

## Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* a extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*

ZAMBRANO, Cristina Gomes<sup>1</sup>; FONSECA, Anelise Oliveira da Silva<sup>2</sup>; MAIA FILHO, Fernando de Sousa; BAPTISTA, Cristiane Telles; BOTTON, Sônia Avila; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UFPEL, [cris-zambrano@hotmail.com](mailto:cris-zambrano@hotmail.com)

<sup>2</sup>UFPEL, [anelise\\_fonseca@yahoo.com.br](mailto:anelise_fonseca@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>UFPEL, [danielabrayer@gmail.com](mailto:danielabrayer@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

*Pythium insidiosum* é um oomiceto patógeno para mamíferos e o único agente etiológico da pitiose. É descrita em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, em países do continente Americano, Oceania e África, afetando diversas espécies domésticas e selvagens, assim como também humanos (GAASTRA et al., 2010). No Brasil, a pitiose tem sido bem documentada e ocorre em equinos (MARCOLONGO- PEREIRA et al. 2012), bovinos (GRECCO et al. 2009), ovinos (SANTURIO et al. 2008), caninos (PEREIRA et al. 2013) e humanos (MARQUES et al. 2006), porém a maioria dos casos corresponde a lesões cutâneas em equinos (SANTURIO et al. 2006).

As terapias utilizadas para o tratamento da pitiose apresentam resultados variados e podem incluir o emprego da imunoterapia, cirurgia e combinação de antimicrobianos. Diversos estudos de suscetibilidade *in vitro* com *P. insidiosum* utilizando diferentes classes de fármacos, incluído antifúngicos, tem demonstrado resultados variados (FONSECA et al., 2014). Todavia, observa-se que as infecções clínicas causadas por *P. insidiosum* pobremente respondem a esses métodos terapêuticos (GAASTRA et al. 2010). Diante dessas dificuldades, a busca por novos compostos com atividade antimicrobiana frente a *P. insidiosum* são necessários para complementar os métodos terapêuticos da pitiose.

*Bacillus amyloliquefaciens* é uma bactéria gram-positiva, telúrica, não patogênica, capaz de produzir endósporos que lhe permitem sobreviver por longos períodos em condições adversas. A temperatura ideal para o crescimento celular é entre 30 e 40°C. Alguns estudos têm demonstrado que *B. amyloliquefaciens* produz substâncias ativas, entre elas iturina A, que apresenta atividade antimicrobiana sobre bactérias (BATISTA, 1993) e fungos fitopatogênicos (YOSHIDA et al., 2001; YU et al., 2002).

O objetivo deste trabalho é avaliar *in vitro* a inibição do crescimento micelial de *P. insidiosum* utilizando o extrato bruto de *B. amyloliquefaciens*.

### 2. METODOLOGIA

Para a realização dos testes *in vitro* foram utilizados oito isolados de *P. insidiosum* e um isolado de *B. amyloliquefaciens* pertencentes a micoteca do Laboratório de Micologia (UFPEL).

A técnica de suscetibilidade baseou-se no método de difusão em disco, com adaptações. *B. amyloliquefaciens* foi cultivado em frascos estéreis contendo 25 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), incubado a 37°C em agitação de 120

rpm/3 dias. A solução teste foi obtida por centrifugação da cultura a 2.500 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante total, uma alíquota de 15 $\mu$ L foi utilizada para impregnação dos discos de papel filtro previamente esterilizados.

O teste de suscetibilidade foi realizado em placas de Petri contendo meio agar levedura 0,1%. Discos de cultura de *P. insidiosum*, de aproximadamente 1cm de diâmetro, foram distribuídos na posição central de cada placa. Posteriormente, quatro discos impregnados com o sobrenadante de *B. amyloliquefaciens* foram dispostos em cruz, a uma distância de aproximadamente 2cm dos discos de cultura e 2cm dos bordos das placas. Os testes foram realizados em duplicata para cada isolado testado. As placas foram incubadas em estufa a 37°C/3 dias. A leitura levou em consideração a medida do halo de inibição e o resultado final foi expresso como a média do valor do halo de inibição em milímetros (mm).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão demonstrados os valores médios dos halos de inibição dos oito isolados de *P. insidiosum* avaliados. Considerando-se as médias de todos os isolados, observa-se que o valor médio que inibiu o crescimento micelial de *P. insidiosum in vitro* foi de 26,8 mm.

