

Interações fúngicas observadas através de imagem química por espectrometria de massas

Tallyta Santos Teixeira¹, Jorge Candido Rodrigues Neto², Aparecido Almeida Conceição³, Félix Gonçalves de Siqueira⁴, Patrícia Verardi Abdelnur⁵

Resumo

Os fungos filamentosos são responsáveis pela produção de vários metabólitos, principalmente em cocultivo, devido às interações microbianas simularem um ambiente complexo de competição ou simbiose, que por sua vez estimula a produção de novos compostos químicos com grande aplicação industrial. Essas interações são facilmente classificadas conforme os efeitos ou ainda as alterações na macromorfologia estrutural do crescimento micelial, mas podem ainda ser complementadas através de ferramentas analíticas robustas. Uma das técnicas que pode ser empregada para esses estudos é a imagem química por espectrometria de massas (do inglês, *Imaging Mass Spectrometry*, IMS), pois permite informações complementares através da localização química espacial. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar as interações entre os fungos *Aspergillus terreus* (ATCC® 20542™) e *Pleurotus pulmonarius* (BRM 055674) por IMS. Os fungos foram cultivados em meio BDA por 8 dias a 28 °C, desidratados e submetidos a aplicação da matriz HCCA por sublimação. As imagens químicas foram obtidas por MALDI-IMS (do inglês, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Imaging Mass Spectrometry*) e os metabólitos foram identificados por UHPLC-ESI-MS/MS (do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization – Tandem Mass Spectrometry*). Dessa forma, nove íons foram detectados por MALDI-IMS, principalmente na zona do cocultivo entre os fungos, sendo um deles (m/z 346) identificado. Pela imagem química, notou-se ainda que os íons detectados estão relacionados à interação dos microrganismos, por terem sido detectados apenas na zona de cocultivo, ou seja, ausentes no branco e nos monocultivos. Portanto, a imagem química por espectrometria de massas forneceu informações complementares as morfológicas visualizadas, de que os fungos interagem positivamente e por contato. E apesar dos desafios encontrados na identificação dos metabólitos, essa ferramenta pode ser amplamente utilizada para prospectar metabólitos provenientes de cocultivos destinados a aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: *imaging mass spectrometry*, MALDI-IMS, *Aspergillus terreus*, *Pleurotus pulmonarius*, metabolômica, biotecnologia industrial.

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, doutoranda em Química, Universidade Federal do Goiás, tallyta.tst@gmail.com

² Químico, doutorando em Química, Universidade Federal do Goiás, jorgecrn@hotmail.com

³ Biotecnologista, mestre em Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso, aparecido.aac@gmail.com

⁴ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁵ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

Introdução

Os microrganismos crescem naturalmente em ambientes complexos, repletos de interações inter e intraespécies. Essas interações estimulam a produção de diversos metabólitos especializados, e podem ter efeitos positivos ou negativos. Os efeitos positivos, também chamados de mutualísticos ou neutralista auxiliam, por exemplo, na comunicação com outros microrganismos. Já os efeitos negativos, também chamados de antagonicos, podem promover a produção de antibióticos e ácidos orgânicos, por exemplo, como mecanismo de defesa (Martínez-Buitrago; Ramos; Castellanos, 2019). E ambos os casos são interessantes para a descoberta de novos metabólitos ou análogos mais potentes destinados a aplicações industriais (Netzker et al., 2015).

Os fungos filamentosos são conhecidos por produzirem diversos compostos quando interagem com microrganismos de outro reino (*Aspergillus fumigatus* e *Streptomyces peucetius*), de outro gênero (*Penicillium pinophilum* e *Trichoderma harzianum*) ou espécie (*Fusarium tricinctum* e *Fusarium begoniae*) (Qian et al., 2020). Essas interações são realizadas a partir de experimentos de cocultivo ou pareamento (cultivo em ágar-enriquecido), que consiste no cultivo de um ou mais microrganismo em um mesmo ambiente (Martínez-Buitrago; Ramos; Castellanos, 2019). Esse ambiente competitivo geralmente desafia os microrganismos estimulando a produção de novos metabólitos (Netzker et al., 2015).

