

A IMPORTÂNCIA DA LIOFILIZAÇÃO NA PRESERVAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspergillus* DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

THE IMPORTANCE OF LYOPHILIZATION IN PRESERVING SPECIES OF THE *Aspergillus* GENUS OF BIOTECHNOLOGICAL INTEREST

MARIA TAMARA FELIPE¹, JADSON BEZERRA^{2,3}, CRISTINA SOUZA-MOTTA^{3,4}, CLEDIR SANTOS^{5*}

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE.

² Pesquisador de Pós-Doutorado da Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE.

³ Doutor(a) em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE.

⁴ Professora da Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE.

⁵ Professor da Universidad de La Frontera – UFRO, Temuco, Chile. Doutor em Química pela Universidade do Porto, Portugal.

* Universidad de La Frontera, Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Av. Francisco Salazar 01145, Temuco, 4811-230 Chile. E-mail: cledir.santos@ufrontera.cl.

RESUMO

Os fungos estão em todos os ecossistemas e apresentam ampla utilização e importância econômica na biotecnologia. Espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. niger* e *A. oryzae*, são amplamente utilizadas em processos biotecnológicos que envolvem a produção de agentes antibióticos, antitumorais, antifúngicos e enzimas. A importância dos fungos para a humanidade gera a necessidade da preservação destes, para garantir sua disponibilidade em utilizações futuras. Pesquisas recentes destacam a importância dos métodos de preservação a longo prazo, em especial a liofilização, na manutenção das características dos indivíduos. O objetivo do presente estudo busca, a partir de dados na literatura, descrever a importância da liofilização na preservação de fungos do gênero *Aspergillus* de interesse biotecnológico. Neste contexto, realizou-se uma pesquisa bibliográfica em bancos de dados e indexadores, selecionando os artigos referentes as áreas de micologia, coleção de culturas de fungos, métodos de preservação, liofilização e a importância de algumas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*. De acordo com os dados da literatura, são necessários estudos mais detalhados para verificar a eficácia desta técnica de preservação na manutenção das características fenotípicas de espécies de *Aspergillus*.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*. *Aspergillus oryzae*. Biotecnologia.

ABSTRACT

Fungi are found in all ecosystems, are widely used and present economical relevance in biotechnology. Species of the genus *Aspergillus*, such as *A. niger* and *A. oryzae*, are widely used in biotechnological processes involving the production of antibiotics, antitumor, antifungal, and enzyme. The importance of fungi for humanity generates the need for their preservation, to ensure their

availability for future use. Recent research highlights the importance of long-term preservation methods, especially freeze-drying in maintaining the characteristics of individuals. The aim of the present study is, based on literature data, to describe the importance of freeze-drying in the preservation of *Aspergillus* fungi of biotechnological interest. In this context, a bibliographic search in databases and indexers was performed and articles referring to the areas of mycology, fungal culture collection, preservation methods, freeze-drying and the importance of some species belonging to the genus *Aspergillus* were assessed and discussed. According to literature data, more detailed studies are needed to verify the effectiveness of this preservation technique in maintaining the phenotypic characteristics of *Aspergillus* species.

Keywords: *Aspergillus niger*. *Aspergillus oryzae*. Biotechnology.

INTRODUÇÃO

O Reino Fungi é composto por espécies amplamente distribuídas na natureza, encontradas em quase todos os ecossistemas, podendo ser uni ou multicelulares de vida livre ou simbiótica, apresentando diversas morfologias (STAJICH, 2017). É considerado como um grupo extremamente vasto e diverso (MENOZZI *et al.*, 2017), com uma riqueza estimada em torno de 5,1 milhões de espécies, das quais apenas cerca de 100 mil foram descritas até ao momento (MENOZZI *et al.*, 2017). A diversidade deste Reino torna necessária a preservação de seus integrantes em coleções de culturas, pois tais infraestruturas são de essencial relevância na preservação, identificação, disponibilidade e geração de conhecimento (PALÁCIO-CABRERA *et al.*, 2016).

Dentre os fungos de importância econômica, destacam-se espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* por possuírem ampla distribuição e por serem produtoras de vários compostos, tais como enzimas, antibióticos, antitumorais e micotoxinas (KRIJGSHELD *et al.*, 2013; ARZANLOU *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019; FRISVAD *et al.*, 2019), como também por algumas de suas espécies serem consideradas como patógenas de humanos e animais (RODRIGUES *et al.*, 2011; SAMSON *et al.*, 2014).

