

1 Verificação de atividade antimicrobiana de fungos do solo por método rápido

2
3
4
5
6 Milthes Viana GUEDES¹, Maxwell Adriano ABEGG¹

7
8
9
10
11 ¹ Iniciação Científica, Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Exatas e
12 Tecnologia – ICET da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Rua Nossa
13 Senhora do Rosário 3863 – Tiradentes.

14 Email: milthesguedes@gmail.com; maxabegg@gmail.com

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28 ITACOATIARA- AM

Verificação de atividade antimicrobiana de fungos do solo por método rápido

RESUMO

É bem conhecido que fungos permanecem um dos mais importantes recursos para a descoberta de bioatividade de novos compostos. Devido à sua diversidade e distribuição, ocupam virtualmente todos os biomas terrestres desempenhando um importante papel ecológico. Da história de descoberta de drogas de microrganismos, metabólitos secundários dos fungos forneceram um número de drogas importantes, como a penicilina. O processo normalmente usado para descobrir antibióticos inclui vários passos: (1) isolamento de microrganismos principalmente de terra (normalmente 2–3 dias é preciso), (2) cultura pura de microrganismos isolados (3–5 dias), (3) identificação de microrganismos isolados principalmente por características morfológicas para eliminar cepas duplicadas (14–21 dias), (4) testando se ou não os extratos obtidos de cultivos em caldo dos microrganismos mostram atividade antimicrobiana para selecionar microrganismos candidatos à produção de antibióticos (7–8 dias) e (5) recultivo de microrganismos candidatos para observar a reprodutibilidade de atividade antimicrobiana (6–8 dias). Este processo rotineiro normalmente leva 5–7 semanas. Neste estudo, o objetivo é verificar através de um método mais eficiente e mais rápido descrito previamente, se fungos presentes em solos são potenciais candidatos a produzirem antifúngicos anti-*Candida*. Foram testadas diferentes amostras de solos da região Amazônica dos municípios de Itacoatiara e Parintins adicionados diretamente em placa de petri com meio de cultura BDA e posteriormente pulverizou-se *Candida albicans* ATCC 64548, *Candida albicans* ATCC 10224, *Candida krusei* ATCC 20298 separadamente, inoculadas em meio Waksman. Fungos que mostraram efeitos antagônicos (zona de inibição) sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei* foram selecionados e isolados. Pela observação dos aspectos analisados, embora tenhamos

padronizado o método de semeadura e de inoculação do spray de *Candida* sp., tendo o crescimento de fungos filamentosos do solo de forma satisfatória e sendo observado até o momento atividade inibitória para dois isolados fúngicos contra *C. albicans* e *C. krusei*, ainda se faz necessário novos estudos visando à caracterização e identificação taxonômica do fungo filamentoso inibidor e do metabólito secundário.

Palavra-chave: Antagonismo de fungos; Metabolitos; Microbiologia; Antifúngicos.

ABSTRACT

It is very known that fungi stay one of the most important resource for the bioactive discovery of new composed. Due to his diversity and distribution, they occupy all virtually of the terrestrial biomes playing an important ecological part. Of the history of discovery of drug of microorganisms, fungal secondary metabolites provided a number of important drugs, as the penicillin. The process usually used to discover antibiotics includes several steps: (1) isolation of microorganisms mainly of earth (usually 2-3 days it is necessary), (2) pure culture of isolated microorganisms (3-5 days), (3) identification of microorganisms isolated mainly by morphologic characteristics to eliminate duplicated stumps (14-21 days), (4) being tested or not obtained extracts of cultivations in broth of the microorganisms show activity antimicrobial to select microorganisms candidates the production of antibiotics (7-8 days) and (5) reculture of microorganisms candidates to observe the reproductibilidad of activity antimicrobial (6-8 days). This routine process usually takes 5-7 weeks. In this study, the objective is to verify through a more efficient and faster method described previously, if present fungi in soils are potential candidates to produce it antifungal *anti-Cândida*. Different samples of soils of the Amazonian area of the municipal districts of Itacoatiara and Parintins were tested added directly in petri plate with middle of culture PDA and later *Candida albicans* ATCC 64548 was sprayed, *Candida albicans* ATCC 10224, *Candida krusei* ATCC 20298 separately, inoculated in half Waksman. Fungi that showed antagonistic effects (inhibition area) on the growth of *C.albicans* and *C. krusei* they were selected and isolated. For the observation of the analyzed aspects, although we have standardized the sowing method and of inoculation of the spray of *Candida* sp., tends the growth of filamentous fungi of the soil in a satisfactory way and

being observed until the moment activity inhibitory for two isolated fungi against *C. albicans* and *C. krusei*, it is still made new necessary studies seeking to the characterization and identification taxonomic of the inhibiting filamentous fungi and of the fungal secondary metabolites.