Dentre as atividades biológicas dos metabólitos produzidos através destas interações fúngicas podem ser citados os antibióticos (Bertrand et al., 2014; Qian et al., 2020), as enzimas (Sperandio; Ferreira Filho, 2019) e os hormônios (Bertrand et al., 2014), mostrando que diferentes tipos de compostos químicos podem ser gerados por meio da interação microbiana. Já a visualização morfológica da interação de dois fungos, se classifica em apenas quatro tipos, sendo eles: inibição por contato, inibição por distância, zona de confronto e sobreposição (Bertrand et al., 2013). Apesar da facilidade na classificação destes tipos de interações através das alterações morfológicas visíveis (cores, formas de massa micelial, entre outros), é necessário o uso de ferramentas analíticas mais robustas para visualização química dos compostos produzidos, a fim de complementar as informações.

Nesse sentido, a imagem química por espectrometria de massas (IMS) pode ser uma ferramenta útil. Isso porque a IMS relaciona os íons detectados na amostra (razão massa-carga, m/z) ponto-a-ponto, expressando o resultado através de uma imagem química, tendo em vista que possui a distribuição dos íons/metabólitos presentes na amostra (Dunham et al., 2017). Essa técnica é amplamente utilizada na área médica para análise de tecidos e células tumorais (Caprioli et al, 1997), e recentemente vêm sendo expandida para aplicações na área biotecnológica, analisando bactérias e fungos (Yang et al., 2012; Bhandari et al., 2014; Araújo et al., 2017; Liu et al., 2020).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as interações entre os fungos *Aspergillus terreus* (ATCC® 20542TM) e *Pleurotus pulmonarius* (BRM 055674) através da imagem química por espectrometria de massas (IMS), comparando os metabólitos produzidos individualmente por cada fungo (monocultivo) e em cocultivo, e também complementando as informações morfológicas visíveis.

Material e Métodos

Os fungos utilizados no trabalho foram *Aspergillus terreus* (ATCC® 20542TM) e *Pleurotus pulmonarius* (BRM 055674 – pertencente à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias, CMMABio). O cocultivo foi realizado em placas de petri contendo lâminas de MALDI-IMS (*indium tin oxide coating glass slides*, Bruker Daltonics) e meio de cultura BDA (batata-ágar-dextrose). Os fungos foram então mantidos por 08 dias a 30 °C em incubadora B.O.D., e em seguida as amostras foram preparadas para análise por MALDI-IMS.

O preparo da amostra consistiu na remoção das lâminas de MALDI-IMS das placas de petri, contendo meio BDA e os fungos cultivados, sendo posteriormente submetida a um dessecador a vácuo, até completa desidratação, e a aplicação da matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidróxicinâmico) por sublimação. As lâminas contendo as amostras foram então inseridas na placa *MTP Slide Adapter II* (Bruker Daltonics) e as imagens químicas foram adquiridas por MALDI-MSI (*UltrafleXtreme*, Bruker Daltonics).

Os dados de massas foram obtidos automaticamente no *software flexControl* versão 4.0 (Bruker Daltonics), na faixa de massa entre m/z 500-1500, com *laser* no modo ultra (abertura de 120 μ m) e otimizados para intensidade de 90%, ganho de detector 10x (2550V), 1000 *shots*, 2000 Hz, largura lateral (*rather width*) de 120 μ m e com caminhada parcialmente aleatória (*random walk parcial*) pelas amostras no momento da aquisição. Os dados de imagem foram obtidos e processados no *software flexImaging*, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), atribuindo escala de cores por gradiente, filtro de massa de 1 Da e normalização RMS (do inglês, *Root Mean Square*).

A extração dos metabólitos foi realizada com metanol e a análise química foi feita por UHPLC-ESI-MS/MS para identificação em alta resolução (Prominence LC30AD, Shimadzu e Maxis 4G, Bruker Daltonics). Os padrões de fragmentação obtidos foram comparados com o banco de dados *MetFrag* (Rutkies et al., 2016). A metodologia empregada e descrita acima pode ser visualizada resumidamente na Figura 1.



