

Avaliação do potencial antimicrobiano de fungos isolados do solo do Município de Iranduba

Evaluation of the antimicrobial potential of fungi isolated from the soil of the Municipality of Iranduba

Evaluación del potencial antimicrobiano de hongos aislados del suelo del Municipio de Iranduba

Recebido: 24/03/2021 | Revisado: 29/03/2021 | Aceito: 02/04/2021 | Publicado: 12/04/2021

Andréia Almeida Carmin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8737-3031>
Escola Superior Batista do Amazonas, Brasil
E-mail: aalmeidacarmin@gmail.com

Paulo Alexandre Lima Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1940-7447>
Universidade do Estado do Amazonas, Brasil
E-mail: psantiago@uea.edu.br

Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6943-8436>
Universidade do Estado do Amazonas, Brasil
E-mail: srhrael@hotmail.com

Aldalúcia Macêdo dos Santos Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1932-4350>
Escola Superior Batista do Amazonas, Brasil
E-mail: aldalucia.gomes@gmail.com

Keila Dayane do Espírito Santo Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1697-3558>
Escola Superior Batista do Amazonas, Brasil
E-mail: keila_dayane@yahoo.com.br

Resumo

O Brasil está entre os países que possui a maior biodiversidade biológica do mundo, estimada em 20% das espécies já conhecidas como um todo. Os fungos compreendem um grupo heterogêneo de microrganismos, podendo ser sapróbios, parasitas ou simbioses. Esses microrganismos são de extrema importância na produção de produtos que são utilizados nas indústrias farmacêutica, sendo fonte de substância no combate de doenças infecciosas. Esta pesquisa tem por finalidade avaliar a atividade antimicrobiana de fungos isolados do solo sobre *Staphylococcus aureus*. Os fungos foram coletados no Município de Iranduba, transportados ao laboratório multidisciplinar da Escola Superior Batista do Amazonas – Esbam, onde foram isolados, purificados e conservados em Glicerol 20%. Foram separados para o teste o F4 e F9. No teste de atividade antimicrobiana, apenas a espécie F4 desenvolveu halo de inibição de 0,9 mm.

Palavras-chave: Fungo do solo; Atividade antimicrobiana; Iranduba-AM.

Abstract

Brazil is among the countries with the highest biological biodiversity in the world, estimated at 20% of the species already known as a whole. The fungi comprise a heterogeneous group of microorganisms, being able to be saprobious, parasites or symbionts. Often the elements of diversity less visible are considered to be the most important for maintaining life. These microorganisms are extremely important in the production of products that are used in the pharmaceutical industries, being a source of substance in the fight against infectious diseases. The aim of this research was to evaluate the antimicrobial activity of isolated soil fungi on *Staphylococcus aureus*. The fungi were collected in the Municipality of Iranduba, transported to the multidisciplinary laboratory of the Superior Baptist School of Amazonas - Esbam, where they were isolated, purified and preserved in 20% Glycerol. F4 and F9 were separated for the test. In the antimicrobial activity test, only the F4 species developed a inhibition halo of 0.9mm.

Keywords: Soil fungus; Antimicrobial activity; Iranduba-AM.

Resumen

Brasil se encuentra entre los países que tienen la mayor biodiversidad biológica del mundo, estimada en el 20% de las especies ya conocidas en su conjunto. Los hongos comprenden un grupo heterogéneo de microorganismos, que pueden ser saprobios, parásitos o simbioses. Estos microorganismos son de suma importancia en la elaboración de

productos que se utilizan en las industrias farmacéuticas, siendo fuente de sustancia en la lucha contra enfermedades infecciosas. Esta investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de hongos aislados del suelo en *Staphylococcus aureus*. Los hongos fueron recolectados en el municipio de Iranduba, transportados al laboratorio multidisciplinario de la Escola Superior Batista do Amazonas - Esbam, donde fueron aislados, purificados y conservados en Glicerol al 20%. F4 y F9 se separaron para la prueba. En la prueba de actividad antimicrobiana, solo las especies F4 desarrollaron una zona de inhibición de 0,9 mm.

Palabras clave: Hongo del suelo, Actividad antimicrobiana, Iranduba-AM.

