# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS POTENCIALMENTE BIOATIVOS PROVENIENTES DE AMBIENTES CAVERNÍCOLAS

Caroline Rosa Silva (PIBIC/Fundação Araucária), Sônia Alvim Veiga Pileggi (Orientador), e-mail: savpileggi@uepg.br; sonia.pileggi@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEBIOGEM.

**Microbiologia** - **Microbiologia Aplicada**

**Palavras-chave:** Cavernas, fungos, biotecnologia, bioprospecção.

## Resumo

Atualmente, os microrganismos isolados de ambiente cavernícola são pouquíssimo estudados, embora este habitat possua características singulares que tendem ao desenvolvimento de diferentes metabólitos pelos microrganismos, e esses metabólitos podem possuir um alto potencial biotecnológico no campo agronômico, farmacêutico, entre outros. Diante disso, foram realizadas técnicas moleculares, com a finalidade de identificar fungos isolados da caverna, considerados potencialmente inibidores de alguns fungos patógenos de plantas e linhagens bacterianas de referência. Foram isoladas colônias monospóricas dos fungos cavernícolas para purificar as amostras, para serem identificadas as espécies inibitórias já mencionadas. Está sendo extraído o DNA das espécies promissoras para posteriormente realizar a amplificação por PCR da região ITS1 - 5.8S - ITS2 do rDNA, encaminhar para o sequenciamento, visando a identificação molecular das espécies promissoras.

## Introdução

O ambiente cavernícola é considerado um ambiente com baixíssima concentração de carbono orgânico (0,5 mg de TOC/L), ou seja, são pobres em nutrientes. Os microrganismos que habitam esses locais podem ser residentes (nutridos exclusivamente com a matéria encontrada na caverna) ou transitórios (sobrevivem enquanto houver matéria orgânica disponível). Esporos de fungos e bactérias são frequentemente encontrados em superfícies calcáreas e de espeleotemas de calcita, auxiliando em sua formação, bem como em sua degradação (RODRIGUES et al., 2009).

O isolamento físico e algumas características singulares das cavernas proporcionam um habitat microbiano único, com pressões evolutivas diferenciadas da superfície e, assim possuem uma maior tendência em desenvolver novos compostos (BARTON & JURADO, 2007).

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. Portanto, é notório que as cavernas possuem um elevado potencial biotecnológico e é um ecossistema pouquíssimo estudado na perspectiva da microbiologia, daí a importância em se conhecer e estudar os microrganismos isolados destes ambientes (MARQUES et. al., 2015).
A identificação de fungos é rotineiramente baseada em características morfológicas, que podem ser ambíguas, mas técnicas moleculares, como o sequenciamento de genes, têm proporcionado resultados mais seguros no que diz respeito à identificação, taxonomia e filogenia de fungos (ROCHA, 2010).
Dado o exposto, este projeto visou identificar por técnicas moleculares, fungos isolados da caverna, considerados potencialmente inibidores de alguns patógenos de plantas e linhagens bacterianas de referência, e promissores para o isolamento de produtos ou metabólitos de interesse farmacológico e agronômico.

**Materiais e Métodos**

Foram realizados microcultivos de 11 isolados cavernícolas a fim de confirmar se as amostras eram mesmo puras ou se continham tipos diferentes de fungos. Por microscopia ótica, observaram-se diferentes tipos de esporos em uma mesma amostra, constatando-se que havia mais de um tipo de fungo nos isolados. Para a purificação das linhagens, foram isoladas colônias monospóricas dos fungos cavernícolas, para posterior identificação molecular.
Para obtenção destas colônias, os fungos foram inoculados em meio BDA (Agar de Batata e Dextrose), pH 6,8, e mantidos em estufa a 28°C. Após 5 - 10 dias de incubação, com auxílio de um bisturi estéril, o micélio foi raspado, coletado e imerso em um tubo contendo 5 mL de solução de Tween 80 a 0,1%. O conteúdo foi macerado com bastão de vidro também esterilizado, e posteriormente foi filtrado em seringa com lã de vidro autoclavada. Para retirar os esporos presos, a lã de vidro foi lavada com 9 mL de solução salina a 0,85% e todo o conteúdo foi coletado em tubo tipo Falcon de 15 mL, completando um volume final de 14 mL.
A solução foi centrifugada a 3500 rpm por 4 minutos, depois descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se o precipitado com 500 µL de solução salina a 0,85%, obtendo-se assim a solução de esporos. Logo após coletaram-se 100 µL da solução e em Câmara de Neubauer foram contados os esporos e a suspensão foi diluída até conter $10^6$ a $10^7$ esporos por mL. Após a contagem de esporos foram inoculados 100 µL da solução de esporos em três placas de Petri, as quais foram incubadas em estufa a 28°C.
Cerca de 2-3 dias depois, cada esporo germinou e deu início ao crescimento de um novo micélio. Através da diluição feita anteriormente os esporos cresceram distantes, possibilitando o isolamento de colônias monospóricas, obtendo-se desta maneira os estoques das linhagens fúngicas puras.
Foram selecionadas 4 amostras mais promissoras, as quais foram crescidas em 200 mL de meio BDB (Caldo de Batata e Dextrose), pH 6,8, por cinco dias, a 28°C, e rotação 120 rpm.
Após o período de incubação, o conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo e o micélio obtido foi coletado, com o auxílio de uma espátula estéril, e liofilizado.
O DNA dos fungos está sendo extraído utilizando o protocolo de FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1995), modificado. Após a liofilização o micélio será triturado com nitrogênio líquido, e cerca de 300 mg de micélio serão colocados em tubos para microcentrífuga. Serão adicionados 600 µL de Tampão de Extração pré-aquecido a