Figura 1. Esquema do procedimento experimental seguido para análise MALDI-IMS dos fungos *P. pulmonarius* (BRM 055674) e *A. terreus* (ATCC® 20542™).

Resultados e Discussão

Inicialmente, três regiões de uma mesma lâmina foram analisadas, sendo que uma das regiões correspondia à zona de cocultivo e as outras duas, a partes dos fungos *P. pulmonarius* e *A. terreus* individualmente, ou seja, considerando que uma zona em que não houve interação. Além disso, na mesma lâmina analisou-se uma região na ausência dos fungos, tendo apenas o meio BDA, sendo esta quarta região considerada como branco da análise. Isso garantiu que todas as regiões foram submetidas ao mesmo preparo de amostra (desidratação e aplicação de matriz) e aquisição de imagens químicas por MALDI-IMS.

Nove íons foram detectados por MALDI-IMS na zona do cocultivo, sendo eles: m/z 210, 277, 307, 321, 329, 346, 351, 462 e 484 (Figura 2). Nota-se ainda que no branco da amostra não houve imagem química relacionada a estes nove íons, o que confirma que esses íons foram produzidos pelos fungos apenas após o cocultivo.

Os íons m/z 329, 351 e 484 foram mais abundantes e tiveram uma imagem química nítida, em relação aos demais íons detectados. Eles provavelmente estão relacionados a metabólitos envolvidos na Interação entre os microrganismos estudados. Isso porque, durante o crescimento micelial foi visualizada uma interação de efeito positivo (Martínez-Buitrago; Ramos; Castellanos, 2019) e do tipo por contato, no qual os fungos ficam próximos, sem competição aparente de nutrientes do meio (Bertrand et al., 2013).

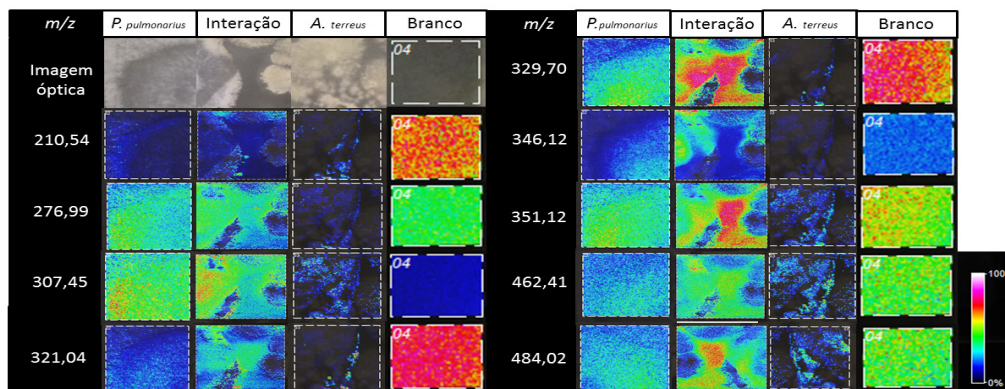


Figura 2. MALDI(-)-IMS de metabólitos produzidos pelos fungos *Pleurotus pulmonarius* (BRM 055674) e *Aspergillus terreus* (ATCC® 20542™) individualmente e na zona de cocultivo (interação), em meio BDA com matriz HCCA aplicada por sublimação (branco).

Todos os íons foram investigados por UHPLC-ESI-MS/MS, e o íon m/z 346 foi identificado. Ele foi detectado na forma desprotonada [M-H] e designado como monofosfato de adenosina ($C_{10}H_{14}N_5O_7P$), que corresponde a um metabólito primário relacionado ao desenvolvimento do microrganismo. Outros métodos de extração de metabólitos e de análise por UHPLC-MS/MS podem ser explorados, em futuros experimentos, na tentativa de identificar uma maior quantidade de compostos.