1. Introdução

1.1 Biodiversidade e fungos associados ao solo

O Brasil está entre os países que possui a maior biodiversidade biológica do mundo, estimada em 20% das espécies já conhecidas como um todo. Principalmente a floresta Amazônica a maior do planeta, em recursos variados de matéria-prima. Apesar da imensa diversidade biológica que nela se encontra, apenas uma pequena parte tem sido estudada, muito menos os microrganismos microscópicos e sua associação com o solo (Souza *et al.*, 2004).

Muitas vezes os elementos da diversidade menos visíveis, são considerados os mais importantes para a manutenção da vida. Entre esses microrganismos, que são essenciais no ecossistema, um bom exemplo são os fungos. Os fungos compreendem um grupo heterogênicos de microrganismos que podem ser saprofiticos, parasitas ou simbiote. Esses organismos são eucarióticos, heterotróficos, sobrevivem como decompositores se nutrindo de matéria orgânica morta. São conhecidos como cogumelos, mofos, bolores, orelha-de-pau, guarda chuvas e leveduras (Tortora, 2012).

Esses organismos são predominantes em ambiente ácido, crescem em uma temperatura que variam entre 25 a 37°C. São formados por uma única célula como as leveduras, ou multicelulares como filamentosos. Tendo uma estimativa de 1,5 milhões de espécies no mundo em diferente habitat, solo, água, planta, ar e até no corpo humano. Somente 70.000 espécies de fungos foram catalogadas (Silva *et al.*, 2016).

Os fungos são importantes para vários setores, nas indústrias alimentícias, na produção de queijo, bebidas alcoólicas entre outros produtos. Os fungos cooperam nas indústrias farmacêutica na produção de medicamentos, contribuem nos processos de biodegradação e ação biológica de efluentes, realizam atividade enzimática. Os fungos também são de grande importância na agropecuária ecológica, orgânica ou biológica que cooperam para o crescimento da biodiversidade e variedades de espécie. Sendo útil para manter o equilíbrio do meio ambiente (Abreu *et al.*, 2015).

Esses microrganismos são de extrema importância na produção de produtos que são utilizados nas indústrias farmacêutica (Tortora, 2012).

Sendo fonte de substância no combate de doenças infecciosas. Como por exemplo a penicilina, que é um antibiótico, produzido por um fungo de bolor de pão. Que foi descoberto por acaso, em experiências feita por Alexander Fleming em 1928, essa descoberta importante revolucionou a medicina, que por meio dela foi possível reduzir os números de morte provocados por doenças infecciosas. Também contribuíram para os avanços científicos, nos campos da farmacologia e biotecnologia. Em busca de novas substâncias capazes de bloquear ou até mesmo destruir organismos patogênicos, substituindo medicamento que ao longo do tempo perderam sua eficácia (Calixto *et al.*, 2012).

1.2. Organismos patogênicos

De maneira geral, o termo patógeno ou agente infeccioso refere-se a todo e qualquer organismo que possa causar uma doença. Este termo é comumente aplicado as bactérias devido a sua capacidade de causar doenças através da invasão de tecidos. Esta habilidade, causa uma intensa resposta imune devido a liberação de endotoxinas pelo organismo invasor. Dentre as bactérias patogênicas mais comuns estão o *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose que vitimou mais de 1,5

milhão de pessoas em 2013. Bactérias do gênero *Streptococcus* e *Pseudomonas* são conhecidas por causar pneumonia assim como o *Staphylococcus aureus* que mesmo fazendo parte da biota da pele, pode causar infecções graves como pneumonia e meningite (Alberts, Johnson, *et al.*, 2002; Fish, 2002; Zumla, Petersen, *et al.*, 2015).

1.2.1 Taxonomia, patogenicidade e resistência de *Staphylococcus aureus*

Pertencente ao reino Bactéria, filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales* família *Staphylococcaceae* gênero *Staphylococcus*. O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva frequentemente encontrada em indivíduos saudáveis de maneira mutualística. Este organismo é causador de diversas infecções brandas como acnes e furúnculos e até infecções severas como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, sepse e outras (Almeida *et al.*, 2016).

