

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS FÚNGICAS EM DIFERENTES TIPOS DE ARMAZENAMENTO

Kéttlin Ruffatto¹, Jeferson Henrique Ziem², Mônica Jachetti Maciel³

Resumo: A preservação das micotecas em laboratórios é importante para futuros estudos. O objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade das células fúngicas em diferentes condições de armazenamentos. Os experimentos foram realizados em triplicatas com os gêneros *Curvularia*, *Fusarium*, *Botrytis* e *Penicillium*. Os fungos foram mantidos em cinco diferentes tipos de armazenamento, que foram: ágar inclinado com glicerol, ágar inclinado, glicerol em microtubos estéreis, pequenos fragmentos de ágar e água destilada, em três temperaturas diferentes: temperatura ambiente (23 °C), geladeira (5 °C) e congelador (-20 °C). A viabilidade foi observada após 15, 30, 45 e 60 dias. Dentre as condições aplicadas, os que obtiveram os melhores resultados, *Curvularia* obteve maior nota em pequenos fragmentos de ágar em temperatura ambiente, água destilada em temperatura ambiente e temperatura de geladeira até os 60 dias. Já o gênero *Fusarium* atingiu nota máxima em fragmentos de ágar em temperatura ambiente e temperatura de geladeira e água destilada também em temperatura ambiente e temperatura de geladeira. Entretanto, o gênero *Botrytis* demonstrou um melhor crescimento tendo nota máxima em ágar inclinado em temperatura ambiente, hifas no glicerol em temperatura de geladeira, fragmentos de ágar em temperatura de congelamento e água destilada em temperatura ambiente, temperatura de geladeira e temperatura de congelador durante o período observado. *Penicillium* apresentou nota máxima em fragmentos de ágar em temperatura de geladeira e com água destilada em temperatura ambiente, nos 60 dias. Todos os gêneros obtiveram os melhores resultados com água destilada em temperatura ambiente.

Palavras-chave: Coleção de culturas. Fungos filamentosos. Solo.

EVALUATION OF THE VIABILITY OF FUNGAL CELLS IN DIFFERENT TYPES OF STORAGE

Abstract: The preservation of library collections in laboratories is important for future studies. The objective of this work was to evaluate the viability of fungal cells in different storage conditions. The experiments were

- 1 Bióloga e mestrandia, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado, RS, Brasil. E-mail: kruffatto@universo.univates.br
- 2 Estudante do curso de Ciências Biológicas (Bacharelado), do Centro de Ciências Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), da Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado, RS, Brasil. E-mail: jeferson.ziem@universo.univates.br
- 3 Bióloga, doutora em Ciências Veterinárias (UFRGS), professora do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), do Programa de Pós- Graduação em Sistemas Ambientais Sustentáveis (PPGSAS), da Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado, RS, Brasil. E-mail: monicajm@univates.br

-- ARTIGO RECEBIDO EM 17/06/2020. ACEITO EM 20/05/2021. --

carried out in triplicates with the genera *Curvularia*, *Fusarium*, *Botrytis* and *Penicillium*. Fungus were stored in five different types of storage, which were: inclined agar with glycerol, inclined agar, glycerol in sterile microtubes, small fragments of agar and distilled water in three different temperatures: room temperature (23 °C), refrigerator (5 °C) and freezer (-20 °C). Viability was observed after 15, 30, 45 and 60 days. Among the conditions applied, the ones that obtained the best results, *Curvularia* obtained a higher grade in small fragments of agar at room temperature, distilled water at room temperature and refrigerator temperature up to 60 days. The genus *Fusarium* reached a maximum grade in agar fragments at room temperature and refrigerator temperature and distilled water also at room temperature and refrigerator temperature. However, the genus *Botrytis* showed a better growth having a maximum grade in inclined agar at room temperature, hyphae in glycerol at refrigerator temperature, agar freezing temperature fragments and distilled water at room temperature, refrigerator temperature and freezer temperature. *Penicillium* presented a maximum note on agar fragments at refrigerator temperature and with distilled water at room temperature in the 60 days. All genera obtained the best results with distilled water at room temperature.

