

Artigo

História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (*Neonothopanus gardneri*) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz

Ventura, F. F.; Silva, R. T. P.; Stevani, C. V.*

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (1), 41-55. Data de publicação na Web: 1 de novembro de 2014

<http://www.uff.br/rvq>

History of the Bioluminescent Fungi Flor-de-Coco (*Neonothopanus gardneri*) and Effects of Culture Conditions on Light Emission

Abstract: The investigations on fungal bioluminescence initiated in 2001 in Brazil at the Laboratory of Fungal Bioluminescence of Instituto de Química – Universidade de São Paulo. Ever since, 13 Brazilian species (14% of total) were identified by the group. The fungus *Gerronema viridilucens* was used initially as model organism in the mechanistic studies on light emission and on the toxicological assay. Nowadays, this fungus was replaced *Neonothopanus gardneri*, whose characteristics of growth and bioluminescence are more suitable to the research conduct in the laboratory. Toxicological luminescent assays with fungi are important to evaluate the bioavailability and the effects caused by environment pollutants and fungicides. However, before the development of such assays it is necessary to optimize the culture conditions, aiming to obtain a more constant and reproducible bioluminescence profile. In this work, the history of bioluminescent fungi in Brazil is present from the point of view of the group. Moreover, the variation of culture conditions was evaluated in order to develop a toxicological assay with *N. gardneri*. Therefore, conditions such as temperature, medium pH and nutrients concentration were altered. The most adequate condition to the expected application was defined as pH 6, 30°C, 1% of sugarcane molasses and 0,01% yeast extract. In this condition the light emission is high and presents a low variation pattern. This species is a good option to perform toxicological assays, demonstrating benefits when compared to the *G. viridilucens* fungus.

Keywords: Basidiomycete; bioassay; bioluminescence; ecotoxicity.

Resumo

As investigações sobre fungos bioluminescentes no Brasil iniciaram-se em 2001, no Laboratório de Bioluminescência de Fungos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Desde então, foram identificadas 13 espécies nacionais (14% do total no mundo) pelo grupo. O fungo *Gerronema viridilucens* foi inicialmente utilizado como organismo modelo nos estudos mecanísticos de emissão de luz e ensaios de toxicidade. Atualmente, este fungo foi substituído pelo *Neonothopanus gardneri*, cujas características de crescimento e bioluminescência mostraram-se mais adequadas às linhas de pesquisa desenvolvidas. Ensaios bioluminescentes de toxicidade com fungos são importantes para avaliar a biodisponibilidade e os efeitos causados por poluentes ambientais e fungicidas. Entretanto, antes de desenvolver tais ensaios é necessário a otimização das condições de cultura, visando obter um perfil de bioluminescência mais constante e reprodutível. Este trabalho apresenta o histórico sobre fungos bioluminescentes no Brasil sob o ponto de vista do grupo. Adicionalmente, as condições de cultura foram variadas e avaliadas com o intuito desenvolver um ensaio toxicológico com o *N. gardneri*. Para isso, foram variados os fatores temperatura, pH do meio e concentração de nutrientes. A condição mais adequada à aplicação prevista foi definida como pH 6, não tamponado, 30°C, 1% de melado de cana e 0,01% de extrato de levedura. Nesta condição a emissão de luz é alta e apresenta um perfil com menos variação. Esta espécie é uma boa opção para ensaios de toxicidade, apresentando vantagens em relação ao fungo *G. viridilucens*.

Palavras-chave: Basidiomiceto; bioensaio; bioluminescência; ecotoxicidade.

* Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Química Fundamental, Campus de São Paulo, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil.

✉ stevani@iq.usp.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150003](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150003)

História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (*Neonothopanus gardneri*) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz

Fernanda de F. Ventura,^{a,b} Rafael T. P. Silva,^a Cassius V. Stevani^{a,*}

^a Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Química Fundamental, Campus de São Paulo, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil.

^b Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, CEP 05409-002, São Paulo-SP, Brasil.

* stevani@iq.usp.br

Recebido em 1 de novembro de 2014. Aceito para publicação em 1 de novembro de 2014

1. Introdução
2. Metodologia
3. Resultados de Discussão
4. Conclusões

1. Introdução

O estudo que é desenvolvido com fungos bioluminescentes no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), no Laboratório de Bioluminescência de Fungos (LBF), foi iniciado em março de 2001 com uma visita ao Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), no município de Iporanga, SP. Na época, o Prof. Stevani, o então aluno de doutorado e biólogo João R. L. de Godoy (que havia encontrado cogumelos bioluminescentes na localidade alguns meses antes) e mais alguns colaboradores tentaram, em vão, encontrar cogumelos bioluminescentes na floresta da Mata Atlântica. No ano seguinte, em março também, finalmente foram encontrados alguns cogumelos, pertencentes à primeira

espécie de fungo que foi identificada, *Gerronema viridilucens*. A obtenção da cultura isolada do fungo *G. viridilucens* (micélio), entretanto, só foi alcançada em dezembro de 2003, com a ajuda do então mestrando Moacir A. Torres e da Dra. Marina Capelari, taxonomista de fungos do Instituto de Botânica do Parque do Estado, em São Paulo, SP (IBot). Neste meio tempo, dezenas de expedições foram realizadas ao PETAR com o intuito de isolar o micélio do fungo *G. viridilucens*, identificado em 2005,¹ sendo que muitas delas envolveram o transporte de material de cultura microbiológica, equipamentos científicos, tenda para acampar e mantimentos para a localidade denominada Camargo (ou Jabuticabeira, devido à centenária jabuticabeira que ali se encontra), distante 12 km mata adentro, no Bairro da Serra, em Iporanga (Figura 1).



Figura 1. Transporte de material científico e provimentos em duas expedições diferentes na floresta da Mata Atlântica em Camargo, município de Iporanga, SP, em abril de 2002 e 2003.
Fotos: Cassius V. Stevani, IQ-USP, Brasil

No início, em 2002, não havia nenhuma informação anterior sobre fungos bioluminescentes no Brasil. Quando se diz “nenhuma informação” não há uso de hipérbole, pois não existiam sequer relatos confiáveis da existência, muito menos de amostras preservadas em herbários brasileiros, de espécies de fungos bioluminescentes. Desta forma, o trabalho desenvolvido pelo LBF foi pioneiro neste assunto, partindo literalmente do zero. Atualmente, foram descobertas 13 novas espécies de fungos bioluminescentes no

