

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE – CAMPUS ARAQUARI

**Bruno Bonassoli, Emanuel de Freitas, João Antônio, Lucas Hellmann
de Oliveira, Maria Paula, Nickolas Marmitt Murakami**

**ISOLAMENTO DE FUNGOS RESISTENTES A RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA**

ARAQUARI/SC

2015

**Bruno Bonassoli, Emanuel de Freitas, João Antônio, Lucas Hellmann
de Oliveira, Maria Paula, Nickolas Marmitt Murakami**

ISOLAMENTO DE FUNGOS RESISTENTES A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Trabalho de Qualificação do Projeto Integrador
apresentado ao Instituto Federal Catarinense – *Campus*
Araquari como parte complementar à matriz curricular
do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino
Médio.

**ARAQUARI/SC
2015**

RESUMO

Os fungos são seres vivos eucarióticos, amplamente distribuídos na natureza e relacionados a algumas patologias, produção de produtos farmacêuticos e alimentação. Estes organismos são facilmente adaptáveis às condições ambientais, podendo se desenvolver em ambientes extremos. Dentre estes fungos destacam-se os fungos radiotróficos, descobertos em uma expedição exploradora em um reator altamente radioativo da usina nuclear de Chernobyl - Ucrânia. São capazes de crescer na presença de radiação 500 vezes maior que a de fundo. Estes fungos produzem melanina, pigmento que atua na conversão da radiação em energia química, ativando vias anabólicas a partir da massa de gases presentes na atmosfera. O estudo de fungos melanizados traz a perspectiva da utilização destes organismos em sistemas de biorremediação de áreas contaminadas com material radioativo e em missões espaciais. Com base nestes aspectos, este trabalho propõe o isolamento de fungos melanizados a partir de ambientes naturais, utilizando meio de cultura sintético preparado para o isolamento. Foram isolados fungos septados e com esporos aparentemente melanizados a partir de amostras de alho e testados com relação ao tempo de resistência à radiação esterilizante ultravioleta (UV-C) em meio de cultura mínimo. Os resultados mostraram que os fungos isolados foram capazes de resistir a 30 minutos de exposição à radiação UV-C, a qual foi capaz de induzir a produção aparente de melanina, visualizada como pontos negros no centro das colônias.

Palavras-chave: Fungos melanizados, isolamento, resistência, ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo geral.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3 JUSTIFICATIVA.....	3
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
5 METODOLOGIA.....	7
5.1 Isolamento de fungos melanizados.....	7
5.2 Ensaios de resistência a radiação UV.....	7
6 RESULTADOS.....	9
7 CONCLUSÃO.....	13
8 REFERÊNCIAS.....	14

1 INTRODUÇÃO

Na natureza são encontrados diversos tipos de fungos, representando uma forma de vida bastante simples. Os fungos são seres vivos eucarióticos e podem apresentar dimensões consideráveis como os cogumelos, mas também formas microscópicas como bolores e leveduras. Muitos fungos estão relacionados a várias enfermidades e intoxicações, porém alguns são utilizados como alimento e também como fonte para o isolamento de substâncias aplicadas como medicamentos.

Um tipo especial de fungo foi descoberto quando um robô explorador do reator altamente radioativo da usina nuclear de Chernobyl, na Ucrânia, retornou com manchas negras semelhante a um mofo. O acesso a estes fungos foi restrito pois não eram adaptados a viver fora do reator, uma vez que pareciam utilizar o próprio pigmento de melanina para converter radiação γ em energia química para o seu crescimento. Estes fungos passaram a ser chamados de fungos radiotróficos, uma vez que são espécies que vivem no interior e em torno do reator nuclear.

Devido ao alto nível de radiação, o acesso às instalações da usina de Chernobyl é bastante restrito, fazendo com que a obtenção de cepas dos fungos seja extremamente difícil, dificultando assim os estudos.

O mecanismo de conversão de radiação gama em energia química parece ser semelhante ao sistema de captura de fótons da luz visível pela clorofila e geração de energia química na forma de trifosfato de adenosina (ATP), de organismos fotoautotróficos. Entretanto, não é conhecido se os fungos radiotróficos utilizam, a partir da melanina, uma via metabólica complexa como ocorre no processo da fotossíntese.

