

DIVERSIDADE FISIOLÓGICA RELACIONADA À VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE FUNGOS DECOMPOSITORES ZIGOMICETOS MUCORÓIDES.

Luana O. Bernardes; Érika F.C. Maciel; Paulo C. Ferreira; Drauzio E.N. Rangel.

Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D). Av. Shishima Hifumi, 2911 – São José dos Campos, SP, CEP 12.244-000, drauzio@univap.br

Resumo - Quando os fungos do solo e fezes são isolados usando meios de cultura sólidos, os membros da ordem Mucorales estão entre os isolados de fungos mais comuns. Os quatro isolados foram nomeados: Cicarelli, Papulsa, Doc. Beaver e Zaina e coletados na Universidade do Vale do Paraíba. No primeiro experimento, os esporangiósporos foram produzidos no meio de batata dextrose e agar (PDA) a 28 °C por dois dias e a germinação de cada isolado foi realizada nos meios de cultura Czapek, Emerson, PDA e Sabouraud dextrose agar (SDA) onde a germinação foi registrada a cada hora até 6 h a 28 °C. Em um segundo experimento, os esporangiósporos foram produzidos nos meios Czapek, meio mínimo, Emerson, PDA e SDA por sete dias a 28 °C e a germinação foi realizada em meio mínimo com 0,1% de glicose, a germinação foi registrada a cada hora a partir da inoculação até 8 h a 28 °C. Foi observado que a nutrição exerce efeito nos processos fisiológicos de fungos. No primeiro experimento o fungo produzido em meio Czapek teve uma cinética de germinação mais rápida que os outros três meios, sendo que o meio SDA foi o meio que proporcionou uma velocidade de germinação mais baixa. No segundo experimento foi notado que aparentemente este fungo não usa fontes de carbono endógenas acumuladas nos conídios, pois a germinação dos quatro isolados produzidos em cinco diferentes meios de cultura teve aparentemente a mesma velocidade de germinação. O isolado do cavalo Zaina germinou de forma mais acelerada que os outros isolados.

Palavras-chave: zigomicetos mucoróides; meios de cultura; germinação; esporangiósporos; fisiologia de fungos.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas, Microbiologia

Introdução

A micota coprófila é uma comunidade diversificada de fungos morfológica e fisiologicamente especializados (RICHARDSON, 2008). As fezes de herbívoros são potencialmente um bom substrato para o crescimento dos fungos, contendo altas concentrações de carboidratos solúveis, compostos nitrogenados, vitaminas e minerais como celulose e lignocelulose, contendo um teor de misturas adequado (CARLILE, 2001).

Espécies do gênero *Mucor* têm uma distribuição cosmopolita e podem ser isoladas a partir de qualquer material orgânico em contato com o ar, estes tem sido isolado a partir de substratos, como solo, húmus, outros em restos orgânicos e em fezes (ALEXOPOULOS, 1996; RICHARDSON, 2001; ALVEZ *et al.*, 2002; SANTIAGO; SOUZA-MOTTA, 2006). Quando os fungos do solo e fezes são isolados usando meios de cultura sólidos, os membros da ordem Mucorales estão entre os isolados de fungos mais comuns (SCHOENLEIN-CRUSIUS, 2006). Eles são freqüentemente mais eminentes nas culturas, devido à taxa de crescimento extremamente rápida, uma

característica importante em sua habilidade para competir no solo (MOORE- LANDECKER, 1996).

Condições ambientais relativas a fontes de carbono, fósforo, nitrogênio, tensão de oxigênio, pH, temperatura, intensidade de radiação visível e microelementos influenciam o metabolismo e conseqüentemente, o crescimento celular, a diferenciação, a formação de estruturas reprodutivas e a diferenciação sexual (GRIFFIN, 1994, HALL *et al.*, 1994; LI & HOLDOM, 1995).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a velocidade de germinação de esporangiósporos do fungo *Mucor circinelloides* em diferentes meios de cultura; e em um segundo experimento avaliar a nutrição endógena na germinação de esporangiósporos em meio mínimo com 0,1 % de glicose.

Material e Métodos

Isolados e cultivo

A coleta dos fungos zigomicetos mucoróides foram realizadas para uso em estudos anteriores no Laboratório de Microbiologia Ambiental – IP&D. Os isolados foram coletados de excrementos de

quatro cavalos do centro de treinamento eqüestre da Universidade do Vale do Paraíba e foram nomeados de acordo com os respectivos cavalos: Cicarelli, Papulsa, Doc. Beaver e Zaina.

