

## MANUTENÇÃO DE CULTURAS DE *MICROSPORUM CANIS* POR LIOFILIZAÇÃO (OBSERVAÇÃO APÓS 20 ANOS)\*

Hassib ASHCAR \*\*

RIAL-A/380

ASHCAR, H. — Manutenção de culturas de *Microsporum canis* por liofilização (observação após 20 anos). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33: 7-11, 1973.

RESUMO: Foram analisados os caracteres macroscópicos e microscópicos de culturas de *Microsporum canis*, obtidas a partir de preparações liofilizadas e mantidas em refrigerador ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ), durante 20 anos. As culturas liofilizadas mantiveram os caracteres morfológicos e a pigmentação da amostra original. O autor considera o método de liofilização satisfatório para manter por longo tempo a viabilidade e para evitar o pleomorfismo e a degeneração das culturas de *Microsporum canis* Bodin, 1902.

DESCRIPTORIOS: conservação de culturas de fungos; liofilização de fungos.

### INTRODUÇÃO

Nos últimos decênios vários autores têm se preocupado mais intensamente com a manutenção de coleções de culturas de microfungos. As necessidades dos laboratórios das instituições científicas e das indústrias de fermentação podem variar muito com relação ao tipo e ao tamanho da coleção; porém, como assinala SMITH<sup>8</sup>, os seguintes requisitos devem ser sempre observados: manutenção de culturas vivas, puras, pelo tempo que for necessário e com todas as características que a amostra possuía ao ser incluída na coleção.

Com relação a esses requisitos, destaca-se, entre vários métodos utilizados para a manutenção de culturas de microfungos, a liofilização, que tem mostrado resultados satisfatórios, nas pesquisas de vários autores.

O método da liofilização tem sido avaliado, tanto na manutenção de culturas de leveduras como na de fungos filamentosos (bolores).

Trabalhos pioneiros sobre a liofilização de culturas de leveduras, conforme citação de ATKIN *et alii*<sup>2</sup>, são os de Elser *et alii* (1935), Wickerham & Andreasen (1942) e Wickerham & Flickinger (1946). Demonstraram os autores citados que o método da liofilização é satisfatório para conservar células de leveduras, em estado viável, por períodos prolongados de tempo.

Atkin e colaboradores empregaram a técnica usada por Wickerham & Andreasen para a liofilização de várias amostras de leveduras de cerveja, a fim de avaliar a taxa de sobrevivência. As leveduras foram suspensas em soro normal de cavalo, congeladas rapidamente, secadas a alto vácuo e finalmente fechadas. Todas as culturas assim prepara-

\* Trabalho realizado na Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz e do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

das e examinadas, até períodos de três meses, permaneceram vivas. Observaram, entretanto, que a taxa de sobrevivência era muito baixa, pois, fazendo contagens em placa, verificaram que 98,89% das células das leveduras não sobreviviam à liofilização.

BRÉCHOT *et alii*<sup>3</sup> estudaram a influência da velocidade de congelação e da temperatura do banho de congelação sobre a taxa de sobrevivência de leveduras liofilizadas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Concluíram que a congelação deve ser efetuada a uma velocidade ótima, acima ou abaixo da qual se observa diminuição da taxa de sobrevivência das leveduras liofilizadas. Com a aparelhagem de que dispunham, verificaram que a velocidade de congelação, que permitiu obter a taxa de sobrevivência mais elevada (28%), foi conseguida, mergulhando-se as leveduras em recipiente metálico durante um minuto, em banho refrigerante a  $-33^{\circ}\text{C}$ .

