

## AVALIAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DE MACROFUNGOS NO CULTIVO *IN VITRO* DE *PYTHIUM INSIDIOSUM*

LUÍZE GARCIA DE MELO<sup>1</sup>; CAROLINE QUINTANA BRAGA<sup>2</sup>; DIULIANI FONSECA MORALES<sup>2</sup>; LISIANE VOLCÃO<sup>2</sup>; EDUARDO BERNARDI<sup>2</sup>; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [luizegarmel@gmail.com](mailto:luizegarmel@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [carolineqbraga@hotmail.com](mailto:carolineqbraga@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [diulimoralesfonseca@gmail.com](mailto:diulimoralesfonseca@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [lisivolcao@hotmail.com](mailto:lisivolcao@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [edu.bernardi@hotmail.com](mailto:edu.bernardi@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [danielabrayer@gmail.com](mailto:danielabrayer@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

*Pythium* spp. é um oomiceto, classificado taxonomicamente na Família Pythiaceae, Ordem Pythiales, Classe Oomycetes e Reino Straminipila (SANTURIO *et al.*, 2006; KIRK *et al.*, 2018). O gênero apresenta organismos de reprodução assexuada, caracterizada pela produção de zoósporos biflagelados (SANTURIO *et al.*, 2004). As espécies sapróbias podem crescer no solo, locais alagados e na matéria orgânica em decomposição, ou podem ser parasitas de animais e plantas (BHALERAO *et al.*, 2020; RAI *et al.*; 2020; VALENTE, 2020). Contudo, o desenvolvimento do oomiceto depende de fatores abióticos no ecossistema, como áreas alagadas e temperatura (ZAMBRANO *et al.*, 2017; ZARO *et al.*, 2018).

*Pythium insidiosum* é um agente etiológico da pitiose, enfermidade que atinge principalmente o tecido subcutâneo de mamíferos que habitam regiões tropicais, subtropicais e temperadas (LEAL *et al.*, 2001; SANTURIO *et al.*, 2006; GAASTRA *et al.*, 2010; KRAJAEJUN *et al.*, 2018; RAI *et al.*, 2020). Os equinos são os mais atingidos no Brasil, considerado país endêmico da doença (SANTURIO *et al.*, 2006).

Extratos de basidiomicetos são conhecidos por apresentar compostos bioativos com atividades antimicrobianas e antioxidantes (VOLCÃO *et al.*, 2019), além de possuir alto teor de proteína, fonte de fibra, vitaminas e baixo teor de lipídios (CHANG & MILES, 1989; MANZI *et al.*, 1999; SAPATA, 2005), sendo uma ótima fonte de nutrientes. Nesse sentido, extratos de basidiomicetos podem possuir propriedades potenciais para meios de cultivo de micro-organismos.

O presente estudo avaliou a ação de extratos aquosos de macrofungos como fatores de crescimento para o cultivo *in vitro* de *P. insidiosum*.

### 2. METODOLOGIA

Para a realização dos testes *in vitro* foram utilizados cinco isolados de *P. insidiosum* (P01, P03, P37, P08, CBS7) pertencentes a micoteca do Laboratório de Micologia (Labmico) UFPEL e três extratos aquosos de basidiomicetos: *Auricularia auricula*, *Lactarius deliciosus* e *Laccaria laccata*.

As três espécies de cogumelos silvestres foram coletadas no Horto Botânico Irmão Teodoro Luís (31°48'57"S 52°25'57"O), um bosque com predominância de *Pinus* spp. em frente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (31°48'8.69"S 52°24'51.83"O), Campus Capão do Leão, Universidade Federal de



Pelotas – UFPel/RS; e em uma área localizada no Bairro Vila Assumpção (31°45'52.63"S 52°15'35.35"O), Pelotas/RS.

As espécies foram identificadas de acordo com características macro e micro morfológicas e separadas em amostras representativas. Posteriormente foram transferidas para estufa a 50°C por um período de 96 horas para desidratação dos basidiocarpos e armazenadas em recipientes hermeticamente fechados, protegidos da luz e umidade até a produção dos extratos (VOLCÃO *et al.*, 2019).

Após a desidratação, os cogumelos silvestres foram triturados e utilizados para produção e obtenção dos extratos aquosos. O pó obtido da Trituração foi diluído em água destilada (AD), na concentração de 50g de pó para 100 mL de AD. Em seguida as soluções foram incubadas em banho de ultrassom (SB-5200 DTDN Ultrasonic Cleaner) a uma temperatura de 40°C por 120 minutos para a extração (ROESLER *et al.*, 2007). As suspensões foram filtradas a vácuo, em papel filtro Whatman® nº1, e armazenadas em geladeira a 4°C até o momento dos testes.