Key word: Antagonism of fungi; Metabolites; Microbiology; Antifungal.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (ALEKHINA *et al.*, 1997).

Os fungos são um dos grupos mais diversos da Terra. São conhecidos apenas cerca de 105.000 espécies de fungos, aproximadamente 7% do estimado de 1,5 milhões de espécies. Devido a sua diversidade e distribuição, ocupam virtualmente todos os biomas terrestres desempenhando um importante papel ecológico. (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). É conhecido bem que fungos permanecem um dos mais importantes recursos para a descoberta de bioatividade de novos compostos (PELAEZ, 2005).

Os fungos são organismos eucarióticos, quimioheterotróficos, de nutrição absorptiva com digestão extracorpórea parcial, predominantemente aeróbica ou fermentadores facultativos, que apresentam estrutura corpórea pluricelular micelial (fungos filamentosos) ou unicelular leveduriforme (leveduras), com parede celular constituída de quitina e glicanos e tendo o ergosterol como principal esteroide constituinte da membrana plasmática. Os fungos são predominantemente sapróbios e a decomposição, particularmente em ambientes terrestres é a principal função ecológica desempenhada por este grupo de organismos. Eles podem ainda viver associados a outros organismos como parasitas ou mutualistas, como também formarem associações que não compreendem nem relação de parasitismo estrito nem mutualismo estrito, como no caso dos líquens e fungos endobioticos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

A importância econômica dos fungos para as sociedades compreendem tanto aspectos negativos, ou danos que estes organismos podem causar a economia, quanto aspectos positivos, podendo ser aproveitados economicamente. Os aspectos positivos dos fungos na economia, entretanto, suplantam os negativos. No setor agropecuário, os fungos já são utilizados para a micorrização de sementes de algumas plantas cultivadas e no controle biológico de animais, plantas e fungos parasitas de vegetais agricultáveis. O impacto positivo dos fungos na economia decorre principalmente do setor industrial, já que diversos produtos são o resultado direto da atividade biológica desses organismos. Toda a indústria de processos fermentativos quer de bebidas ou de alimentos fermentados, baseia-se na utilização industrial do processo natural de fermentação realizado por fungos (ALEKHINA *et al.*, 1997).

Da história de descoberta de droga de microrganismos, metabólitos secundários dos fungos proveram um número de drogas importantes, como a penicilina (FLEMING, 1929). Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana incluem, entre outros, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, como por ex., as plantas e animais. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para: novos antibióticos e agentes terapêuticos; probióticos; produtos químicos; enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas; biorremediação de poluentes; e biolixiviação e recuperação de minérios. Outros benefícios incluem o prognóstico e prevenção de doenças emergentes em seres humanos, animais e plantas, e a otimização da capacidade microbiana para a fertilização dos solos e despoluição das águas.

Foram descobertos muitos antifúngicos de microrganismos. O processo normalmente usado para descobrir antifúngicos inclui vários passos: (1) isolamento de microrganismos principalmente de terra (normalmente 2–3 dias é preciso), (2) cultura pura de microrganismos isolados (3–5 dias), (3) identificação de microrganismos isolados principalmente por características morfológicas para eliminar cepas duplicadas (14–21 dias), (4) testando se ou não os extratos obtidos de cultivos em caldo dos microrganismos mostram atividade antimicrobiana para selecionar microrganismos candidatos à produção de antibióticos (7–8 dias) e (5) recultivo de microrganismos candidatos para observar a reprodutibilidade de atividade antimicrobiana (6–8 dias). Este processo rotineiro (nomeou o tradicional método neste estudo) normalmente leva 5–7 semanas (KAWAGUCHI, M. et al., 2013). Neste estudo, o objetivo é verificar através de um método mais eficiente e mais rápido descrito previamente, se fungos presentes em solos são potenciais candidatos a produzirem antifúngicos anti-*Candida*.

