Uso de criobolas para criopreservação de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Marcio Hipolito[1], Danielle C. Dias[2], Carolina Lambertini[3,4], Ana M. Cristina R. P. F. Martins[1], Cinthia R. Oliveira[2], Claudia M. Ferreira[2] e Luís Felipe Toledo[4]

[1] *Instituto Biológico, APTA – SAA, Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura (LISA). Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1.252, Vila Mariana, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: hipolito@biologico.sp.gov.br*

[2] *Instituto de Pesca, APTA – SAA. Avenida Francisco Matarazzo, 455, Água Branca, CEP 05501-900, São Paulo, SP, Brasil.*

[3] *Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

[4] *Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Laboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros (LaHNAB). Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil. E-mail: toledolf2@yahoo.com*

Diversas técnicas foram estabelecidas e são amplamente utilizadas para conservação de culturas de fungos microscópicos (Smith, 1983; Morris *et al.,* 1988; Hoffmann, 1990; Boyle *et al.,* 2003; Diogo *et al.,* 2005; Lambertini *et al.,* 2013). Contudo, o aprimoramento destas técnicas é fundamental para evitar uma possível atenuação, contaminação ou mesmo alterações genômicas das linhagens cultivadas e preservadas (Boyle *et al.,* 2003). Para *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), um fungo patógeno de anfíbios, existem protocolos e adaptações para sua criopreservação tanto em ultrafreezer (-80°C) como em nitrogênio líquido (Longcore, 2000; Boyle *et al.,* 2003; Lambertini *et al.,* 2013). Porém, é possível que as técnicas vigentes possam ser substituídas por alternativas mais simples e rápidas que permitam, por exemplo, dispensar o preparo de substâncias crioprotetoras e minimizar o tempo de trabalho laboratorial. Assim, sugerimos a utilização de criobolas como metodologia alternativa para a criopreservação de cepas do *Bd* em ultrafreezer (-80°C) e argumentamos sobre possíveis vantagens de sua utilização frente os protocolos já conhecidos (Longcore, 2000; Boyle *et al.,* 2003; Lambertini *et al.,* 2013).

Protocolo para criopreservação com criobolas

1. **Preparo dos cultivos.** Para a criopreservação devem ser utilizadas culturas puras de *Bd,* inoculadas em meio sólido composto por triptona a 1% (Vieira e Toledo, 2012), por 7 dias de incubação a 17°C em estufa BOD. A viabilidade do fungo é confirmada com a visualização de colônias típicas com zoosporângios globosos e zoósporos ativos se movimentando junto a estas colônias. Após este procedimento, adiciona-se 1,5 mL de água destilada esterilizada em cada placa, agita-se levemente, lavando-se toda a superfície da placa que deve ser deixada em repouso por 30 minutos para a liberação dos zoósporos na água.
2. **Congelamento com criobolas.** Após esta primeira etapa, raspa-se a superfície da placa com alça em "L" e 1 mL deste lavado deve ser transferido para os tubos de criopreservação [utilizamos os tubos da marca "AES Laboratories/France® (cryobilles/cryobeads)"], cobrindo todas as criobolas, conforme orientação do fabricante, agitando-se vigorosamente e deixando o conteúdo em repouso por 10 minutos para impregnar as criobolas. Após esse período, retira-se e descarta-se o excesso do líquido, no maior volume possível. A seguir, armazena-se os tubos em ultra-freezer a -80°C (Fig. 1A).
3. **Reativação.** Para a reativação das cepas criopreservadas, retira-se uma criobola do tubo referente à cepa a ser testada com o auxílio de uma pinça esterilizada, insere-se a mesma em um criotubo (1,5 mL) e aquece-se a 43°C em banho-maria por 45 segundos. Pode-se também realizar o mesmo procedimento sem este aquecimento. A seguir, aloca-se a criobola na superfície de uma placa com meio de cultura triptona 1% previamente preparada e pressiona-se levemente para sua adesão ao meio (Fig. 1B). Sela-se a placa com filme plástico ou Parafilm®, incuba-se em estufa B.O.D. à temperatura de 17°C e aguarda-se o crescimento. A temperatura de incubação pode variar dentro da faixa de crescimento ótimo do fungo que é de 17 a 23°C (Piotrowski *et al.,* 2004).

