

**AVALIAÇÃO DE FONTES DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE
INIBIDOR DE CRESCIMENTO DE *Aspergillus fumigatus* USP2 por
Corynebacterium sp.**

*Gabrielle Fernanda Zimmer*¹
*Maria Viviane Gomes Müller*²
*Valeriano Antonio Corbellini*³

RESUMO

O aumento significativo na incidência de infecções fúngicas invasivas e a resistência natural de agentes etiológicos a antifúngicos existentes têm motivado a constante pesquisa por novos agentes antifúngicos nos últimos anos. Neste sentido, foi selecionada uma cepa de *Corynebacterium* sp. com potencial antagonista frente à *Aspergillus fumigatus* USP2. A cepa foi cultivada em fase submersa e em fase sólida, avaliando-se a variação das fontes de glicose, sacarose e glicerol em presença de peptona, bem como o meio sintético Czapek. Os caldos de cultivo submerso foram utilizados para o ensaio de antagonismo microbiano com o fungo *Aspergillus fumigatus* USP2. Os resultados apontam que o cultivo em fase sólida utilizando glicose como fonte de carbono apresenta maior potencial inibitório da cepa de *Corynebacterium* sp. sobre o fungo *Aspergillus fumigatus* USP2.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*. Atividade antifúngica. *Corynebacterium* sp.

ABSTRACT

The significant increase in the incidence of invasive fungal infections and the natural resistance to existing antifungal etiological agents has motivated the constant search for new antifungal agents in recent years. In this context, we selected a strain of *Corynebacterium* sp. with antagonist activity against *Aspergillus fumigatus* USP2. The strain was cultured by submerge and by solid phase fermentation, evaluating the variation of the carbon source from glucose, sucrose, glycerol and synthetic medium Czapek. The broths of submerged culture were used in microbiologic antagonism test with *Aspergillus fumigatus* USP2. The results show that the solid phase fermentation using glucose as the carbon source have a more inhibitory potential for *Corynebacterium* sp. strain over *Aspergillus fumigatus* USP2.

¹ Acadêmica do Curso de Química Industrial da Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC. <gabriellezimmer@yahoo.com.br>

² Doutora em Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. <mmulher@unisc.br> Departamento de Biologia e Farmácia. Professora da Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC;

³ Doutor em Química – área de concentração: Síntese Orgânica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Departamento de Química e Física. Professor da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. <valer@unisc.br>

Keywords: *Aspergillus fumigatus*. Antifungal Activity, *Corynebacterium* sp.

1 INTRODUÇÃO

Aspergillus fumigatus é um fungo saprófita que desempenha uma função essencial na reciclagem do carbono e nitrogênio. Os conídios de *A. fumigatus* são frequentemente inalados por seres humanos, mas raramente têm quaisquer efeitos adversos, desde que sejam eliminados eficientemente por mecanismos da imunidade inata. (LATGÉ, 1999; LATGÉ, 2001)

A frequente busca por novos agentes antifúngicos nos últimos anos é consequência do um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas invasivas e da resistência natural destes micro-organismos a antifúngicos já existentes.

Aspergillus fumigatus é considerado o agente etiológico mais comum, responsável por cerca de 90% das infecções humanas, causando em seres humanos uma micose oportunista, a aspergilose. Esta doença atinge pacientes imunossuprimidos, como portadores do HIV, pré-maturos, transplantados e hospitalizados por períodos prolongados em unidades de terapia intensiva (LATGÉ, 1999; NWOSU, 2001; BERGOLD, 2004).

Devido à grande necessidade de descoberta de novos agentes antifúngicos, este trabalho teve como objetivo a seleção de micro-organismos com potencial inibitório sobre o fungo *Aspergillus fumigatus* USP2 avaliando a eficiência dos processos fermentativos e a variação de fontes de carbono.

2 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo comparativo de fontes de carbono em cultivo submerso e em fase sólida, para a avaliação do potencial inibitório da bactéria *Corynebacterium* sp. sobre o fungo *Aspergillus fumigatus* USP2.