METODOLOGIA

Amostra de solo:

No campo, os solos foram coletados manualmente com auxílio de faca e acondicionados em recipientes de vidro. Todos os exemplares coletados foram diferenciados por dados de campo, cor, luminosidade incidente, data e local também foram devidamente registrados no momento da coleta. As diferentes amostras de solo foram utilizadas em três meios distintos para o isolamento de fungos filamentosos.

Meio 1: composto por sacarose 2,0%, glicose 1,0%, milho em pó íngreme (Marcor Desenvolvimento, Carlstadt, NJ, EUA), de 0,5%, extrato de bonito 0,5%,

KH₂PO₄ a 0,1%, CaCO₃, canamicina 0,1mg 1mL e Agar 1,5%, ajustado para pH 6,0 antes da esterilização.

Meio 2: composto por amido solúvel 3,0%, glicerol 1,0%, farinha de soja 2,0%, levedura seca 3,0%, KCl a 0,3%, CaCO₃ 0,2%, MgSO₄ 7H₂O 0,05%, KH₂PO₄ 0,05%, canamicina 0,1mg 1ml e Agar 1,5%, ajustado para pH 6,5 antes da esterilização (Kawaguchi et al, 2012).

Meio 3: composto por ágar batata dextrose (BDA) 15mL.

Meio 4: composto por BDA 15 ml e cloranfenicol (antibiótico).

Métodos de Semeadura do solo:

O método de semeadura foi testado com cinco amostras de solo.

Solo 1 – Terra Preta Floresta (TPA- Floresta) / Localizada em Itacoatiara-AM;

Solo 2 – Terra Preta Fora da Mata (TPA- Fora) / Localizada em Itacoatiara-AM;

Solo 3 – Mata da região do lago de Serpa Composta (MS) / Localizada em Itacoatiara-AM;

Solo 4 – Terra da Margem do Lago do Caru Composta (CARU) / Localizada em Itacoatiara-AM;

Solo 5 – Terra Preta de área indígena (TP -índio) / Localizada em Parintins-AM

Cada amostra de solo (0,015g) foi adicionada diretamente em uma placa de petri (90 x 15 milímetros) em triplicata para cada amostra de solo. Cada ponto de fusão (em 45-50 °C) meio (15 mL, meios 1-3) foi vertido para a placa e misturou-se bem para

dispersar a amostra. A placa de solo foi incubada a 27°C por 2-3 dias para formar colônias de fungos.

Métodos de inoculação de *C. albicans*:

Candida albicans ATCC 64548, *Candida albicans* ATCC 10224, *Candida krusei* ATCC 20298 foram usadas como fungo patogênico. Uma alça do fungo patogênico de um tubo com ágar inclinado para (7,5 mL, em tubo com tampa de rosca, 9x16x 150 mm) inoculou-se em meio Waksman (10 mL peptona 0,5%, extrato de carne 0,5%, NaCl 0,3% e 2,0% de glicose, ajustada para pH 7,0 antes da esterilização) e incubou-se a 27°C durante 2 dias, antigindo 1,0 mL de concentração.

Método de inoculação:

A cultura original de *C. albicans* e *C. krusei* foram diluídas com salina estéril para ajustar a $5-10 \times 10^5$ UFC (Unidades formadoras de colônia) mL⁻¹. A suspensão (40 mL) foi sobreposta por pulverização (figura 1) a uma altura de cerca de 150 milímetros em placas de solo preparadas como descrito anteriormente. Com um aperto no spray atomizador, aproximadamente 50 µL de solução foi pulverizada. As placas foram inoculadas e incubadas a 27°C durante um a dois dias.

Fungos que mostram efeitos antagônicos (zona de inibição) sobre o crescimento de *C.albicans* foram selecionados (Kawaguchi M. et al, 2012).

Identificação taxonômica dos fungos:

Identificação taxonômica de fungos foi realizada observando o arranjo preciso dos conidióforos e a maneira em que foram produzidos (ontogenia conídios) por fungos cultivados em BDA. Para o método de cultura, o BDA em blocos (5x5mm²). As culturas foram cortadas assepticamente e colocadas em lâminas de microscópico estéreis

(26x76mm²). Quatros bordas do bloco de ágar foram inoculados com linhagens fúngicas. As inoculadas em ágar de blocos foram cobertas por lamínulas estéreis (18x18mm²) e incubadas com algodão úmido dentro da placa, a 25°C, durante 3 dias. As lamínulas foram cuidadosamente removidas dos blocos de ágar e montadas em uma gota azul de algodão (lactofenol) e sobreposta com uma lâmina de vidro limpa. A estrutura, estruturas de frutificação e padrão de ramificação dos esporos ou conídios foram observados sob microscópico (Seifert *et al.*, 2011).