É importante destacar também que os metabólitos de origem microbiana são produzidos em condições específicas de cultivo e, raramente são relatados em bancos de dados de MS/MS, o que explica a dificuldade na identificação desses compostos ao buscar nos tradicionais bancos de dados. Algumas pesquisas evidenciam esforços

para criar plataformas que reúnam informações de diversos bancos de dados de metabólitos microbianos no *The Natural Products Atlas* (www.npatlas.org) de forma a acelerar e facilitar o processo de identificação molecular e elucidação estrutural (Van Santen et al., 2019). Porém, é amplamente requerida a participação da comunidade científica para alimentação destes dados na plataforma, ou ainda a criação de banco de dados próprios para impulsionar a identificação dos compostos microbianos e posterior aplicação destes.

Considerações Finais

As informações dos íons detectados por MALDI-IMS na zona de interação dos fungos estudados corroboram com as informações visualizadas na interação durante o crescimento. Foi visualizada uma interação de efeito positivo e do tipo por contato, e os íons (m/z 210, 277, 307, 321, 329, 346, 351, 462 e 484) foram detectados apenas quando os fungos estão em cocultivo (ou seja, ausentes em monocultivos).

Apesar dos desafios encontrados na identificação dos metabólitos, o uso de MALDI-IMS para visualização química dos metabólitos provenientes da interação de fungos é uma abordagem promissora para aplicações biotecnológicas. Destaca-se ainda que o trabalho é inovador devido a poucos estudos no campo da imagem química por espectrometria de massas de fungos.

Referências

- ARAÚJO, F. D. D. S.; ARAÚJO, W. L.; EBERLIN, M. N. Potential of *Burkholderia seminalis* TC3. 4.2 R3 as biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* evaluated by mass spectrometry imaging. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, 28, n. 5, p. 901-907, 2017.
- BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O. et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology advances**, 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.
- BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; BUJARD, A. et al. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of chromatography A**, 1292, p. 219-228, 2013.
- BHANDARI, D. R.; SHEN, T.; RÖMPP, A.; ZORN, H. et al. Analysis of cyathane-type diterpenoids from *Cyathus striatus* and *Hericium erinaceus* by high-resolution MALDI MS imaging. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 406, n. 3, p. 695-704, 2014.
- CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Analytical chemistry**, 69, n. 23, p. 4751-4760, 1997.
- DUNHAM, S. J.; ELLIS, J. F.; LI, B.; SWEEDLER, J. V. Mass spectrometry imaging of complex microbial communities. **Accounts of chemical research**, 50, n. 1, p. 96-104, 2017.
- LIU, R.; KHAN, R. A. A.; YUE, Q.; JIAO, Y. et al. Discovery of a new antifungal lipopeptaibol from *Purpureocillium lilacinum* using MALDI-TOF-IMS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2020.
- MARTÍNEZ-BUITRAGO, P. A.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L. Binary co-culture selection from marine-derived microorganisms for differential production of specialized metabolites. **Química Nova**, 42, n. 7, p. 713-719, 2019.
- NETZKER, T.; FISCHER, J.; WEBER, J.; MATTERN, D. J. et al. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. **Frontiers in microbiology**, 6, p. 299, 2015.

RUTTKIES, C.; SCHYMANSKI, E. L.; WOLF, S.; HOLLENDER, J. et al. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. **Journal of cheminformatics**, 8, n. 1, p. 3, 2016.

SPERANDIO, G. B.; FERREIRA FILHO, E. X. Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: a review. **International Biodeterioration, Biodegradation**, 142, p. 109-123, 2019.

VAN SANTEN, J. A.; JACOB, G.; SINGH, A. L.; ANIEBOK, V. et al. The natural products atlas: an open access knowledge base for microbial natural products discovery. **ACS central science**, 5, n. 11, p. 1824-1833, 2019.

YANG, J. Y.; PHELAN, V. V.; SIMKOVSKY, R.; WATROUS, J. D. et al. Primer on agar-based microbial imaging mass spectrometry. **Journal of bacteriology**, 194, n. 22, p. 6023-6028, 2012.