Brasil pelo LBF, o que corresponde a 14% do total de 91 descritas (D. E. Desjardin, comunicação pessoal). Dentre as espécies brasileiras, onze podem ser encontradas no PETAR, uma na Amazônia, uma em Costa Rica, MS, uma em Jacarezinho, PR e uma na Mata dos Cocais (Piauí, Tocantins, Goiás e Maranhão).^{2,3} Amostras de todo o material estão depositadas no IBot e no herbário da San Francisco State University, em São Francisco, CA, EUA, sob os cuidados do Prof. Dennis E. Desjardin, curador e taxonomista responsável pela identificação de todos os

fungos descobertos. Foram também obtidas culturas isoladas de cinco fungos bioluminescentes, *G. viridilucens*, *Mycena lucentipes*, *M. asterina*, *M. luxaeterna* e *Neonothopanus gardneri*. Em 2011 a espécie *M. luxaeterna* foi eleita uma das [Top Ten New Species](#) pelo International Institute for Species Exploration da Arizona State University, EUA. É interessante também relatar que quatro das espécies de fungos descritas como bioluminescentes já tinham sido identificadas anteriormente, porém sem a descrição de sua emissão de luz. Geralmente, os taxonomistas de fungos coletam os cogumelos de dia, anotam observações sobre a forma, cor e outras características e os secam para preservação, procedimento este que extingue a emissão de luz. A descoberta de novas espécies bioluminescentes requer que a coleta seja feita à noite, de preferência na fase de Lua Nova, desligando as lanternas de tempo em tempo, durante a caminhada pela floresta.

Dois dos fungos coletados merecem comentários adicionais, *G. viridilucens* e *N. gardneri* (Figura 2), devido à importância dos mesmos para o avanço dos estudos do LBF acerca do mecanismo de emissão de luz e do desenvolvimento de um ensaio de toxicidade com fungos basidiomicetos.⁴⁻⁷ A primeira espécie utilizada em ambas as linhas de pesquisa do LBF foi a do fungo *G. viridilucens*, cujos corpos de frutificação (cogumelos) surgem sempre na natureza na casca do tronco ou raízes de árvores vivas na Mata Atlântica, cuja umidade é alta e a temperatura pode variar bastante durante o ano. Como na época era o único fungo que se dispunha no laboratório, este foi utilizado, embora se desenvolvesse lentamente tanto em meio líquido quanto em ágar e seus corpos de frutificação (para preparação de extratos) fossem pequenos e raros de se encontrar. No que se refere ao ensaio de toxicidade (abordado mais adiante), o micélio do fungo *G. viridilucens* também apresentava alguns inconvenientes, pois a intensidade e o perfil da emissão de luz dependiam da umidade à qual o fungo estava exposto.

Em 2008 foi obtida a cultura do fungo *N. gardneri* a partir de corpos de frutificação coletados em Teresina, PI. Na verdade, o grupo sabia da existência deste fungo desde 2001, cujos corpos de frutificação são muito maiores e emitem luz mais intensa do que os outros. No entanto, somente a partir de 2005 foram obtidas informações confiáveis sobre a localização de corpos de frutificação de *N. gardneri*, primeiramente em Gilbués e mais tarde em Teresina, ambas no Piauí. A história do *N. gardneri* no Brasil é bem anterior. Este fungo cresce na base de palmeiras, principalmente babaçu, no bioma da Mata dos Cocais, provavelmente há milhões de anos, onde é conhecido pela população local como flor-de-coco. Contudo, a ciência conheceu o *N. gardneri* em 1840, através de George Gardner, botânico; zoólogo e médico britânico que realizou uma expedição ao Brasil a fim de registrar os aspectos das regiões por onde passou e coletar espécies diversas para estudo. Gardner relata em seu livro, "[Viagens pelo Brasil](#)", que em uma rua da Vila de Natividade, em Goiás (hoje Tocantins), alguns garotos brincavam com algo luminoso, que primeiramente supôs ser um enorme vagalume, mas que uma observação mais minuciosa revelou ser um cogumelo, de início classificado como *Agaricus gardneri*.⁸ De 1840 até 2011, este fungo foi classificado como *Omphalia gardneri*, *Pleurotus gardneri*, *Omphalotus nidiformis* e, finalmente, *N. gardneri*, classificação baseada em critérios morfológicos e de biologia molecular. Devido aos corpos de frutificação maiores, alta intensidade de luz, crescimento mais rápido do micélio, boa adaptação em meio de ágar e líquido e perfil de emissão de luz previsível, o fungo *N. gardneri* é o organismo atualmente usado pelo LBF em todas as linhas de pesquisa.

A segunda parte deste trabalho trata da otimização da bioluminescência (BL) em diferentes condições nutricionais e de cultivo, bem como o potencial uso do fungo *N. gardneri* na avaliação da toxicidade de substâncias puras e fungicidas para a agricultura contra basidiomicetos

fitopatogênicos.