Ensaio de atividade anti- *C. albicans* e anti- *C. krusei*:

Atividade anti- *C. albicans* e *C. krusei* foi medido por difusão de ágar estabelecendo método utilizando disco de papel (8mm) que contém EtOH extrato de fungos isolados (60mL). A cultura original de *C. albicans* e *C. krusei* (15mL) foi colocada diretamente em placas de plástico (15 mm). Fusão (a 45-50°C) GY ágar (15mL, glicose 1,0%, extrato de levedura 0,5% e ágar 0,8%, ajustado para pH 6,0 antes da esterilização) foi vertida para a placa e misturando bem para dispersar a *C.albicans* e *C. krusei* separadamente. As placas com cândida foram incubadas a 27 de °C por 24h (De, Beer. *et al.*, 1945).

Método de Isolamento Tradicional:

O método para o isolamento tradicional foi efetuado de acordo com o estabelecido no método de revestimento do solo descrito anteriormente, placas de solo foram preparadas pelo mesmo método. Fungos derivados de solo, isolado a partir das placas de solo e depois incubadas de 2-3 dias a 27°C, foram recultivadas em LCA e YpSS (amido solúvel 1,5%, extrato de levedura 0,4%. K₂HPO₄ a 0,1%, MgSO₄ 7H₂O 0,05% e ágar 2,0% ajustado para pH 6,0 antes da esterilização) banhados durante semanas.

Depois da duplicação das cepas de fungos, os fungos foram re-cultivados em 3 meios líquidos (meio1-3) utilizando o mesmo método tal como descrito acima (Takada, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a estimativa que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos foi escolhido para o desenvolvimento desta pesquisa, solos de regiões distintas da floresta Amazônica nos municípios de Itacoatiara e Parintins, onde a possibilidade de encontrar microrganismos não caracterizados é maior comparado a outras localidades do mundo devido a sua grande extensão territorial de floresta nativa.

O estudo iniciou-se com preparação das placas através do método de semeadura de solo com o meio 1 e 2 obteve crescimento de fungos filamentosos, porém não apresentou inibição após a pulverização da *C. albicans*, não se dando continuidade através deste procedimento. Assim, para o meio 1 e 2 novos testes serão necessários com utilização de uma espécie diferente de *Candida*.

As placas preparadas através do método de semeadura de solo com meio 3 apresentou grande crescimento por bactérias presente no solo, sendo inviável a pulverização de *C.albicans* no meio, devido ao excesso de crescimento de fungos filamentosos como de bactérias do solo, sendo necessária a utilização de antibióticos para a inibição do crescimento das bactérias.

As placas preparadas através do método de semeadura de solo com o meio 4 apresentou grande variedade de fungos presente no solo (figura 2), tendo uma grande variedade de microrganismo em cada solo analisado. Este meio foi suplementado com o antibiótico cloranfenicol e depois de testado verificou-se a sua eficiência para o

crescimento de fungos, sem contaminação por microrganismos indesejáveis sendo caracterizado apto para realização dos testes. Quando as placas feitas pelo método do meio 4 foram submetidas ao teste de inoculação de *Candida* as amostras de solo TPA-Floresta, TPA- Fora da Mata, MS e CARU não manifestaram nenhuma atividade antagonista de inibição a *C. albicans* e *C. krusei* inoculadas.

Neste estudo, só verificamos a eficiência e rapidez do método para fungos isolados de amostras diretamente da terra que podem produzir anti-*C. albicans* com a amostra de solo 5 TP-índio (figura 3), duas colônias que mostraram efeitos antagônicos no crescimento com *Candida* sp. formando zona de inibição (halo de inibição) foram selecionados para nova inoculação de *Candida* de forma que as colônias estivessem isoladas de outros microrganismos também presentes nas placas. Das duas colônias isoladas da placa do solo 5 (Figura 4) as duas colônias formaram halo de inibição tanto para os dois tipos de fungo patogênico utilizados *C. albicans* e *C. krusei*.

