



Caracterização morfológica e bioquímica de uma nova espécie do gênero *Aspergillus*, isolada na caverna Gruta do Catão, São Desidério - BA

Aluna: Juliana Cristina Porta Caldeira

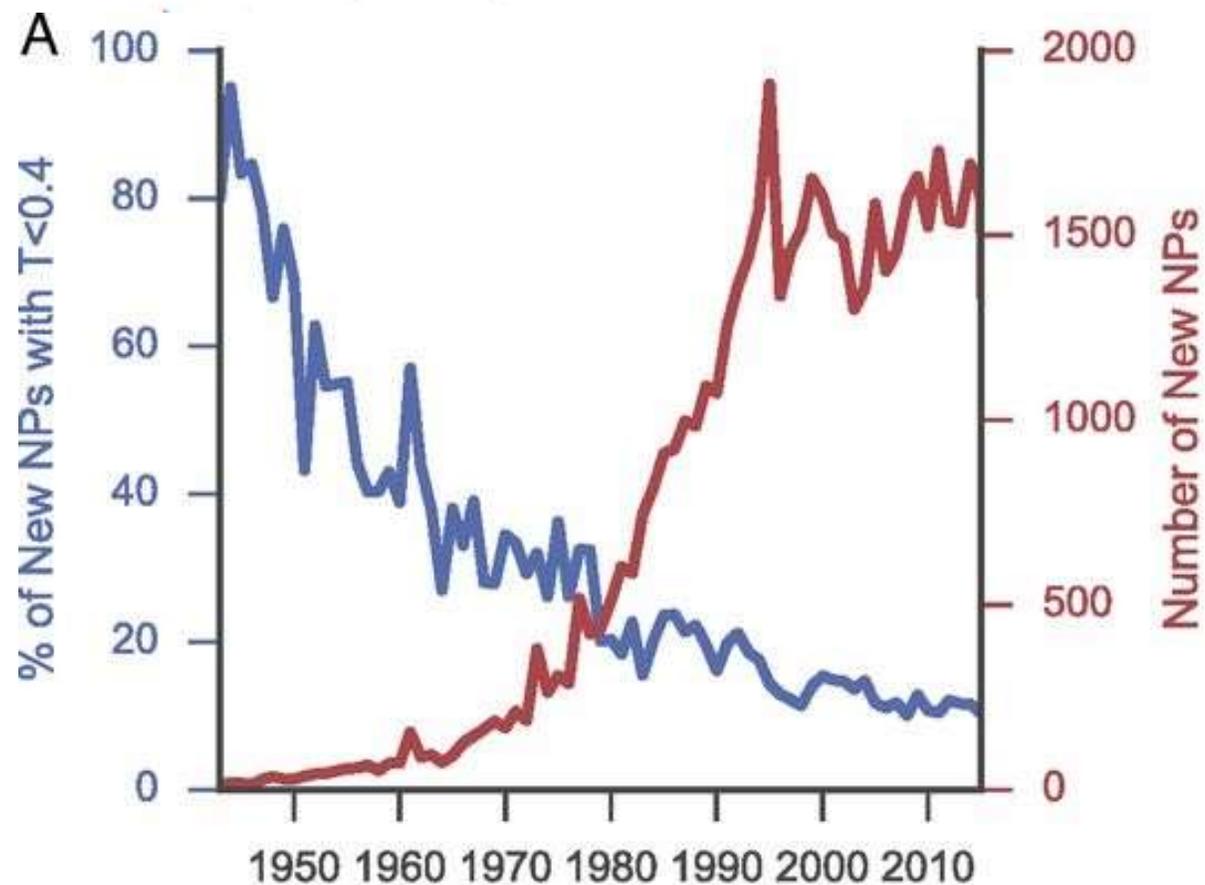
Orientadora: Dra. Mirna H. Regali Seleglim

Coorientadora: Dra. Carla Andréa Leite

Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends

Cameron R. Pye^a, Matthew J. Bertin^{b,c}, R. Scott Lokey^a, William H. Gerwick^{b,c,1}, and Roger G. Linington^{d,1}

- Declínio na descoberta de novos compostos naturais



(PNAS, 2016)

Potencial da descoberta de novos compostos a partir de microrganismos originários de ambientes extremos

Antibiotic drug discovery

Wolfgang Wohlleben , Yvonne Mast, Evi Stegmann, Nadine Ziemert

First published: 29 July 2016 | <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12388>

Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites

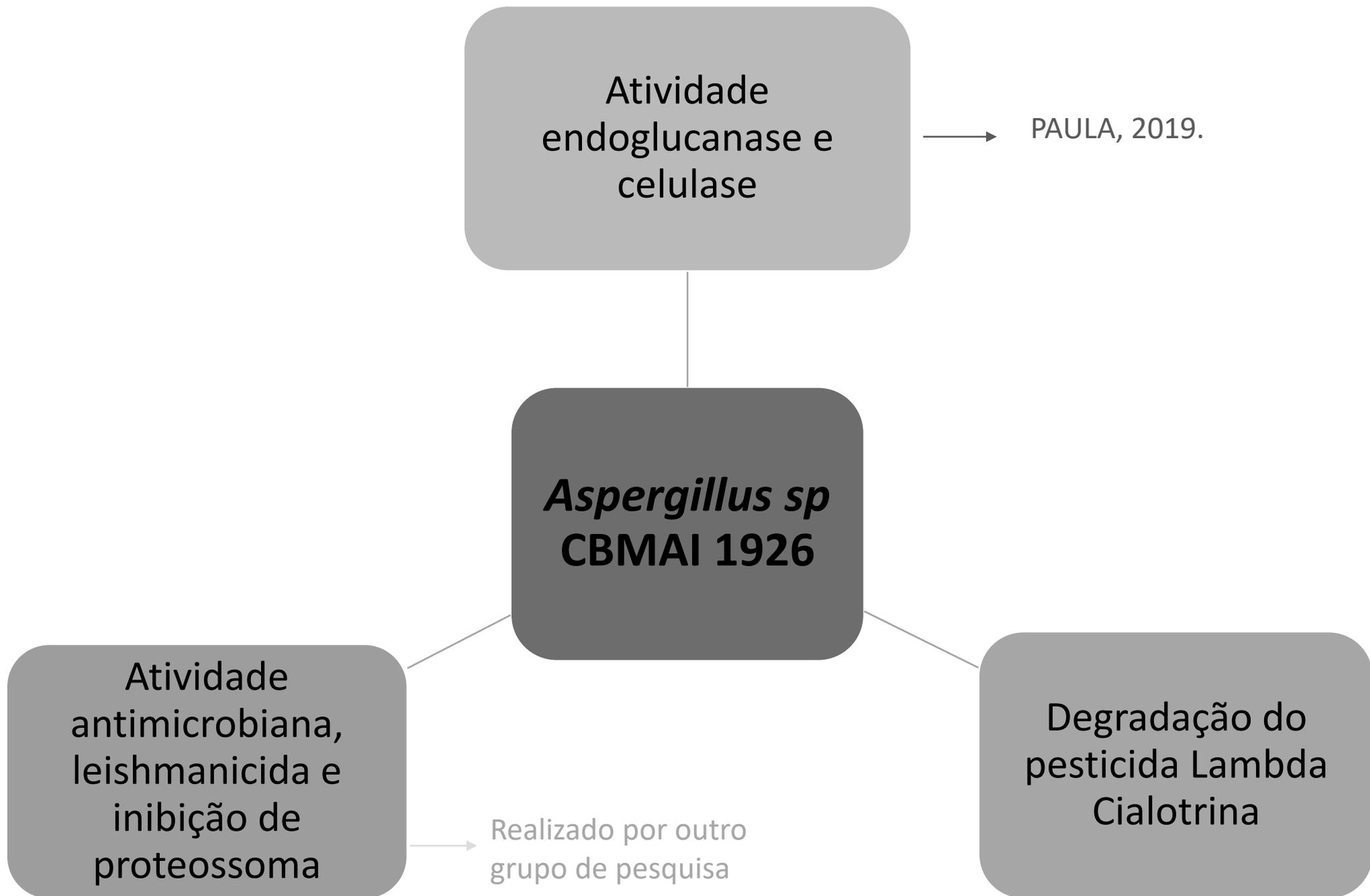
Renato Chávez¹, Francisco Fierro^{2}, Ramón O. García-Rico³ and Inmaculada Vaca^{4*}*

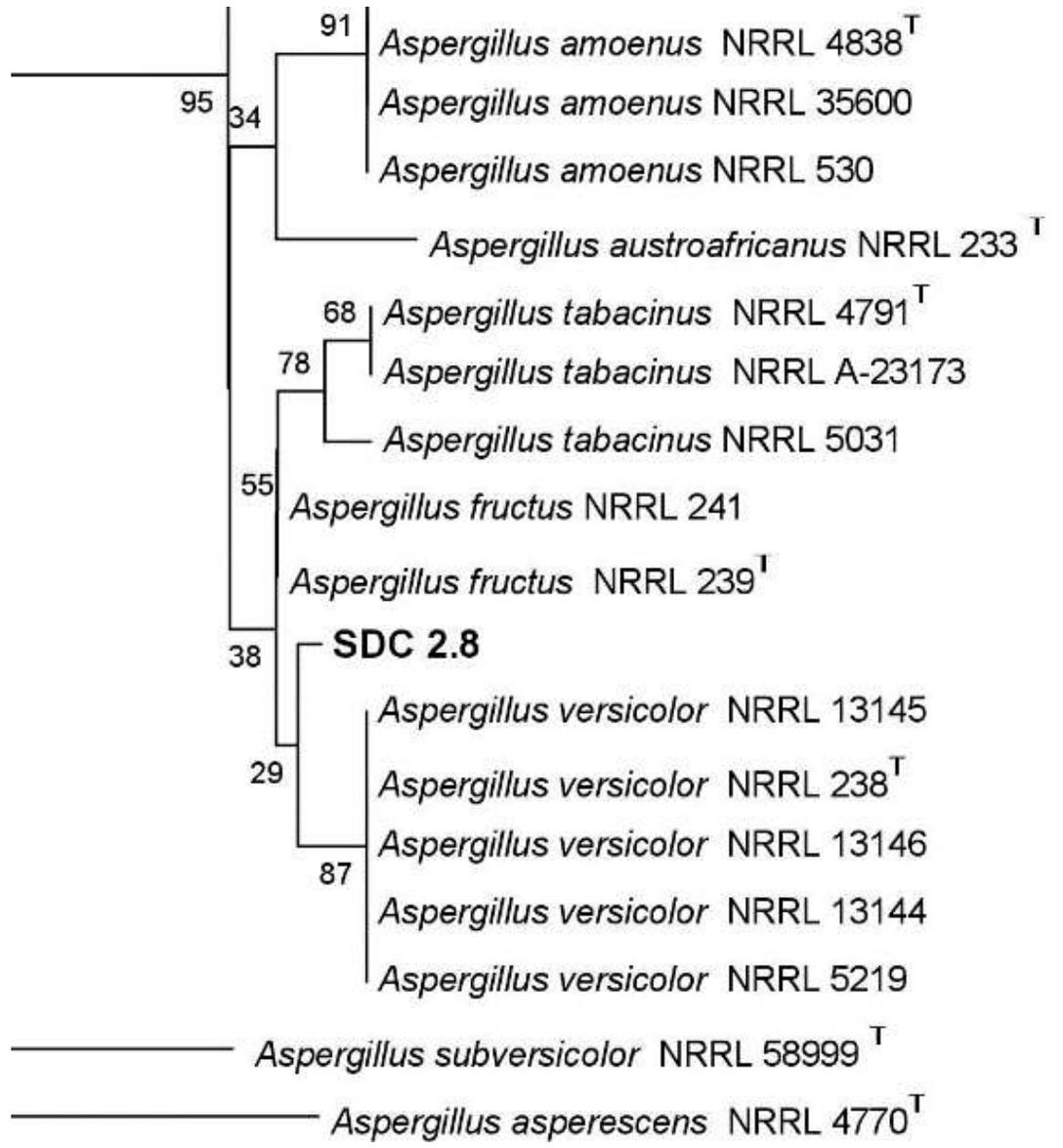
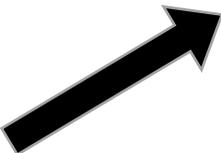
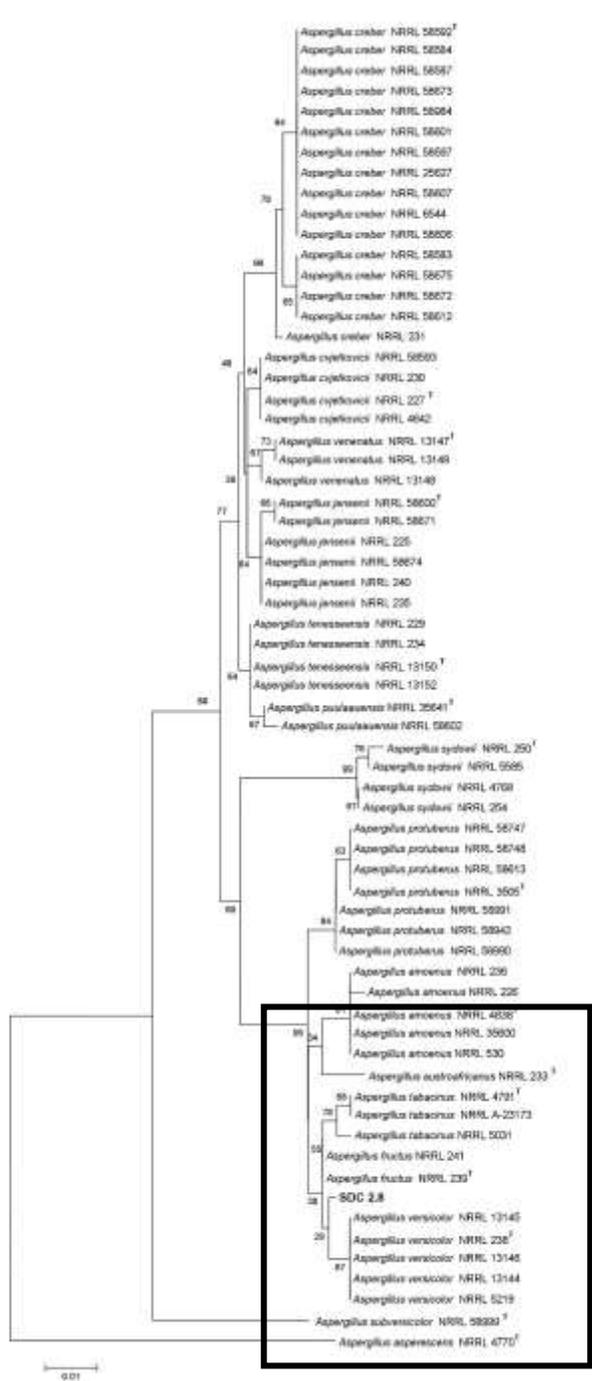
Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites

A.M. Sayed, M.H.A. Hassan, H.A. Alhadrami, H.M. Hassan, M. Goodfellow, M.E. Rateb 

First published: 16 July 2019 | <https://doi.org/10.1111/jam.14386>







Método “Neighbor-Joining” obtido para a linhagem *Aspergillus sp* CBMAI 1926 (SDC 2.8) baseada na análise filogenética dos dados da sequência de β -tubulina. Os números das ramificações acima são valores de bootstrap e a frente dos nomes estão os números de acesso no GenBank. Apenas valores acima de 50% são indicados.

Objetivo

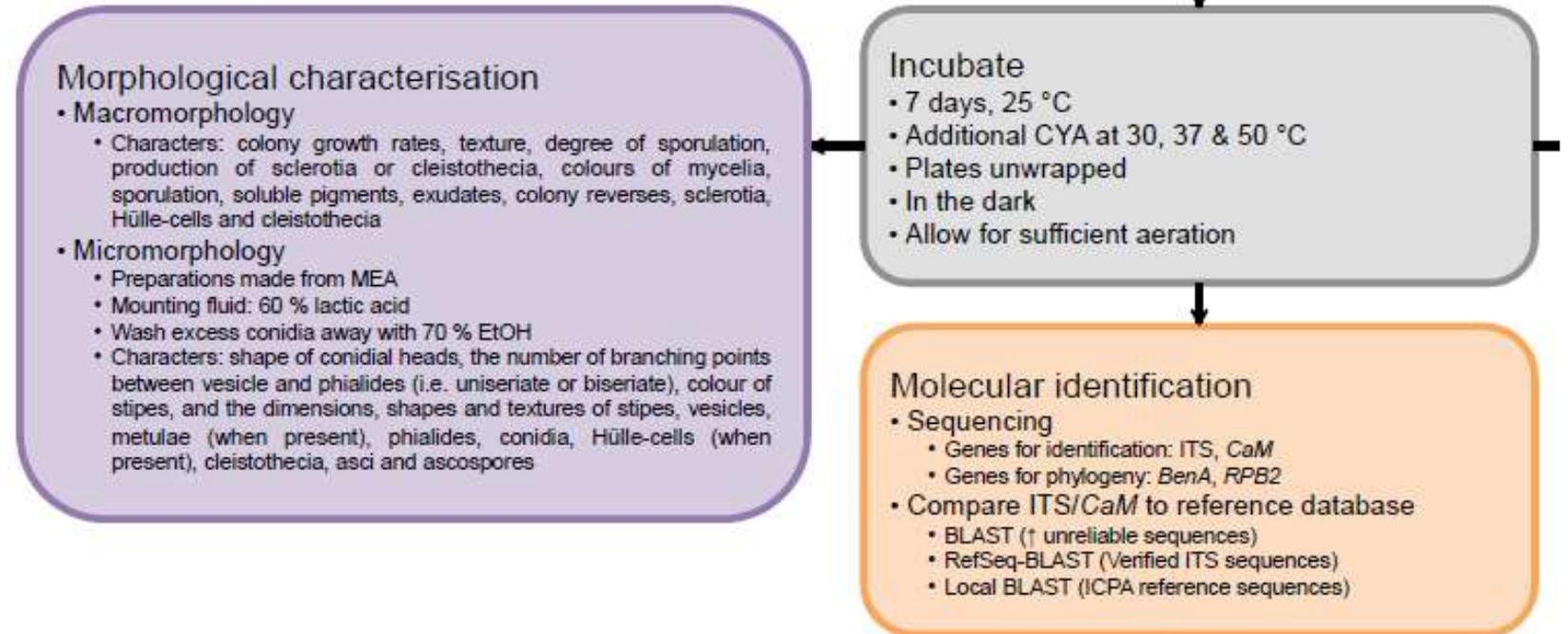
Caracterização morfológica, molecular e bioquímica do *Aspergillus sp* CBMAI 1926 utilizando ferramentas fenotípicas e moleculares.





Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*

R.A. Samson^{1*}, C.M. Visagie¹, J. Houbraken¹, S.-B. Hong², V. Hubka³, C.H.W. Klaassen⁴, G. Perrone⁵, K.A. Seifert⁶, A. Susca⁵, J.B. Tanney⁶, J. Varga⁷, S. Kocsubé⁷, G. Szigeti⁷, T. Yaguchi⁸, and J.C. Frisvad⁹



Resultados parciais - Microscopia

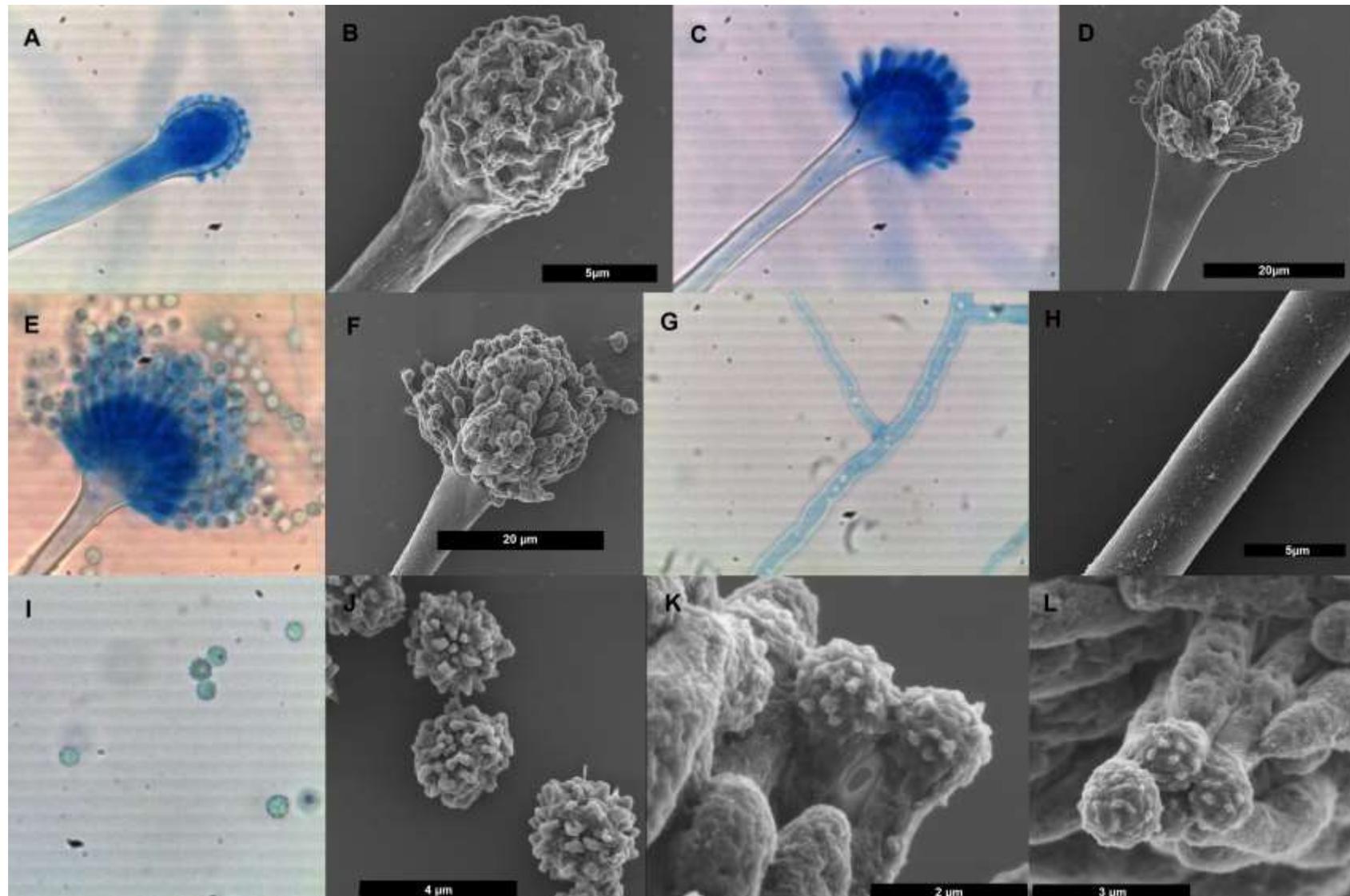
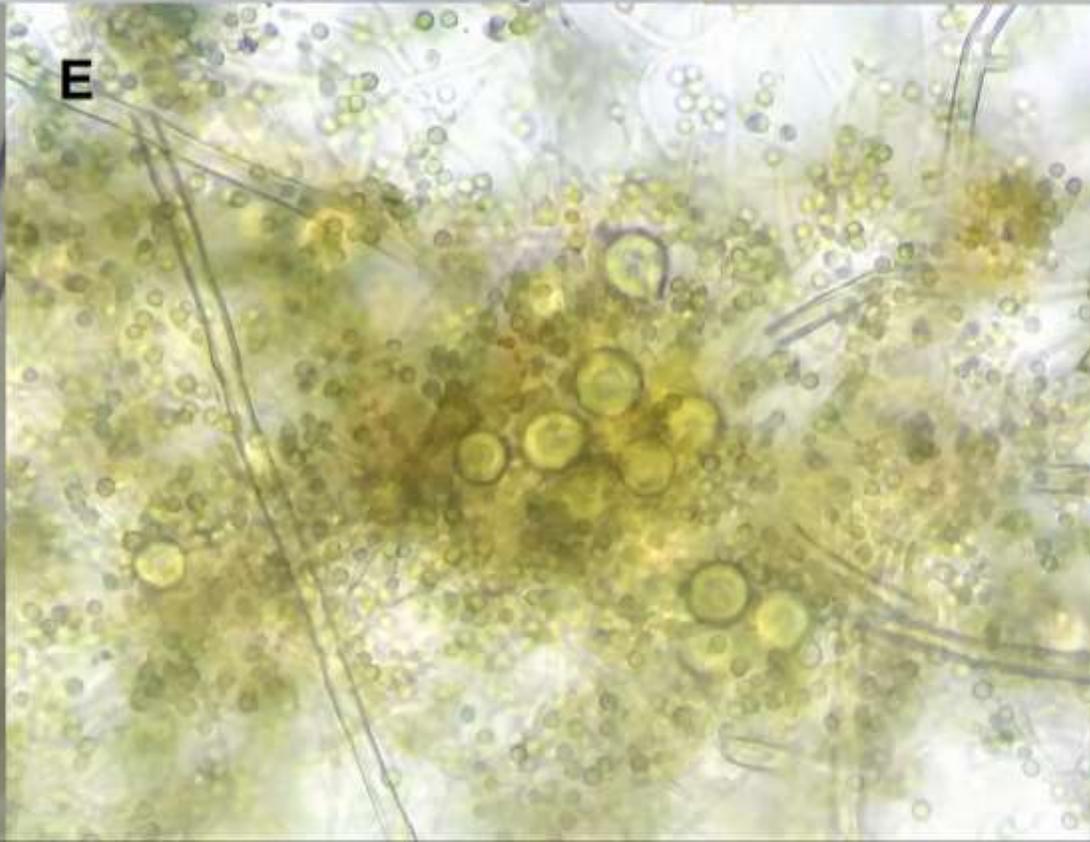
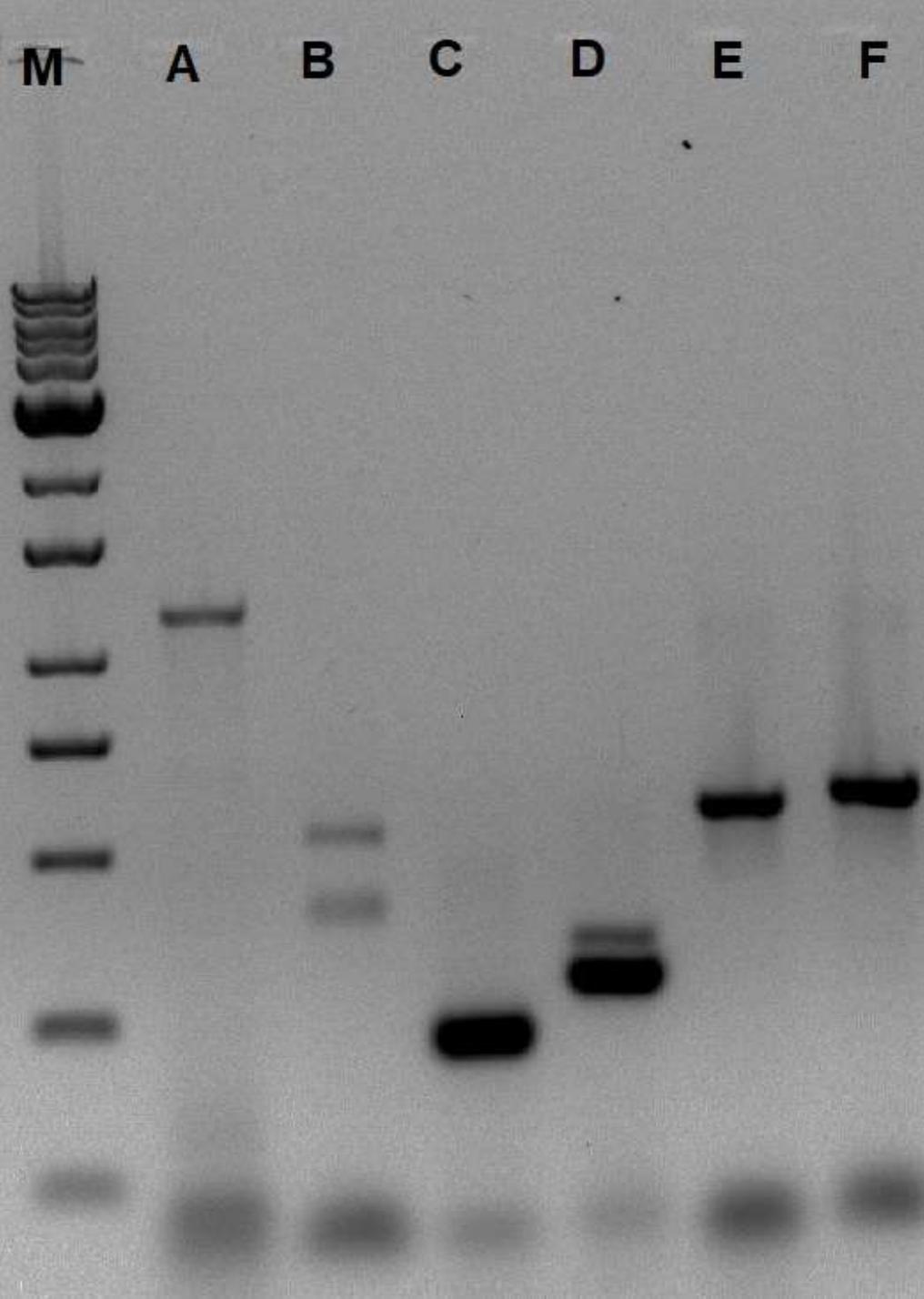


