

CURVA DE CRESCIMENTO MICELIAL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Panus strigellus*, UM COGUMELO COMESTÍVEL

Raquel Sousa CHAVES¹; Ruby VARGAS-ISLA²; Alessandra Martins Meira ARAÚJO³; Noemia Kazue ISHIKAWA⁴

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM; ²Colaboradora/Doutoranda do curso de Botânica/CNPq/INPA; ³Colaboradora/voluntária INPA; ⁴Orientadora CBIO/ INPA

1. Introdução

Na Amazônia é encontrada uma vasta diversidade de basidiomicetos, entre eles *Panus strigellus* (Berk.) Overh., um cogumelo comestível (Vargas-Isla *et al.* 2010), que produz como principal composto antimicrobiano o sesquiterpeno hipnofilina, este composto apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e antifúngica contra *Cladosporium herbarum* (Ishikawa *et al.* 2009). Hipnofilina já foi isolado de outros macrofungos, como *Crepidotus epibryus* (Fr.) Quél. [*Pleurotellus hypnophilus* (Pers.) Fayod.], apresentando atividade antibacteriana e antifúngica (Kupka *et al.* 1981; Giannetti *et al.* 1986), *Lentinus crinitus* (L.) Fr. (Abate e Abraham 1994), *Lentinus connatus* Berk., apresentando atividade antiprotozoária contra *Plasmodium falciparum* Welch. (Rukachaisirikul *et al.* 2005) e *Panus lecomtei* (Fr.) Corner. (*Lentinus strigosus* Fr.) com atividade contra *Trypanosoma cruzi* Chagas. e *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* (Cota *et al.* 2008; Souza-Fagundes *et al.* 2010). Em experimento com incubação de 30 dias *P. strigellus* apresentou produção de compostos antibacterianos contra *B. subtilis* a 25 °C. No entanto, não produziu a 35 °C (Chaves *et al.* 2011). Assim o objetivo deste trabalho foi ampliar a avaliação do crescimento micelial e da produção de metabólitos antimicrobianos de *P. strigellus* nas temperaturas de 25 e 35 °C, durante 45 dias. Assim como, comparar os mesmos fatores utilizando três isolados de *P. strigellus*.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos: os basidiomas dos isolados de *P. strigellus* utilizados neste estudo encontram-se depositados no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob os números INPA 222827, INPA 239979 e INPA 243943. As culturas miceliais estão depositadas na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA, sob os números INPACM 1464, INPACM 1530 e INPACM 1532.

2.2. Obtenção de inóculo: um fragmento da cultura micelial estoque foi transferido para placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e mantidos em incubadora do tipo Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a 25 °C, na ausência de luz, por sete dias. Fragmentos de 2 x 2 mm retirados da borda da colônia foram utilizados como inóculos dos experimentos.

2.3. Efeito da temperatura: cinco inóculos foram transferidos para frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio Extrato de Malte e Peptona de soja (EMP). O experimento foi conduzido em dois tratamentos de temperatura, 25 e 35 °C, sendo retirados ao acaso três frascos da incubadora a cada cinco dias. O procedimento repetiu-se até 45 dias de incubação.

2.4. Filtrado e biomassa: o micélio foi separado do meio de cultura por filtração. O filtrado foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana e a colônia fúngica para avaliar a produção de biomassa. Para isto a colônia fúngica foi desidratada em estufa com circulação de ar a 65 °C por 24 h, seguida por 105 °C até obter massa constante. As amostras foram mensuradas com auxílio de balança analítica.