As colônias do solo TP-índio foram identificadas como 1.1 TP-índio e 1.2 TP-índio (figura 4) quando submetidas para identificação macromorfológica (por exemplo, cor de colônia e características culturais) apresentaram-se com aspecto de colônias brancas, arredondadas com características distintas em relação ao crescimento a 1.1 apresentou um tempo de crescimento menor em relação a 1.2 que necessitou de um tempo maior de incubação em estufa. Tendo uma diferença significativa na observação no verso da placa entre as duas, acreditando-se que os isolados do solo TP-índio eram espécies diferentes.

Na observação micromorfológica para identificação taxonômica de fungos feitas dos isolados do solo 5 foi realizada observando o arranjo das estruturas de frutificação (por exemplo tamanho de esporo e forma), sendo observados conidiósporos identificado

o gênero para ambas as colônias como pertencentes à *Aspergillus* sp. Não se identificou até o momento as espécies a qual esses fungos do solo que apresentam anti- *C.albicans* e anti- *C. krusei* são pertencentes. Observou-se também a formação de clamidoconídios intercalar quando o método para identificação taxonômica de fungos foi feita com a colônia inoculada com *C. albicans* ou *C.krusei* sendo analisado um comportamento diferente do fungo derivado do solo 5 quando encontrado isolado em placa. Assim, como nesta pesquisa SOARES & et al., encontrou dificuldades para a caracterização da espécie de *Aspergillus* devido as informações geralmente obtidas de um único lugar não podem solucionar o filogenia com um nível satisfatório de confiança nem pode resolver perguntas de identificação de espécies e em concordância ALFAIATE & et al., afirma que a análise de dados multilocus de DNA provê um método seguro para identificação de espécies.

Quando as amostras isoladas foram submetidas ao ensaio de atividade anti- *C. albicans* e anti- *C. krusei* não se obteve atividade inibitória necessitando de novos estudos para realização da fermentação na qual posteriormente possa isolar o metabólito secundário que produziu o halo de inibição quando inoculados com *C.albincas* e/ou *C. krusei*.

Por este método KAWAGUCHI et al., isolou 151 fungos candidatos a anti- *C. albicans* derivados de 18 solos exibiram efeitos antagônicos e foi selecionado dentro de uma semana e, entre eles, 26 fungos exibiram atividade anti-*C. albicans* quando submetidos em caldos de re-cultura. Assim, este método nos permite obter fungos produtores de antibiótico derivados de amostras do solo em um tempo mais curto (de 5-7 semanas para 2 semanas) e segundo KAWAGUCHI & et al., esse método apresenta uma taxa mais alta de isolados (17,2% a 31%) que o método tradicional. A mesma situação foi observada durante o desenvolvimento deste estudo em poucos dias (2 -3

dias) o crescimento dos fungos derivados do solo (figura 2) por toda a extensão da placa tendo que adaptar o método em relação incubação ao tempo de crescimento (1-2 dias) para possibilitar a inoculação da *C. albicans* e *C. krusei* aonde os fungos ainda não tivesse ocupado toda a placa para que se pudessem observar possíveis halos de inibição.

Esses resultados estão de acordo com os apresentados por KAWAGUCHI et al., sendo a utilização do método recomenda, pois permite obter e analisar amostras de fungos do solo produtores de antibióticos em um tempo mais curto em relação ao método tradicional, porém se faz necessário de uma diversidade maior de amostras da região para que a taxa de obtenção de fungos produtores de anti *C. albicans* e *C. krusei* seja maior e é esperado que este método seja aplicável para isolamento de microrganismos derivados do solo mostrando efeitos antagônicos em outros microrganismos patogênicos.

CONCLUSÃO

Pela observação dos aspectos analisados, embora tenhamos padronizado o método de semeadura e de inoculação do *spray* de *Candida* sp., tendo o crescimento de fungos filamentosos de forma satisfatória e sendo observado até o momento atividade inibitória, ainda se faz necessário novos estudos visando à identificação e/ou caracterização taxonômica do fungo filamentoso inibidor e de seu metabólito secundário e análise de um número maior de amostras do solo da região Amazônica.

AGRADECIMENTOS

À FAPEAM pela concessão da bolsa/Pibic.

Ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia do Amazonas – ICET-AM – pela
infraestrutura concedida para realização desse projeto.