Considerações sobre o método

O uso de criobolas para preservação e transporte de microrganismos vem se intensificando (Hamon *et al.,* 2011; Domelier *et al.,* 2006; Braun & Sutherland, 2004). Segundo Asha *et al.* (2005), as criobolas (geralmente 25 por tubo) são preenchidas por um líquido de criopreservação e os organismos se aderem facilmente aos grânulos porosos de sua superfície podendo ser removidos individualmente para inoculação. Estes autores desenvolveram estudos sobre o armazenamento e criopreservação da bactéria *Clostridium difficile* em criobolas e afirmam que este material apresentou a mesma eficiência que os métodos convencionais. No Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, foram realizados experimentos com a finalidade de verificar a eficiência das criobolas para criopreservação e a elaboração de protocolos sobre sua utilização e reativação de cepas de *Bd.* Após 3 e 4 dias de incubação já se notava o crescimento das colônias típicas do *Bd* junto às criobolas e a atividade dos zoósporos. Assim, foi constatada a viabilidade das colônias

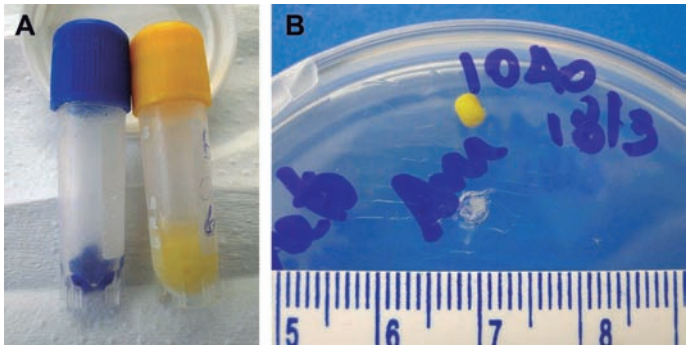


Figura 1: Criotubos contendo criobolas (assim como fornecidos pelo fabricante) (A) e uma criobola sobre meio de cultura sólido (B). As cores das criobolas somente auxiliam na organização da coleção, mas são iguais e possuem as mesmas propriedades.

criopreservadas. Após 7 dias de cultivo, nas mesmas condições de incubação, a cultura foi repicada em outras placas com meio de cultura mostrando-se viável. Com ou sem aquecimento, houve recuperação das amostras.

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 ocorrência excessiva de mutações que alterem suas características originais (Boyle *et al.,* 2003; Diogo *et al.,* 2005). Além disso, procura-se adequar a escolha de uma técnica de conservação baseando-se nas particularidades do agente, nas características do próprio método a ser aplicado, nos custos de manutenção da técnica, da importância do acervo e principalmente na capacidade laboratorial e disponibilidade de equipamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa no Estado de São Paulo – Processos: 2011/50009-9; 2011/51694-7) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Processos: 405285/2013-2; 302589/2013-9; 307017/2012-5) por financiamentos e bolsa de produtividade.

REFERÊNCIAS

Asha, N. J.; Fawley, N. W.; Freeman, J. e M. H. Wilcox. 2005. Increase rate of DNA recovery from United Kingdom Epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains cryogenically. *Journal of Clinical Microbiology,* 43(11): 5794-5795.

Boyle, D. G.; A. D. Hyatt; P. Daszak; L. Berger; J. E. Longcore; D. Porter; S. G. Hengstberger e V. Olsen. 2003. Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes. *Disease of Aquatic Organisms,* 56: 59-64.

Braun, P. e J. P. Sutherland. 2004. Predictive modelling of growth and enzymatic synthesis and activity by a cocktail of *Yarrowia lipolytica, Zygosaccharomyces bailii* and *Pichia anômala. Food microbiology,* 21(4): 459-467.

Diogo, H. C.; A. Sarpieri e M. C. Pires. 2005. Fungi preservation in distilled water. *Anais Brasileiro de Dermatologia,* 80(6): 591-594.

Domelier, A. S.; Mee-Marquet, N. V.; Grandet, A.; Mareghetti, L.; Rosenau, A. e R. Quentin. 2006. Loss of Catabolic Function in *Streptococcus agalactiae* Strains and Its Association with Neonatal Meningitis. *Journal of Clinical Biology,* 44(9): 3245-3250.

Hamon, E.; Horvatovich, P.; Izquierdo, E.; Bringel, F.; Marchioni, E.; Werner, D. e S. Ennahar. 2011. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of the key proteins in bile tolerance. *Biomedcentral Microbiology,* (11): 63.

Hoffmann, P. 1990. Cryopreservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7, 92-94. Technical Information Sheet No. 5.

Lambertini, C.; D. Rodriguez; F. B. Brito; D. S. Leite e L. F. Toledo. 2013. Diagnóstico do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis. Herpetologia Brasileira,* 2(1): 12-17.

Longcore, J. E. 2000. Recognizing, isolating, and culturing *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Integrated research challenges in Enviromental Biology.* Fevereiro 2012, http://irceb.asu.edu/amphibians/pdf/IsolatingBatrach.doc.

Morris, G. J.; D. Smith e G. E. Coulsonl. 1988. A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi. *Journal of General Microbiology,* 134: 2897-2906.

Piotrowski, J. S.; S. L. Annis e J. E. Longcore. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis,* a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia,* 96(1): 9-15.

Smith, D. 1983. Cryoprotectants and the cryopreservation of fungi. *Transactions of the British Mycological Society,* 80(2): 360-363.

Vieira, C. A. e L. F. Toledo. 2012. Isolamento, cultivo e armazenamento do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis. Herpetologia Brasileira,* 1(1): 18-19.



Phyllomedusa burmesteri, **Caraça, MG - Foto:** José Pombal Jr.