Estas doenças podem ocorrer através da produção de toxinas como no caso da pele escaldada, intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico ou por invasão direta o que leva a formação de abscessos e a destruição dos tecidos devido a infecção cutânea. Tais infecções podem ser combatidas com uma terapia de antibiótico de acordo com o grau de infecção, estes medicamentos podem ser daptomicina, tigeciclina, linezolida, trimetropim, sulfamentazol, doxiciclina, minociclina, clidamicina ou linezolida. Mesmo com uma terapia de antibiótico eficiente, as cepas de *Staphylococcus aureus* adquiriram mecanismo de defesa contra alguns antibióticos. Essa resistência delimita as opções de terapia tardando o tempo de tratamento (Lima *et al.*, 2015).

O excessivo uso desnecessário e indiscriminado dos antibióticos e a falta de agilidade nos diagnósticos de infecções bacterianas tem aumentado a resistência desses patógenos como um todo. A grande maioria dessas linhagens de *S. aureus* adquiriram filamento genético chamado de plasmídeo que codifica uma penicilina (β -lactamase), enzima capaz de inativar o antibiótico através de hidrólise do anel β -lactâmico (Lima *et al.*, 2015).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo isolar os fungos associados ao solo coletado no município de Iranduba e posteriormente avaliar o potencial antimicrobiano dos fungos isolados frente a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*.

2. Metodologia

Foram coletadas amostras de solo na Comunidade de São Sebastião (Figura 1), do Município de Iranduba, localizado à margem esquerda do Rio Solimões, na confluência deste com o rio Negro, a sul da capital do Amazonas, Manaus, acesso por via fluvial e terrestre, distante cerca de 35 km (em linha reta) da Cidade de Manaus – AM.

Figura 1 - Localização da comunidade São Sebastião, Município de Iranduba-AM.



Fonte: Googleearth.

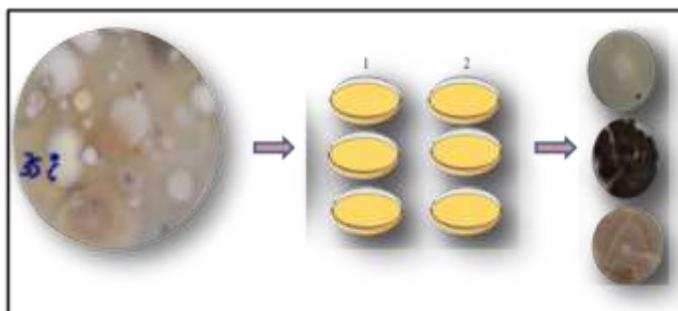
2.1. Coleta, isolamento, purificação e conservação dos fungos associados ao solo.

O solo coletado foi armazenado em um recipiente estéril. Em seguida foi conduzido ao Laboratório Multidisciplinar da Escola Superior Batista do Amazonas, para realização da técnica de isolamento de acordo com protocolo de Mello e Silva (2011).

2.2 Isolamento dos Fungos

Foi preparado o meio de cultura Agar Sabouraud -SB, suplementado com amoxicilina (c = 50mg/mL), para prevenir contaminação com bactérias. Em seguida foi pesado 1g do solo, acrescentado 10 ml de água destilada autoclavada para diluição, homogeneizado de 1 a 1 minuto por 5 min. Uma alíquota de 50 µl da suspensão, foi plaqueado em meio de cultura com auxílio de uma alça de drigalsky, espalhando cuidadosamente com movimentos circulares. As placas foram identificadas, isoladas com filme pvc plástico, e armazenadas em estufa, com temperatura configurada para 35 °C, após de 5 dias, foi realizado o repique das amostras até a obtenção de culturas puras conforme observado na Figura 2.

Figura 2 - Repique das linhagens.

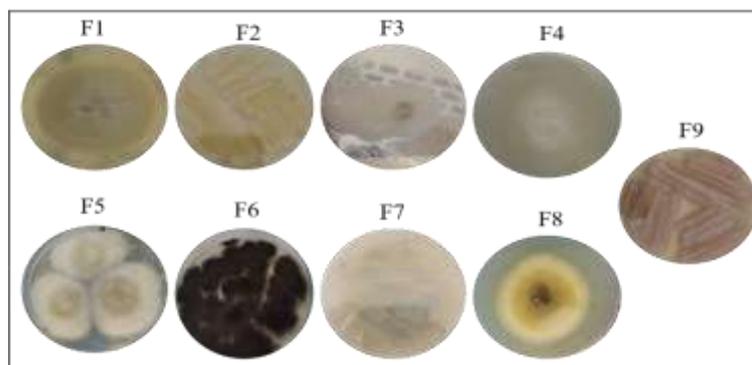


Fonte: Autores.

