CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOATIVIDADE DE FUNGOS DE AMBIENTE CAVERNÍCOLA

Caroline Rosa Silva (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Sônia Alvim Veiga Pileggi (Orientadora), e-mail: savpileggi@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural,Molecular e Genética (DEBIOGEM)

Área: Microbiologia
Subárea: Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Caverna, antimicrobiano, bioprospecção.

Resumo

O ambiente cavernícola é considerado um ambiente oligotrófico para atividade microbiana. Em conjunto com a baixa concentração de nutrientes, o afastamento físico e outras características, tornam as cavernas ecossistemas únicos e favoráveis ao desenvolvimento de metabólitos pelos microrganismos residentes que podem possuir potencial biotecnológico. Diante disto, este trabalho objetivou testar a bioatividade de fungos coletados em cavernas frente a linhagens fúngicas fitopatogênicas de referência, por meio do método de cultura pareada, e também investigar a atividade antimicrobiana dos mesmos fungos frente a linhagens de referência, por meio do teste de disco-difusão em agar. Obtiveram-se resultados previamente favoráveis, porém, quando repetidos, não foram confirmados, necessitando testes adicionais com outras metodologias.

Introdução

Cavernas são consideradas ambientes com baixíssima concentração de carbono orgânico (0,5 mg de TOC/L), ou seja, são pobres em nutrientes. Os microrganismos que habitam as cavernas podem ser residentes (nutridos exclusivamente com a matéria encontrada na caverna) ou transitórios (sobrevivem enquanto houver matéria orgânica disponível). Esporos de bactérias e fungos se encontram frequentemente em superfícies calcárias e de espeleotemas de calcita, auxiliando em sua degradação bem como em sua formação (RODRIGUES et al., 2009). O afastamento físico juntamente com outros fatores peculiares do ecossistema de caverna facilita a formação de um ambiente singular, com isso há uma predisposição de metabólitos novos. É notório que as cavernas possuem alto potencial biotecnológico e são ecossistemas pouquíssimo estudados na perspectiva microbiológica, daí a importância em se conhecer e estudar os microrganismos isolados de caverna (MARQUES et al., 2015). A hipogemicina dimérica A, produzida por um actinomiceto isolado de caverna da espécie *Nonomuraea specus,* possui atividade citotóxica frente à linhagem TCT-1 das células do câncer de colo, enquanto que a monomérica atua como antibiótico (DEREWACZ et al., 2014). Rodrigues e cols. (2009) isolaram *Bacillus cereus* (CAV1) de uma caverna em Goiás (GO), que demonstrou ser produtor de biomoléculas de interesse biotecnológico, como

antimicrobianos e enzimas, apresentando bioatividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho investigar a bioatividade de linhagens fúngicas isoladas do ambiente cavernícola frente a fungos fitopatogênicos e cepas de referência.

Materiais e Métodos

Foram realizados testes de bioatividade, utilizando 15 fungos isolados de ambiente cavernícola, frente aos fungos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (linhagens PS+, mais virulenta, e PS-, menos virulenta) e *Trichoderma* sp., (IAPAR) pelo método de cultura pareada em agar sólido, de acordo com Mariano (1993).

Tanto os fungos isolados quanto os fitopatógenos foram crescidos em meio de cultivo BDA (Agar de Batata e Dextrose: 200 g/L de batata, 20 g/L de dextrose e 15 g/L de agar), pH 6,8, a 28°C, por 5 dias.

Com auxílio de um furador de rolhas, foram obtidos discos de agar de 5 mm de diâmetro, das colônias fúngicas crescidas em BDA. O mesmo procedimento foi realizado com os fungos cavernícolas e os fitopatógenos. Os discos foram retirados e colocados em polos opostos de uma placa de Petri contendo meio BDA (em um dos polos o fungo de caverna e no outro o patógeno), à distância de aproximadamente 1 cm da borda. Como controle, foram colocados discos somente de um tipo de fungo, em posições equivalentes às dos confrontos. Durante o tempo de incubação, observaram-se as placas de confronto, buscando halos de inibição do patógeno. Foram realizadas três repetições dos confrontos, com a finalidade de confirmar os resultados.

Realizaram-se também testes de bioatividade com os mesmos fungos cavernícolas frente às seguintes linhagens bacterianas de referência: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus feacalis* ATCC 29212, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 *Acinetobacter baumanii* ATCC 19906 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A mesma metodologia foi aplicada frente à levedura *Candida albicans* ATCC 10231.

As bactérias foram inoculadas e crescidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth: 17,0 g/L de peptona de caseína, 3,0 g/L de peptona de soja, 2,5 g/L de glicose, 5,0 g/L de cloreto de sódio, 2,5 g/L de fosfato dipotássico), pH 7,3, a 37°C, por 24 horas.

Em placas de Petri contendo meio de cultivo Ágar Mueller-Hinton (300 g/L de infusão desidratada de carne, 17,5 g/L de caseína hidrolisada, 1,5 g/L de amido, 17 g/L de agar), as cepas bacterianas de referência, previamente crescidas em TSB, foram espalhadas na superfície da placa com Swab estéril, formando um tapete bacteriano homogêneo.

Utilizando um furador de rolhas, foram obtidos discos de ágar de 5 mm de diâmetro das colônias de fungos de ambiente cavernícola, que foram colocados sobre o tapete bacteriano à distância de 1 cm da borda. Como controle, foram inoculados na mesma placa, sobre o tapete bacteriano, em posição oposta a dos discos contendo os fungos cavernícolas, apenas discos de BDA. Outras duas formas de controle executadas foram semear somente o tapete bacteriano na placa de Petri, e em outra placa foi inoculado somente o fungo de caverna, diretamente sobre o meio de cultivo BDA, sem crescimento microbiano.