A melanina é um pigmento de coloração acastanhada, cuja função principal é proteger o DNA contra a ação nociva da radiação emitida pelo sol.

Com base nestes aspectos, este trabalho teve como objetivo isolar fungos melanizados a partir de ambientes naturais e avaliar sua capacidade de resistir a exposição à radiação ultra violeta (UV-C).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Geral

O objetivo geral deste trabalho foi isolar fungos capazes de resistir a exposição à radiação ultravioleta (UV-C) em tempos prolongados, determinando assim, certos prazos de evolução por meio a exposição contínua sob radiação, que deveria ser esterilizante.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar fungos potencialmente produtores de melanina a partir de ambientes naturais, utilizando meio de cultivo seletivo, como alho (*Allium sativum*);
- Testar as colônias isoladas quanto a resistência à luz ultravioleta (UV-C) por meio de exposição a esta radiação em tempos variados;
- Testar as colônias selecionadas de maior resistência quanto ao crescimento em condições nutricionais restritas frente à exposição à radiação UV;
- Comparar os resultados com um fungo não melanizado controle.

3 JUSTIFICATIVA

Até pouco tempo, o potencial dos fungos era desconhecido, pois foi distinguido das plantas e nomeado como classe própria a menos de duas décadas. Representam seres simples, cujo o desempenho na natureza é interessante, pois apresentam alto nível de adaptação.

A evolução é algo que na maioria dos casos leva muito tempo, porém os fungos e protozoários quebram esta barreira, evoluindo conforme suas necessidades. Um exemplo desta capacidade são os fungos radiotróficos de Chernobyl (famoso pelo acidente nuclear ocorrido na década de 1980), que se adaptaram a um ambiente cuja radiação é 500 vezes maior que o normal. Estes fungos parecem obter energia apenas de radiação gama e fonte de carbono da atmosfera para síntese de material genético.

Devido ao alto nível de radiação ionizante, o acesso em Chernobyl é extremamente restrito, fazendo com que a obtenção de cepas dos fungos seja muito difícil.

Os estudos realizados até o momento mostraram que a melanina dos fungos radiotróficos é quimicamente idêntica à melanina do corpo humano, levando-se a acreditar que ela poderia fornecer energia para as células da pele.

Também, este tipo de estudo traz a perspectiva de aplicação deste conhecimento em missões espaciais longas ou até mesmo na colonização de outros planetas, uma vez que a radiação ionizante é predominante no espaço, algumas espécies de fungos radiotróficos representariam uma fonte inesgotável de alimentos.

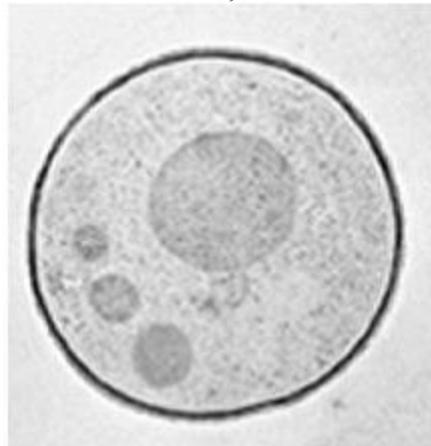
Além das propriedades na transdução da radiação em energia química, os fungos radiotróficos apresentam certo grau de rádio resistência, sendo capazes de absorver e metabolizar compostos radioativos do ambiente, representando um possível agente de aplicação em sistemas de biorremediação de áreas contaminadas (DIGHTON, TUGAY e ZHDANOVA, 2008).

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Microrganismos melanizados são as espécies frequentemente encontradas em ambientes extremos, como solos contaminados com radionuclídeos, ambientes de altitude elevada e regiões Ártica e Antártica. Essa evidência sugere que a presença da melanina é importante para o ciclo de vida destes organismos (DADACHOVA et al., 2007; ROBINSON, 2001).