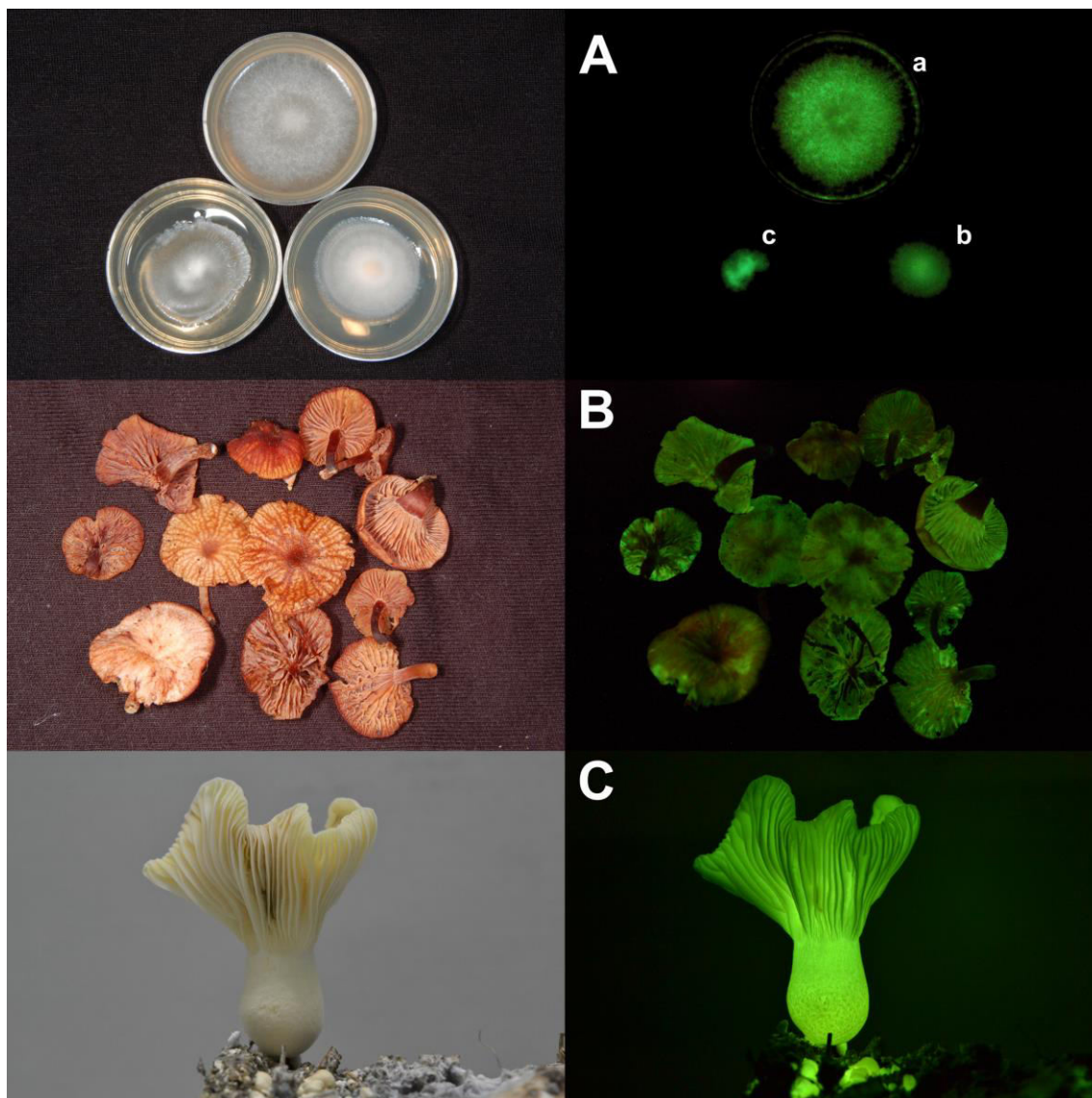


Figura 2. Micélio dos fungos *Neonothopanus gardneri* (a), *Gerronema viridilucens* (b) e *Mycena lucentipes* (c), no claro e no escuro, inoculados no mesmo meio de cultura e com a mesma idade (A). Corpos de frutificação dos fungos *G. viridilucens* (B) e *N. gardneri* (C) no claro e no escuro. O *G. viridilucens* não emite luz no estipe, enquanto o *N. gardneri* emite luz por todo o cogumelo. Fotos: Cassius V. Stevani, IQ-USP, Brasil

Fungos basidiomicetos patogênicos e otimização da bioluminescência para aplicação em bioensaios de toxicidade

Fungos basidiomicetos patogênicos

Na natureza, fungos basidiomicetos

correlacionam-se com as plantas tanto de forma benéfica (e. g., micorrizas) quanto prejudicial (no caso de espécies parasitas). Em um país, como o Brasil, em que uma das principais bases da economia é a agricultura, a preservação da saúde das lavouras é um tópico essencial para garantir a rentabilidade da colheita e produtos de boa qualidade⁹. Doenças como armilarirose, podridão parda,

ferrugem-do-café, carvão-do-milho, rizoctoniose, mofo-cinza, ferrugem-da-soja, ferrugem-negra-do-trigo, cárie-do-trigo e bolha-branca-do-pinheiro¹⁰ são prevenidas e tratadas com uma vasta gama de fungicidas, que por vezes podem ter ações indesejadas e adversas no meio ambiente.¹¹

Há relatos, oriundos do estado do Amapá, de que cafezais emitem luz à noite (Etelvino

Bechara, comunicação pessoal). Tal fato é devido à doença chamada popularmente de “Ojo de Gallo”, causada por uma espécie de fungo bioluminescente, *Mycena citricolor*. Nessa doença, a folha do café fica com manchas esbranquiçadas e arredondadas, o que diminui significativamente a produção de café pela planta (Figura 3).^{12,13}



Figura 3. Folha de café infectada com o fungo bioluminescente patogênico *Mycena citricolor*. Doença conhecida como “Ojo de Gallo” nas regiões cafeicultoras de língua espanhola da América do Sul. Reprodução da ref. 13 com autorização. Copyright © 2011 Coffee Kids, EUA

Em gimnospermas, uma doença muito comum chamada armilarirose, provocada pelo fungo *Armillaria mellea*, se desenvolve nas raízes, deixando a folhagem com um aspecto marrom avermelhado, causado pelo consumo dos nutrientes que originalmente seriam absorvidos pela planta. Há a formação de corpos de frutificação em determinadas épocas do ano, mas é através do seu micélio que o fungo da espécie *A. mellea* é identificado, devido à sua BL visível.¹⁴ Com o exposto acima, ensaios bioluminescentes de toxicidade com fungos são de interesse científico devido à necessidade de avaliar a toxicidade de fungicidas diversos, visando estudar seus impactos ambientais, e desenvolver formulações mais eficientes para controlar infestações de patogenicias em plantações, considerando que existem

doenças que não só são causadas por basidiomicetos em geral, mas também pelas suas espécies bioluminescentes.¹⁵

Adicionalmente, devido às relações simbióticas com os demais organismos no ecossistema e aos processos de ciclagem de nutrientes, possíveis contaminações ambientais afetam não somente os fungos, mas também as demais espécies que convivem no mesmo ambiente, interferindo no funcionamento do ecossistema como um todo. Por esse motivo, é necessário desenvolver metodologias de fácil implementação, economicamente viáveis, reprodutíveis e eficazes, que permitam monitorar e avaliar a toxicidade de agentes xenobióticos para fungos, principalmente basidiomicetos. A este filo pertencem a maioria dos fungos de podridão branca

(degradadores de lignina) e que estão envolvidos diretamente na sobrevivência de plantas superiores. Desta forma, bioensaios de toxicidade com fungos luminescentes representam uma importante metodologia para o biomonitoramento do meio ambiente e na análise de possíveis contaminações por compostos orgânicos e inorgânicos diversos.¹⁵⁻¹⁹

Bioensaios de toxicidade *in vivo* não permitem identificar e quantificar o agente tóxico, embora a análise quantitativa seja importante para determinar a concentração de contaminantes acumulados no meio ambiente. Os bioensaios permitem estabelecer a fração biodisponível de diferentes substâncias presentes na amostra ambiental analisada, indicando também possíveis efeitos sinérgicos entre as mesmas, e avaliar os danos efetivamente provocados aos organismos expostos aos contaminantes.