2.3 Conservação das linhagens obtidas

As colônias puras cresceram em meio Agar Sabouraud (SB – Sabouraud), na temperatura de 28 °C. As linhagens obtidas estão apresentadas na Figura 3.

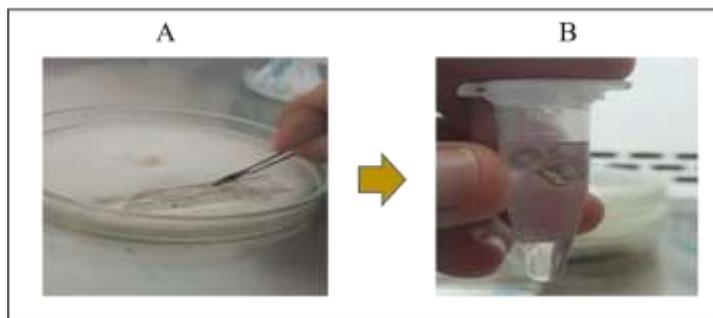
Figura 3 - Linhagens purificadas.



Fonte: Autores.

Os fungos foram cortados e armazenados em microtubos de 1,5 ml, conforme Figura 4. Em seguida adicionou-se Glicerol a 20%, e por fim as linhagens foram armazenadas em geladeira na temperatura de 4 °C.

Figura 4 - Conservação das linhagens.

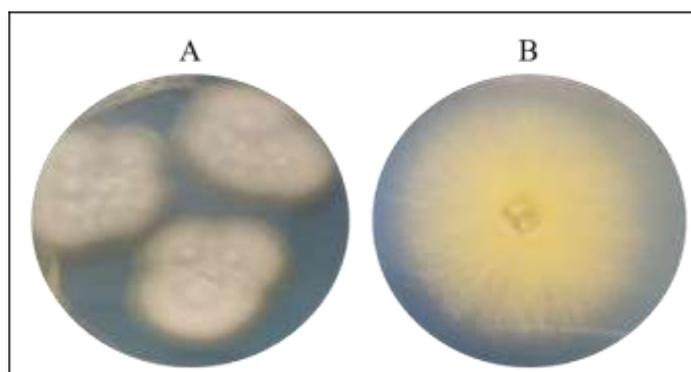


Fonte: Autores.

2.4 Teste de atividade antimicrobiana

Na avaliação de atividade antimicrobiana, dois fungos foram selecionados de maneira aleatória. Estes foram cultivados em meio sólido YES durante sete dias (Figura 5) na temperatura de 28 ± 1 °C. Após o tempo de crescimento, foi retirado um bloco de gelose da placa cultivada e inoculou-se no centro da placasemeada com o patógeno previamente cultivado (Ichikawa, *et al.*, 1971).

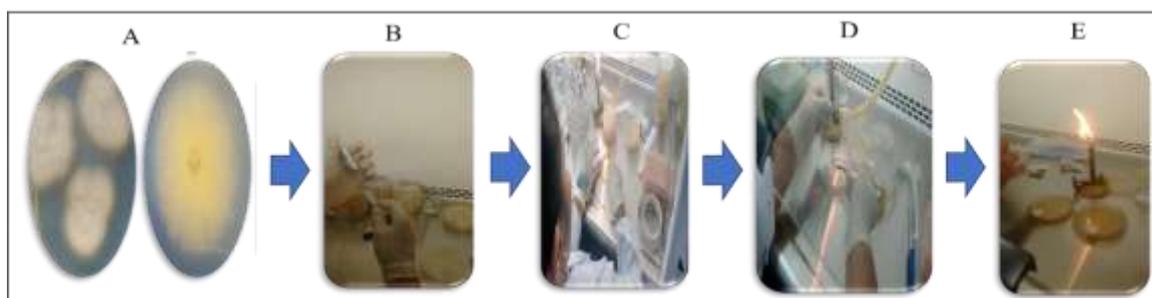
Figura 5 - Fungos selecionados, A- F4 e B- F9.



Fonte: Autores.