Figura 9. A e B. Conidióforo em formação com 3 dias. C e D. Conidióforo com 5 dias já apresenta vesícula bisseriada. E e F. Conidióforo com formação de vesícula bisseriada hemisférica (7 dias). G. Hifas hialinas. H. Hifa imagem MEV. I e J. Conídios com ornamentação verrugosa. K e L. Conídios em formação. As imagens em microscópio óptico estão com um aumento de 400X e foram realizadas utilizando o corante azul de algodão (Lactofenol).





Identificação por técnicas moleculares

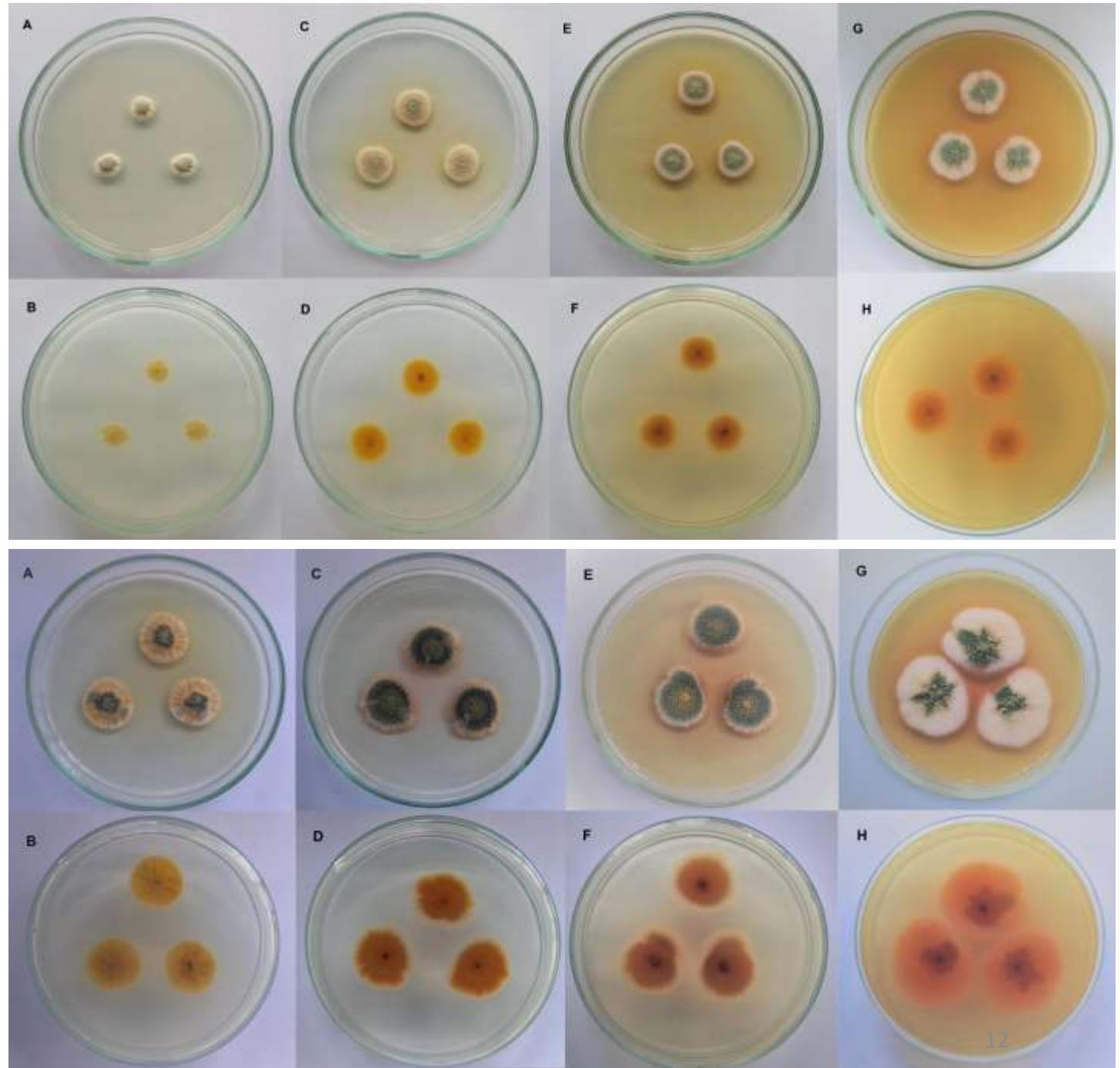
M. Marcador molecular GD 1Kb plus DNA Ladder RTU, GeneDirex. **A.** gene *RPB2* ~1200pb. **B.** gene *CaM* ~580pb. **C.** região do ITS1 ~250pb. **D.** região do ITS2 ~280pb. **E.** oligos ITS1 e ITS4 para amplificar a região interna do ITS ~550pb. **F.** oligos ITS1 e ITS5 para amplificar a região interna do ITS ~550pb.

Extração de DNA: protocolo do kit de extração de DNA de Microrganismos, NucleoSpin® Microbial DNA- MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG. E a quantificação do DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro UV-VIS Nanovue (GE Healthcare).

Morfologia das colônias em diferentes pH

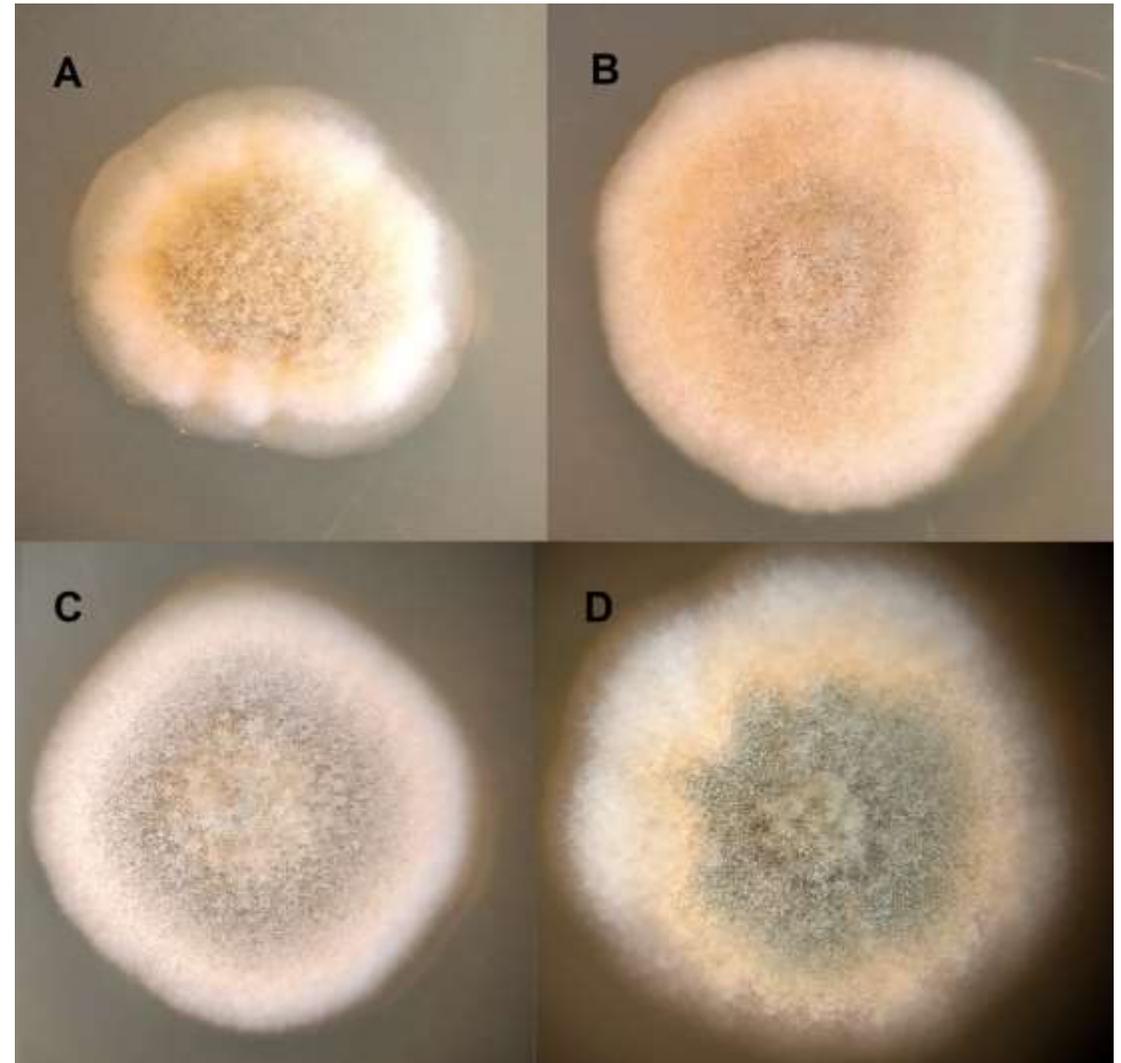
Incubadas em BOD à 25°C por 7, 14 e 21 dias.