Suspensão dos Esporangiósporos

Os esporangiósporos dos quatros isolados foram colhidos com o auxílio da alça de platina e suspensos em 10 ml de água destilada esterilizada em tubo de ensaio de poliestireno 15-ml (Corning®, Corning, NY, USA).

Experimento 1: Velocidade de germinação de esporangiósporos em diferentes meios de cultura.

Os isolados foram retirados da cultura estoque e transferidos para placas de Petri (Poliestireno, 95 x 15 mm) em 23 ml de meio batata dextrose agar (PDA) (Difco, Detroit, MI). Todos isolados foram mantidos a 28 °C por dois dias. Para cada experimento, foram produzidos quatro diferentes culturas, uma para cada replicação do experimento, sendo essas Czapek (Difco, Detroit, MI), batata dextrose agar, (PDA) (Difco, Detroit, MI), Sauboraud dextrose agar (SDA) (Difco) e Emerson YpSs Agar (Difco).

A germinação foi registrada a cada hora a partir da inoculação até 6 h a 28 °C.

Experimento 2: Avaliação da nutrição endógena na germinação em meio mínimo com 0,1% de glicose.

Os isolados cresceram em placas de Petri (Poliestireno, 95 x 15 mm) com 23 ml de meio batata dextrose agar (PDA) (Difco, Detroit, MI), Czapek (Difco, Detroit, MI), Sauboraud dextrose agar SDA (Difco), Emerson YpSs agar (Difco) seguindo as recomendações da embalagem e meio mínimo (MM; 0,6 % (w/v) de nitrato de sódio, 0,3 % (w/v) de fosfato dipotássico, 0,15 % (w/v) de sulfato de magnésio, 0,15 % (w/v) cloreto de potássio, 0,003 % (w/v) de sulfeto de ferro, 4,5 % (w/v) de Bacto agar (Becton Dickinson, Sparks, MD). Todos isolados foram mantidos na estufa a 28 °C por sete dias.

A germinação destes isolados produzidos nos cinco meio de cultura foi realizada no meio mínimo suplementado com 0,1% (w/v) de glicose em placa de Petri (60 x 15 mm) com 8 ml, para cada replicação. A germinação foi registrada a cada 1 h a partir da inoculação até 8 h a 28 °C. Para o experimento com meio mínimo, a suspensão dos esporangiósporos utilizada foi igual ao descrito acima.

Contagem dos Esporangiósporos

A germinação foi observada em um aumento de 400x. Os esporangiósporos foram considerados germinados quando os mesmos apresentaram uma visível projeção do tubo germinativo (MILNER et., al 1991). Um mínimo de 300 esporos por placa foi avaliado e a porcentagem de germinação calculada pela comparação de esporos germinados e não germinados (BRAGA et al., 2001).