Keywords: Collection of cultures. Filamentous fungi. Soil.

1 Introdução

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos) (MOURA et al., 2016). A estrutura desses organismos é basicamente formada por filamentos chamados de hifas que em conjunto é denominado micélio. O micélio pode ter duas formas distintas: micélio vegetativo que é aquele que se fixa no substrato absorvendo assim os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento e o micélio reprodutivo que produz esporos para promover sua reprodução (ALMEIDA, 2015), a técnica de microcultivo é usada para visualizar com mais detalhes essas estruturas (RIBEIRO; STELATO, 2011).

Existem espécies macroscópicas (cogumelos) e microscópicas que são conhecidas como bolores ou mofo e as leveduras (PUTZKE, 2004). São encontrados em praticamente todos os lugares e sua alimentação se dá por meio da absorção de matéria-orgânica existente no solo, na água, nos animais e nas plantas hospedeiras (TORTORA et al., 2012). Devido a essa característica são considerados ótimos decompositores e podem ser utilizados como fertilizantes de solo (MOURA et al., 2016).

Nas plantas, são benéficos por fornecem nutrientes e água, favorecendo assim, a retenção de umidade, agregação e a estabilidade dos solos como simbiontes obrigatórios chamados de fungos micorrízicos (SOUZA et al., 2003). Dentre os gêneros mais encontrados no solo estão *Botrytis*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium* (BORGES et al., 2011).

Estudos como o de Colla e colaboradores (2008) mostraram que fungos filamentosos como o *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* conseguem se desenvolver em meio contaminado com atrazina indicando a possibilidade de utilização desses organismos em estudos de biorremediação de solos contaminados com herbicidas triazínicos, usados para controle de ervas daninhas. Já os fungos entomopatogênicos têm grande versatilidade e podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento de insetos considerados pragas em plantações, sendo muito utilizados no controle biológico (DE CASTRO, 2016).

Por isso, a preservação destes indivíduos por longos períodos de tempo em laboratório é importante para estudos científicos e aplicações tecnológicas. As coleções de culturas são centros de conservação que tem a função de coletar organismos relevantes, tornando-os

disponíveis para usuários interessados. Os maiores problemas encontrados na preservação durante períodos prolongados são garantias da sobrevivência microbiana, conservação das características morfológicas, fisiológicas, genéticas, pureza dos isolados e a contaminação por parte de outros fungos, bactérias e ácaros (ABREU; TUTUNJI, 2005; CANHOS *et al.*, 2007).

Os principais métodos de preservação de fungos utilizados são temperaturas baixas, nitrogênio líquido, sílica-gel, solo ou areia, tecidos secos do hospedeiro, repicagens periódicas, água destilada ou método de Castellani, liofilização e óleo mineral (BUENO *et al.*, 2006). A escolha do método de preservação deve levar em conta o baixo custo de manutenção, facilidade no armazenamento, importância do acervo e principalmente da disponibilidade de equipamentos (ABREU; TUTUNJI, 2005). Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de células fúngicas em diferentes condições de armazenamento.

2 Material e Métodos

2.1 Isolamento de fungos

Os fungos utilizados no trabalho foram isolados de solos coletados em uma propriedade rural, localizada no interior do município de Arroio do Meio, situado no Vale do Taquari – Rio Grande do Sul.

Após a remoção de sujidades superficiais, as massas de solo foram coletadas ao acaso, com o auxílio de um trado modificado, em uma parcela de aproximadamente 1 m². As amostras foram coletadas em cinco pontos diferentes, amostrando-se os cantos e o centro do quadrante, e a dimensão desta amostragem era de 10 cm de diâmetro e 5 cm de profundidade.

As amostras dos solos coletados foram armazenadas em um balde plástico previamente desinfetado com álcool 70° GL, após esta coleta, as amostras foram homogeneizadas e transferidas para um saco de *stomacher* estéril, colocadas em uma caixa de isopor contendo gelo e transportadas até a Universidade do Vale do Taquari – Univates, no laboratório de Microbiologia Didático. Em seguida, as amostras foram seca durante 24 horas, a 25 °C em estufa bacteriológica. Deste material se fez diluições decimais sucessivas e em seguida, o isolamento de diversos fungos. Para as avaliações da viabilidade fúngica foram utilizados os diferentes gêneros de fungos filamentosos: *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia* e *Botrytis*.