Aspergillus niger e *Aspergillus oryzae* são exemplos de espécies deste gênero que possuem grande importância econômica e industrial na produção de enzimas, ácidos orgânicos e na produção de alimentos asiáticos. Estas espécies são muito utilizadas na indústria alimentar para a manufatura de produtos de consumo humano seguros e, por isso, o seu potencial é reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA, Estados Unidos da América). Considerando a grande importância dos organismos pertencentes ao reino dos fungos, estes necessitam de boas técnicas de manutenção, preservação, como também de identificação e caracterização de linhagens que produzam compostos de importância biotecnológica, farmacêutica e industrial (ARZANLOU *et al.*, 2016; BRANDI; ANDERSEN, 2017; DI COLOGNA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018; MACHIDA; YAMADA; GOMI, 2008).

Entre as diversas técnicas de preservação de microrganismos utilizadas para preservar os fungos filamentosos, podem-se citar: subcultura, óleo mineral, água (método de Castellani), gel de sílica, congelamento em nitrogênio líquido

(criopreservação) e liofilização (SOLA *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*, 2017a), destacando-se dentre estas, a técnica de liofilização, por ser um método a longo prazo e considerado como um dos mais confiáveis e que pode ser utilizado para uma ampla gama de microrganismos (SOLA *et al.*, 2012). Porém, pouco ainda se sabe sobre os efeitos da preservação a longo prazo, na variabilidade das características fenotípicas dos organismos preservados. Com isso, é importante a verificação desses fatores antes e depois dos microrganismos serem submetidos a preservação. Portanto, o presente trabalho busca, a partir de dados na literatura, descrever a importância da liofilização na preservação de fungos do gênero *Aspergillus* de interesse biotecnológico.

METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado por um levantamento bibliográfico de artigos disponibilizados nas plataformas de pesquisa Periódicos Capes, Google Acadêmico, Scielo, PubMed e Science Direct. Para direcionar as buscas nas plataformas foram utilizadas as seguintes palavras-chaves: *Aspergillus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *culture collections*, *fungi*, *freeze drying and preservation methods*. Dos artigos encontrados foram selecionados os que estavam dentro do tema proposto na revisão.

DESENVOLVIMENTO

Os Fungos

O Reino Fungi encontra-se subdividido em sete filos, são eles: *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota* (HIBBETT *et al.*, 2007, TAKAHASHI *et al.*, 2017). Os fungos são caracterizados por ter parede celular composta por quitina e glucanas, por serem eucariotos, uni ou multinucleados, homo ou heterocarióticos, haploides, dicarióticos ou diploides. Apresentando um modo de reprodução que pode ser sexual (cariogamia e meiose), parassexual (cariogamia seguida de aneuploidia) e/ou assexual (divisão nuclear mitótica). Além de serem quimio-heterotróficos (obtendo nutrientes por absorção) (MAIA; CARVALHO-JUNIOR, 2010; TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Os *Chytridiomycota* são caracterizados por possuírem centríolos e flagelos e esporos sexuais chamados oósporos (MAIA; CARVALHO-JUNIOR, 2010). Juntamente com os *Blastocladiomycota* e os *Neocallimastigomycota* fazem, os *Chytridiomycota* compõem o grupo de fungos aquáticos que produzem zoósporos flagelados. Os *Microsporidia* são parasitas obrigatórios que crescem e se reproduzem apenas dentro das células hospedeiras e seus esporos contêm um aparelho de infecção semelhante a um arpão que penetra no plasma do hospedeiro (MONEY, 2016).

Os *Glomeromycota* são caracterizados por formar micorriza arbuscular, unicelulares e multinucleados, não se conhece a reprodução ou esporos sexuais, contudo seus esporos assexuais são denominados glomerosporos. Os *Basidiomycota* apresentam esporos de reprodução sexual denominada basidiosporos, os quais são formados em estruturas especializadas (basídios),

localizados em basidiomas, os quais podem se apresentar com tamanho ressaltado.

Os *Ascomycota* apresentam reprodução sexuada formados em estruturas especializadas denominadas ascas, que de maneira geral ficam protegidos dentro de ascas, este filo se destaca por apresentar espécies importância econômica mundial, como as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (MAIA; CARVALHO-JUNIOR, 2010; MONEY, 2016).

Os fungos são considerados como decompositores, simbiotes, mutualistas e parasitas, desempenhando assim um papel fundamental na natureza (KNIEMEYER, 2011; JONES *et al.*, 2011; ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2018).