2.1 Amostragem

O micro-organismo com potencial inibitório sobre *Aspergillus fumigatus* USP2 foi selecionado por um processo de triagem em que o micro-organismo foi cultivado em

caldo Sabouraud por 4 dias a 30°C e submetido ao cultivo em placa de Petri com ágar Sabouraud em presença de *Aspergillus fumigatus* USP2. Após a seleção, o micro-organismo com potencial inibitório foi submetido a uma análise morfológica com o auxílio da coloração de Gram para a identificação do gênero do micro-organismo.

2.2 Fermentação submersa

A cepa de *Corynebacterium* sp. foi cultivada em ágar Sabouraud a 30°C por 24 horas, sendo suspensa em caldo Sabouraud para padronização com uma concentração de células suspensas de 0,1 de absorbância a 660 nm. Foram adicionados 0,250 mL da suspensão padronizada em 25 mL de caldo Sabouraud e incubado a 30°C em incubador orbital com 120 rpm por 7 dias, sendo recolhidas amostras em triplicata nas primeiras 12 horas e a cada 24 horas e armazenadas a - 5°C.

2.3 Fermentação em fase sólida

A cepa de *Corynebacterium* sp. foi cultivada em ágar Sabouraud a 30°C por 24 horas em estufa bacteriológica, a biomassa do micro-organismo em questão foi padronizada com uma concentração de células suspensas de 0,1 de absorbância a 660 nm e 1 mL da suspensão de células foi misturada a 10 mL de ágar. No meio de cultivo foi estudado a variação da fonte de carbono, utilizando três diferentes fontes como a Glicose, Sacarose e Glicerol e o meio Czapek amplamente utilizado no cultivo de fungos. Os meios de cultivo foram incubados a 30°C em estufa bacteriológica por 48 horas, sendo recolhidas amostras no tempo 0, 12, 24, 36 e 48 horas e armazenadas a - 5°C.

2.4 Ensaio de antagonismo microbiano

O caldo de cultivo de 7 dias de *Corynebacterium* sp. foi centrifugado (5 min a 3.000 rpm e 10 min a 10.000 rpm) e filtrado em membrana Millipore 0,45 µm. Alíquota de 1 mL do filtrado foi a 5 mL de ágar Sabouraud e a mistura vertida em placa de Petri, seguida por inoculação central com disco de cultura de *Aspergillus fumigatus* USP2 de 5 mm (previamente cultivado por 24 horas a 30°C em ágar Sabouraud). As medições do crescimento micelial radial foram em 12, 16, 20, 24, 28, 36 e 48 horas de incubação.

O ensaio de termossensibilidade da substância inibitória produzida pela cepa de *Corynebacterium* sp. foi realizado com o melhor tempo da curva de crescimento, sendo

autoclavado por 20 minutos entre 120°C e 127°C e realizado o ensaio por antagonismo microbiano e medido o crescimento micelial radial.

Para o ensaio com a cepa cultivada em fase sólida as amostras cultivadas nos diferentes tempos foram diluídas uma vez e autoclavadas por 20 minutos entre 121 e 127 °C e redistribuídas em placas de Petri de 9 mm, seguida por inoculação central com disco de cultura de *Aspergillus fumigatus* USP2 de 5 mm (previamente cultivado por 24 horas a 30°C em ágar Sabouraud). O ensaio por antagonismo microbiano foi realizado a 30°C, sendo medido o crescimento micelial radial no tempo 0, 12, 16, 20, 24, 28, 48 e 72 horas de incubação. As médias dos diâmetros da variação da fonte de carbono foram comparadas considerando um erro $\alpha = 5 \%$, usando o teste t de Student bicaudado e considerando que as variâncias entre as mesmas são significativas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Amostragem

A cepa bacteriana isolada pertence ao gênero *Corynebacterium* sp. e foi caracterizada pela morfologia como bacilos Gram-positivos, paliçadas e não esporuladas. As bactérias do gênero *Corynebacterium* sp. são conhecidas como agentes patogênicos de seres humanos e animais (COLLINS, 1999).