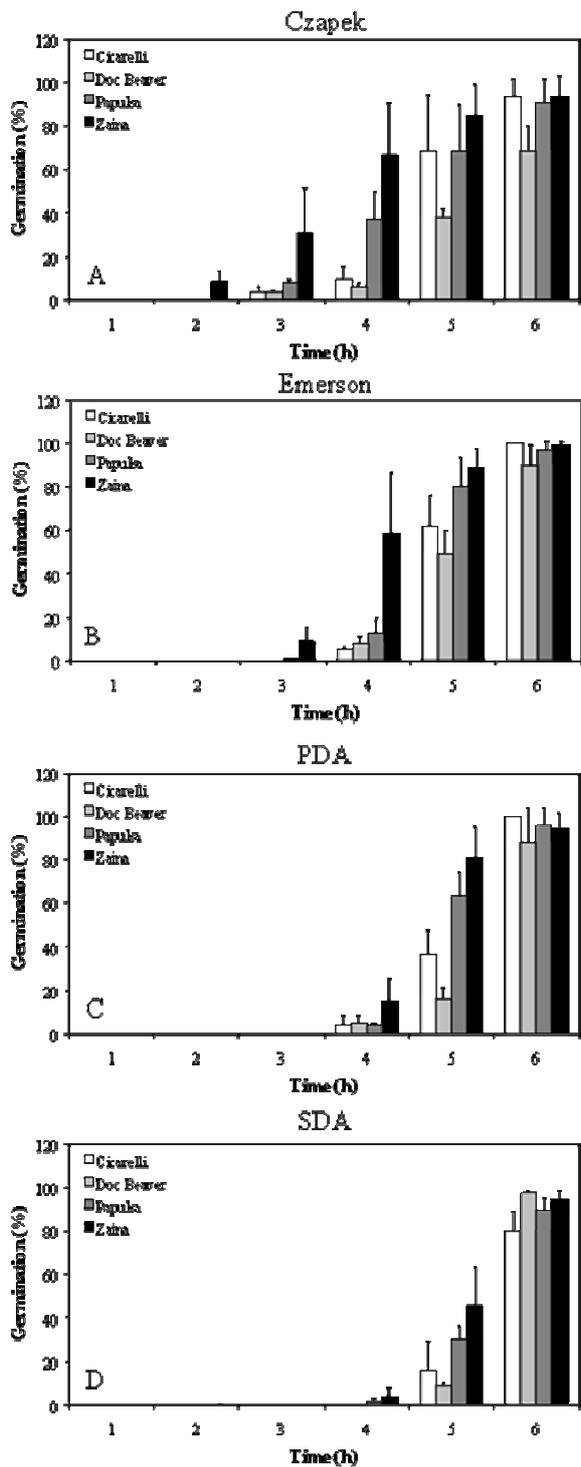
Resultados

Experimento 1: Velocidade de germinação de esporangiósporos em diferentes meios de cultura.

Os esporangiósporos produzidos no meio Czapek apresentaram maior velocidade de germinação (Fig. 1A) seguida pelos esporangiósporos dos isolados crescidos no meio Emerson (Fig. 1B), PDA (Fig. 1C) e SDA (Fig. 1D), sendo que o SDA foi o meio que propiciou a menor velocidade germinação dos esporangiósporos.

Não se observou tubos germinativos a terceira hora de germinação nos meios de cultura PDA e SDA respectivamente, entretanto uma dilatação no diâmetro médio do esporo foi observado, nota-se então uma germinação diferenciada destes fungos, visto que PDA é um meio de cultura utilizado como padrão para crescimento de culturas de fungos seguido pelo meio de cultura SDA, trata-se de meios com alta concentração de açúcares [PDA (20 g/l dextrose) e SDA (40 g/l dextrose)]. Os tubos germinativos surgiram a partir da segunda hora no meio de cultura Czapek, ao contrário de todos os outros meios. Observou-se um aumento significativo nas hifas na quinta e sexta hora de germinação, fenômeno ocorrido em todos os meios de cultura utilizados.

O isolado Zaina germinou mais rápido que os outros isolados.



Experimento 2: Avaliação da nutrição endógena na germinação em meio mínimo com 0,1% de glicose.

A germinação ocorreu igualmente a partir da 3 h em MM suplementado com 0,1% de glicose para todos os cinco meios de cultura utilizados. Os isolados Cicarelli (Fig.2A), Doc Beaver (Fig.2B), Papula (Fig.2C) e Zaina (Fig.2D) tiveram germinação semelhante.