Apesar da sua grande importância, estes microrganismos ainda são pouco conhecidos no que diz respeito a sua diversidade. O número total estimado de espécies de fungos é de 1,5 milhão. Porém, até ao momento apenas cerca de 100.000 espécies foram descritas (KNIEMEYER, 2011; SIMÕES *et al.*, 2013), o que ressalta ainda mais a importância da preservação e manutenção de tais organismos.

Segundo Takahashi *et al.* (2017), só no Brasil existem cerca de seis mil espécies, as quais estão subdivididas em 1.246 gêneros, 102 ordens e 13 divisões. Dentre as espécies fúngicas com potencial biotecnológico podemos destacar as do gênero *Aspergillus*, por ser amplamente distribuído mundialmente e pela sua grande importância em diversos setores, como por exemplo, pela sua capacidade de produzir enzimas recombinantes (JONES *et al.*, 2011; ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2018).

O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* está contido na ordem *Eurotiales*, família *Trichocomaceae* (BATTAGLIA *et al.*, 2011). Trata-se de um gênero amplamente distribuído e frequentemente encontrado em regiões de clima tropical a subtropical (MAIA; FRAGA, 2017), crescendo em uma ampla faixa de temperatura que varia de 6-55 °C (KRIJGSHELD *et al.*, 2013). Foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli (ARZANLOU *et al.*, 2016). e atualmente, compreende cerca de 260 espécies de fungos filamentosos.

São caracterizados como saprófitos (presentes no solo e matéria orgânica em decomposição), patógenos de humanos (KRIJGSHELD *et al.*, 2013; ARZANLOU *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018), animais e plantas (KRIJGSHELD *et al.*, 2013), e também são conhecidos por produzirem metabólitos secundários bioativos e enzimas extracelulares, tais como proteases, lipases, amilases e celulasas (ARZANLOU *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018) e ácidos orgânicos, tal como o ácido cítrico, produzido largamente por *Aspergillus niger* (KNIEMEYER, 2011).

Dentre as espécies do gênero *Aspergillus* mais utilizadas em processos biotecnológicos para a produção enzimática, podem-se mencionar *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus*, e *A. versicolor*. Evidenciando as espécies da seção *Nigri*, as quais são mais estudadas devido ao seu potencial na produção de amilase, celulase, pectinase, protease e fitase (MAIA; FRAGA, 2017).

A FDA reconhece a utilização de tais microrganismos na produção de enzimas e também considera que os produtos derivados destes podem ser utilizados para o consumo humano de forma segura. Algumas espécies até detêm o estatuto de Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS), por apresentar baixa toxicidade e por apresentar um histórico de uso no preparo e na produção de alimentos e bebidas (ex. cerveja) (MAIA; FRAGA, 2017).

Os fungos pertencentes a este gênero também desempenham grande importância na saúde, podendo causar doenças em humanos e animais como é o caso da aspergilose, causada especialmente pelas espécies *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. lentulus*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. ustus*, *A. niger* e *A. oryzae* (KNIEMEYER, 2011; VIVEK-ANANTH *et al.*, 2018).

Segundo Vivek-Ananth *et al.* (2018) os resultados de estudos realizados com análises “ômicas” tem se mostrados promissores para a descoberta de novos biomarcadores, por meio da análise de proteomas e secretomas fúngicos, como os das espécies do gênero *Aspergillus*, levando assim ao melhor entendimento da relação fungo-hospedeiro e patogenicidade.

Aspergillus niger

O *Aspergillus niger* é uma espécie que se encontra taxonomicamente inserida na seção *Nigri* do gênero *Aspergillus*, a qual inclui os *Aspergillus* negros (MEIJER *et al.*, 2011). *Aspergillus niger* é uma espécie de fungo filamentosos encontrada no solo, caracterizada por apresentar colônia negra e por crescer geralmente em matéria orgânica em decomposição (SCHUSTER *et al.*, 2002).

Muito isolados desta espécie têm sido encontrados em diferentes posições geográficas do globo, contudo, com maior frequência em regiões mais quentes (SAMSON *et al.*, 2010). Esta espécie é capaz de se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura que varia entre 6 a 47 °C, apresentando crescimento ótimo em temperaturas entre 35 a 37 °C (SCHUSTER *et al.*, 2002; PALACIOS-CABRERA *et al.*, 2005). Além dessa ampla faixa de temperatura, esta espécie também é capaz de crescer em uma ampla faixa de pH que varia entre 1,4 a 9,8. Desta forma, pode-se dizer que estas características conferem a este microrganismo a capacidade de sobreviver em vários ambientes, principalmente ambientes quentes e úmidos (SCHUSTER *et al.*, 2002).