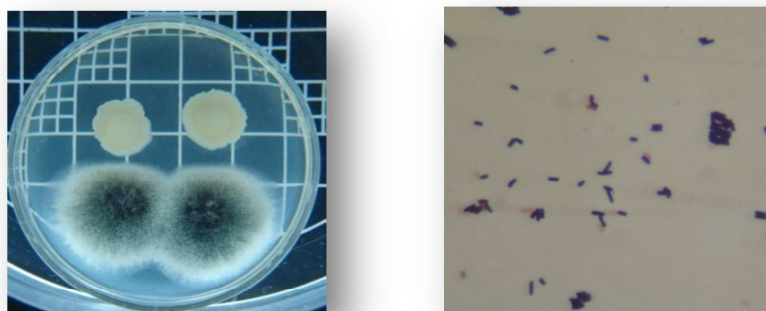


Figura 1 - Ensaio de antagonismo microbiano da bactéria *Corynebacterium* sp. com o fungo *Aspergillus fumigatus* USP2 (esquerda) e coloração de Gram da bactéria *Corynebacterium* sp. (direita).

Apesar do fungo e da bactéria estarem próximos, foi possível observar que a inibição resultou da excreção de metabólitos, pois o fungo foi incapaz de desenvolver hifas ao redor a colônia bacteriana.

3.2 Fermentação submersa

Na figura 2 encontra-se o conjunto de gráficos de crescimento micelial radial do *Aspergillus fumigatus* USP2, podendo se verificar a linearidade dos gráficos. A eficiência de inibição do crescimento micelial radial pode ser observado a partir de 24 horas de fermentação da cepa *Corynebacterium* sp.

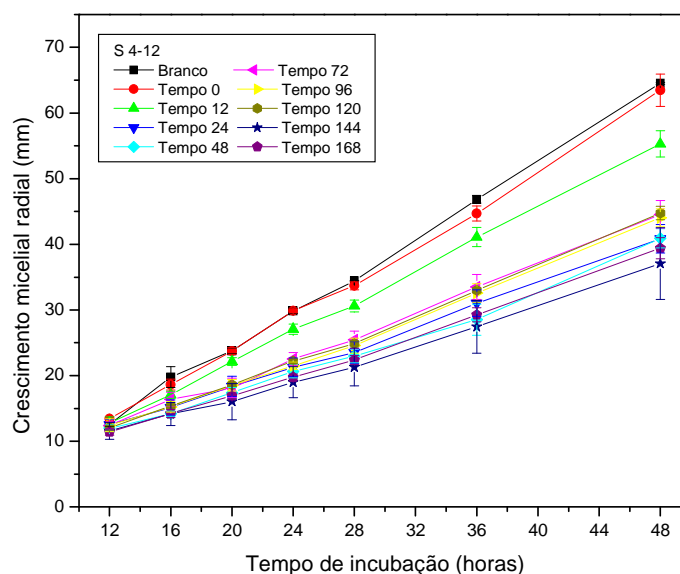


Figura 2- Gráfico de crescimento micelial radial da cepa de *Aspergillus fumigatus* USP2 em contato com o substrato da bactéria *Corynebacterium* sp. cultivado em fermentação submersa com caldo Sabouraud.

O tempo 168 horas de fermentação apresentou maior inibição do *Aspergillus fumigatus* USP2, sendo semelhante ao tempo 144 horas de incubação. Essa semelhança pode ser caracterizada pela estabilização do crescimento bacteriano.