Os ensaios toxicológicos (bioensaios) mais tradicionais são realizados com organismos aquáticos, em especial bactérias como a *Escherichia coli*, *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium phosphoreum*, entre outros.²⁰ Um dos métodos de monitoramento ambiental mais difundido é o com a bactéria marinha *V. fischeri*, denominado Microtox®, que se baseia na inibição da emissão de luz com o aumento de concentração e toxicidade do agente tóxico em estudo. Este é considerado um método de análise confiável, rápido, simples e economicamente viável, que pode ser utilizado para uma grande variedade de matrizes ambientais.^{21,22}

Já os estudos voltados para ensaios de toxicidade com fungos bioluminescentes são menos comuns e pouco explorados, com apenas algumas publicações voltadas para essa finalidade específica. Tais organismos, no entanto, são de grande interesse para esse tipo de aplicação, uma vez que são representantes do primeiro nível trófico da cadeia alimentar de solos. Neste contexto, a BL é utilizada como um parâmetro precoce de toxicidade, com tempo de resposta menor, quando comparada com outros

sinais, como inibição da taxa de crescimento ou morte.²³⁻²⁵ Antes de desenvolver e aplicar bioensaios para avaliação da toxicidade de compostos para fungos bioluminescentes, no entanto, é necessário fazer um ajuste das condições de cultura para a espécie de interesse, conforme será abordado a seguir.

Otimização e efeitos das condições de cultura sobre a bioluminescência

Embora a BL em fungos seja observada desde tempos remotos, estudos científicos sobre o mecanismo de emissão de luz e aplicações práticas destes organismos ainda não são tão usuais quanto as desenvolvidas para outros organismos bioluminescentes.²⁶ Deste modo, há ainda necessidade por conhecimentos mais aprofundados nesta área, a fim de entender melhor as propriedades bioquímicas e fisiológicas associadas aos fungos bioluminescentes. Os resultados dos trabalhos nessa área são essenciais para auxiliar no desenvolvimento e aprimoramento de aplicações específicas para esses organismos, como é o caso dos bioensaios mencionados no tópico anterior, elaborados no sentido de avaliar a toxicidade de diversos compostos orgânicos e inorgânicos para determinadas espécies.^{6,27,28}

Assim como os habitats naturais onde os fungos se desenvolvem possuem, muitas vezes, condições climáticas distintas entre si, cada espécie apresenta características próprias de emissão de luz e crescimento em diferentes condições de inoculação.²⁹ Portanto, a alteração de parâmetros relacionados às condições de cultivo pode afetar significativamente o desenvolvimento e o metabolismo fúngico. Dessa forma, para a implementação de um bioensaio de toxicidade, é necessário aperfeiçoar as condições de cultura a fim de maximizar a BL (dentro de um perfil de emissão de luz padronizado) e o crescimento da espécie em estudo, visando maior sensibilidade e confiabilidade. Uma das principais etapas neste sentido é a condução de estudos prévios acerca de como a BL varia em função

de diferentes condições de cultura. Estes estudos compreendem a variação dos nutrientes utilizados na preparação dos meios e outros fatores relacionados ao ambiente de crescimento, principalmente pH, temperatura e umidade.

Os elementos básicos aproveitados na nutrição e no crescimento dos fungos são o carbono, nitrogênio, hidrogênio e oxigênio. Estes são fornecidos em meios de cultura por meio da adição de açúcares (presentes no melão, por exemplo) e extrato de levedura ou de malte (entre outros) inseridos juntamente com ágar, no caso deste meio de cultura. O equilíbrio adequado entre a concentração de cada nutriente disponível para absorção pelos fungos também é essencial para garantir seu desenvolvimento, de modo que é preciso otimizar os componentes e as suas quantidades no meio de acordo com a espécie em estudo.³⁰

Apesar da variedade de temperaturas ótimas, as espécies mesofílicas (que crescem em temperaturas ótimas moderadas) são predominantes, já que nessa condição intermediária o metabolismo não se torna usualmente lento e é mais improvável que ocorra desnaturação de enzimas.^{31,32} Já em relação ao pH, o mais comum é que os fungos cresçam em meios neutros ou ácidos (com pH entre 4 e 6), de modo a não afetar fatores como especificação; solubilidade e absorção de nutrientes.³³

De forma compatível com o exposto acima, estudos sobre os efeitos de condições de cultura sobre a emissão de luz por fungos indicam que estes se desenvolvem com maior BL, em geral, quando incubados no escuro, em meios com pHs baixos (3,0-4,5) ou mais próximos da neutralidade (5,0-6,0) sob temperaturas entre 22 e 25 °C. Os nutrientes consistem, em sua maioria, de fontes de carbono (melão de cana, dextrose de batata e extrato de malte, além de outros açúcares - principalmente monossacarídeos e dissacarídeos) e fontes de nitrogênio (em especial, extrato de levedura; fosfato de amônio dibásico e asparagina).^{6,27-30,34}

Uma vez que a espécie *N. gardneri* foi identificada e cientificamente catalogada apenas nos últimos anos, estudos sobre os efeitos de condições de cultura utilizando esse fungo são inéditos. Deste modo, o objetivo do presente trabalho, além de apresentar um histórico sobre os fungos bioluminescentes e abordar uma aplicação prática para os mesmos, é avaliar o efeito da temperatura, pH e concentração de nutrientes sobre a emissão de luz deste fungo.

2. Metodologia

Reagentes

Para cultivar o fungo em laboratório, o meio de cultura foi preparado em água deionizada contendo melão de cana-de-açúcar de grau alimentício (Brix 83,4 %, Pol 49,21 %) doado pela Usina São José da Estiva (Novo Horizonte - SP), ágar também de grau alimentício e extrato de levedura (Oxoid).

Aparelhagem

Os componentes do meio de cultura foram pesados utilizando balança analítica e semianalítica da Mettler Toledo, modelo AG285 e PB3001-S e diluídos em água purificada por um sistema Milli-Q modelo Direct. Os valores de pH dos meios de cultura e soluções foram medidos de forma direta utilizando pHmetro Mettler Toledo, modelo mp225, acoplado a um eletrodo da Mettler. Para a esterilização do meio de cultura e utensílios diversos, foi utilizada uma autoclave vertical da Phoenix, linha AV, seguindo as condições recomendadas pelo manual do aparelho: 30-40 min de esterilização a 121 °C e 1,1 kgf cm⁻² de pressão. O meio de cultura autoclavado foi manuseado dentro de fluxo laminar Trox Technik, série 2711, previamente esterilizado

com álcool 70 % (v:v) e 15 min de luz UV. Para se ter maior quantidade de material, o micélio foi cultivado em placas de Petri de 100 mm (Corning), as quais foram utilizadas como fonte de inóculo para as placas de 35 mm (Corning) utilizadas na medição da BL. O diâmetro do inóculo foi padronizado com um fura-rolhas de 3,5 mm de diâmetro interno. Uma vez inoculadas as placas, estas foram mantidas dentro de uma câmara climatizada Binder, modelo KBWF 240, a 25 °C e 90 % de umidade. Para acompanhar a variação da BL do micélio do fungo nas placas de 35 mm, foi utilizado um luminômetro de microplaca Tecan Infinite® M200, e um suporte adaptado para acondicionar as placas individualmente no equipamento.