A melanina (do grego *melanos*, preto) é um pigmento de alto peso molecular com várias funções biológicas. Este pigmento é sintetizado por alguns tipos de fungos, conferindo proteção às radiações ultra violeta (UV) e solar. As melaninas são geralmente pigmentos escuros formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e são sintetizadas durante a formação do esporo para deposição na parede celular (CALVO et al., 2002) (Figura 1).

Figura 1 - Célula do fungo melanizado *Cryptococcus neoformans*. Uma camada escura de melanina é observada na parede celular no contorno da célula. Este fungo cresce mais rápido que o normal quando submetido a intensa radiação.



Fonte: <https://www.sciencenews.org/node/11308>

Espécies de fungos melanizados foram encontrados colonizando as paredes de reatores danificados e altamente contaminados com material radioativo da usina de Chernobyl e em solos do entorno. Foram descobertas 37 espécies mutantes de fungos crescendo em neste local. Especula-se que estes fungos tenham sofrido mutações que os tornaram capazes de transformar radiação em energia. Dentro da usina, os tipos mais comuns são mutantes do *Cladosporium sphaerospermum*, que provoca micose, e a *Penicillium hirsutum*, que ataca plantações de alho (MORAES, 2008; DADACHOVA et al., 2007; ZHDANOVA e CASADEVALL, 1991) (Figura 2). Especula-se que estes fungos tenham tido acesso ao interior do reator a partir de fissuras na cobertura de concreto construída no entorno do reator para deter a liberação de radiação para a atmosfera.

Figura 2 Aspecto macroscópico dos fungos (A) *Cladosporium sphaerospermum* e (B) *Penicillium hirsutum*.
(A) (B)



Fonte: http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_MWS23962&res=640&flags=col3: e http://www.science.oregonstate.edu/bpp/Plant_Clinic/Garlic/penicillium.htm

Segundo estudos da *Albert Einstein College of Medicine*, os fungos encontrados em Chernobyl são capazes de "comer" radiação. Estas pesquisas originaram-se a partir da utilização de um robô explorador enviado ao núcleo do reator altamente radioativo de Chernobyl. Este robô retornou com amostras de um aparente mofo preto, removido das paredes do reator (MORAES, 2008).

Com base nos estudos desta amostra coletada, surgiu a hipótese de que estes fungos utilizam-se do pigmento melanina para converter radiação gama em energia química para o seu crescimento, mesmo em condições de privação de nutrientes. Foram descobertos que os fungos *Wangiella Dermatitidis* e *Cladosporium Cryptococcus* (fungos capazes de produzir melanina) aumentaram sua biomassa gradativamente ao serem expostos à radiação consideravelmente maior que a de fundo, com acesso de nutrientes restritos (ZHDANOVA et al., 1991; DADACHOVA et al., 2007).

Estes fungos possuem a capacidade de usar a radioatividade como fonte de energia para a síntese de nutrientes e estímulo do crescimento. São capazes de utilizar melanina para converter radiações α e β em energia química para dar suporte ao seu crescimento. Considera-se que assim como as plantas utilizam o pigmento clorofila para converter luz solar em energia química, estes fungos utilizam o pigmento melanina para converter uma parte diferente do espectro eletromagnético (radiação ionizante) em energia para vias anabólicas de síntese de carbono orgânico reduzido (carboidratos) para seu crescimento (DADACHOVA e CASADEVALL, 2008; ZHDANOVA, 2004).

Foi observada que a radiação promove a germinação de esporos em espécies de fungos de regiões contaminadas, resposta conhecida como resposta radioprotetiva (DADACHOVA e CASADEVALL, 2008).

Experimentos mostraram que melanina irradiada aumentou em quatro vezes a sua capacidade de reduzir NADH em comparação à melanina não irradiada. Células dos fungos melanizados *Wangiella dermatitidis* e *Cryptococcus neoformans* apresentaram uma maior taxa de crescimento, maior peso seco e incorporação três vezes maior de ^{14}C -acetato quando expostas à radiação ionizante 500 vezes maior que a radiação de fundo. Também, a exposição de células de *C. neoformans* a esses níveis de radiação (20 a 40 minutos) alterou as propriedades químicas de sua melanina e aumentou as taxas de transferência de elétrons mediadas pela melanina (medidos como redução de ferrocianeto por NADH) (DADACHOVA et al., 2007).