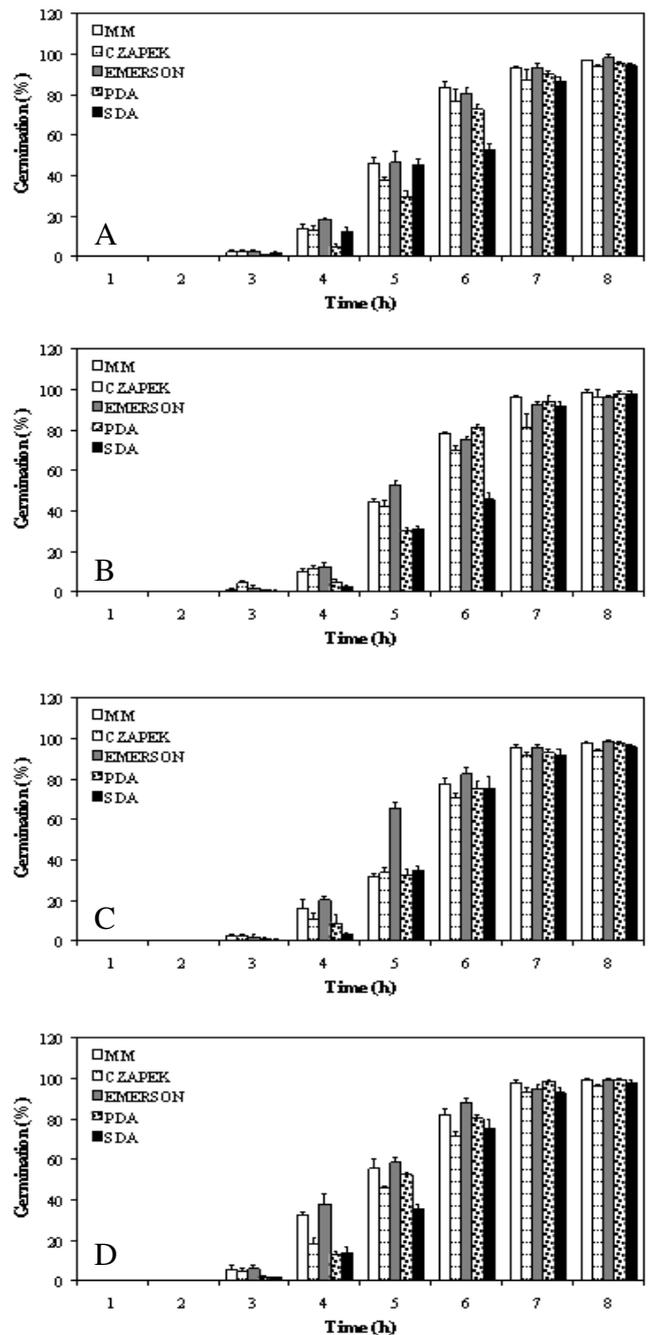


Figura 2: Velocidade de germinação dos fungos zigomiceto mucoróides produzido sob diferentes condições de cultura. **A-** Germinação do isolado Cicarelli em meio mínimo (MM), Czapek, Emerson, PDA e SDA; **B** - Germinação do isolado Doc Beaver em meio mínimo (MM), Czapek, Emerson, PDA e SDA; **C** - Germinação do isolado Papulsa em meio mínimo (MM), Czapek, Emerson, PDA e SDA; **D** - Germinação do isolado Zaina em meio mínimo (MM), Czapek, Emerson, PDA e SDA.

Discussão

Vários experimentos têm lidado com a influência da nutrição basal sobre o crescimento de fungos e esporulação a fim de se conhecer os componentes ideais para o cultivo dos fungos. A germinação de esporos requer condições especiais e, portanto, a taxa de germinação é normalmente diferente em diferentes meios de cultura (LEITE *et al.*, 2003; PAUL *et al.*, 1993; RANGEL *et al.*, 2008b). Observou-se no primeiro experimento alta taxa de germinação no meio Czapek que é considerado pobre. O meio de cultura Emerson favoreceu também rápida velocidade de germinação seguido do meio Czapek. Em contraste, PDA e SDA apresentaram menor velocidade de germinação. Algumas espécies de Zygomycetes tem sido chamados “fungos do açúcar” por causa do fato que eles não tem enzimas para degradar carboidratos complexos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996), portanto, possivelmente os carboidratos dos meios Emerson, PDA e SDA não foram catabolizados rapidamente para a rápida germinação destes esporangiósporos.

No segundo experimento, a velocidade de germinação foi aparentemente semelhante para todos os isolados produzidos em diferentes meios de cultura. Estes resultados não coincidem com estudos sobre a germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae*, onde verificou-se que os conídios produzidos em MM germinaram mais rápido que os outros meios, especialmente em comparação aos conídios produzidos em PDAY (RANGEL *et al.*, 2008). Assim, é provável que a cinética de germinação desses fungos não esta relacionada aos carboidratos endógenos acumulados nos esporangiósporos e sim diretamente relacionado com ao metabolismo de carboidratos exógenos do meio de cultura.

Segundo BRAGA *et al.*, 1999 Pode-se supor que a respiração micelial ocorre às custas das reservas endógenas, que se acumulam ao longo da fase de crescimento. Em outros fungos a trealose intracelular e mobilização manitol podem contribuir de alguma forma às exigências de energia de respiração endógena e fornecer energia para a germinação dos esporos

(D'ENFERT *et al.*, 1999; ELBEIN *et al.*, 2003; THEVELEIN 1984). A adaptação fisiológica de fungos ao estresse nutricional ou osmótico também tem sido observada em outros estudos sobre a cinética de germinação (RANGEL *et al.* 2008b).

Conclusão

Em conclusão foi verificado no primeiro experimento que meios de cultura com açúcares mais simples proporcionaram maior taxa de germinação de todos os isolados, entretanto, no segundo experimento onde os esporangiósporos foram produzidos em diferentes meios de culturas e posteriormente germinados em meio mínimo com 0,1% de glicose, indicou que estes fungos provavelmente não tem ou não utilizam açúcares endógenos que possivelmente auxiliariam-nos na velocidade de crescimento; isolado do cavalo Zaina germinou de forma mais acelerada que os outros isolados resultante de uma natural adaptação.