Manutenção da espécie *N. gardneri* em laboratório

Culturas para manutenção do micélio foram preparadas nas placas de petri de 100 mm, contendo meios compostos por 1 % (m:v) de melão de cana; 0,1 % (m:v) de extrato de levedura e 2 % (m:v) de ágar. Na inoculação, micélios cultivados durante 15 dias sob 25 °C e 30 °C em local escuro foram perfurados na região periférica com um fura-rolhas esterilizado. Em seguida, os inóculos, removidos com uma pinça metálica também esterilizada, foram transferidos para o novo meio de cultura. Por fim, todas as placas foram vedadas com filme plástico para evitar contaminações e as culturas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura e luminosidade.

Otimização da BL

As culturas de *N. gardneri* foram preparadas em placas de Petri de 35 mm, conforme procedimento descrito na seção anterior, variando os seguintes fatores: pH (4, 6 e 8 não tamponados e com tampão citrato/fosfato 20 mM); temperatura de cultivo (18 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C); concentração de melão de cana (0,2 %, 1 %

e 5 %, m:v) e concentração de extrato de levedura (0,02 %, 0,1 % e 0,5 % - m:v). A resposta das culturas foi avaliada sempre com a alteração de um único fator por vez, mantendo os demais constantes e sempre utilizando ágar grau alimentício na concentração de 2 %. O perfil de BL foi obtido ao longo de 13 dias de incubação, utilizando um luminômetro de microplacas para medir a luz emitida pelo micélio. Um suporte para acondicionar as placas individualmente no equipamento foi adaptado para viabilizar a medição da emissão de luz. A BL em cada placa foi quantificada em quatro replicatas, pela somatória de 384 pontos quantificados em toda a área do suporte.³⁴ O perfil de BL foi obtido a partir de gráficos da emissão de luz em função do tempo de incubação, elaborados no software Origin 7.0. As curvas correspondentes à variação do extrato de levedura em 0,02 % e 0,5 % foram ajustadas utilizando um modelo de Edgeworth-Cramer (ECS). Os demais perfis de BL foram ajustados utilizando o modelo sigmoidal de Boltzmann, para crescimento exponencial.

3. Resultados e Discussão

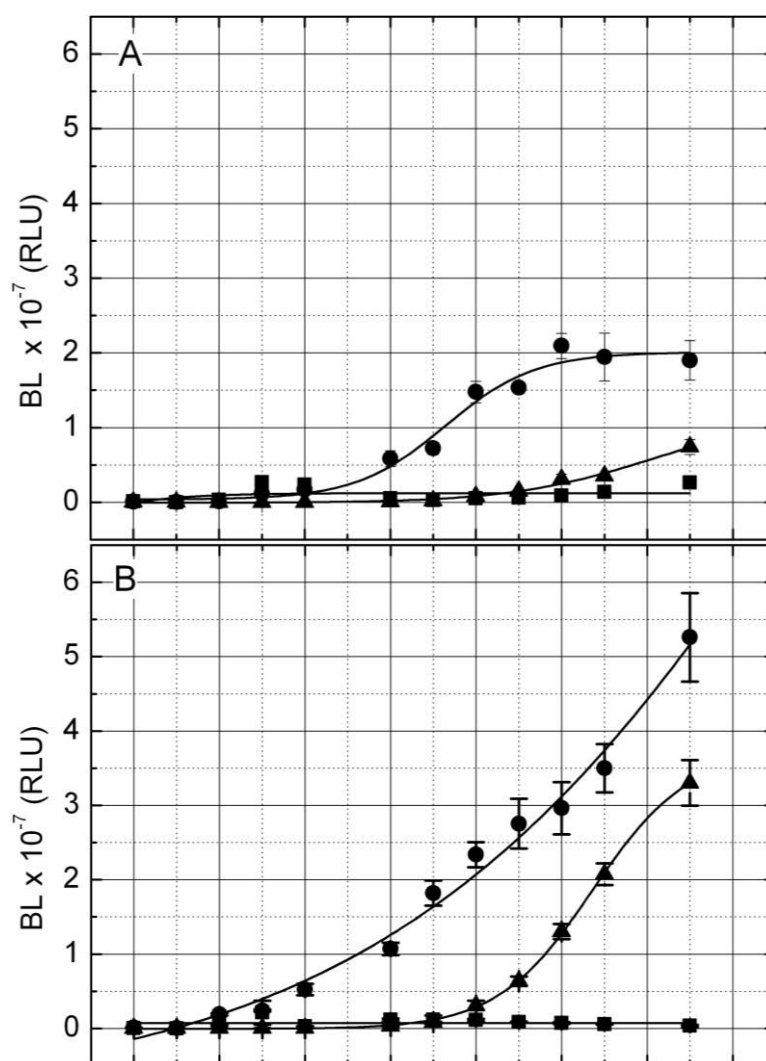
No âmbito do presente trabalho, os efeitos das condições de cultura foram estudados visando o desenvolvimento de um bioensaio toxicológico com o fungo *N. gardneri*, como desenvolvido anteriormente para o fungo *G. viridilucens*.⁶ Para isso, avaliou-se principalmente a capacidade dessa espécie de emitir luz com reprodutibilidade e o perfil de BL em diferentes cenários, buscando estabelecer, desta forma, uma condição padrão de cultivo para viabilizar o propósito em questão.

Resultados preliminares demonstraram que o micélio não se desenvolve em 18 °C ou sob meios tamponados, em qualquer um dos pHs testados (4, 6 ou 8). De forma complementar, diferentemente da espécie *G. viridilucens*, que necessita da adição de 200 µL de água sobre o micélio no momento da inoculação, as culturas de *N. gardneri*

crecem menos e de forma mais assimétrica nas mesmas condições de umidade. A emissão de luz, neste caso, apresentou também altas variações (acima de 25 %), sem um perfil reproduzível. Tal fato é condizente com as condições em que ambos os fungos aparecem na natureza, o primeiro na Mata Atlântica (alta média umidade) e o segundo na Mata dos Cocais (umidade média muito mais baixa).

Os primeiros parâmetros a serem alterados no estudo foram a temperatura de

cultivo e o pH dos meios (Figura 4). Os resultados desta etapa mostraram que não ocorre desenvolvimento ou emissão de luz em 35 °C. Um baixo valor de BL foi observado quando o micélio foi inoculado em meios de pH 8 e pH 4. Neste último observou-se, também, produção de grande quantidade de melanina pelo fungo, indicando um possível mecanismo de defesa contra condições consideradas agressivas pela espécie.