A exposição à radiações não ionizantes apresentaram resultados similares em relação à capacidade de transporte de elétrons mediado pela melanina. Estes resultados indicaram que fungos melanizados também são capazes de utilizar a radiação da luz visível ou do calor para o crescimento (DADACHOVA et al., 2007).

5 METODOLOGIA

5.1 Isolamento de fungos melanizados

Para o isolamento, foi efetuada a raspagem da superfície de uma amostra de alho e inoculada em meio de cultivo YPD (peptona bacteriológica 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L, glicose 20 g/L e ágar 15 g/L, pH 6,5-6,8) (AUSUBEL, et al., 1994). Após verificado o crescimento, foram selecionados como candidatos a fungos melanizados aqueles que apresentaram coloração escura, proveniente da provável presença de melanina na sua parede celular.

5.2 Ensaios de resistência a radiação UV

Para testar a capacidade de resistência dos fungos selecionados à radiação UV, inicialmente uma gota de 10 uL da cultura líquida do fungo selecionado foi inoculado na região central da placa de Petri contendo o meio sólido YPD e incubados a 35 °C até o desenvolvimento de uma massa celular visível. Posteriormente estas placas foram submetidas a exposição à radiação UV (270 – 230 nm), a qual tem ação germicida, por tempos fixos, em intervalos de dez minutos, até um tempo máximo de trinta minutos. Após a exposição, as placas foram novamente incubadas a 35 °C e o aumento do diâmetro da massa celular foi medido diariamente por um período máximo de até dez dias. Desta forma, foi construída uma curva de tempo de exposição (0, 10, 20, e 30 minutos) em função do diâmetro da massa celular por dia.

Como controle foi utilizada uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura não melanizada).

Os fungos que se apresentaram resistentes a tempos maiores de exposição à radiação UV foram testados quanto a capacidade de utilizar a energia da radiação incidente para a síntese de carbono orgânico. Inicialmente os fungos foram cultivados em meio YPD líquido a 35 °C até o crescimento, seguido de centrifugação de 2 mL da cultura a 697 ×g por 2 minutos e descarte do sobrenadante. A massa celular foi ressuspensa em 500 µL de solução salina (NaCl 0,9% (p/v)) e este volume aplicado na área central de uma placa de Petri contendo um meio de cultivo mínimo (NaNO₃ 3,0 g/L, K₂HPO₄ 1,0 g/L, MgSO₄.7H₂O 1,0 g/L, KCl 0.5 g/L, tiamina 0.003 g/L, NH₄Cl 5.3 g/L, ágar 15 g/L, pH 6.5) (ADACHOVA et al., 2007). Estas placas foram submetidas a exposições diárias à radiação UV (uma exposições de 30 minutos/dia) para estímulo do desenvolvimento da massa celular. O diâmetro de crescimento foi medido

diariamente até um período máximo de dez dias. De acordo com os resultados, os tempos de exposição à radiação UV foram aumentados para se verificar o efeito causado.

Como controle foram utilizados os mesmos fungos ensaiados, porém sem serem expostos à luz UV.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos devem ser considerados como suposições e não concretizações. Por falta de estrutura ou bibliografia, alguns resultados presentes neste projeto não podem ser tratados como resultados concretos, e sim como hipóteses.

Na proposta original, os fungos melanizados seriam obtidos a partir de fontes naturais ricas em β -caroteno, porém optou-se em isolar estes fungos a partir de amostras de alho (*Allium sativum*), uma vez que foi descrito que os fungos radiotróficos descobertos nos reatores nucleares da usina de Chernobyl eram da espécie *Penicillium hirsutum*, comum em plantações de alho (MORAES, 2008).