A espécie *Aspergillus niger* possui grande interesse em vários setores econômicos, para indústria química (HOSSAIN *et al.*, 2016) e principalmente para a indústria alimentícia. Consequentemente, *A. niger* tem sido relatada como promissora para a produção de poligalacturonases (PG) a nível industrial (MACIEL *et al.*, 2013) e apresenta um importante potencial na produção industrial de ácidos orgânicos como o ácido cítrico; sendo um dos fungos filamentosos mais utilizados, por desempenhar uma alta produção do ácido e uma mínima produção de metabólitos secundários.

Esta espécie também apresenta importância na produção de várias outras enzimas de interesse comercial (SCHUSTER *et al.*, 2002; BRAAKSMA *et al.*, 2010; KNIEMEYER, 2011; ODONI *et al.*, 2017). Dentre estas enzimas podemos citar as amilases, proteases, hemicelulases, lipases, tanases, celulases, peccinases (SHI *et al.*, 2016), asparaginases, beta-galactosidases, glicose oxidase, glicosidases, fosfolipases e fitases (BRAAKSMA *et al.*, 2010).

De acordo com o tipo de utilização desses microrganismos, eles podem receber o título de GRAS pela FDA, que considera seguro para o consumo humano os produtos derivados obtidos de isolados de *A. niger*, mesmo quando são produtores de micotoxinas em baixas concentrações (SCHUSTER *et al.*, 2002; NASSER *et al.*, 2003; BRAAKSMA *et al.*, 2010; PERRONE *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2016).

Aspergillus oryzae

O *Aspergillus oryzae* é uma espécie que se encontra inserida da secção *Flavi* do gênero *Aspergillus*. Esta espécie é considerada como não patogênica, não apresentando potencial produção de aflatoxinas (FRISVAD *et al.*, 2019). Durante o período de crescimento, apresenta colônias inicialmente brancas e posteriormente amarelo-esverdeadas. A sua temperatura ótima de crescimento é entre 32 a 36 °C. Quanto à sua distribuição geográfica, é encontrado nos cinco continentes. É amplamente utilizado na indústria biotecnológica alimentícia, principalmente na China e no Japão, onde é usado para a produção de alimentos fermentados (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1991; KATAYAMA *et al.*, 2015).

O *Aspergillus oryzae* é considerado como uma variedade domesticada de *A. flavus* (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1991; UDATHA *et al.*, 2015; FRISVAD *et al.*, 2019), gerada através da sua ampla utilização biotecnológica, que fez com que esta espécie fosse domesticada, perdendo algumas de suas características (como caracteres morfológicos e capacidade de produção de aflatoxinas). A origem do seu nome se deu devido ao tipo de aplicação, pois tem sido muito utilizado, em alguns países asiáticos, na fermentação de arroz e soja (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1991).

Há muitos anos, a aplicação deste fungo já havia sido autorizada pelo Ministério de Saúde da Dinamarca (MSD) através de uma permissão para o seu uso na produção de enzimas. O MSD considerou que este organismo cumpre com os requisitos para *Good Industrial Large Scale Practice Organisms* (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1991). Além disso, o longo histórico de uso desse fungo o conduziu ao estatuto de GRAS, atribuído pela FDA (MACHIDA *et al.*, 2005; ODA *et al.*, 2006; KRIJGSHELD *et al.*, 2013; BRANDI; ANDERSEN, 2017). Sua utilização como segura também é apoiada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (MACHIDA; YAMADA; GOMI, 2008).

Coleções de culturas

Para se entender melhor o que são coleções de culturas temos que ter alguns termos bem definidos, são eles: cultura, coleção e cepa. O termo cepa segundo Dijkshoorn, Ursing e Ursing (2000) é comumente usado para indicar uma cultura pura. Na microbiologia, a palavra cultura é aplicada para referir-se a cultivos de microrganismos, como fungos, em substratos específicos (chamados meios de cultura). O termo coleção significa reunião de objetos da mesma natureza. Portanto, coleções de culturas podem ser definida como uma local onde se encontram preservados *ex situ* organismos vivos (RAMIREZ-GARCIA *et al.*, 2016; SBM, 2018), suas células e partes replicáveis; tais como genoma, plasmídeos, vírus e cDNAs (SBM, 2018). As coleções de culturas têm como

objetivo a preservação, manutenção e fornecimento de informações associadas a estes microrganismos, contribuindo de forma direta para estudos de classificação e biodiversidade (SIMÕES *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2016).