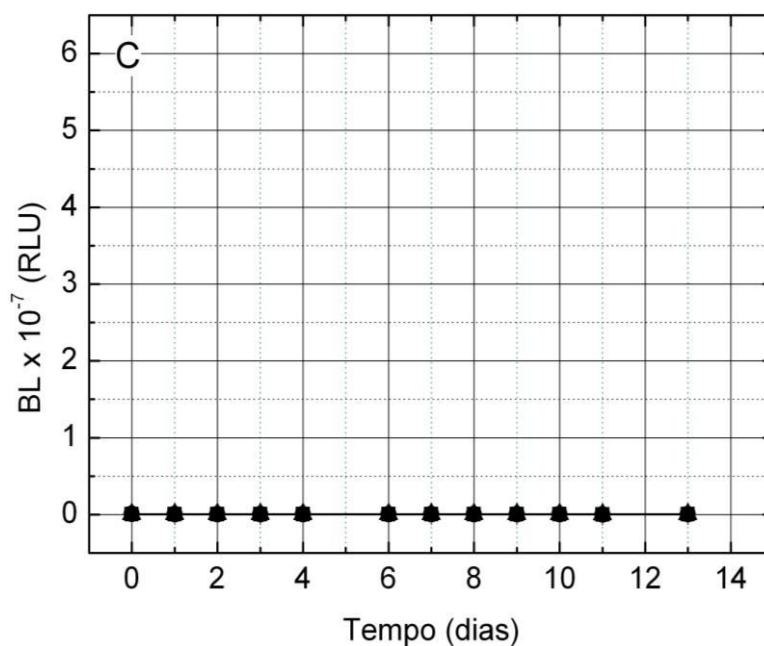


Figura 4. Perfis de BL do fungo *N. gardneri* com o tempo de inoculação em placa de ágar, em 25 °C (A), 30 °C (B) e 35 °C (C), em meios de cultura não tamponado com pH 4 (■), 6 (●) e 8 (▲)

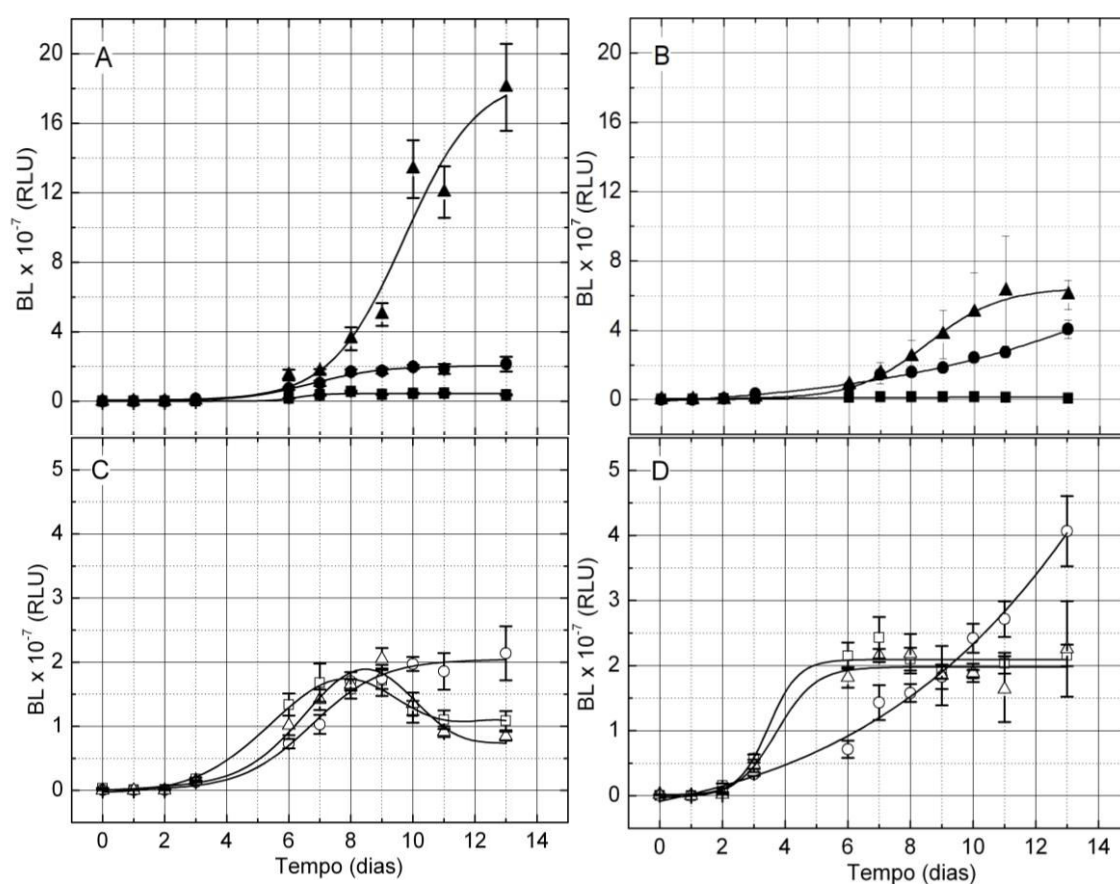


Figura 5. Perfis de BL da espécie *N. gardneri* com o tempo de inoculação em placa de ágar, pH 6 a 25 °C (A e C) e 30 °C (B e D), variando a concentração de melão em 0,2 % (■), 1 % (●) e 5 % (▲) e extrato de levedura em 0,02 % (□), 0,1 % (○) e 0,5 % (△)

Os maiores níveis de BL foram observados em pH 6, nas temperaturas de 25 °C e 30 °C. Por essa razão, essas condições foram adotadas no prosseguimento do trabalho, para avaliação dos efeitos dos nutrientes sobre a luz emitida. Nestes experimentos, variando-se a concentração da fonte de carbono (melaço) e de nitrogênio (extrato de levedura), a emissão de luz foi mais pronunciada nos meios incubados em pH 6, 30 °C, com 5 % de melaço e 0,1 % de extrato de levedura (Figura 5).