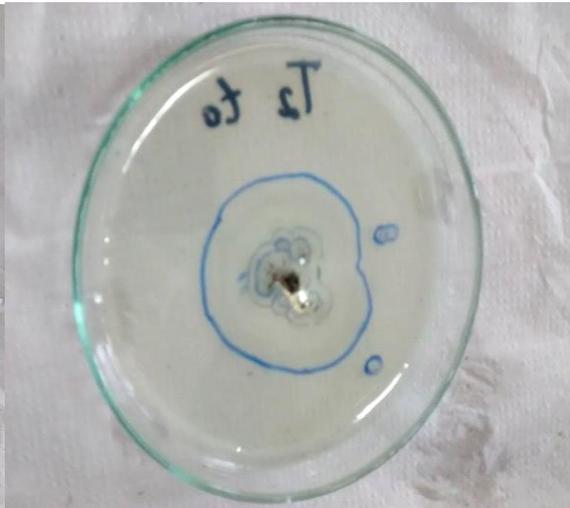
Os fungos isolados foram submetidos a exposição à radiação UV-C em diferentes intervalos de tempo: 0, 10, 20 e 30 minutos (Figura 3).

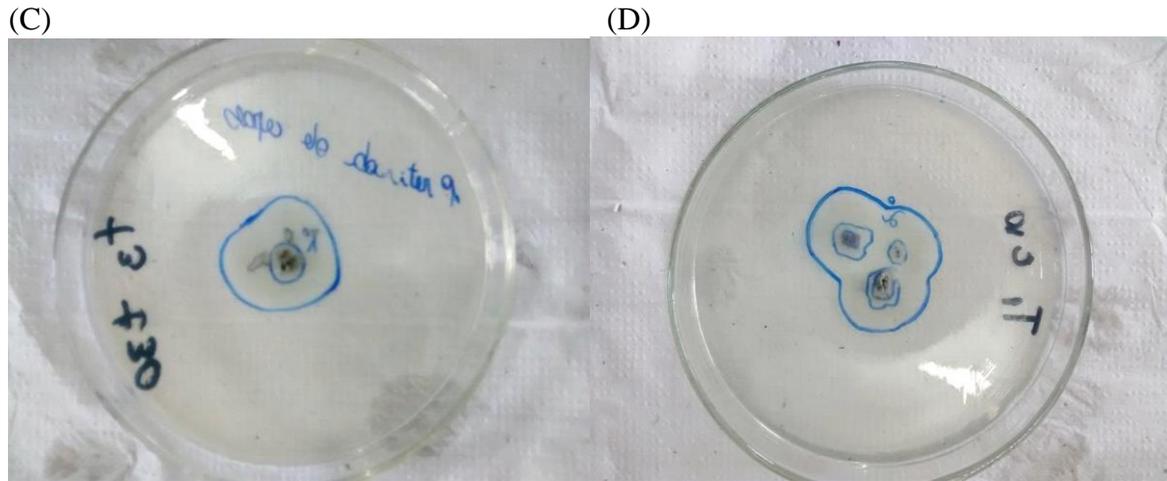
Figura 3 Placas de Petri contendo o fungo *Penicillium hirsutum* submetidos à exposição a UV-C. Os fungos foram pré-cultivados em meio YPD, seguido da inoculação de 10 uL do pré-inóculo em meio sólido mínimo, seguido por incubação a 35 °C por 72 horas antes da primeira exposição. A, controle (sem exposição); B, 10 minutos; C, 20 minutos e D, 30 minutos de exposição a UV-C.

(A)



(B)



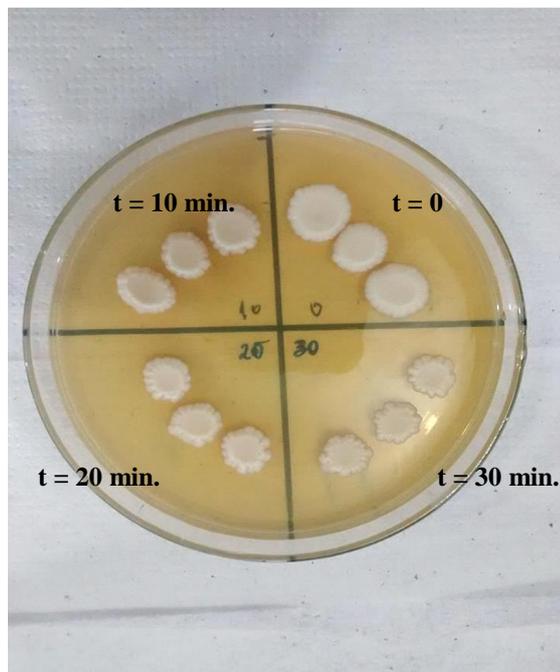


Fonte: autores.

