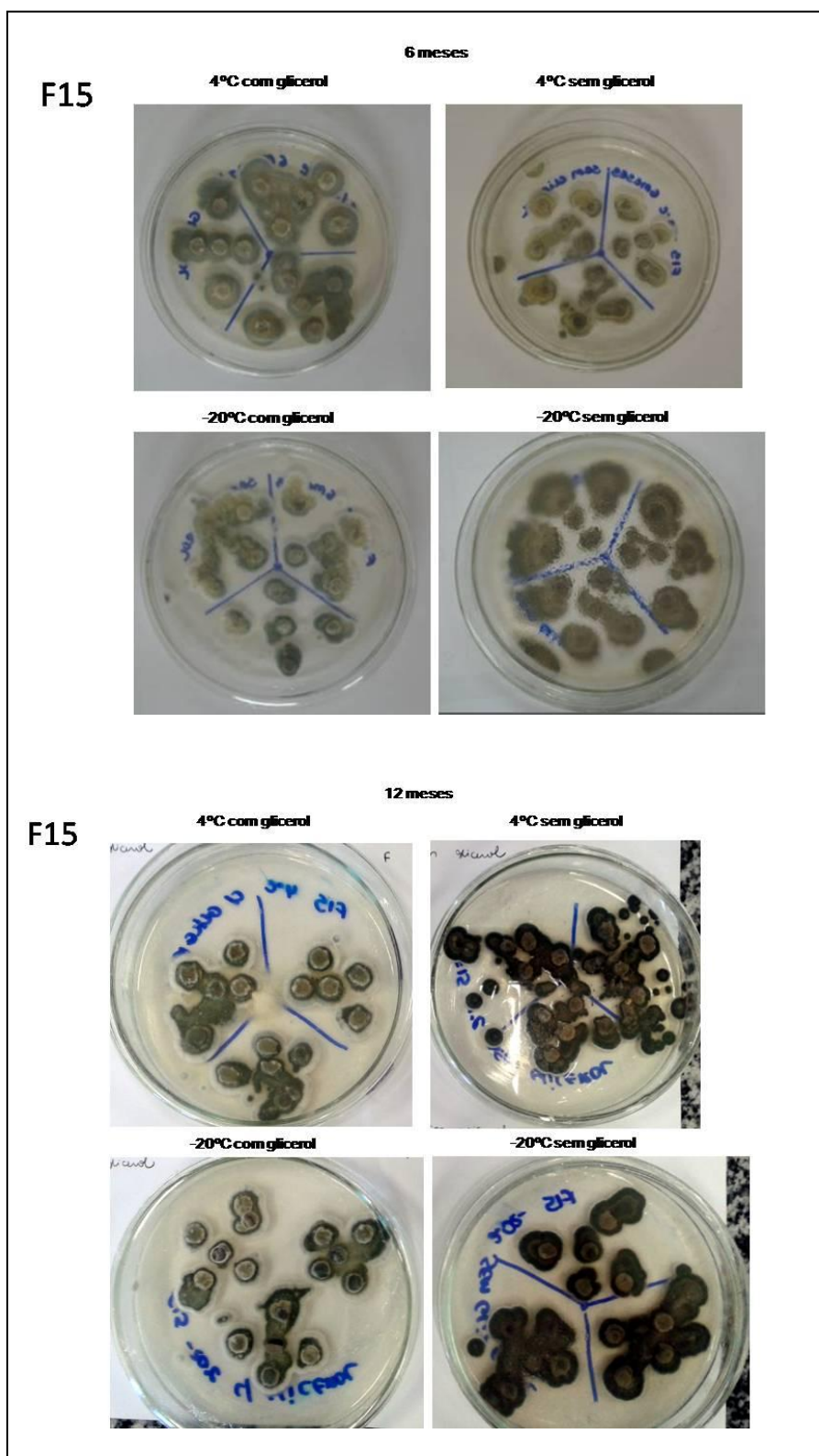


Figura 2. Reativação do fungo F15 após período de preservação de 6 e 12 meses sob diferentes condições de temperatura e adição ou não de crioprotetor.