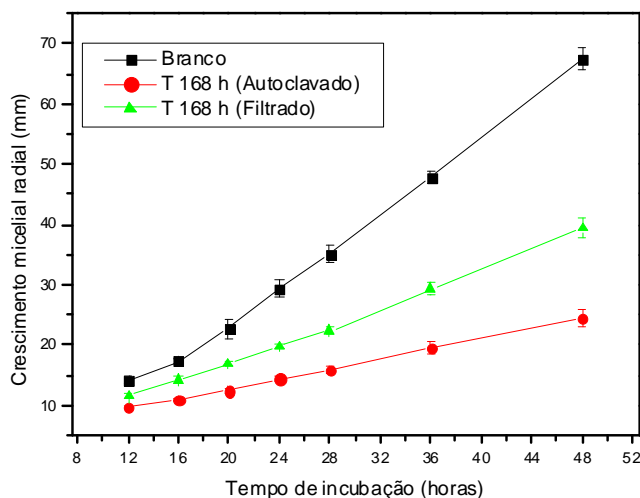


Figura 3- Gráfico de crescimento micelial radial da cepa de *Aspergillus fumigatus* USP2 em contato com o substrato da bactéria *Corynebacterium* sp. cultivado em fermentação submersa com caldo Sabouraud avaliando a termossensibilidade do potencial inibitório da bactéria.

A atividade inibitória produzida pela cepa *Corynebacterium* sp. não apresentou termossensibilidade, apresentando maior inibição sobre o *Aspergillus fumigatus* USP2 (figura 3), com um crescimento micelial radial de $24,42 \pm 1,48$ mm de diâmetro e obtendo uma maior inibição do que o caldo filtrado com $39,40 \pm 1,16$ mm.

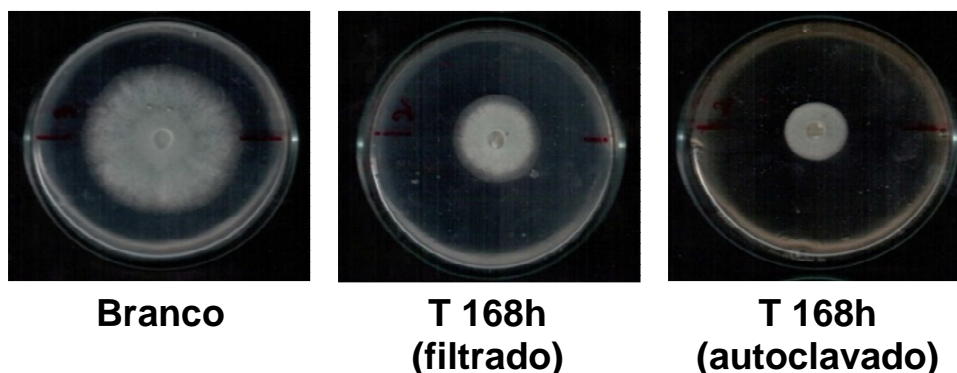


Figura 4- Ensaio de crescimento micelial radial da cepa de *Aspergillus fumigatus* USP2 em contato com o substrato da bactéria *Corynebacterium* sp. cultivado em fase submersa com caldo Sabouraud avaliando a termossensibilidade do potencial inibitório da bactéria.

A redução do crescimento micelial radial da amostra controle (sem a presença da bactéria) em relação à amostra de tempo 168 horas de cultivo da bactéria filtrada no tempo de 48 horas de incubação foi de 43 %. Já a amostra filtrada em relação à

autoclavada foi de 36% e a amostra autoclavada em relação ao controle apresentou uma redução de 64%.

3.3 Cultivo em fase sólida

No ensaio de antagonismo microbiano todas as fontes testadas a partir de 24 horas de incubação da bactéria apresentaram redução do crescimento micelial radial. Os tempos de 0 e 12 de incubação da bactéria são semelhantes ao controle negativo sem a bactéria, devido a não reprodução significativa.