O teste de crescimento de *P. insidiosum* foi realizado em placas de Petri contendo ágar levedura (AL) 0,1%. Foram utilizadas placas controle contendo apenas AL 0,1% e placas tratamento contendo 25 mL de AL 0,1% acrescido de 1% (250µL por placa) do extrato aquoso de cada cogumelo (*A. auricula*, *L. deliciosus* e *L. laccata*). O extrato foi distribuído sobre a superfície das placas com AL 0,1% com o auxílio de um bastão de vidro. Posteriormente, discos de cultura micelial (10 mm) de *P. insidiosum*, foram distribuídos na posição central de cada placa. As placas foram incubadas em estufa a 37°C/72 horas. A leitura das placas foi feita através de marcação do crescimento micelial a cada 24 horas e levou em consideração a medida do crescimento radial das hifas de *P. insidiosum* durante o tempo. As duplicatas representaram uma unidade experimental, e o resultado foi expresso como a média do valor de crescimento das hifas em milímetros (mm). Os testes foram realizados em duplicata para cada isolado testado.

Para interpretação dos dados realizou-se análise de variância (Anova) no Software Rstudio, considerando a variável dependente o crescimento das hifas como resposta para verificar a diferença entre os tratamentos, e variável independente os meios de cultura com extratos e o grupo controle.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de crescimento micelial de *P. insidiosum* nos meios suplementados com extratos aquosos de cogumelos silvestres estão demonstrados na Tabela 1 e Figura 1. Os resultados mostram que a média de crescimento micelial do oomiceto no meio de cultura suplementado com extrato aquoso de *L. laccata* foi superior aos meios suplementados com os demais extratos e ao meio controle (AL). Embora os resultados da ANOVA não tenham mostrado diferença entre os tratamentos ( $p>0,05$ ), observou-se que as medianas do crescimento micelial de *P. insidiosum* nos meios de cultura suplementado com os extratos aquosos de *A. auricula*, *L. deliciosus* e *L. laccata* (tratamentos) foram superiores ao controle (AL) (Figura1).

O extrato de levedura (AL) constituiu-se num autolisado de células de leveduras, amplamente utilizado na preparação de meios de cultura microbiológicos para bactérias e fungos, pois fornece vitaminas, nitrogênio, aminoácidos e carbono (NEOGEN, 2011). Neste meio de cultura, *P. insidiosum* apresenta ótimo crescimento micelial, sendo o meio de eleição para o isolamento

e manutenção deste oomiceto em cultivo laboratorial. Considerando a constituição nutricional dos cogumelos que apresenta alto teor de aminoácidos, fibra, vitaminas e baixo teor de lipídios (CHANG & MILES, 1989; MANZI *et al.*, 1999; SAPATA, 2005), constata-se que os extratos aquosos dos macrofungos utilizados neste estudo para suplementação dos meios de cultura tratamento, não apresentam grandes diferenças nutricionais em relação a composição do meio de cultura agar levedura utilizado como controle. Desta forma, outros experimentos empregando um meio de cultura controle diferente são necessários para avaliar a função dos extratos de cogumelos como fatores de crescimento de *P. insidiosum*.

Tabela 1. Média do crescimento micelial (mm) de *P. insidiosum* em resposta aos diferentes tratamentos

	AL <sup>(1)</sup>	A.a. EAQ <sup>(2)</sup>	L.d. EAQ <sup>(3)</sup>	L.I. EAQ <sup>(4)</sup>
CBS7	58,62	60,58	62,49	61,04
P01	71,54	85,12	85,99	86,99
P03	70,54	0,00	78,95	80,54
P08	79,08	76,37	73,83	86,00
P37	77,08	77,87	0,00	86,16
<b>Média (mm)</b>	<b>71,372a</b>	<b>59,988a</b>	<b>60,252a</b>	<b>80,146a</b>

<sup>(1)</sup>AL (Ágar levedura 0,1%), <sup>(2)</sup>A.a. EAQ (Extrato aquoso de *Auricularia auricula*), <sup>(3)</sup>L.d. EAQ (Extrato aquoso de *Lactarius deliciosus*), <sup>(4)</sup>L. I. EAQ (Extrato aquoso de *Laccaria laccata*). Médias seguidas pelas mesmas letras, na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste Anova ( $p>0,05$ ).