2.5. Avaliação antimicrobiana: utilizou-se o método de difusão em ágar (técnica do pocinho), tendo como microrganismo teste a bactéria Gram-positiva *B. subtilis*. Uma alíquota da colônia bacteriana foi transferida para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio Infusão de Cérebro e Coração (ICC) e incubadas a 37 °C por 18±1 h. Após esse período, a cultura bacteriana foi diluída primeiro em Água peptonada e posteriormente em meio Infusão de Cérebro e Coração Ágar (ICCA) em concentração aproximada de 10⁵ UFC/mL, 20 mL do meio com a bactéria foi transferido para placas de Petri (diâm. 9 cm). Após solidificação do meio confeccionou-se três orifícios de 9 mm de diâmetro em cada placa, para onde transferiu-se 0,1 mL de filtrado dos diferentes tratamentos do cultivo micelial de *P. strigellus*. As placas foram armazenadas em geladeira a 4 °C *overnight* e posteriormente mantidas a 37 °C em estufa bacteriológica de 12 a 18 h. Após este período, foi observado se houve ou não formação de zona de inibição da bactéria ao redor dos pocinhos. Havendo formação de halo, mediu-se com auxílio de régua a distância entre a borda do orifício e a borda do halo.

2.6. Delineamento experimental: o experimento foi inteiramente casualizado e em parcela, no efeito principal a temperatura e nas subparcelas o tempo, com três repetições para avaliar a produção de biomassa e nove para avaliar a atividade antimicrobiana.

2.7. Comparação de isolados: o cultivo obedeceu aos mesmos critérios descritos acima. A temperatura de incubação foi de 25 °C e o período de 30 dias. A massa da colônia micelial foi desidratada para avaliar o crescimento micelial e o filtrado foi testado contra *B. subtilis*, pelo teste do pocinho. O

experimento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para o crescimento micelial e nove para a atividade antimicrobiana. Os dados do crescimento micelial e da atividade antimicrobiana foram submetidos à ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância.

3.Resultados e Discussão

3.1.Curva de crescimento micelial e atividade antimicrobiana de *Panus strigellus*

Os valores referentes ao crescimento micelial e atividade antimicrobiana de *P. strigellus* (Figura 1) indicam que a temperatura de incubação micelial (25 e 35 °C), influenciou ambos os fatores analisados. A produção de biomassa foi maior no cultivo a 35 °C. A atividade antibacteriana contra *B. subtilis* de 0,1 mL do filtrado do cultivo micelial de *P. strigellus* foi observada apenas quando a incubação aconteceu em ambiente com temperatura de 25 °C, com formação de zona de inibição bacteriana a partir de 20 dias de incubação. Houve diminuição significativa na atividade antimicrobiana aos 45 dias de incubação ($p < 0,01$).