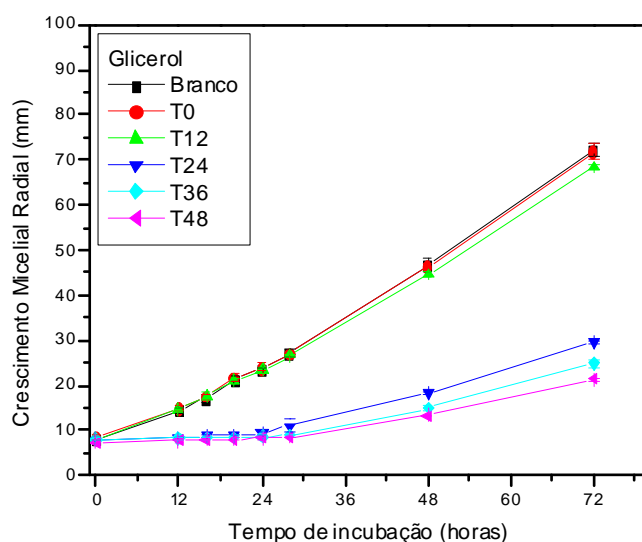


Figura 5- Gráfico de crescimento micelial radial da cepa de *Aspergillus fumigatus* USP2 em contato com o substrato da bactéria *Corynebacterium* sp. cultivado em fase sólida contendo glicerol no meio de cultivo.

O glicerol é uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilada por microorganismos (bactérias, fungos e leveduras) para obtenção de energia metabólica, estuda-se a sua utilização principalmente em bactérias. (NEVOIGT, 1997; GANCEDO, 1968)

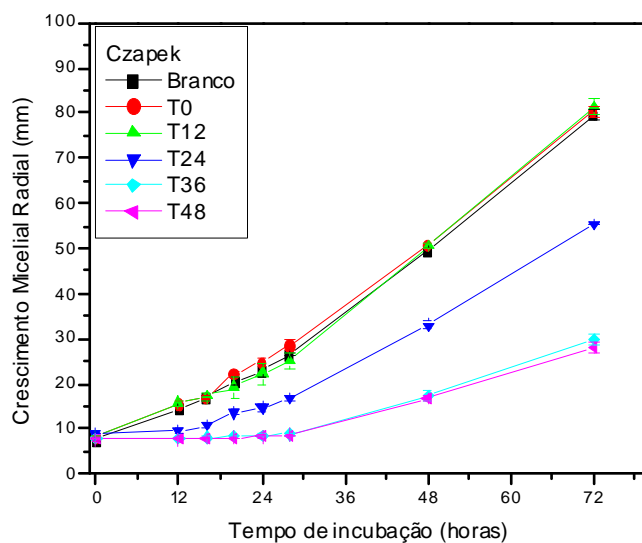


Figura 6- Gráfico de crescimento micelial radial da cepa de *Aspergillus fumigatus* USP2 em contato com o substrato da bactéria *Corynebacterium* sp. cultivado em fase sólida em meio de cultivo Czapek.

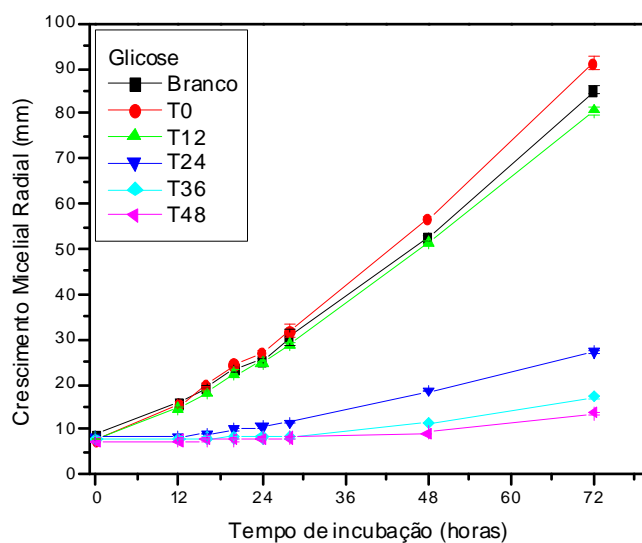


Figura 7- Gráfico de crescimento micelial radial da cepa de *Aspergillus fumigatus* USP2 em contato com o substrato da bactéria *Corynebacterium* sp. cultivado em fase sólida contendo glicose no meio de cultivo.