Ao orientador professor Maxwell Adriano Abegg pela confiança, orientação e
ensinamentos.

BIBLIOGRAFIAS CITADAS

Alekhina *et al.*, 1997. **Bacterial diversity in forest soils: a successional analysis.** Microbiology, 66: 4, 466-469.

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.E.; Blackwell, M. **Introductory Mycology.** 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

De Beer, E. J. & Sherwood, M. B. **The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances.** J. Bacteriol. 50, 459–467 (1945).

Fleming, A. **On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*.** Brit. J. Exp. Pathol. 10, 226–236 (1929).

Kawaguchi, M. et al. **A new ascochlorin derivative from *Cylindrocarpon* sp. FKI-4602.** The Journal of antibiotics. 66, 23–29 (2013).

Kawaguchi, M. et al. **New method for isolating antibiotic-producing fungi.** The Journal of antibiotics. 66, 17-21 (2013).

Pelaez, F. in **Handbook of Industrial Mycology** (ed. Zhiqiang An) Vol. 22, 49–92 (Marcel Dekker, New York, 2005).

Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W. & Kendrick, B. **The Genera of Hyphomycetes.** CBS Biodiversity Series 9 (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, 2011).

Soares, C. et al. **Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal.** Mycologia, 104 (3), 2012, pp. 682-697.

Takada, M. In **The Isolation Method of Microorganisms.** (eds Yamasato, K., Morichi, T., Udagawa, S. & Kodama, T.) 31–43 (R&D Planning Tokyo, 2001) (in Japanese).

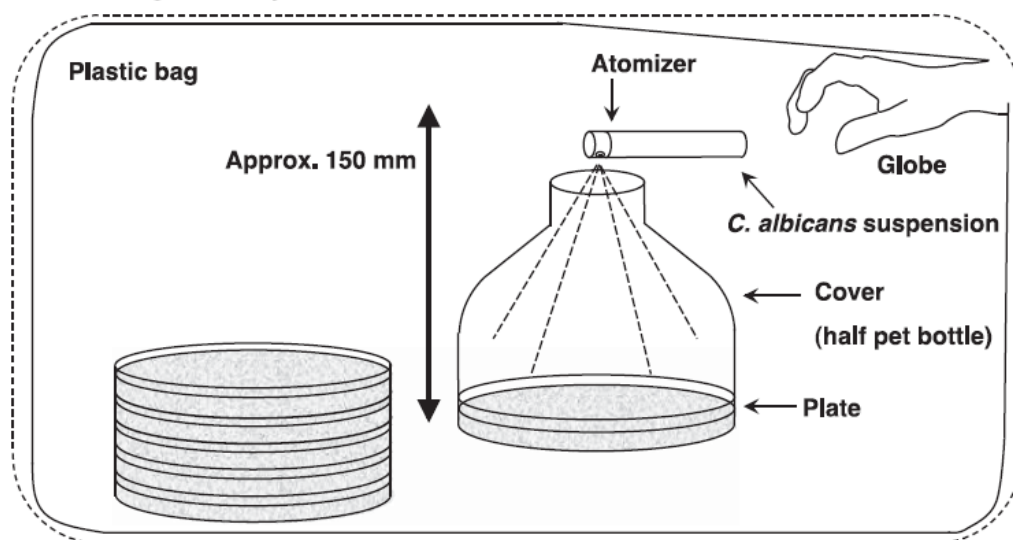


Figura 1. Instalações para inoculação de *C. albicans* através de pulverização em caldo Waksman na superfície da placa.