Agradecimentos

Ao Dr. Donald W. Roberts, Utah State University, Logan, UT pela doação de microscópios, meios de culturas, lâmpadas UV-B, e outros materiais de laboratório. Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica para Luana O. Bernardes. Ao CNPq – Projeto Edital Universal. Ao Prof. Dr. Drauzio E.N. Rangel e aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental.

Referências

- ALVES, M. H., et al. **Táxons de Mucor Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil.** Rev. bras. Bot. vol.25, n.2, p. 147-160, 2002.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, Charles W.; BLACKWELL, Meredith. **Introductory mycology:** C. J. Alexopoulos, C. W. Mims, M. Blackwell. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996. x, 869 p.
- BRAGA, G.U.L., DESTÉFANO, R. G. R., MESSIAS, C.L.: **Oxygen Consumption by Metarhizium anisopliae during Germination and Growth on Different Carbon Sources.** Journal of Invertebrate Pathology 74, 112–119, 1999.
- BRAGA, G.U.L., FLINT, S.D., MESSIAS, C.L., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. **Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete Metarhizium anisopliae: A study of reciprocity and recovery.** Photochemistry and Photobiology 73, 140-146, 2001.

- CARLILE, Michael J.; GOODAY, Graham W.; WATKINSON, Sarah C. **The fungi:** Michael J. Carlile, Sarah C. Watkinson, Graham W. Gooday. 2nd. ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. 588 p.
- D'ENFERT C, BONINI BM, ZAPPELLA PDA, FONTAINE T, da Silva AM, TRENZI HF, 1999. Neutral trehalases catalyze intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. **Molecular Microbiology** 32: 471–483.
- ELBEIN AD, PAN YT, PASTUSZAK I, CARROLL D, 2003. **New insights on trehalose: a multifunctional molecule.** **Glycobiology** 13: 17R–27R. Thevelein JM, 1984. **Regulation of trehalose mobilization in fungi.** *Microbiological Reviews* 48: 42–59.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology.** 2^a ed. New York: Wiley-Liss, 1994. P. 458.
- HALL, R. A et al. **Influence of culture age on rate of conidiospore germination in four deuteromycetous Entomogenous fungi.** *Mycological Research* 98 (7) : 763 768. 1994.
- LEITE, L.G., ALVES, S.B., BATISTA FILHO, A., and ROBERTS, D.W., **Effect of Salts, Vitamins, Sugars and Nitrogen Sources on the Growth of Three Genera of *Entomophthorales*: *Batkoa*, *Furia*, and *Neozygites*,** *Mycol. Res.*, 2003, vol. 107, pp. 872–878.
- LI, D.P. & HOLDOM, D.G. **Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes).** *J. Invertebr. Pathol.*, v.65, p.253-260, 1995.
- MILNER, R.J., HUPPATZ, R.J., SWARIS, S.C. **A new method for assessment of germination of *Metarhizium conidia*.** *J. Invertebr. Pathol.* 57, 121-123, 1991.
- MOORE-LANDECKER, J. **Fundamentals of the fungi.** 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. Cap.3: Zoosporic fungi: p.33-79.
- PAUL GC, Kent CA, Thomas CR. **Viability testing and characterisation of germination of fungal spores by automatic image analysis.** *Biotechnol Bioeng* 1993;42:11–23.
- RANGEL, D.E.N., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. **Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance.** *J. Invertebr. Pathol.* 93, 127-134, 2006.
- RANGEL, D.E.N., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. **Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia.** *Mycol. Res.* 112, 1362-1372, 2008a.
- RANGEL, D.E.N., ALSTON, D.G., ROBERTS, D.W. **Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, and entomopathogenic fungus** *Mycol. Res.* 112, 1355-1361, 2008b.
- RICHARDSON M.J. **Records of coprophilous fungi from the Lesser Antilles and Puerto Rico.** *Caribbean Journal of Science*, 44: 206-214, 2008.
- SANTIAGO, André Luiz Cabral Monteiro Azevedo; SOUZA-MOTTA, Cristina Maria de. **Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase.** *Acta Bot. Bras.* 2006, vol.20, n.3, pp. 641-647., 2006.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; MILANEZ, A.I.; TRUFEM, S.F.B.; Pires-Zottarelli, C.L.A.; Grandi, R.A.P.; Santos, M.L. & Giustra, K.C. **Microscopic fungi in the Atlantic rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil.** *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 244-252, 2006.
- THEVELEIN, JM Regulamento da mobilização da trealose fungos. *Comentários microbiológicos*, Washington, 48 (1): 42-59, de 1984.