No entanto, para viabilizar o futuro desenvolvimento do bioensaio toxicológico, foi utilizado como critério de análise não apenas a intensidade da luz emitida (condição ótima para a BL), mas também o perfil de BL do fungo. Isso porque, para essa aplicação, desejou-se investigar em qual condição e a partir de quanto tempo de

inoculação era obtida uma fase na qual a emissão de luz apresenta a menor variação possível, de forma reprodutível e estável. Tais características não foram observadas na condição supracitada de maior emissão de luz, onde a BL aumenta continuamente e com alta variação (Figura 5), mas foram obtidas quando o micélio foi cultivado sob 30 °C em meio com pH 6 não tamponado, contendo 1 % de melaço e 0,02 % de extrato de levedura (Figura 6). Nesta condição, a emissão de luz mostrou-se menos pronunciada em comparação com o meio contendo 5 % de melaço (Figura 5), mas o perfil de BL apresentou maior reprodutibilidade e menor variação entre dias durante a fase em que a emissão de luz atinge um platô (a partir do 6º dia de inoculação), onde a BL é mantida em $2,0 \pm 0,2 \times 10^7$ RLU, entre o 6º dia e o 13º dia de incubação (Figura 6).

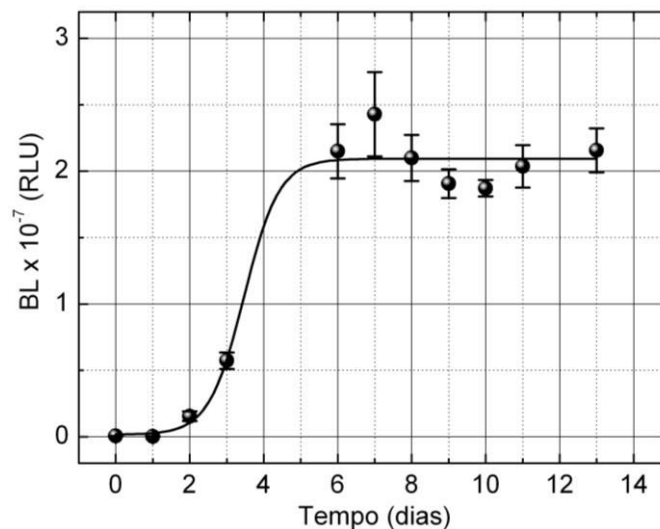


Figura 6. Perfil de BL da espécie *N. gardneri* inoculada em 30 °C, em meio de pH 6 não tamponado, contendo 1 % de melaço; 2 % de ágar e 0,02 % de extrato de levedura (N = 4)

A condição de cultura mencionada acima (30 °C, pH 6, 1 % de melaço e 0,02 % de levedura), embora não seja considerada como ótima para emissão de luz, seria a condição mais ideal para realizar um bioensaio de toxicidade. Isso porque, neste caso, a BL é a maior possível dentro de um perfil em que a BL, após passar por uma fase de aumento exponencial e menos estável na

emissão de luz, atinge em pouco tempo uma etapa com maior precisão intra-dias e entre-dias. Este comportamento de emissão de luz propicia maior precisão e exatidão na medição da inibição da BL fúngica, provocada pela ação tóxica de um agente químico em contato com o micélio bioluminescente durante o bioensaio.

Comparando os resultados com a da espécie *G. viridilucens*, estudada pelo grupo anteriormente,^{6,34} é notável que o fungo *N. gardneri* é uma opção mais viável para a realização de bioensaios com fungos bioluminescentes (Figura 7), uma vez que apresenta um perfil de BL mais constante,

com maior reprodutibilidade e maior intensidade da BL na condição selecionada como ideal. Além disso, a espécie em estudo requer menor tempo para incubação até atingir a fase na qual o bioensaio seria conduzido (o período, neste caso, foi reduzido de 10 dias para 7 dias).

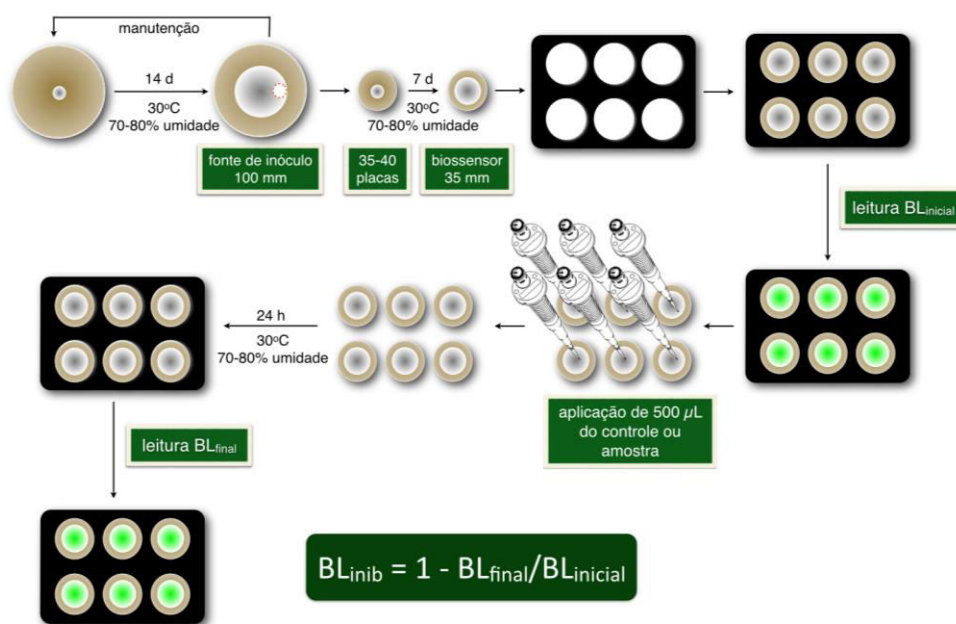


Figura 7. Bioensaio luminescente de toxicidade a ser desenvolvido com o fungo *N. gardneri*, conforme anteriormente planejado para o fungo *G. viridilucens*^{2,6}

4. Conclusões

O estudo sobre o efeito de diferentes condições de cultura sobre a emissão de luz por fungos bioluminescentes permite estabelecer condições ideais de cultivo para uma determinada espécie em estudo e conhecer características intrínsecas da mesma. Trabalhos nessa área são indispensáveis para aplicações específicas, como o desenvolvimento de bioensaios. Neste caso, a avaliação do comportamento do fungo *N. gardneri* em diferentes circunstâncias foi necessário para analisar tanto a intensidade da luz emitida quanto a sua reprodutibilidade dentro de um perfil de BL. Os resultados evidenciaram que a espécie em questão possui um grande potencial para ser utilizada em bioensaios, já que

apresentou maior BL em um perfil mais estável e com desvios menores em comparação com a outra espécie bioluminescente cultivada em meio de cultura sólido e utilizada para o mesmo propósito.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Usina São José da Estiva (Novo Horizonte, SP) pela doação do melaço de cana de açúcar, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 13/16885-1), à Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho (FUNDACENTRO) e ao CNPq pelo apoio financeiro, ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo e ao Núcleo

Avançado de Pesquisa em Fotoquímica da USP (NAP PhotoTech) pela infraestrutura e ao Dr. Ismael Dantas, proprietário da Fazenda Cana Brava, em Altos, PI, pela ajuda e autorização de coleta de cogumelos do fungo *N. gardneri*.