De acordo aos dados disponíveis no Centro Mundial de Microrganismos da Federação Mundial de Coleções de Culturas (WFCC), atualmente as coleções de culturas estão distribuídas nos 5 continentes: África com um total de 18 coleções e 17.277 culturas, América com 196 coleções e 583.498 culturas, Ásia com 281 coleções e 1.266.274 culturas, Oceania com 42 coleções e 120.379 culturas e Europa com 250 coleções e 1.126.150 culturas. As três primeiras posições do ranking mundial de países e regiões com maior número de cepas está ocupada atualmente pelos EUA, Bélgica e China, com respectivamente com 32 coleções de cultura e 337.006 cepas, 7 coleções de culturas e 281.040 cepas, e 44 coleções de cultura e 267.982 cepas. O Brasil ocupa a sétima posição com cerca de 84 coleções de culturas registradas e 121.186 cepas (Tabela 1) (WFCC, 2019).

Tabela 1 – Distribuição das coleções de culturas e culturas mundialmente.

Continentes	Coleções de Cultura	Culturas
África	18	17.277
América	196	583.498
Ásia	281	1.266.274
Europa	250	1.126.150
Oceania	42	120.379

Fonte: WFCC (2019).

Mediante um levantamento realizado pelo Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA) e pelo Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICo), foram reconhecidas 26 coleções brasileiras, das quais sete destacam-se por fornecer coleções microbianas e dispor de controle de qualidade, são elas: a Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo/SP; Fiocruz – RJ; EMBRAPA; CBMAI (CPQBA – UNICAMP) Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de Campinas e a Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. A Micoteca URM se destaca por ser um dos mais importantes centros de preservação da biodiversidade fúngica brasileira, contribuindo com a preservação *ex situ* de parte da diversidade de fungos tropicais do Brasil, principalmente das Regiões Norte e Nordeste (BEZERRA *et al.*, 2017).

O aumento de número de coleções de culturas de microrganismos no mundo ocasionou a necessidade de harmonização e acesso a informações disponíveis por estes, surgindo assim em 1972, o primeiro Diretório Mundial de Coleções de Culturas de Microrganismos, o qual estabeleceu o banco de dados CCINFO (*Culture Collections Information Worldwide*) criado a partir da *World Data Center For Microorganisms* (WDCN) (MCCLUSKEY, 2017; WU *et al.*, 2017).

De acordo com CCINF existem 785 coleções de culturas registradas na WFCC, distribuídas em 76 países e regiões, as quais armazenam um total de 3.120.602 cepas de microrganismos, distribuídas entre 1.341.819 bactérias, 824.897 fungos, 38.622 vírus e 32.220 linhagens celulares. Estas coleções de culturas estão inseridas em universidades (323), órgãos governamentais (299),

semigovernamentais (61), privados (52) e em indústrias (24). Dentre os serviços prestados podemos citar: depósitos de patente (112), serviços de armazenamento (350), distribuição (355), identificação (388), treinamento (312) e consulta (314) (Tabela 2) (WFCC, 2019).

Tabela 2 – Distribuição das coleções de culturas nos diversos seguimentos.

Apoiado por	Nº de coleções
Universidade	323
Governamental	299
Semigovernamental	61
Privado	52
Indústria	24

Fonte: WFCC (2019).

Importância das Coleções de Culturas

As coleções desempenham um papel muito importante na preservação de materiais biológicos (SIMÕES *et al.*, 2013; LIMA-NETO *et al.*, 2014; RAMIREZ-GARCIA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016) – como os fungos – principalmente no que se refere à conservação da biodiversidade *ex situ* e a informações relacionadas a estes (LIMA-NETO *et al.*, 2014; RAMIREZ-GARCIA *et al.*, 2016). Desta forma, a manutenção desses microrganismos pode levar a estudos que buscam compreender seu papel no meio ambiente (SOLA *et al.*, 2012), gerando conhecimento, desenvolvimento científico e tecnológico (ABREU; TUTUJIN, 2008; PRAKASH; NIMONKAR; SHOUCHE, 2013; SBM, 2018). Tal compreensão tem grande importância, pois contribui com a biotecnologia através do desenvolvimento de novas aplicações, como também com a biossegurança, fornecendo informações essenciais sobre a patogenicidade de muitos agentes (SMITH, 2012; SIMÕES *et al.*, 2013; FORTI *et al.*, 2016; SMITH; MARTIN; NOVOSSIOLOVA, 2016).

Alguns estudos evidenciam a importância das coleções de culturas para a preservação da biodiversidade relatando principalmente a relevância na manutenção de culturas, suas aplicações e o fornecimento seguro (SMITH, 2012; SIMÕES *et al.*, 2013; SMITH; MARTIN; NOVOSSIOLOVA, 2016) de culturas de interesse biológico e histórico, como por exemplo a preservação das linhagens de *Penicillium* de Fleming (SMITH, 2012).