As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após o período de incubação as placas foram analisadas quanto à presença de halos de inibição ao redor do cilindro contendo o fungo de caverna. Os fungos considerados promissores foram caracterizados morfologicamente e microscopicamente pela técnica de microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999). Foram realizadas repetições dos experimentos, a fim de confirmar os resultados obtidos anteriormente.

Durante todo o período de execução do projeto, foi realizada a manutenção dos estoques dos fungos e bactérias em laboratório.

Resultados e Discussão

Os fungos isolados de caverna ainda não foram identificados, portanto cada um recebeu uma numeração de 1 a 15. Com relação ao teste do confronto direto, observou-se possível inibição contra *Trichoderma* sp. dos fungos 1, 2, 3, 4 e 5. Com relação à *S. sclerotiorum* PS-, apresentaram inibição os isolados 1, 3, 4, 5 e 8, e quanto à *S. sclerotiorum* PS+, os fungos 1, 2, 3, 4 e 5 inibiram o crescimento do fitopatógeno.

Foram realizadas repetições dos experimentos, porém não foram obtidos os mesmos resultados descritos acima, portanto não foi confirmada a inibição das linhagens fúngicas patogênicas, diante desta metodologia.

No que diz respeito aos testes de disco-difusão, observaram-se possíveis inibições de colônias bacterianas. Com relação a *S. aureus*, houve inibição pelo fungo 2, *C. albicans* apresentou inibição pelos fungos 1, 5 e 9, e *P. aeruginosa* foi inibida pelo fungo 1. As outras linhagens bacterianas não apresentaram halos frente aos demais fungos cavernícolas.

Foram realizadas repetições dos experimentos, e não foram confirmados os mesmos resultados descritos, portanto não houve confirmação de inibição das linhagens microbianas de referência com os métodos utilizados neste trabalho.

Como os resultados utilizando a metodologia descrita não se mostraram favoráveis, sugere-se a aplicação de outras metodologias, como a obtenção e uso de extratos fúngicos, que aumentem a concentração de metabólitos, a fim de verificar a bioatividade dos fungos de caverna, bem como testes diante de outros patógenos. A amostra de isolados cavernícolas deverá ser aumentada, com a realização de coletas futuras.

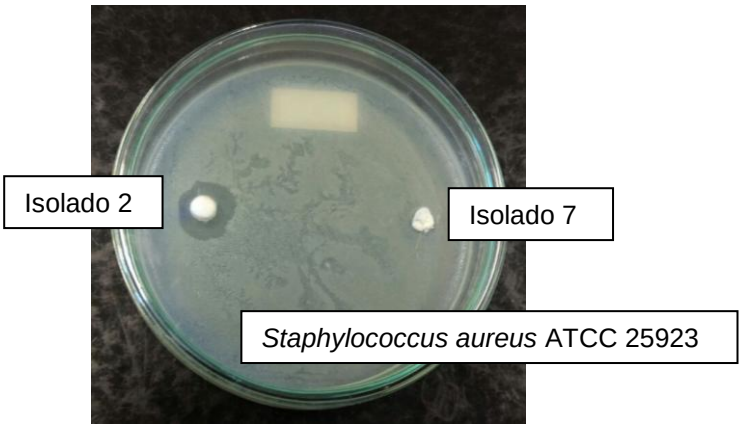


Figura 1 – Presença de halo de inibição, produzido pelo fungo cavernícola (linhagem 2) frente à linhagem bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Conclusões

Os fungos que habitam ambientes cavernícolas são grandes potenciais biotecnológicos, visto que se desenvolvem nestes locais pobres em nutrientes. Neste trabalho não foram comprovados estes dados, talvez devido à pequena amostra de isolados, ou à metodologia escolhida para os testes de confronto, ou ainda à escolha dos microrganismos antagonistas. Em futuros trabalhos pretende-se aumentar a amostra dos isolados cavernícolas, e desenvolver testes adicionais com outras técnicas e diferentes linhagens de referência.

Agradecimentos

À Fundação Araucária e à UEPG, pela bolsa concedida.

Referências

DEREWACZ, D. K.; McNEES, C. R.; SCALMANI, G.; COVINGTON, C. L.; SHANMUGAM, G.; MARNETT, L. J.; POLAVARAPU, P. L.; BACHMANN, B. O. Structure and stereochemical determination of hypogeamicins from a cave-derived actinomycete. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 1759−1763, 2014.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica.** 2a. edição. São Paulo: Editora Premier, 256p, 1999.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. I, p. 369-409, 1993.

MARQUES, E. L. S.; CORREIA, D. C.; OLIVEIRA, R. B. F.; SILVA, K. B.; DIAS, J. C. T.; PIROVANI, C. P.; REZENDE, R. P.. Potencial biotecnológico de microrganismos isolados de cavernas de Paripiranga, Bahia. In: RASTEIRO, M.A.; SALLUN FILHO, W. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 33, 2015. Eldorado. Anais do 33º Congresso Brasileiro de Espeleologia, Campinas – SP, Sociedade Brasileira de Espeleologia - SBE, 2015. p.161-168. Disponível em: <http://www.cavernas.org.br/anais33cbe/33cbe_161-168.pdf>. Acesso em: *01/06/2016.*

RODRIGUES, A. A.; CARRIM, A. J. I.; SADOYMA, G.; VIEIRA, J. D. G. Potencialidades biotecnológicas de *Bacillus cereus* isolado em uma caverna. Anais do XXX Congresso Brasileiro de Espeleologia, Montes Claros - MG, 09-12 de julho de 2009 - Sociedade Brasileira de Espeleologia - SBE.