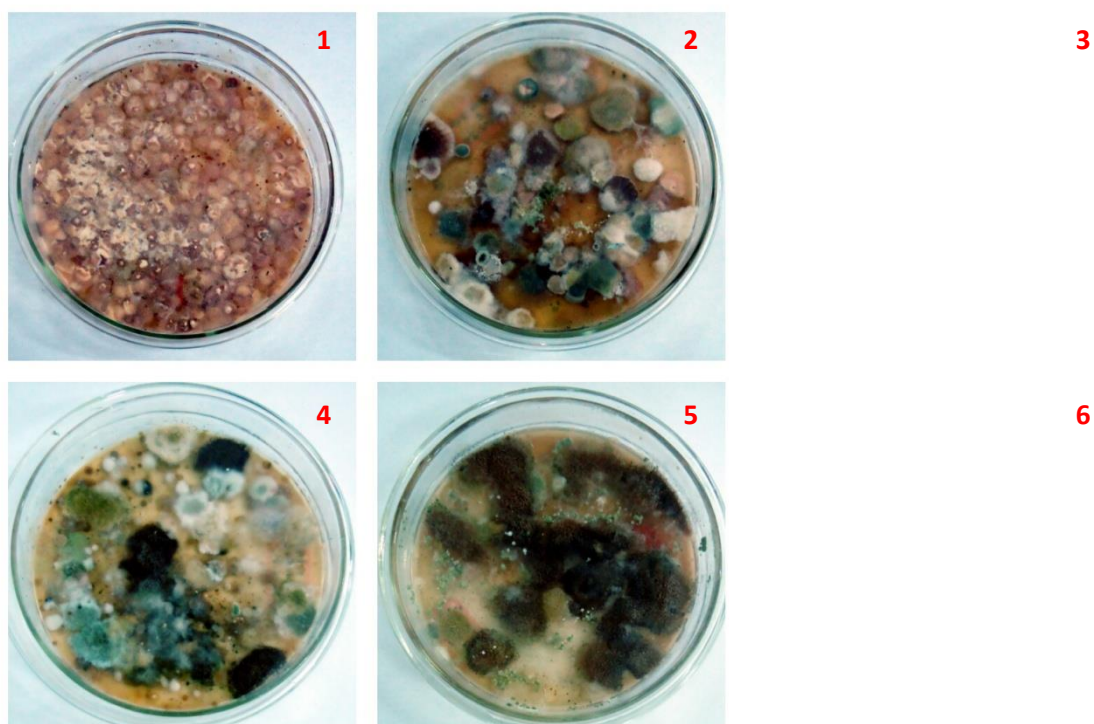


Figura 2. Fungos filamentosos crescido nos solos. 1 - caru; 2 - mata serpa; 3- parintins; 4 - tpa fora da mata; 5 - tpa floresta e 6 - Parintins.

406

407

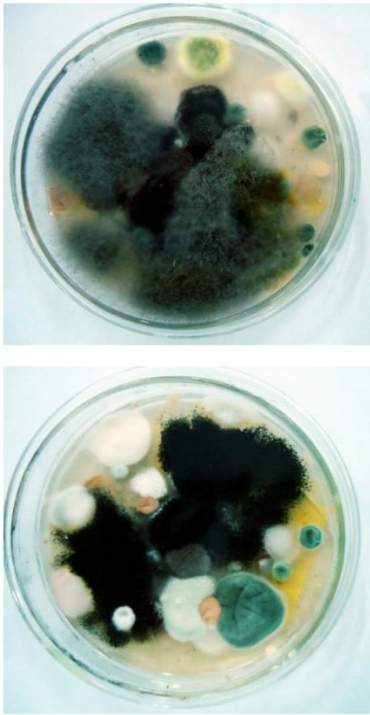


Figura 3. Placa do solo 5, colônias com suspeita de inibição.

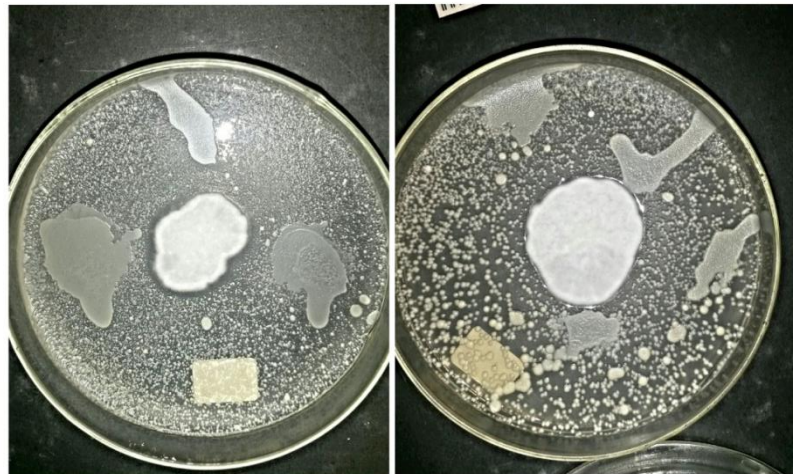


Figura 4 . Colônias repicadas da placa do solo 5 a esquerda 1.1 e 1.2.