A cepa patogênica de *Staphylococcus aureus* foi reativada em Ágar Mueller Hinton (MHA) durante 24 horas à 37 ± 1 °C. Em seguida, foi preparada uma suspensão células do patógeno na escala 0,5 da McFarland que foi espalhada em diferentes placas de petri contendo MHA com o auxílio de um swab. As placas foram vedadas com filme pvc e incubadas por 72 horas à 37 ± 1 °C. Após esse período, foram medidos os halos formados. Este procedimento pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - A- Linhagens selecionadas, B- Suspensão da célula do patógeno, C- Placas semeadas com o patógeno, D- Inoculo do Fungo na placa e E- placas vedadas e identificadas.

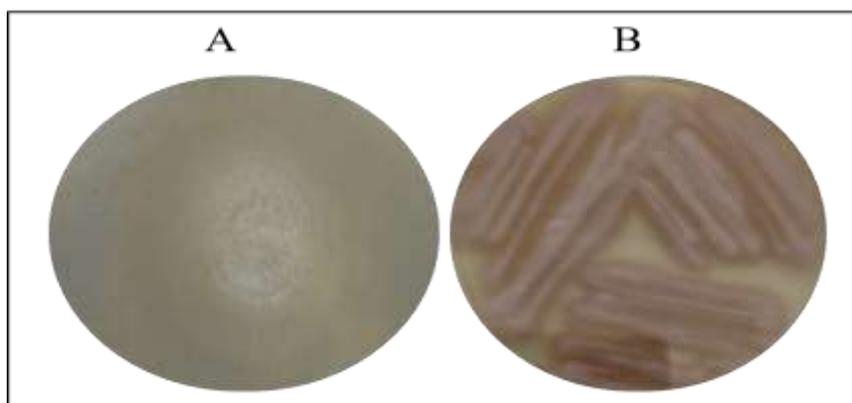


Fonte: Autores.

3. Resultados e Discussão

Nove linhagens de fungos foram isolados, purificados, conservados em glicerol a 20% e armazenados na geladeira. Após a obtenção das linhagens purificadas, foram escolhidos dois fungos F4 e F9, apresentados na Figura 7, para a atividade antimicrobiana.

Figura 7 - Fungos escolhidos para o teste, A- F4 e B- F9.

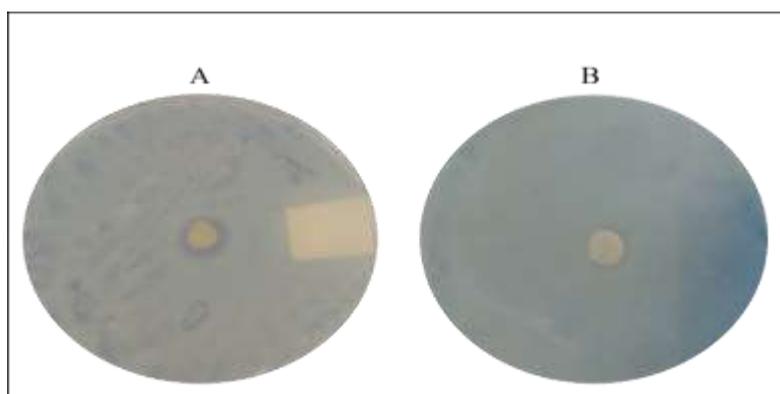


Fonte: Autores.

3.1 Atividades antimicrobiana

No teste realizado verificou-se que dos dois fungos testado F4 e F9, apenas o F4 apresentou atividade antimicrobiana contra cepa de *S. aureus*, com formação de halos ao redor onde foi depositada o bloco de gelose do fungo testado conforme Figura 8.

Figura 8 - Teste de Atividade Antimicrobiana, A- F4 e B- F9, contra *S. aureus*.



Fonte: Autores.

A pesquisa atual pode ser comparada aos estudos realizados por (Silva *et al.*, 2007), que ao testar extrato de plantas como ação antimicrobiana sobre *S. aureus*, apresentou resultado positivo, como pode ser visualizado na Figura 9. Onde as espécies apresentaram sensibilidade ao extrato da casca do cajueiro. Detectaram halo que variam de 10 a 20 mm. No presente estudo o halo observado foi de 0,9 mm.

Figura 9 - halo formado por extrato de casca de caju, contra *S. aureus*.



Fonte:Silva, J. (2007).

Estudos realizado por Pires e Paiva (2018) com fungos endofíticos isolados da floresta tropical seca brasileira (Caatinga), mostrou que dos 30 isolados, oito demonstraram ação antimicrobiana sobre microrganismo patogênico, entre eles *S. aureus*, com formação de halos, que variam de 10,0 a 22 mm. Em nossa pesquisa somente o F4 foi capaz de inibir o patógeno.