Métodos de preservação

Inicialmente os fungos eram preservados e mantido pelo método de repicagem contínua. Este método é de curta duração e as cepas ficam sujeitas a mudanças, tanto fisiológicas quanto morfológicas, devido à necessidade de adaptação destas aos meios quimicamente definidos utilizados em sua manutenção. Esta desvantagem fez com que houvesse a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de preservação, que foram sendo desenvolvidos com o objetivo de manter a viabilidade, pureza, evitando mudanças genéticas nos indivíduos, como também levando em consideração o custo, o transporte, a frequência de uso e importância do microrganismo (BLATNIK; GUNDE-CIMERMAN; CIMERMAN, 1994; HOMOLKA, 2012).

Dentre os métodos de preservação empregados para os fungos filamentosos estão: subcultura, óleo mineral, Castellani, gel de sílica, criopreservação e liofilização (SOLA *et al.*, 2012; PRAKASH; NIMONKAR; SHOUCHE, 2013; BEZERRA *et al.*, 2017). Porém, cada técnica possui suas vantagens e desvantagens, e a escolha do método ideal depende das características de cada microrganismo (BLATNIK; GUNDE-CIMERMAN; CIMERMAN, 1994; SIMÕES *et al.*, 2013).

Apesar do desenvolvimento de métodos de preservação de microrganismos, pouco ainda se sabe sobre se estes protocolos utilizados realmente garantem, a longo prazo, o potencial biotecnológico do material biológico. Porém, nenhum método de preservação assume garantir a estabilidade fisiológica total de um indivíduo. É necessário garantir tais aspectos para que essas culturas possam ser usadas por muitos anos em aplicações biotecnológicas, além de atividades didáticas, em estudos comparativos, industriais e experimentais (SOLA *et al.*, 2012; SIMÕES *et al.*, 2013).

Dentre as técnicas mais utilizadas destaca-se a liofilização, por ser um método de longo prazo e por poder ser utilizada para a maioria dos microrganismos (SOLA *et al.*, 2012; PRAKASH; NIMONKAR; SHOUCHE, 2013). Apesar do principal receio quando se trata de métodos de preservação está relacionado aos efeitos sobre a estabilidade das linhagens, pouco ainda se sabe a respeito das reações e transformações morfofisiológicas decorrentes das circunstâncias de armazenamento (SOLA *et al.*, 2012; PRAKASH; NIMONKAR; SHOUCHE, 2013).

Liofilização

A liofilização é uma das técnicas de preservação de microrganismos, a longo prazo, mais utilizadas e considerada até ao momento, como uma das mais eficientes, devido a capacidade de ser utilizada para a maioria dos organismos, garantindo a viabilidade destes por um longo período. Assim como os outros métodos de preservação, a liofilização tem por finalidade manter as características dos microrganismos (viabilidade e estabilidade genética), com o intuito de evitar alterações que possam a vir modificar as suas características (SIMÕES *et al.*, 2013).

Segundo Sola *et al.* (2011) esta técnica pode garantir a viabilidade dos organismos por 17 a 20 anos, podendo ser usada para a maioria deles, exceto para algas e protozoários. Por estes motivos a técnica é utilizada por diversas coleções de culturas no mundo todo, e considerada como método de referência, quando se trata de conservação a longo prazo.

O processo consiste no congelamento das amostras, seguido de desidratação a vácuo (remoção da água por sublimação), até a formação do material liofilizado estável. Apesar de ser um método bastante utilizado, as etapas da técnica podem causar danos celulares, degradação de enzimas e até mesmo morte dos agentes (SOLA *et al.*, 2011). Contudo, o uso desta técnica tem como vantagem garantir o máximo de estabilidade possível para as culturas preservadas, permitir que estas sejam estocadas (ocupando pouco espaço) e transportadas com facilidade em temperatura ambiente, não necessitando inspeção e manutenção frequentes (SOLA *et al.*, 2011; HOMOLKA, 2012).

Por outro lado, a liofilização como método de preservação, tem como desvantagem a necessidade de equipamento para a desidratação do material, o tempo gasto pelo método, o seu custo e a carência com relação a protocolos específicos para cada grupo taxonômico de microrganismo (SOLA *et al.*, 2011; ROJAS-TOBIAS *et al.*, 2013; SIMÕES *et al.*, 2013).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos avaliando a capacidade deste método em preservar as características fenotípicas dos fungos, utilizando para este fim o método de caracterização morfológica e/ou fisiológica de alguns fungos antes e após serem liofilizados, obtendo resultados positivos quanto a manutenção de tais características. Alguns dos trabalhos realizados avaliando este método foram realizados por Ashcar (1973), Berny e Hennerbert (1991), Garcia (2007), Simões *et al.* (2013), Smith (2012) e Soto *et al.* (2017).