A – pH 3
C – pH 5
E – pH 7
G – pH 9



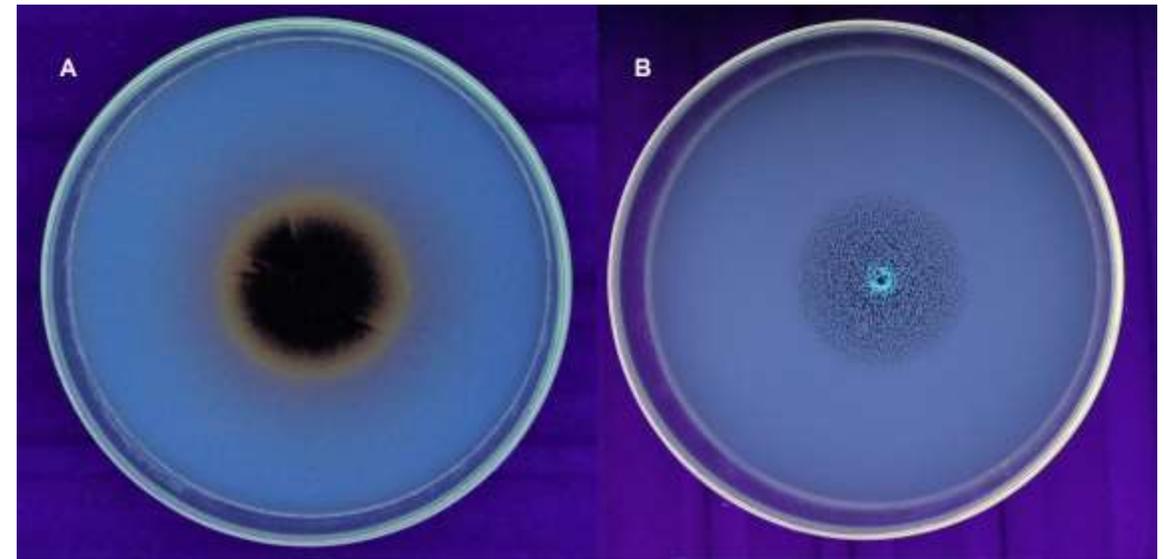
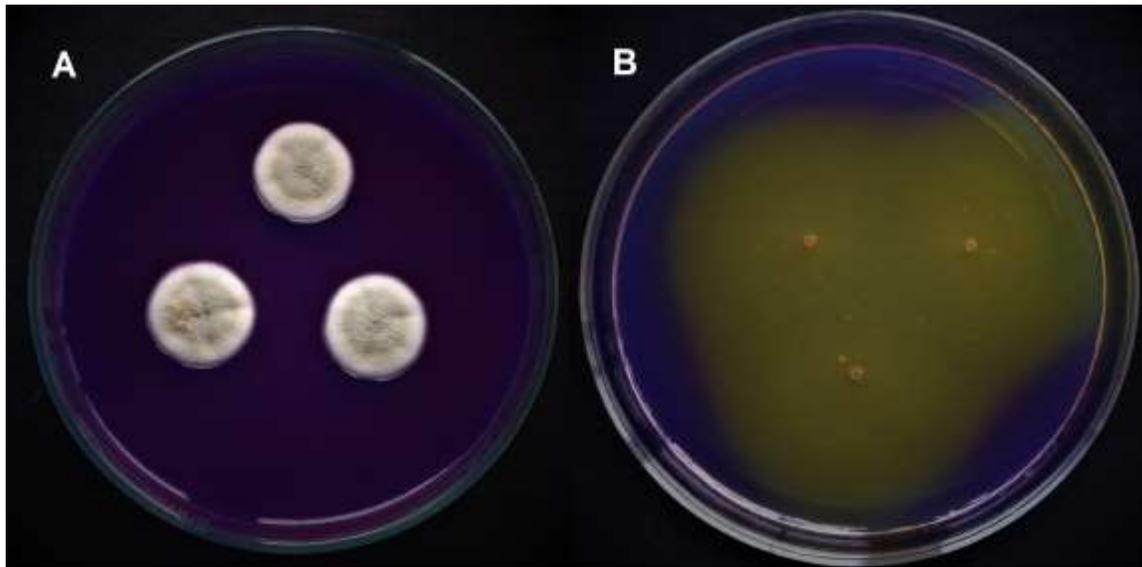
Morfologia das colônias em diferentes pH

As águas do Rio João Rodrigues que passam pela Gruta do Catão, habitat natural da linhagem, apresentavam $\text{pH } 7,4 \pm 0,03$ no momento da coleta do substrato. Essa caverna é formada por rochas carbonáticas que, em contato com a água, libera bicarbonato de cálcio, um sal com características básicas (PAULA, 2014)