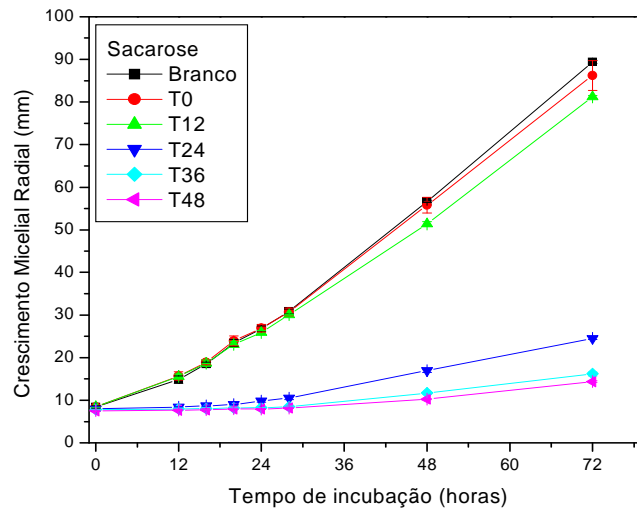


Figura 8- Gráfico de crescimento micelial radial da cepa de *Aspergillus fumigatus* USP2 em contato com o substrato da bactéria *Corynebacterium* sp. cultivado em fase sólida contendo sacarose no meio de cultivo.

Os meios com glicose e sacarose apresentaram curvas semelhantes, sendo que o meio com glicerol apresentou uma pequena redução no crescimento do *Aspergillus fumigatus* USP2 no controle negativo e nos tempos 0 e 12 horas de incubação. O meio Czapek, utilizado por ser um meio sintético que facilitaria a possível extração ou identificação da substância, apresentou uma boa inibição do fungo, mas somente a partir de 36 horas de incubação, pois a bactéria não conseguiu ter uma rápida reprodução neste meio.

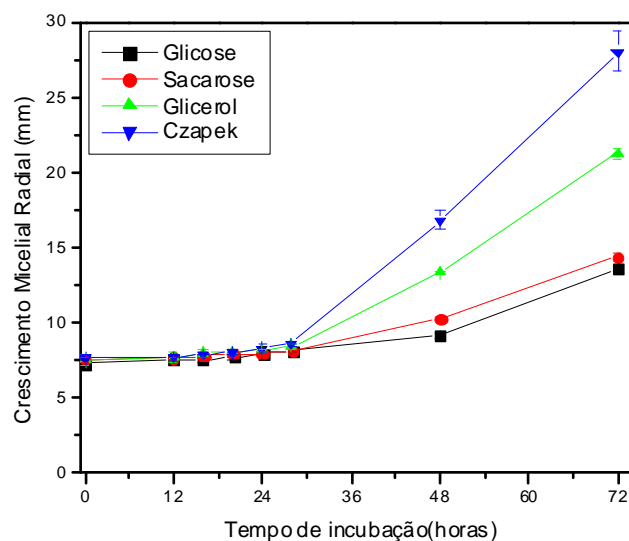


Figura 9- Gráfico do crescimento micelial radial da cepa de *Aspergillus fumigatus* USP2 nos 4 meios de cultivo com a cepa *Corynebacterium* sp. no tempo de 48 horas de incubação.

No ensaio para determinação da melhor fonte de carbono, a glicose é a fonte com maior potencial inibitório no tempo 48 horas de incubação da bactéria, apresentando crescimento micelial radial de $13,64 \pm 0,16$ mm de diâmetro no tempo de 60 horas de incubação em contato com *Aspergillus fumigatus* USP2, seguida pela sacarose com $14,37 \pm 0,19$ mm, glicerol $21,22 \pm 0,28$ mm e Czapek $28,04 \pm 1,34$ mm.

Dentre os fatores que influenciam a conversão de carbono em biomassa, o oxigênio presente ao meio de cultivo é provavelmente um dos fatores mais importantes (GANCEDO, 1968). Explicando o melhor rendimento e menor tempo de processo encontrado na fermentação em fase sólida.