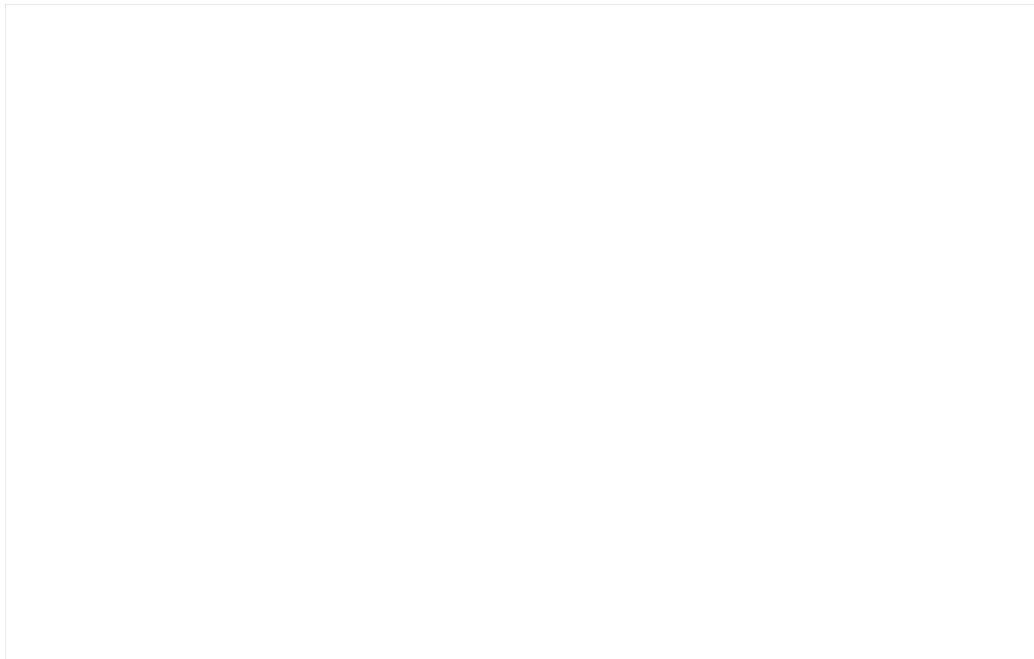


Figura 1 – Curva de crescimento micelial e atividade antibacteriana de *Panus strigellus* (INPACM 1464) cultivado em ambientes com temperaturas de 25 e 35 °C, por 45 dias contra *Bacillus subtilis*. Meio de cultura = Extrato de Malte e Peptona de soja. Volume = 100 mL por frasco. Linhas = biomassa seca. Colunas = atividade antimicrobiana. Barras = erro padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$), [n = 3

3.2.Comparação de três isolados de *Panus strigellus*

A produção de biomassa micelial dos diferentes isolados cultivados em meio de cultura EMP e ambiente com temperatura de 25 °C, por 30 dias de incubação (Figura 2) indica que houve variação entre os isolados. Quanto à atividade antimicrobiana ocasionada por 0,1 mL do filtrado da cultura micelial, mostrou diferença significativa ($p < 0,01$) entre as culturas testadas.

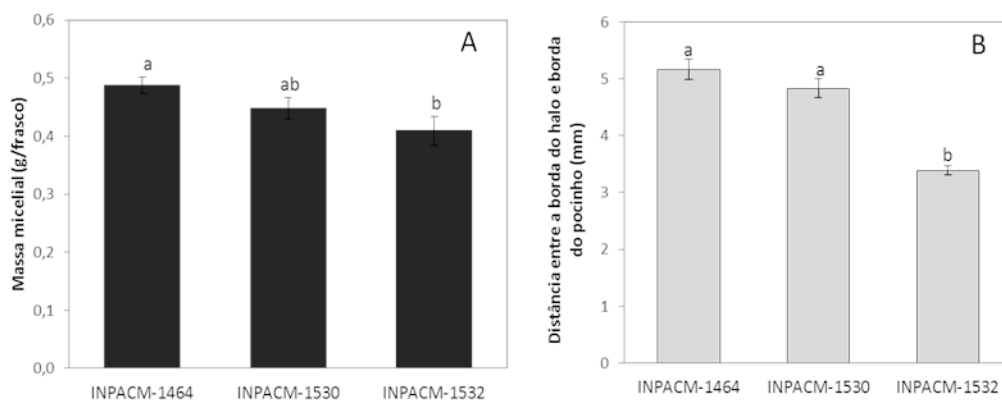


Figura 2 – Comparação de crescimento micelial e atividade antibacteriana de três isolados de *Panus strigellus*, cultivados em ambientes com temperatura de 25 °C, por 30 dias. **A**: produção de biomassa; **B**: atividade antimicrobiana de 0,1 mL de filtrado contra *Bacillus subtilis*.

Meio de cultura = Extrato de Malte e Peptona de Soja. Volume = 100 mL por frasco de 250 mL. Barras = erro padrão. Médias com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). $n = 5$ (crescimento micelial) e $n = 9$ (atividade antibacteriana).

O estudo mostrou que a temperatura de incubação influenciou tanto na produção de biomassa micelial quanto na produção de metabólitos antimicrobianos pela colônia micelial de *P. strigellus* (INPACM 1464). Os dados referentes à biomassa corroboram resultados anteriores de Vargas-Isla e Ishikawa (2008) que relatam a temperatura ótima de 35 °C para o crescimento micelial deste fungo quando cultivado em meio BDA.

Ciclos biológicos descritos por Tortora *et al.* (2000) e Teixeira *et al.* (2011) afirmam que os microrganismos produzem os metabólitos secundários quando atingem a fase estacionária. Afirmitiva observada no tratamento com temperatura de 25 °C, quando a fase estacionária e a produção de compostos iniciam-se com 20 dias de incubação. No entanto, no tratamento com temperatura de 35 °C, mesmo a cultura atingindo uma maior produção de massa micelial e a fase estacionária no vigésimo dia, não houve produção de metabólitos antimicrobianos até o 45º dia de cultivo. Neste sentido Knight *et al.* (2003) discutem que as condições para produção de metabólitos secundários não são necessariamente iguais as condições ótimas para o crescimento. Com relação à temperatura, afirma que em geral a temperatura ótima para produção de metabólitos secundários é inferior a referente ao crescimento. Fato observado neste trabalho.