Referências Bibliográficas

- ¹ Desjardin, D.E.; Capelari, M.; Stevani, C.V. A new bioluminescent agaric from São Paulo, Brazil. *Fungal Diversity* **2005**, *8*, 9. [Link]
- ² Stevani, C. V.; Oliveira, A. G.; Mendes, L. F.; Ventura, F. F.; Waldenmaier, H. E.; Carvalho, R. P.; Pereira, T. A. Current status of research on fungal bioluminescence: biochemistry and prospects for ecotoxicological application. *Photochemistry and Photobiology* **2013**, *89*, 1318. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Oliveira, A. G.; Carvalho, R. P.; Waldenmaier, H. E.; Stevani, C. V. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. *Química Nova* **2013**, *36*, 314. [CrossRef]
- ⁴ Desjardin, D. E.; Oliveira, A. G.; Stevani, C. V. Fungi bioluminescence revisited. *Photochemistry and Photobiology Sciences* **2008**, *7*, 170. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Oliveira, A. G.; Stevani, C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. *Photochemistry and Photobiology Sciences* **2009**, *8*, 1416. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Mendes, L. F.; Stevani, C. V. Evaluation of metal toxicity by a modified method based on the fungus *Gerronema viridilucens* bioluminescence in agar medium. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2010**, *29*, 320. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ Mendes, L. F.; Bastos, E. L.; Stevani, C. V. Prediction of metal cation toxicity to the bioluminescent fungus *Gerronema viridilucens*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2010**, *29*, 2177. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Capelari, M.; Desjardin, D. E.; Perry, B. A.; Asai, T.; Stevani, C. V. *Neonothopanus gardneri*: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. *Mycologia* **2011**, *106*, 1433. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Martinelli, L. A.; Naylor, R.; Vitousek, P. M.; Moutinho, P. Agriculture in Brazil: impacts, costs, and opportunities for a sustainable future. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, **2010**, *2*, 431. [CrossRef]
- ¹⁰ American Phytopathology Society. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/>>. Acesso em: 15 agosto 2014. [Link]
- ¹¹ Yang, C.; Hamel, C.; Vujanovic, V.; Gan, Y. Fungicide: Modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecology* **2011**, *2011*, 1. [Link]
- ¹² Boquete Panama Guide, TCM Coffee Diseases. Disponível em: <<http://www.boqueteguide.com/?p=10309>>. Acesso em: 7 setembro 2014. [Link]
- ¹³ Coffee Kids/Flickr. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/coffeekids/>>. Acesso em: 15 setembro 2014. [Link]
- ¹⁴ Worall, J. Armillaria root disease, shoestring root rot. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/Armillaria.aspx>>. Acesso em: 12 setembro 2014. [Link]
- ¹⁵ Gadd, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist* **1993**, *124*, 25. [CrossRef]
- ¹⁶ Timbrell, J.; *Principles of Biochemical Toxicology*, 3a ed., Taylor & Francis: Londres, 2001.
- ¹⁷ Ritchie, J. M.; Cresser, M.; Cotter-Howells, J. Toxicological response of a bioluminescent microbial assay to Zn, Pb and Cu in an artificial soil solution: relationship with total metal concentrations and free ion activities. *Environmental Pollution* **2001**, *114*, 129. [CrossRef]
- ¹⁸ Lasat, M. M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* **2002**, *31*, 109. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ His, E.; Beiras, R.; Seaman, M. N. L. Em *Advances in marine biology*; Southward, A. J.; Tyler, P. A.; Young, C. M., eds.; Academic Press: London, 1999. [Link]
- ²⁰ Steinberg, S. M.; Poziomek, E. J.; Engelmann, W. H.; Rogers, K. R. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere* **1995**, *30*, 2155. [CrossRef]
- ²¹ Jones, K. D.; Huang, W. H. Evaluation of toxicity of the pesticides, chlorpyrifos and arsenic, in the presence of compost humic

- substances in aqueous systems. *Journal of Hazardous Materials* **2003**, *103*, 93. [CrossRef]
- ²² Ishaque, A. B.; Johnson, L.; Gerald, T.; Boucaud, D.; Okoh, J.; Tchounwou, P. B. Assessment of individual and combined toxicities of four non-essential metals (As, Cd, Hg and Pb) in the Microtox assay. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2006**, *3*, 118. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Herring, P. J. Luminous fungi. *Mycologist* **1994**, *8*, 181. [CrossRef]
- ²⁴ Steinberg, S. M.; Poziomek, E. J.; Engelmann, W. H.; Rogers, K. R. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere* **1995**, *30*, 2155. [CrossRef]
- ²⁵ Bermudes, D.; Gerlach, V. L.; Nealson, K. H. Effects of culture conditions on mycelial growth and luminescence in *Panellus stipticus*. *Mycologia* **1990**, *82*, 295. [CrossRef]
- ²⁶ Deheyn, D. D.; Latz, M. I. Bioluminescence characteristics of a tropical terrestrial fungus (Basidiomycetes). *Luminescence* **2007**, *22*, 462. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Weitz, H. J.; Campbell, C. D.; Killham, K. Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing. *Environmental Microbiology* **2002**, *4*, 422. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Vydryakova, G. A.; Gusev, A. A.; Medvedeva, S. E. Effect of organic and inorganic toxic compounds on luminescence of luminous fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2011**, *47*, 324. [CrossRef]
- ²⁹ Weitz, H. J.; Ballard, A. L.; Campbell, C. D.; Killham, K. The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi. *FEMS Microbiology Letters* **2001**, *202*, 165. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁰ Barbosa, C. C.; Monteiro, A. C.; Correia, A. C. B.; Pereira, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2002**, *37*, 821. [CrossRef]
- ³¹ Hawksworth, D. L.; Kirsop, B. E.; Jong, S. C.; *Filamentous Fungi*. Cambridge University Press: Cambridge, 1988. [CrossRef]
- ³² Kavanagh, K.; *Fungi: Biology and Applications*, 2a. ed., John Wiley & Sons: Chichester, 2011. [CrossRef]
- ³³ Madan, M.; Thind, K. S.; *Physiology of Fungi*, APH Publishing: Nova Deli, 1998.
- ³⁴ Mendes, L. F.; Bastos, E. L.; Desjardin, D. E.; Stevani, C. V. Influence of culture conditions on mycelial growth and bioluminescence of *Gerronema viridilucens*. *FEMS Microbiology Letters* **2008**, *282*, 132. [CrossRef] [PubMed]