CONCLUSÕES

A preservação de fungos é um recurso prático necessário para a atividade didática, de pesquisa e industrial. Para isso, faz-se necessário o uso de técnicas de longo prazo, tal como a liofilização, para garantir manutenção da viabilidade, da pureza, bem como evitando mudanças genéticas nos indivíduos. Portanto, realizar a manutenção, estoque e preservação de fungos por métodos que garantam a longo prazo as características do indivíduo, significa assegurar um patrimônio de culturas permitindo assim uma ampla exploração biológica deste.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 55 - 59, 2018.
- ABREU, M. M. V; TUTUNJI, V. L. Implementação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 236 - 251, 2008.
- ARZANLOU, M. *et al.* Two novel *Aspergillus* species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran. **Mycological Progress**, v. 15, n. 10 - 11, p. 1081 - 1092, 2016.
- ASHCAR, H. Manutenção de culturas de *Microsporum canis* por liofilização - (observação após 20 anos). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 33, p. 7 - 11, 1973.
- BARBESGAARD, P.; HELDT-HANSEN, H. P.; DIDERICHSEN, B., On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 569 - 572, 1992.
- BATTAGLIA, E. *et al.* Analysis of regulation of pentose utilisation in *Aspergillus niger* reveals evolutionary adaptations in *Eurotiales*. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 1, p 31 - 38, 2011.

BERNY, J. F.; HENNEBERT, J. A. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. **Mycologia**, v. 83, n. 6, p. 805 - 815, 1991.

BEZERRA, J. D. P. *et al.* Micoteca URM da UFPE: uma fonte de recursos biológicos do Brasil. Recife. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 13 - 14, p. 47 – 56, 2017.

BLATNIK, J., GUNDE-CIMERMAN, N., CIMERMAN, A. Preservation of rennet producing *Rhizomucor miehei* strain. **Biotechnology Techniques**, v. 8 n. 7, p. 487 - 490, 1994.

BRAAKSMA, M. *et al.* An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining *in silico* predictions with shotgun proteomics data. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 584, 2010.

BRANDI, J.; ANDERSEN, M. R. Aspergilli: Models for systems biology in filamentous fungi. **Current Opinion in Systemns Biology**, v. 6, p. 67 - 73, 2017.

DI COLOGNA, N. M. *et al.* Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, p. 1 - 10, 2017.

COSTA, J. *et al.* Overview of Fungi and Mycotoxin Contamination in *Capsicum* Pepper and in Its Derivatives. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 27, 2019.

FRISVAD, J. C. *et al.* Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 1 - 63, 2019.

FORTI, T. *et al.* Evaluation of a fungal collection as certified reference material producer and as a biological resource center. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 403 - 409, 2016.

GARCIA, A. M. Survival and predatory activity of *Arthrobotrys musiformis* submitted to lyophilization. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1203 - 1206, 2007.

HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509 – 547, 2007.

HOMOLKA, I. Methods of Cryopreservation in Fungi. In: GUPTA, V. K. *et al.* (Eds.). **Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology**, República Tcheca: Fungal Biology, 2012, p. 9 -16.

HOSSAIN, A. H. *et al.* Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in *Aspergillus niger*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 130-145, 2016.

JONES, M. D. M. *et al.* Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. **Nature**, v. 474, n. 7350, p. 200 - 203, 2011.

KATAYAMA, T. *et al.* Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 4, p. 637 - 642, 2015.

KNIEMEYER, O. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3232 - 3243, 2011.

KRIJGSHELD, P. *et al.* Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, n. 1, p. 1 - 29, 2013.

LIMA-NETO, R. *et al.* Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collectio. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515 - 522, 2014.

MACHIDA, M. *et al.* Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1157 - 1161, 2005.

MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. **DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes**, v. 15, n. 4, p. 173 - 183, 2008.

MACIEL, M. *et al.* Production of Polygalacturonases by *Aspergillus* Section *Nigri* Strains in a Fixed Bed Reactor. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1660 - 1671, 2013.

MAIA, L. C.; CARVALHO-JUNIOR, A. A. Introdução: Fungos do Brasil. In: FORZZA, R. C., *et al.* (org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, vol.1. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, p. 43 - 48.