2.2 Avaliação da viabilidade fúngica

Os experimentos foram realizados em triplicata. Para o armazenamento dos fungos foram utilizadas cinco metodologias, que foram: preservação em ágar inclinado, preservação em ágar inclinado com glicerol, preservação em glicerol (hifas/espores), preservação em pequenos fragmentos de ágar e preservação com água destilada estéril.

Para a preservação em ágar inclinado foram utilizados aproximadamente 5 mL de ágar *Sabouraud* Dextrose (SAB) em cada tubo de ensaio. Estriou-se os fungos no ágar e

em seguida os tubos foram incubados a temperatura de 25 °C por 5 dias (ALVES; FARIA, 2010).

Na preservação em ágar inclinado com glicerol foram utilizados aproximadamente 5 mL de ágar SAB inclinado em cada tubo de ensaio. Estriou-se os fungos no ágar e em seguida os tubos foram incubados a temperatura de 25 °C por 5 dias. O glicerol estéril foi adicionado aos tubos após o fungo já ter se desenvolvido (BUENO, 2006).

Na metodologia de preservação em glicerol (hifas/espores), primeiramente os fungos foram incubados em ágar SAB a 25 °C por 5 dias. Após este período, as hifas dos fungos foram raspadas com o auxílio de uma alça de inoculação de aproximadamente 10 µL e colocadas em microtubos estéreis com glicerol (GIRÃO *et al.*, 2004).

A preservação em pequenos fragmentos de ágar foi realizada após a incubação dos fungos em ágar SAB a 25 °C por 5 dias. Pequenos fragmentos de ágar de 0,5 x 0,5 cm com o fungo desenvolvido foram transferidos para microtubos estéreis (DELLARETTI, 2014).

A preservação por método de Castellani foi feita da seguinte forma: Após a incubação dos fungos em ágar SAB a 25 °C por 5 dias foram transferidos pequenos fragmentos de ágar de 0,5 x 0,5 cm em microtubos estéreis. Junto com o fragmento de ágar com o fungo crescido se acrescentou água destilada estéril (CASTELLANI, 1967).

Os tubos e microtubos com os fungos foram identificados adequadamente e armazenados em temperatura ambiente (23 °C), geladeira (+/- 5 °C) e congelador (-20 °C).

Após o armazenamento dos diferentes métodos descritos acima, os fungos foram testados quanto à viabilidade. Este estudo foi realizado após 15, 30, 45 e 60 dias do armazenamento. Os fungos dos tubos com ágar inclinado (com e sem glicerol) foram estriados em ágar SAB. Isso também ocorreu com os fungos mantidos armazenados em glicerol, em pequenos pedaços de ágar e em água. Após a incubação por 25 °C/ 5 dias, as colônias desenvolvidas a partir das estruturas foram avaliadas quanto ao vigor de acordo com a seguinte escala de notas conforme Bueno (2006), porém, com adaptações, pois as estruturas foram observadas macroscopicamente, como pode ser observado na Figura 1.

- 0 – Ausência de germinação;
- 1 – Germinação de algumas estruturas;
- 2 – Germinação de todas as estruturas com micélio pouco vigoroso;
- 3 – Germinação de todas as estruturas com micélio vigoroso, mantendo as características de esporulação e de aparecimento de novas estruturas de resistência.

Para evitar a avaliação de fungos contaminantes das culturas, as características macro e micromorfológicas dos isolados foram observadas. Para o estudo macroscópico foram observadas a superfície e o reverso das colônias, quanto ao diâmetro, cor dos conídios e micélio, textura, presença de exsudatos e pigmentos solúveis. As estruturas microscópicas, como conidióforos, foram analisadas por meio de microcultivo.