Na secagem a vácuo, KRAMER<sup>6</sup> verificou, liofilizando culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens*, *Absidia glauca*, *Rhizopus nigricans* e *Trichophyton tonsurans*, que se provê o ótimo, com umidade residual abaixo de 0,5%. Se a umidade residual da cultura original secada não fôr conhecida, a estocagem deve ser feita à temperatura de  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Com relação ao tempo de viabilidade decorrido após a liofilização de culturas de fungos, investigações importantes foram feitas por FENNELL *et alii*<sup>5</sup>. Esses autores liofilizaram culturas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gladiolium*, *Blakeslea*, *Mucor*, *Phycomyces* e *Rhizopus* e, após a liofilização, fizeram testes de viabilidade, em períodos de tempo que variavam de 34 a 85 meses (7 anos). Os resultados mostraram que todas as culturas mantiveram-se viáveis, sendo que a maioria delas com viabilidade considerada como excelente ou como boa. Verificaram, também, a viabilidade após liofilização de alguns fungos patogênicos. Sete amostras do gênero *Trichophyton*, uma amostra de *Candida albicans* e outra de *Sporotrichum schenkii* mostraram viabilidade excelente; uma cultura de *Cryptococcus neoformans* mostrou viabilidade boa e, finalmente, foram consideradas fracas as viabilidades de uma cultura de *Blastomyces dermatitidis* e de outra de *Histoplasma capsulatum*.

Posteriormente, LEITE & ANTUNES<sup>7</sup> liofilizaram macerado de fragmentos de colônias de fungos agentes etiológicos de tinhas, inclusive de *Microsporium canis*, e observaram viabilidade satisfatória após dois anos.

Observações por períodos de tempo mais prolongados foram feitas por nós, com preparações liofilizadas de *Penicillium notatum* e de *Microsporium canis*. Em nosso trabalho anterior<sup>1</sup>, relatamos que esporos liofilizados de *Penicillium notatum*, conservados em refrigerador a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ , permaneceram viáveis durante 25 anos. Após esse longo período de tempo, a cultura de *Penicillium notatum*, obtida a partir de esporos liofilizados, conservava tanto as características macroscópicas e microscópicas como as propriedades bioquímicas, inclusive a de produzir penicilina, iguais às da cultura original.

A verificação da viabilidade de uma cultura de *Microsporium canis*, 20 anos após liofilização, com exames de controle dos caracteres macroscópicos e microscópicos, constituiu o objetivo deste trabalho.

## MATERIAL E METODOS

### Cultura original

Isolada por nós, em 1952, de cabelo (paciente A.S.S., registro n.º 77 da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz), foi identificada como *Microsporium canis* Bodin, 1902, com base nos caracteres macroscópicos e microscópicos descritos por SWARTZ<sup>8</sup> e por CONANT *et alii*<sup>4</sup>. Esta cultura original apresentava, de início, morfologia típica, com abundância de macroconídios e produção de pigmento amarelo-laranja. Alguns dias após o isolamento e a identificação, a cultura entrou na coleção da referida Seção de Micologia sob o n.º 195, em 15 de abril de 1952, sendo mantida, daí por diante, pelo método usual, isto é, por repiques sucessivos em ágar Sabouraud, a curtos intervalos de tempo. Dez dias após (25.4.52), foram feitas preparações para a manutenção da cultura, também, pelo método líofilo.

### Método de liofilização

A partir de cultivos em meio inclinado de ágar Sabouraud glicosado, foram feitas suspensões, em leite desnatado, de esporos (ma-

croconídios) e de fragmentos do micélio aéreo (hifas). O veículo foi obtido a partir de leite desnatado em pó, ao qual se adicionou água destilada na proporção do leite comum. A suspensão foi distribuída em pequenas ampolas de vidro, 0,5 ml em cada uma. Em seguida, as preparações foram rapidamente congeladas, em mistura de neve carbônica e álcool etílico e secadas no aparelho de Flosdorf. Após a secagem, a vácuo, as ampolas foram fechadas e conservadas em refrigerador a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ . Por ocasião da abertura das ampolas, 20 anos após a liofilização, verificou-se que o vácuo era satisfatório, testando-as com aparelho apropriado.