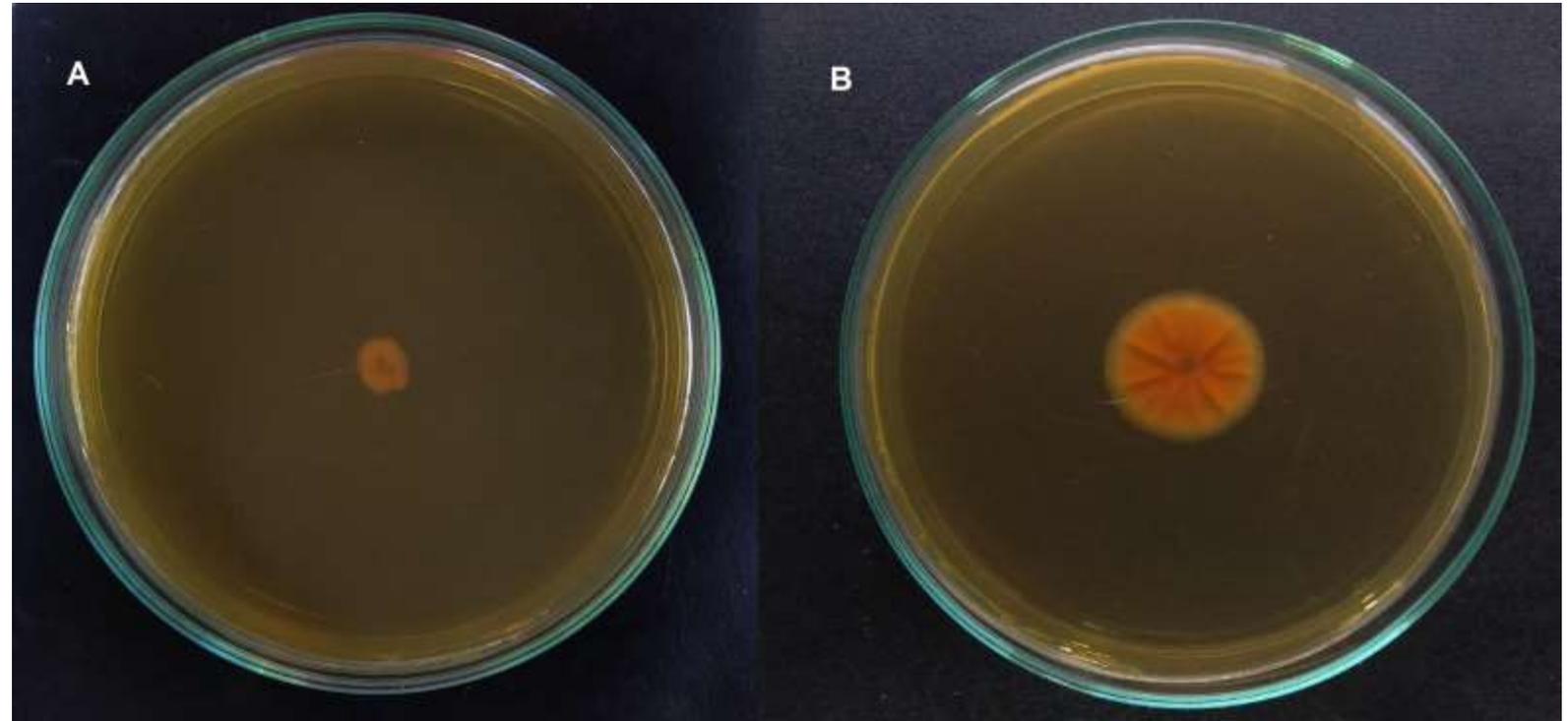
Colônias com 7 dias.

Produção de ácidos orgânicos e aflatoxinas



A. *Aspergillus* sp CMBAI 1926. B. *Aspergillus niger*.

Produção de
ácido
aspergílico e
ácido
neoaspergílico



A. *Aspergillus sp* CBMAI 1926.

B. *Aspergillus flavus*.

- A linhagem não é produtora de ácido aspergílico ou ácido neoaspergílico.



Produção de urease

- Como essa linhagem foi isolada de um ambiente extremo, acreditamos que a produção de urease está relacionada com o processo de obtenção de energia, uma vez que não há indícios desse isolado ser patogênico.

Conclusão

- confirmar que essa linhagem pertence a **um novo clado** de *Aspergillus*, e, este clado pode ou não estar na seção *Versicolores* por diferir das outras espécies.
- Apresentou resultados instigantes quanto a sua **capacidade de crescimento e obtenção de energia**. A hidrólise da ureia utilizando a enzima urease e a utilização da creatina como única fonte de nitrogênio indica a presença de um regulador genético complexo do metabolismo do nitrogênio (MARZLUF, 1997).

Próximas etapas



Curva de crescimento utilizando o meio MEA-Difco e diferentes temperaturas de incubação 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 e 40°C, por um período de 10 dias de crescimento



Caracterização morfológica (MEA-Difco e CYA) em um amplo gradiente de temperatura de incubação (10, 15, 20, 25, 30, 33, 37, e 42°C) por um período de 5, 7, 10, 14 e 21 dias de crescimento.



Purificação dos produtos de PCR e enviar para ser sequenciado.



Avaliar as características macroscópicas das colônias de *Aspergillus sp* CBMAI 1926 incubadas no escuro, na luz e em fotoperíodo 12/12h claro/escuro (Experimento em finalização)

Referências

CHÁVEZ, Renato et al. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 903, 2015.

MARZLUF, G. A. **Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 61, n. 1, p. 17-32, 1997.

PAULA, C. C. P. **Estudo da microbiota edáfica da área cárstica de São Desidério-BA e avaliação do seu potencial celulolítico para possíveis aplicações em microbiologia ambiental**. 2014. 108f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, 2014.

PAULA, CAIO CP DE et al. Altas atividades celulolíticas em fungos filamentosos isolados de um ambiente subterrâneo oligotrófico extremo (caverna do Catão) no Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019.

PYE, Cameron R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.

SAMSON, Robert A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SAYED, Ahmed M. et al. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. **Journal of applied microbiology**, 2019.

WOHLLEBEN, Wolfgang et al. Antibiotic drug discovery. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 541-548, 2016.

AGRADECIMENTOS e COLABORADORES

- À FAPESP, pelo financiamento da pesquisa (processo 2019/03878-3)
- Ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade pela licença de coleta concedida (licença ICMBio/SISBIO 10215).



Profa. Dra. Maria Elina Bichuette
– DEBE/UFSCAR
(FAPESP 2010/08459-4)



Dr. Caio César Pires de Paula,
Institute of Hydrobiology, Biology
Centre CAS, Czech Republic .



Prof. Dr. André Rodrigues -
Departamento de Bioquímica e
Microbiologia, UNESP Rio Claro



Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza
Berlinck, IQSC-USP São Carlos.



Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto –
Grupo de Química Orgânica e
Biocatálise – IQ/USP São Carlos.



Me. Fábio Rocha Rigolin
– DEBE/UFSCAR.