65º C (CTAB 2%; NaCl 1,4M; EDTA 0,02M; Tris-HCl 0,1M pH 8,0; PVP-40 2%; beta-mercaptoetanol 10%).
Os tubos serão agitados por 30 segundos e incubados a 65º C por 30 minutos, agitando-os a cada 5 minutos. Serão adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturando-se lentamente por 5 minutos. As amostras serão centrifugadas a 7000g, a 4º C, por 5 minutos. A fase aquosa será transferida para novo tubo. Adicionar 600 µL de isopropanol a -20º C e misturar lentamente por inversão dos tubos. Centrifugar a 7000g, 4º C, por 15 minutos, e descartar o sobrenadante.
Serão acrescentados 300 µL de etanol 70%. Centrifugar a 7000g, 4º C, por 15 minutos, e descartar o sobrenadante. Serão adicionados 300 µL de etanol 95% a -20º C. Centrifugar a 7000g, 4º C, por 5 minutos, e descartar o sobrenadante. O precipitado será deixado secar a temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µL de $H_2O$ ultrapura.
O DNA será quantificado por espectrofotometria e sua integridade verificada em gel de agarose a 0,8%, utilizando-se o padrão de peso molecular fago lambda Hind III. O DNA dos fungos será submetido a PCR, utilizando primers V9D (TTACGTCCCTGCCCTTTGTA) e LS266 (GCATTCCCAAACAACTCGACTC) (DE HOOG et al., 2003) para a amplificação da região ITS1 - 5.8S - ITS2 do rDNA, sequenciado e será realizada uma análise filogenética utilizando dados de sequências depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

## Resultados e Discussão

Com relação à purificação dos fungos cavernícolas, foram obtidas 33 colônias monospóricas das 11 linhagens iniciais. A partir destas colônias puras, foram selecionadas quatro para a extração e sequenciamento do DNA, sendo três delas referentes à linhagem inicial nº. 5 [5.1; 5.2 (fig. 1); 5.3], e outra à linhagem inicial 9 (9.1), ambas com resultado promissor frente a patógenos fúngicos e bacterianos de referência em etapas anteriores do trabalho.
Foram realizados novamente microcultivos das quatro linhagens monospóricas, e por microscopia ótica observou-se que as mesmas foram purificadas com essa metodologia. A extração do DNA destas 4 linhagens promissoras está em andamento para posterior identificação molecular.

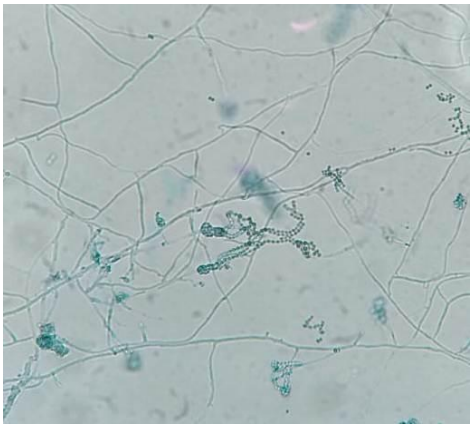


Figura 1. Microcultivo da linhagem monospórica nº. 5.2, mostrando estrutura vegetativa contendo conidióforo e conídios, sugerindo se tratar do gênero *Penicillium* sp. (M.O. em aumento 400X).

## Conclusões

Conclui-se com este trabalho a importância da identificação molecular de fungos, visto que de maneira geral a identificação se baseia em características morfológicas macroscópicas e microscópicas, que podem ser inconclusivas.

**Agradecimentos**

À Fundação Araucária, pela bolsa concedida ao primeiro autor.
Ao C-LABMU/PROPESP/UEPG, pelo auxílio na liofilização dos micélios fúngicos.

**Referências**

BARTON, H. A.; JURADO, V. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe*, v. 2, n. 3, p. 132-138, 2007.

DE HOOG, G.S., VICENTE, V., CALIGIORNE, R.B., KANTARGLIOCU, S., TINTELNOT, K., GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G., HAASE, G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *J. Clin. Microbiol*. v. 41, p. 4767–4778, 2003.

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.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 1995.

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.*

ROCHA, L. F. Caracterização morfológica, molecular e biológica de fungos patogênicos a invertebrados dos Cerrados de Goiás. Ministério de Educação e Desportos - Universidade Federal de Goiás – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. TESE. Goiânia, 2010.

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.