3 Resultados e Discussão

O gênero *Curvularia* obteve maior nota em pequenos fragmentos de ágar em temperatura ambiente, água destilada em temperatura ambiente e temperatura de geladeira após os 60 dias (Tabela 1). Já o gênero *Fusarium* atingiu nota máxima em fragmentos de ágar em temperatura ambiente e temperatura de geladeira e água destilada também em temperatura ambiente e temperatura de geladeira. Porém não se manteve viável após 45 dias em temperatura ambiente e temperatura de congelador em ágar inclinado e temperatura de congelador em ágar inclinado com glicerol, após 30 dias em temperatura ambiente em ágar inclinado com glicerol e água destilada em temperatura de congelador, após 15 dias em temperatura de congelador com hifas no glicerol (Tabela 2). Entretanto, o gênero *Botrytis* demonstrou um melhor crescimento tendo nota máxima em ágar inclinado em temperatura ambiente, hifas no glicerol em temperatura de geladeira, fragmentos de ágar em temperatura de congelamento e água destilada em temperatura ambiente, temperatura de geladeira e temperatura de congelador, nos 60 dias (Tabela 3). *Penicillium* apresentou nota máxima em ágar inclinado em temperatura de geladeira, fragmentos de ágar em temperatura de geladeira e com água destilada em temperatura ambiente, nos 60 dias, porém após os 45 dias não apresentou crescimento em temperatura ambiente com ágar inclinado e temperatura ambiente em ágar inclinado com glicerol (Tabela 4).

Tabela 1- Avaliação da viabilidade fúngica de *Curvularia*

Condições de armazenamento/ Temperaturas		Período de armazenamento (dias)			
		15	30	45	60
Ágar inclinado	T. A.	3	2	2	2
	T. G.	3	3	2	2
	T. C.	3	2	2	3
Ágar inclinado com glicerol	T. A.	3	2	2	2
	T. G.	3	3	2	2
	T. C.	3	3	2	2
Glicerol (hifas/ esporos)	T. A.	2	1	1	1
	T. G.	3	3	2	2
	T. C.	3	3	2	2
Pequenos fragmentos de ágar	T. A.	3	3	3	3
	T. G.	3	3	2	2
	T. C.	3	3	2	2
Método Castellani	T. A.	3	3	3	3
	T. G.	3	3	3	3
	T. C.	3	3	2	2

T. A.: Temperatura ambiental (23 °C);

T. G.: Temperatura de geladeira (5 °C);

T. C.: Temperatura de congelamento (-20 °C).

Fonte: Os autores.

Tabela 2 – Avaliação da viabilidade fúngica de *Fusarium*

Condições de armazenamento/ Temperaturas		Período de armazenamento (dias)			
		15	30	45	60
Ágar inclinado	T. A.	3	3	1	0
	T. G.	3	2	1	1
	T. C.	3	2	2	0
Ágar inclinado com glicerol	T. A.	3	2	0	0
	T. G.	3	2	1	1
	T. C.	3	2	2	0
Glicerol (hifas/ esporos)	T. A.	0	3	3	2
	T. G.	0	0	3	2
	T. C.	3	0	0	0
Pequenos fragmentos de ágar	T. A.	3	3	3	3
	T. G.	3	3	3	3
	T. C.	3	1	1	1
Método Castellani	T. A.	3	3	3	3
	T. G.	3	3	3	3
	T. C.	3	2	0	0

T. A.: Temperatura ambiental (23 °C);

T. G.: Temperatura de geladeira (5 °C);

T. C.: Temperatura de congelamento (-20 °C).

Fonte: Os autores.

Tabela 3 - Avaliação da viabilidade fúngica de *Botrytis*

Condições de armazenamento/ Temperaturas		Período de armazenamento (dias)			
		15	30	45	60
Ágar inclinado	T. A.	3	3	3	3
	T. G.	3	2	2	2
	T. C.	3	2	2	2
Ágar inclinado com glicerol	T. A.	3	2	2	2
	T. G.	3	2	2	2
	T. C.	3	2	2	2
Glicerol (hifas/ esporos)	T. A.	3	2	2	2
	T. G.	3	3	3	3
	T. C.	3	3	2	2
Pequenos fragmentos de ágar	T. A.	3	3	2	2
	T. G.	3	2	2	2
	T. C.	3	3	3	3
Método Castellani	T. A.	3	3	3	3
	T. G.	3	3	3	3
	T. C.	3	3	3	3

T. A.: Temperatura ambiental (23 °C);

T. G.: Temperatura de geladeira (5 °C);

T. C.: Temperatura de congelamento (-20 °C).

Fonte: Os autores.