#### Controle dos caracteres culturais

Feitos em culturas obtidas a partir de preparações liofilizadas de *Microsporium canis*, consistiu na observação dos seguintes caracteres:

a) *Caracteres macroscópicos*: Aspecto, forma, tamanho, cor e produção de pigmento de colônia gigante, desenvolvida em placa de ágar Sabouraud glicosado em temperatura ambiente, durante 14 dias;

b) *Caracteres microscópicos*: Estruturas do micélio vegetativo e reprodutivo, em microculturas em lâmina, e em macroculturas em ágar Sabouraud glicosado.

## RESULTADOS

#### Cultura original

A cultura de *Microsporium canis* que, desde seu isolamento, foi mantida por repiques sucessivos em ágar Sabouraud, em pouco tempo apresentou pleomorfismo. As colônias perderam suas características morfológicas originais, apresentando aspecto cotonoso homogêneo, que não se distingue do de outros dermatófitos que também sofrem, usualmente, pleomorfismo e degeneração.

Os exames microscópicos periódicos do micélio mostraram predominância cada vez mais acentuada de hifas estéreis, sendo a cultura original, finalmente, desprezada por degeneração, em 1957, cinco anos após ter sido isolada.

#### Cultura liofilizada

Os exames de controle dos caracteres macroscópicos e microscópicos da cultura, obtida a partir de preparações liofilizadas de *Microsporium canis*, mostraram o seguinte:

a) *Exame macroscópico*: colônia de aspecto penugento, discóide, medindo cerca de 8 cm de diâmetro, de cor branca, com produção de pigmento amarelo-laranja. Na face aérea da colônia (Fig. 1) distinguem-se três zonas concêntricas: a central, de aspecto cotonoso e com área maior, apresenta centro umbelicado, delimitado por anel penugento saliente, do qual saem pregas radiadas; a intermediária, de aspecto cotonoso-pulverulento, com micélio menos denso e, finalmente, a zona periférica, com aspecto de franja penugenta. O reverso da colônia, de aspecto também penugento, apresenta cor amarelo-laranja, pela pigmentação produzida, que se difunde no meio da cultura (Fig. 2).

b) *Exame microscópico*: micélio constituído de trama de filamentos septados que se ramificam profusamente e apresentam anastomoses freqüentes; microconídios de forma alongada que nascem, lateralmente, das hifas; presença de hifas em raqueta e de hifas denticuladas (*pectinate hyphae*); macroconídios abundantes, fusiformes, de paredes espessas, lisas ou rugosas, freqüentemente multi-septados e encontrados geralmente na terminação das hifas.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Analisando-se os caracteres macroscópicos, inclusive pigmentogênese, e microscópicos observados na cultura obtida a partir de preparações liofilizadas, verifica-se que são iguais aos da cultura original, antes da liofilização, identificada como *Microsporium canis* Bodin, 1902, com base nas descrições de SWARTZ<sup>6</sup> e de CONANT *et alii*<sup>7</sup>.

Comparando-se os tempos de viabilidade de preparações de cultura de *Microsporium canis*, verifica-se que esta observação de 20 anos representa um tempo dez vezes mais prolongado do que o observado por LEITE & ANTUNES<sup>7</sup>, que foi de dois anos.

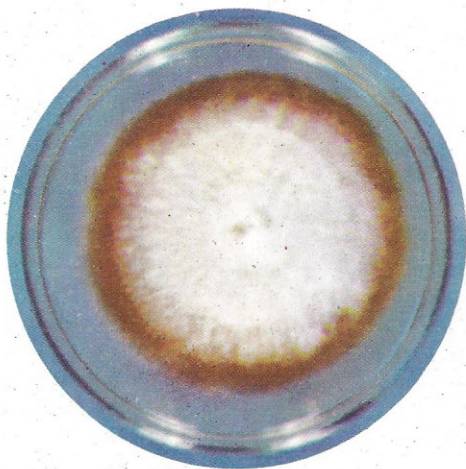


Fig. 1 — Superfície da colônia gigante de *Microsporium canis* desenvolvida 20 anos após liofilização (14 dias de incubação).