Tabela 1: Médias dos halos de inibição do crescimento de *P. insidiosum*

<i>P. insidiosum</i>	Médias das medidas (mm)
PI 02	22
PI 03	24,2
PI 04	26
PI 12	26,5
PI 16	30,6
PI 18	29,7
PI 19	29,1
PI 24	18,8
Valor médio	26,8

A síntese de substâncias naturais antimicrobianas por bactéria e fungos é conhecida há muito tempo. Em oomicetos e fungos, ANJIAH et al. (2003), demonstraram que bactérias do gênero *Pseudomonas*, provenientes de materiais clínicos e de solos, foram capazes de produzir metabólitos, como o cianeto de hidrogênio, que apresentou forte atividade antimicrobiana frente aos patógenos de plantas *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Similarmente, THONGSRI et al. (2012) mostraram a atividade antimicrobiana da pirrolnitrina oriunda de *Pseudomonas stutzeri* como o único composto conhecido com atividade anti- *Pythium*.

*B. amyloliquefaciens* produz substâncias com atividade antimicrobiana, assim como iturina A, capazes de inibir *Rhizoctonia solani* e outros fungos fitopatógenos (YOSHIDA et al., 2001; YU et al., 2002). Todavia, estudos com espécies de *Pythium* são escassos. Os resultados preliminares do presente estudo evidenciam o potencial antimicrobiano desta cepa de *B. amyloliquefaciens* sobre *P. insidiosum*.

## 4. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares deste estudo nos permitem concluir que a bactéria *B. amyloliquefaciens* inibe o crescimento micelial de *P. insidiosum*. No entanto, estudos necessitam ser desenvolvidos para determinar as substâncias ativas com potencial antimicrobiano, assim como também avaliar um número maior de isolados de *P. insidiosum*. Pesquisas que objetivem o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos são importantes para incrementar alternativas ao tratamento da pitiose em animais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJIAIAH, V.; CORNELIS, P.; KOEDAM, N. Effect of genotype and root colonization in biological control of fusarium wilts in pigeonpea and chickpea by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. **Can J Microbiol**, 49(2):85-91, 2003.

BATISTA, C.R.V. Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and on antagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens*, University of Strathclyde, Glasgow, 1993.

FONSECA, A. O. S.; PEREIRA, D. I.B.; MAIA FILHO, F.S.; OSÓRIO, L.G.; MARONEZE, B. P.; VALENTE, J. S. S.; PPTTER, L.; MEIRELES, M. C. A. In vitro susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2014.

GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A; DE COCK, A. W. A. M.; EXEL, T. K.; PEGGE, R. B. G.; SCHEURWATER, J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.1-16, 2010.

GRECO, F. B.; SCHILD, A. L.; QUEVEDO, P.; ASSIS-BRASIL, N. D.; KOMMERS, G. D., MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SORES, M.P. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.11, p.938-942, 2009.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; PEREIRA, D. I. B.; HINNAH, F. L.; COELHO, A. C. B.; SCHILD, A. L. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.9, p.856-868, 2012.

MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; CAMARGO, R. M. P.; MARQUES, M. E. A. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n.5, p.483-485, 2006.

PEREIRA, D. I. B.; BOTTON, S. A.; AZEVEDO, M. I.; MOTTA, M. A. A.; LOBO, R. R.; SOARES, M. P.; FONSECA, A. O.; JESUS, F. P.K.; ELVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Myopathologia**, v.176, n.3-4, p.309-315, 2013.

SANTURIO, J. M.; ARGENTA, J. S.; SCHWENDLER, S. E.; CAVALHEIRO, A. S.; PEREIRA, D. I. B.; ALVES, S. H.; DUTRA, V.; SILVA, M. C.; ARRUDA, L. P.;

NAKAZATO, L.; COLODEL, E. M. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**, v.163, n.9, p.2176-7, 2008.

SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; PEREIRA, D. B.; ARGENTA, J.S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006.

THONGSRI Y. , AROMDEE C., YENJAI C., KANOKMEDHAKUL S., CHAIPRASERT A., HAMAL P., PRARIYACHATIGUL C., **Detection of diketopiperazine and pyrrolnitrin, compounds with anti-*Pythium insidiosum* activity, in a *Pseudomonas stutzeri* environmental strain**, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2012.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from Mulberry leaves. **Biological Control**, Japão, 2001.

YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*, Soil Biology & Biochemistry, USA, 2002.