Tabela 4 – Avaliação da viabilidade fúngica de *Penicillium*

Condições de armazenamento/ Temperaturas		Período de armazenamento (dias)			
		15	30	45	60
Ágar inclinado	T. A.	3	3	3	0
	T. G.	3	3	3	3
	T. C.	3	2	2	2
Ágar inclinado com glicerol	T. A.	3	2	2	0
	T. G.	0	0	0	0
	T. C.	0	0	0	0
Glicerol (hifas/ esporos)	T. A.	3	2	2	2
	T. G.	3	1	1	1
	T. C.	3	1	1	1
Pequenos fragmentos de ágar	T. A.	3	3	3	2
	T. G.	3	3	3	3
	T. C.	3	3	2	2
Método Castellani	T. A.	3	3	3	3
	T. G.	3	3	2	2
	T. C.	3	3	2	2

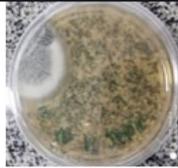
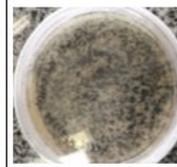
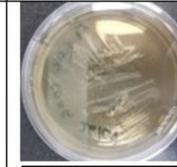
T. A.: Temperatura ambiental (23 °C);

T. G.: Temperatura de geladeira (5 °C);

T. C.: Temperatura de congelamento (-20 °C).

Fonte: Os autores.

Figura 1- Avaliação macroscópica da viabilidade fúngica

Notas Fungos	Nota três	Nota dois	Nota um	Nota zero
<u>Curvularia</u>				
<u>Fusarium</u>				
<u>Botrytis</u>				
<u>Penicillium</u>				

Fonte: Os autores.

Abreu e Tuntuji (2013) observaram que a preservação com glicerol em temperatura de congelamento à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ é adequada para bactérias. Porém, por terem a estrutura diferenciada essa técnica não é recomendada para leveduras devido ao alto grau de decaimento na viabilidade. No presente estudo, somente o gênero *Fusarium* não germinou nessa condição aos 60 dias, demonstrando assim não ser o método mais eficaz.

O glicerol limita a quantidade de oxigênio disponível, fazendo com que o fungo reduza seu metabolismo e consequentemente sua taxa de multiplicação (ROMEIRO, 2006), é provável que seja o motivo pelo qual os gêneros *Penicillium* e *Fusarium* não germinaram nas condições de glicerol em temperatura ambiente e temperatura de congelador. Outro possível motivo é por terem sido expostos por muito tempo ao agente crioprotetor tornando-se assim tóxico para esses gêneros (ABREU; TUNTUJI, 2013). Assim como o estudo de Dellaretti (2014) a maioria dos fungos filamentosos armazenados em geladeira ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e congelador ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) com e sem glicerol no período de 6 e 12 meses não obtiveram viabilidade 100%.

Uma hipótese para o crescimento nulo, quando armazenados em temperatura de congelador, pode ser o fato da ação microbiana cessar ou diminuir à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Entretanto,

criaram melhor quando armazenados em temperatura ambiente, possivelmente por serem fungos do solo e acostumados com temperaturas de 25 °C à 35 °C (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Todavia, para os resultados de armazenamentos com água em congelador (-20 °C) se dá pela formação de cristais de gelo dentro da célula fúngica no momento do congelamento, rompendo assim a parede celular acarretando em um dano na estrutura (ABREU; TUNTUJI, 2013).

Diogo, Sarpieri e Pires (2005) concluíram que o método com água destilada em temperatura ambiente é o mais eficiente para armazenamento de *Penicillium* e *Fusarium* durante doze meses, assim como Almeida (2015) concluiu que esse método é econômico, de fácil manejo, eficiente e aplicável para uma grande variedade de fungos filamentosos. O presente trabalho também demonstrou essa eficiência e todos os isolados se mostraram viáveis até os 60 dias nesta mesma condição.