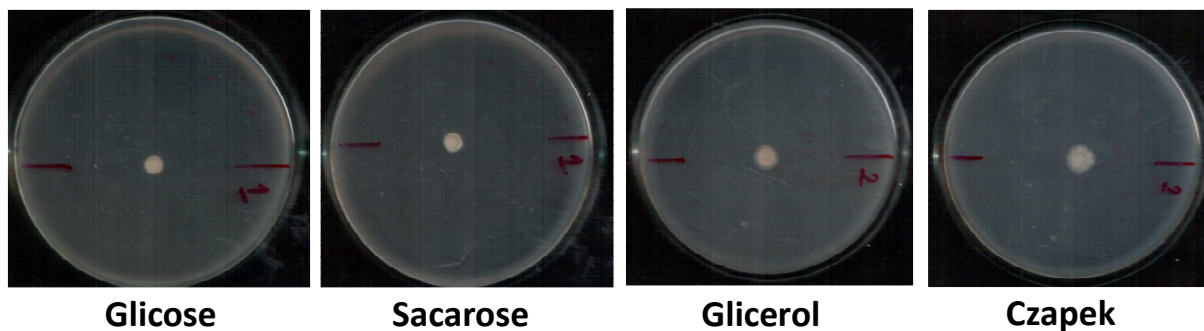


Figura 10- Ensaio de crescimento micelial radial da cepa de *Aspergillus fumigatus* USP2 nos 4 meios de cultivo com a cepa *Corynebacterium* sp. no tempo de 48 horas de incubação.

A cultura de 48 horas com glicose apresentou um maior potencial inibitório com redução de 84 % da velocidade de crescimento micelial radial, a sacarose ficou próxima com 83,9 %, glicerol com 70,6 % e Czapek apresentou 64,8%.

4 CONCLUSÃO

Todos os meios de cultura foram eficientes para o crescimento bacteriano e a substância produzida pela bactéria não é termossensível até 127°C . As médias dos diâmetros da variação da fonte de carbono foram comparadas considerando um erro $\alpha = 5\%$, usando o teste t de Student bicaudado e considerando que as variâncias entre elas são significativas. A glicose é a fonte de carbono com maior eficiência para a indução da produção da substância inibitória, seguida pela sacarose, glicerol e Czapek. Em todas

as fontes testadas a partir de 24 horas de incubação da bactéria já se pode verificar uma redução do crescimento micelial radial.

A utilização do cultivo em fase sólida para produção do potencial inibitório se mostra mais eficiente e prático para uma futura aplicação industrial, devido ao maior rendimento encontrado. Em cultivo em submersa, são necessárias 168 horas de fermentação da bactéria e autoclavagem do material para que se obtenha um crescimento micelial radial de $24,42 \pm 1,48$ mm de diâmetro, já em cultivo em fase sólida são necessários apenas 48 horas de fermentação e o crescimento encontrado foi de $9,14 \pm 0,16$ mm para o melhor meio indutor do potencial inibitório, sendo que a substância produzida é diluída pela metade. Este procedimento é necessário para que as fontes de nitrogênio e carbono sejam renovadas e sem degradação pela repetição da autoclavagem, interferindo no crescimento do fungo e gerando um falso resultado.

REFERÊNCIAS

BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 2, p. 159-72, 2004.

GANCEDO C.; GANCEDO, J. M.; SOLS. A. Glycerol metabolism in yeasts. *European Journal of Biochemistry*, v. 6, n. 2, p. 165-172, 1968.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 2, p. 310- 350, 1999.

LATGÉ, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*. v. 9, n. 8, p. 382-389, 2001.

COLLINS, M. D.; HOYLES, L.; LAWSON, P. A.; FALSEN, E.; ROBSON, R. L.; FOSTER, G. Phenotypic and phylogenetic characterization of a new *Corynebacterium* species from dogs: description of *Corynebacterium auriscanis* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 11, p. 3443-3447, 1999.

NEVOIGT, E; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Review*, v. 21, n. 3, p 231-241, 1997.

NWOSU V.C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research in Microbiology*. v. 152, n. 5, p.421-430, 2001.