MAIA, T. F.; FRAGA, M. E. 2017. Bioprospecting *Aspergillus* section *Nigri* in Atlantic Forest soil and plant litter. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, p. 1-7, 2017.

MCCLUSKEY, K. A Review of Living Collections with Special Emphasis on Sustainability and Its Impact on Research Across Multiple Disciplines. **Biopreservation Biobank**, v. 15, n. 1, p. 20-30, 2017.

MEIJER, M. *et al.* Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 1, p.19 - 30, 2011.

MENOZZI, C. A. *et al.* Otimização da Síntese do Fluconazol: um Importante Fármaco Antifúngico da Classe dos Azóis. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 3, p. 1216 - 1234, 2017.

MONEY, N. P. Fungal Cell Biology and Development. In: WATKINSON, S.; BODDY, L.; MONEY, N.P. **The Fungi**. Estados Unidos: Academic Press, 2016, p. 37-66.

NASSER, P. P. *et al.* Implicações do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdati* e produção de Ocratoxina a. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1172 - 1175, 2003.

ODA, K. *et al.* Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3448 - 3457, 2006.

ODONI, D. I. *et al.* *Aspergillus niger* secretes citrate to increase iron bioavailability. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1424, p. 1 – 13, 2017.

PALACIOS-CABRERA, H. *et al.* Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 24 - 28, 2005.

PERRONE, G. *et al.* *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 11, p. 1138 - 1150, 2011.

PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y.S. Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 339, p. 1 - 9, 2013.

RAMIREZ-GARCIA, A. *et al.* Proteomics as a Tool to Identify New Targets Against *Aspergillus* and *Scedosporium* in the Context of Cystic Fibrosis. **Mycopathologia**, v. 183, n. 1, p. 273 - 289, 2016.

RODRIGUES, P. *et al.* Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 877 – 892, 2011.

ROJAS-TAPIAS, D., *et al.* Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. **Universitas Scientiarum**, v. 18, n. 2, p. 129-139, 2013.

SAMSON, R. A. *et al.* Food and indoor fungi. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. **CBS Laboratory Manual Series**, v. 2, n. 2, p. 390, 2010.

SAMSON, R.A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SANTOS, C. *et al.* The Chilean Network of Microbial Culture Collections: Establishment and Operation. **Boletín Micológico**, v. 31, n. 2, p. 44-50, 2016.

SBM. **Coleções de Culturas e Taxonomia**. 2018. Disponível em: <http://sbmicrobiologia.org.br/areas/colecoes-de-culturas/>. Acesso em: 23 Jan. 2018.

SCHUSTER, E. *et al.* On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, n. 4 - 5, p. 426 - 435, 2002.

SHI, C. *et al.* Physicochemical properties analysis and secretome of *Aspergillus niger* in fermented rapeseed meal. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. 1- 16, 2016.

SILVA, E. P. *et al.* Seleção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de tanase para inclusão em ração animal. **Pubvet - Medicina Veterinária e Zoologia**, v. 12, n. 2, p. 1 - 7, 2018.

SIMÕES, M. F. *et al.* Polyphasic Identification and Preservation of Fungal Diversity: Concepts and Applications. In: MALIK, A. *et al.* (eds.) Management of Microbial Resources in the Environment. **Springer**, v. 5, p. 91 - 117, 2013.

SMITH, D. Culture Collections. **Advances in Applied Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 73 - 118, 2012.

SOLA, M. C. *et al.* Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.

SOTO, I. *et al.* Will fungal strains preserved in culture collections maintain the same biotechnological performance after years of preservation? In: International workshop advances in Science and Technology of Bioresources. 11, 2017, Chile. **Anais [...]**. Chile: Universidad de La Frontera, 2017. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/49020>. Acesso em: 12 de ago. 2019.

STAJICH, J. E. Fungal genomes and insights into the evolution of the kingdom. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, p. 619-633, 2017.

TAKAHASHI, J. A. *et al.* Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 6, p. 2351 - 2382, 2017.

UDATHA, G. *et al.* Deciphering the signaling mechanisms of the plant cell wall degradation machinery in *Aspergillus oryzae*. **BMC Systems Biology**, v. 9, n. 77, p. 1-20, 2015.

VIVEK-ANANTH, R. P. *et al.* Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6617 - 6632, 2018.

WFCC. **Culture Colletions Information Worldwide**. 2019. Disponível em: <http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/>. Acesso em: 20 Mar. 2019.

WU, L. *et al.* World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide. **Nucleic Acids Research** v. 45, n. 1, p. 611-618, 2017.