O tempo de exposição de 15 minutos a UV-C é considerado "esterilizante", uma vez que é capaz de induzir a formação de dímeros de timina no DNA de microrganismos, impedindo a replicação (PELCZAR, 1977).

Neste sentido, utilizou-se como experimento controle uma suspensão de *S. cerevisiae* (0,2 g/mL), inoculada em meio de cultivo sólido Sabouraud Dextrose e submetida a exposição a UV-C em 0, 10, 20 e 30 minutos (Figura 4).

Figura 4 *S. cerevisiae* inoculada em meio sólido Sabouraud Dextrose submetida a UV-C em diferentes tempos.



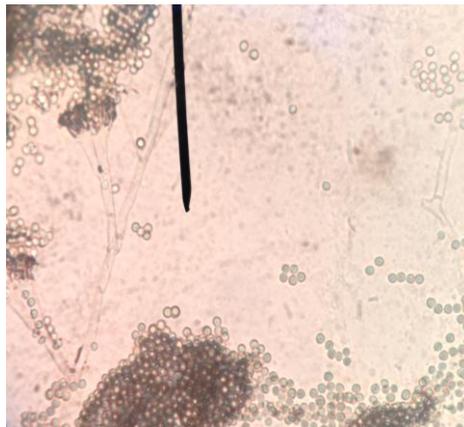
Fonte: autores.

A análise do padrão de crescimento de *S. cerevisiae* revelou que esta levedura sofreu danos e cessou o crescimento a partir de 10 minutos de exposição, reforçando a hipótese do efeito da radiação UV-C sobre o desenvolvimento celular.

Os fungos expostos a diferentes tempos apresentaram diferentes comportamentos, mesmo sendo provenientes do mesmo inóculo.

O fungo controle (sem exposição) apresentou aumento de sua estrutura continuamente em 0,2 cm por dia, em um círculo definido e sem pigmentos aparentes de melanina excessivos em sua massa celular. Foi possível observar hifas não melanizadas, porém, com os esporos aparentemente cobertos pelo pigmento (Figura 5).

Figura 5 Microscopia óptica de amostra de fungo não submetido à exposição a UV-C. Aumento de 1.000 x, sem a utilização de corante.

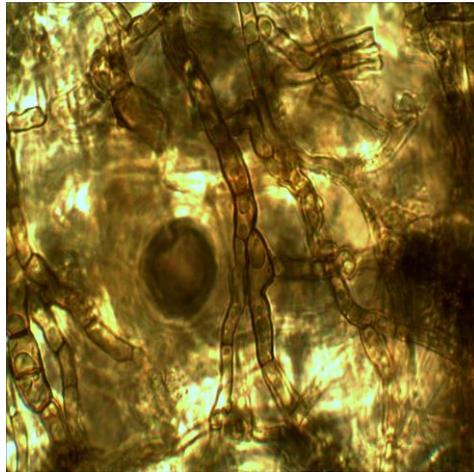


Fonte: autores

A amostra que foi exposta ao tempo de trinta minutos contínuos foi a de comportamento mais surpreendente, que consistiu em apresentar uma concentração de colônias densas e com pigmentos concentrados nos centros das colônias. O aumento de seu diâmetro também foi de comportamento imprevisível e diferenciado do controle, sendo assim, com esse grande índice de resistência foi então proposto uma aproximação da amostra na fonte de radiação, para que esta recebesse dosagens de um nível maior de energia. Os resultados mostraram que com este procedimento o comportamento foi diferente, as colônias pararam seu crescimento e aumentaram a quantidade de melanina aparente, observadas após as exposições. Quando as exposições foram cessadas e os fungos incubados em estufa, o comportamento foi similar ao controle, tendo aumento de hifas sem nenhuma presença de melanina, mas deixando as colônias centrais com a melanina já produzida.