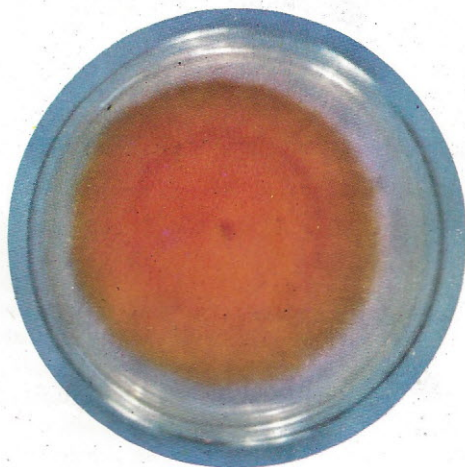


Fig. 2 — Reverso da mesma colônia.

Avalia-se a importância desta observação por duas razões principais: a) pelo interesse que apresenta como fenômeno biológico de sobrevivência de um fungo causador de tinea, decorrido um tempo bastante prolongado após liofilização, tempo esse não observado anteriormente; b) pela conservação dos caracteres macroscópicos e microscópicos, 20 anos após liofilização, de um fungo (dermatófito) que tende facilmente a apresentar pleomorfismo e degeneração, quando mantido pelo método usual, isto é, por repiques sucessivos em meio apropriado de cultura, a curtos intervalos de tempo.

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que: a liofilização é método satisfatório para manutenção de *Microsporium canis*, com capacidade de desenvolvimento de culturas conservando os caracteres macroscópicos e microscópicos, por longo período de tempo — vinte anos ou possivelmente mais.

#### Agradecimentos

Ao Sr. Januário José Delle Cave, pela valiosa colaboração na parte técnica.

RIAL-A/380

ASHCAR, H. — Maintenance of *Microsporium canis* cultures by lyophilization (observation after a period of 20 years). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33: 7-11, 1973.

SUMMARY: The macroscopic and microscopic characteristics of *Microsporium canis* cultures obtained from preparations which had been lyophilized and stored in the refrigerator ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) for 20 years, were analysed.

The lyophilized cultures showed the same morphological characteristics and pigmentation as the original sample.

The author believes that lyophilization is a satisfactory method to preserve viability and to prevent degeneration and pleomorphism of cultures of *Microsporium canis* Bodin, 1902, for a very extended period.

DESCRIPTORS: fungi cultures conservation; fungi lyophilization.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASHCAR, H. — Manutenção de esporos de *Penicillium notatum* por liofilização (Observação durante 25 anos). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30: 81-4, 1970.
2. ATKIN, L.; MOSES, W. & GRAY, P.P. — The preservation of yeast cultures by lyophilization. *J. Bact.*, 57: 575-8, 1949.
3. BRÉCHOT, P.; GUIBERT, L. & CROSON (M<sup>me</sup>) — La lyophilisation des levures (Deuxième part). *Annls Inst. Pasteur* (Paris), 95: 62-72, 1958.
4. CONANT, N.F.; MARTIN, D.S.; SMITH, D.T.; BAKER, R.D. & CALLAWAY, J.L. — Manual of clinical mycology. 2nd ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1946. p. 258.
5. FENNELL, D.I.; RAPER, K.B. & FLICKINGER, M.H. — Further investigations on the preservation of mold cultures. *Mycologia*, 42: 135-47, 1950.
6. KRAMER, K. — Zur Konservierung von SproB- und Sporenpilzen durch Lyophilisation. *Zentbl. Bakt. ParasitKde* (Abt. II) 127(1): 1-9, 1972.
7. LEITE, A.S. & ANTUNES, M.M. — Conservation par lyophilisation des champignons agents étiologiques des teignes. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 149: 1813-5, 1955.
8. SMITH, G. — The maintenance of a culture collection. In: — *An introduction to industrial mycology*. 2nd ed. London, Edward Arnold, 1942. p. 208.
9. SWARTZ, J.H. — Elements of medical mycology. New York, Grune & Stratton, 1943. p. 67-70.

Recebido para publicação em 30 de maio de 1973.