4 Conclusão

Todos os gêneros demonstraram comportamentos diferentes. Para o gênero *Curvularia* os métodos de maior eficiência durante os 60 dias foram fragmentos de ágar em temperatura ambiente, água destilada em temperatura ambiente e geladeira. Já o gênero *Fusarium* se mostrou mais sensível, sendo os métodos que mais se destacaram positivamente foram fragmentos de ágar em temperatura ambiente e geladeira, água destilada em temperatura ambiente e geladeira, os métodos menos indicados para esse gênero são ágar inclinado com glicerol e hifas no glicerol em temperatura de congelador. Para o *Botrytis* os métodos recomendados são ágar inclinado em temperatura ambiente, hifas no glicerol em temperatura de geladeira, pequenos fragmentos de ágar em temperatura de congelador e água destilada em temperatura ambiente, temperatura de geladeira e temperatura de congelador. Para o gênero *Penicillium* os mais indicados são pequenos fragmentos de ágar em temperatura de congelador e água destilada em temperatura ambiente.

Em relação aos métodos utilizados no presente trabalho, o método com água destilada em temperatura ambiente se mostra o mais vantajoso, pois além de ter alta taxa de viabilidade e preservar as características dos isolados, trata-se de um método simples, de baixo custo e não ocupa espaço.

Referências

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de Culturas de microorganismos do UniCEUB. Brasília, **Universitas Ciências da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 236-25, 2005.

ALMEIDA, M. V. A. **Identificação de Fungos Filamentosos Presentes em um Biorreator de Resíduos Sólidos Urbanos**. 2015. Dissertação de Mestrado. Campina Grande, Pernambuco, 2015.

ALVES, R. T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. 1 ed. EMBRAPA. Platina, Distrito Federal. 2010.

BORGES, L. R.; LAZZARI, S. M. N.; PIMENTEL, I. C.; NOVA, M. X. V. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 185-194, 2011.

BUENO, C. J. Métodos de Preservação para Fungos Fitopatogênicos Habitantes do Solo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, n. 2, 2006.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathol**, v. 32, n. 1, p. 42-50, 2006.

CANHOS, V. P.; SETTE, L. D., CUPOLILLO, E., TIGANO, M. S., VAZOLLER, R. F. O papel da Sociedade Brasileira de Microbiologia no suporte à consolidação da Rede Brasileira de Coleções de Cultura de Micro-Organismos. **Microbiologia in foco**, v. 2, p. 40-8, 2007.

CASTELLANI, A. A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 70, p. 181-187, 1967.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; DE LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para Biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciências agrotecnológicas**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

DE CASTRO, M. T. **Controle Biológico de *Hypsipyla grandella* Zeller (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) e novos relatos de ácaros e fungos em mogno (*Swietenia macrophylla* King) em Brasília/DF**. 2016. 177f. Dissertação de Mestrado. Brasília, Distrito Federal.

DELLARETTI, E. M. **Preservação de Fungos em Baixas Temperaturas**. 2014. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal São João Del-Rei. Sete Lagoas, Minas Gerais.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.S.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiros Dermatologia**, 2005.

GIRÃO, M. D.; DO PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-233, 2004.

MOURA, L. F. W. G.; OLIVEIRA, M. V.; MOTA, J. G. S. M.; LÔ, M. M.; RIBEIRO, A. R. C.; LIMA, D. R. Isolamento e Identificação de fungos associados às plantas medicinais nativas da Caatinga da região dos Inhamuns, Tauá, Ceará, Brasil. **Essentia**, Sobral, v. 17, n. 2, p. 43-63, 2016.

MOREIRA F. M. S.; SIQUEIRA J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Editora UFLA. 2006.

PUTZKE, J; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.

RIBEIRO, M. C.; STELATO, M. M. **Microbiologia prática**: aplicações de aprendizagem de microbiologia básica: bactérias, fungos e vírus. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SOUZA, R.G.; MAIA, L.C.; SALE, M.F; TRUFEM, S.F.B. Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, na Região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasil. Botânica**, v. 26, n. 1, p. 49-60, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNCKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: ArtMed. 967p., 2012.