A análise por microscopia óptica dos fungos expostos a UV-C por 30 minutos (Figura 6) revelou que as hifas (bem individualizadas) eram septadas e apresentaram a parede celular escura, supostamente com traços de melanina.

Figura 6 Microscopia óptica do fungo exposto a UV-C por 30 minutos. As amostras foram oriundas do inóculo produzido com os fungos expostos à 30 minutos, com aumento de 1.000 x, com imersão e sem utilização de corante.



Fonte: autores.

Diante dos resultados observados, uma das hipóteses é de que o fungo se comportou às exposições a radiação UV-C semelhantemente ao organismo humano exposto ao sol; a exposição aos raios solares em pequenos intervalos diários por um longo período (10, 15 e 20 minutos, por exemplo) não acaba bronzeando a pele, mas prejudica a saúde, resultando no desenvolvimento de câncer de pele ou outros problemas, como envelhecimento precoce. Já uma exposição intensa em um curto período de tempo (30 minutos de exposição) acaba resultando na autoproteção do organismo, o que no ser humano causa o bronzeamento, uma forma do organismo se proteger contra os raios solares.

Os resultados mostraram que a presença de melanina pode contribuir para a sobrevivência dos fungos frente à exposição à radiação UV-C em tempos prolongados, quando comparado ao controle. Foram relatados fungos melanizados capazes de sobreviver a elevadas doses de radiação ionizante (radiação ©), sugerindo que são capazes de crescerem sem possuírem os devidos nutrientes, pois eles podem estar usufruindo da energia radioativa em um processo semelhante ao que acontece com os seres fotossintetizantes.

7 CONCLUSÃO

Foram isolados fungos septados, aparentemente do tipo *Penicillium*, a partir de amostras de alho. Análises de microscopia óptica revelaram que possuem esporos melanizados e de parede celular densa, sugerindo fortemente em se tratar de fungo da espécie presente tipicamente em alho (*P. hirsutum*) e suspeita de colonizar as paredes dos reatores nucleares da usina Chernobyl. Quando expostos a radiação UV-C mostraram-se resistentes à exposição por 30 minutos, quando comparada ao controle de *S. cerevisiae*, além da radiação ter, aparentemente, induzido a síntese de melanina, observada como pontos negros no centro das colônias.

8 REFERÊNCIAS

- AUSUBEL, BRENT, KINGSTON, MOORE, SEIDMAN, SMITH e STRUHL. Current protocols in molecular biology, **Current Protocols**: Brooklyn, N.Y., 1994.
- CALVO, A.M.; WILSON, R.A.; BOK, J.W.; KELLER, N.P. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 66(3), p.447-459, 2002.
- DADACHOVA, E.; BRYAN, R.A.; HUANG, X.; MOADEL, T.; SCHWEITZER, A.D.; AISEN, P.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. **PLoS One**, 2007.
- DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Ionizing Radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. **Curr. Opin. Microbiol.**, 2008.
- DIGHTON, J.; TUGAY, T.; e ZHDANOVA, N. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. **FEMS Microbiology Letters**, 2008.
- MORAES, M. Os monstros de Chernobyl. **Superinteressante**, 257, 2008.
- ROBINSON, C.H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, 151(2), 2001.
- ZHDANOVA, N.; LASHKOM T.; VASILIVESKAYA, A.; BOSISYUK, L.; SINYAVESKAYA O.; GAVRILYUK, V.; e MUZALE, P. Interaction of soil micromycetes with 'hot' particles in a model system. **Microbiologichny Zhurnal.**, 1991.
- ZHDANOVA, N.; TUGAY, T.; DIGHTON, J.; ZHELTONOZHISKY, V.; MCDERMOTT, P. Ionizing radiation attracts soil fungi. **Mycological Res.**, 108(9), p. 1089-1096, 2004.
- PELCZAR M.J., CHAN E.C.S. Laboratory Exercises in Microbiology, 4th Edition. New York, Mc Graw Hill, 1977.