A comparação de crescimento micelial e atividade antimicrobiana, de três isolados de *P. strigellus*, mostraram que o isolado INPACM 1532, foi inferior, tanto no crescimento micelial quanto na produção de metabólitos antimicrobianos.

4. Conclusão

A produção de metabólitos antimicrobianos é observada quando o fungo é cultivado em ambiente com temperatura de 25 °C, com formação de clara zona de inibição a partir de 20 dias de incubação. Entre os três isolados testados, INPACM 1464 e INPACM 1530 apresentam maior crescimento micelial e maior produção de metabólitos antimicrobianos.

5. Referências Bibliográficas

- Abate, D.; Abraham, W.R. 1994. Antimicrobial metabolites from *Lentinus crinitus*. *Journal of Antibiotics*, 47: 1348-1350.
- Cota, B.B.; Rosa, L.H.; Fagundes, E.M.S.; Martins-Filho, O.A.; Correa-Oliveira, R.; Romanha, A.J.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. 2008. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 263-270.
- Chaves, R.S.; Vargas-Isla, R.; Araújo, J.M.; Ishikawa, N.K. 2011. O efeito da temperatura no crescimento micelial e atividade antimicrobiana de *Panus strigellus*. *XX Jornada de iniciação científica PIBIC INPA – CNPq/FAPEAM*. Manaus, AM.

- Giannetti, B.M.; Steffan, B.; Steglich, W.; Kupka, J.; Anke, T. 1986. Antibiotics from basidiomycetes. Part 24. Antibiotics with a rearranged hirsutane skeleton from *Pleurotellus hypnophilus* (Agaricales). *Tetrahedron*, 42: 3587-3593.
- Ishikawa, N.K.; Vargas-Isla, R.; Macedo-Junior, F.C.; Capelari, M.; Faria, T.J. 2009. **Hipnofilina, sesquiterpeno antimicrobiano isolado de *Lentinus strigellus*, um cogumelo comestível da Amazônia.** In: *61ª Reunião Anual - Sociedade Brasileira para o progresso da ciência*, Manaus-AM.
- Knight, V.; Sanglier, J.J.; DiTulio, D.; Braccili, S.; Bonner, P.; Waters, J.; Hughes, D.; Zhang, L. 2003. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 446-458.
- Kupka, J.; Anke, T.; Gianetti, B.M.; Stglich, W. 1981. Antibiotics from basidiomycetes. *Archives of Microbiology*, 130: 223-227.
- Rukachaisirikul, V.; Tansakul, C.; Saithong, S.; Pakawatchai, C.; Isaka, M.; Suvannakad, R. 2005. Hirsutane sesquiterpenes from the fungus *Lentinus connatus* BCC 8996. *Journal of Natural Products*, 68: 1674-1676.
- Souza-Fagundes, E.M.; Cota, B.B.; Rosa, L.H.; Romanha, A.J.; Corrêa-Oliveira, R.; Rosa, C.A.; Zani, C.L.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O.A. 2010. *In vitro* activity of hypnophilin from *Lentinus strigosus*: a potential prototype for Chagas disease and Leishmaniasis chemotherapy. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 43: 1054-1061.
- Texeira, M.F.S.; Silva, T.A.; Palheta, R.A.; Carneiro, A.L.B.; Atayde, H.M. 2011. *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada*. Edua, Manaus, Brasil. 255pp.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2000. *Microbiologia*. Artmed, Porto Alegre, Brasil. 827 pp.
- Vargas-Isla, R.; Capelari, M.; Ishikawa, N.K. 2010. Ocorrência da espécie comestível *Panus strigellus* no estado do Amazonas. In: *3º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia e XII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental*. Manaus, AM.
- Vargas-Isla, R.; Ishikawa, N.K. 2008. Optimal conditions of *in vitro* mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. *Mycoscience*, 49: 215-219.