Vários estudos têm demonstrado a ação antimicrobianos de isolados do meio ambiente, contra cepas patogênicas humana (Pires & Paiva 2018).

Em nosso estudo não foi diferente, pelo menos um dos fungos testados, detectou formação de halo contra o patógeno de *S. aureus*. O resultado obtido é promissor estimulando pesquisas mais aprofundados a fim de obter melhores resultados, não somente para *S. aureus*, como para outros patógenos.

4. Conclusão

Dos fungos submetidos aos testes, tivemos resultado positivos somente com a espécie F4 para a atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, formando halo 0,9 mm. Estudos aprofundados são essenciais para melhor resultado. Pois sabemos que cepas de *S. aureus* são resistente a determinado antibióticos, e que ao longo do tempo perderam suas eficácias. Maiores estudos devem ser realizados com as demais espécies isoladas neste estudo, assim podendo identificar atividades de aplicações biotecnológicas diversas.

Referências

- Abreu, J. S., Rodovida, A. F. S., & Pamphile, J. A. (2015). Fungos de Interesse: Aplicação Biotecnológicas. *Revista UNINGÁ* 21(1).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Introduction to Pathogens. Molecular Biology of the Cell* (4a ed.). Garland Science.
- Almeida, M. J., Mendonça, R. De L., Freitas, M. Z. C., & Vandesmet, L. C. (2016). *Staphylococcus aureus* Mostra Científica em Biomedicina, – Quixadá/CE 1(1).
- Calixto, C. M. F., & Carvalheiro, É. T. G. (2012). Penicilina: Efeito do Acaso e Momento histórico no Desenvolvimento Científico. *Nova Escola*. 34(3).
- Fish, D. N. (2002). Optimal antimicrobial therapy for sepsis. *Am J Health Syst Pharm*, 59.
- Ichikawa, T., Ishikura, T., & Ozaki, A. (1971). Improvement of Kasugamycin – producing strain by the Agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiológica*.
- Pires, Ivania M. de O., & Paiva, L. M. (2008). Potencial Antimicrobiana de Endofítico de Plantas da Caatinga contra Bactérias Patogênicas ao Homem.
- Lima, M. F. P., Borge, M. A., Parente, R. S., Júnior, R. C. V., & Oliveira, M. E. (2015). *Staphylococcus aureuse* as Infecções Hospitalares- Revisão de Literatura, *Revista UNINGÁ*. 21(1).
- Melo, S. C. M. de, & Reis, A., Silva, J. B., da. (2011). *Manual de Curador de Germoplasma- Micro-Organismo*, Fungos Filamentosos, Embrapa Recurso Genetico e Biotecnologia.
- Souza, Antonia. L., Souza, Afonso. D. L., Filho, Spartaco A, Pinheiro, Maria. L. B., Sarquis, Maria. I. M., & Pereira, J. O. (2004). Atividade Antimicrobiana de Fungos Endofíticos Isolado de Plantas Tóxicas da Amazônia: *Palicourealongiflora*. 34.

Silva, C. J. A., & Malta, D. J. (2016). *Nascimento do. A Importância dos Fungos na Biotecnologia Ciências biológicas e da saúde Recife*. 2(3).

Soares, E. C. L., Costa, E. P., Silva, L. C. N., & Araújo, J. M. (2012). Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces sp.* Scientia plena.

Silva, Jacheline. G., Souza, Ivone. A., Higino, Jane. S., Junior, José. P. S., Pereira, Jozinete V., & Pereira, Maria do. Socorro V. (2007). Atividade Antimicrobiana do Extrato de *Anacardium occidentale* Linn. Em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus* Revista Brasileira de Farmacologia, V. 17.

Tortora, Gerard. J., Funk, Berdell. R., & Case, Christine. L. (2012). *Microbiologia, revisão técnica*: Flávio Guimarães da Fonseca. (10a ed.), Artmed.

Zumla, A., Petersen, E., Nyirenda, T., & Chakaya, J. (2015). "Tackling the tuberculosis epidemic in sub-Saharan Africa—unique opportunities arising from the second European Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP) programme 2015–2024". *International Journal of Infectious Diseases*, 32, 46–49.