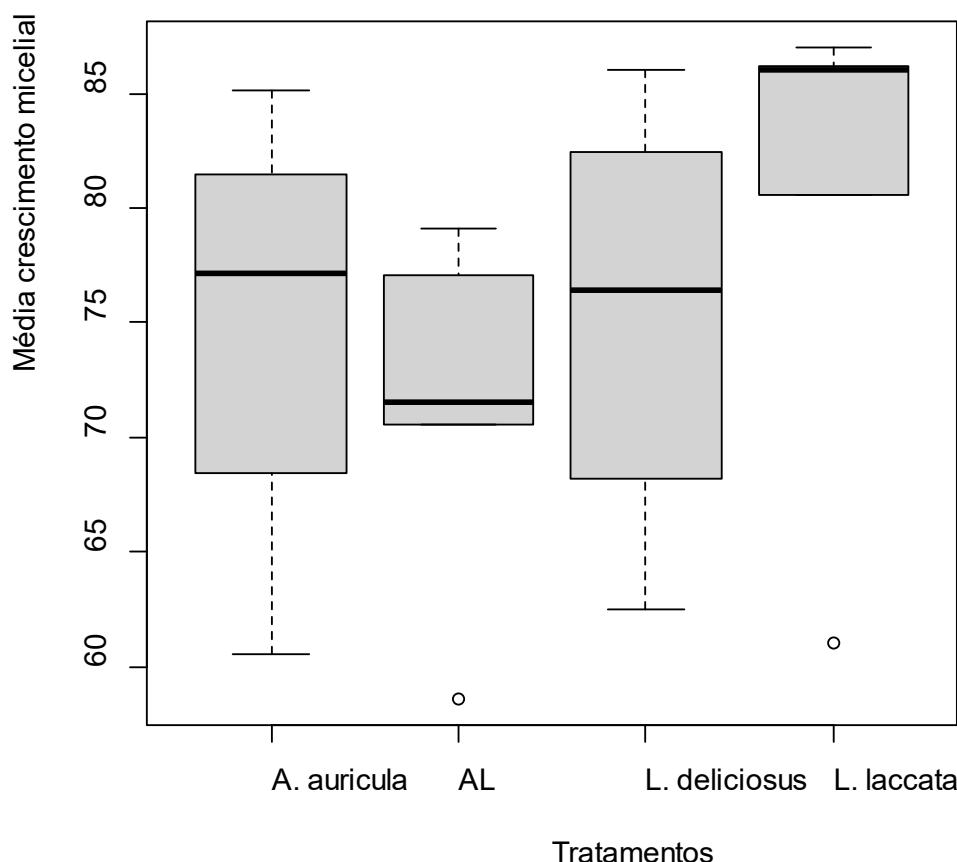


Figura 1. Média de crescimento micelial de *P. insidiosum* em resposta aos diferentes tratamentos.

## 4. CONCLUSÕES

Os extratos aquosos dos macrofungos *Auricularia auricula*, *Lactarius deliciosus* e *Laccaria laccata* incluídos ao meio de cultura incrementam o crescimento *in vitro* de *P. insidiosum*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANG, S.T.; MILES, P.G. Edible mushrooms and their cultivation. **CRC Press Inc.**, 1989.

MANZI, P. et al. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, Roma, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

SAPATA, M.R.L. Valorização de resíduos agrícolas: produção de cogumelos do gênero *Pleurotus*. 2005. 50f. Relatório (Final de Projeto) - Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Estação Agronômica Nacional, Oeiras, 2005.

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

SANTURIO, J. M. *Pythium insidiosum*: avaliação de imunoterápico para eqüinos, utilizando-se coelhos como modelo experimental, Porto alegre, 2004. 71f.

KIRK, P. M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 10th ed. **CAB International, Wallingford**, 2018.

RAI, M.; ABD-EL-SALAM, K. A.; INGLE, A. P.; *Pythium: Diagnosis, Diseases and Management*. 2020. 1 ed. ISBN:0367259419. **CRC Press**. Management of *Pythium* spp. by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. BHALERAO, S. R.; GUND, P. R.; BANSOD, S. D.; RAI, M. p. 2085.

VALENTE J.S.S, BRAGA, C.Q.; BRASIL, C.L.; BAPTISTA, C.T.; REIS, G.F.; PANAGIO, L.A.; NAKAZATO, G.; HÜBNER, S.O.; SOARES, M.P.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v.57, n.7, p.858–863, 2019.

LEAL, A. T.; LEAL, A. B. M.; FLORES, E. F.; & SANTURIO, J. M. Pitiose. **Ciência Rural**, v. 31, n.4, p. 735-743, 2001.

KRAJAEJUN, T., RUJIRAWAT, T., KANPANLEUK, T., SANTANIRAND, P., LOHNOO, T., YINGYONG, W. &PATUMCHAROENPOL, P. Biochemical and genetic analyses of the oomycete *Pythium insidiosum* provide new insights into clinical identification and urease-based evolution of metabolism-related traits. **PeerJ**, v. 6, p. e4821, 2018.

GAASTRA, W., LIPMAN, L. J., DE COCK, A. W., EXEL, T. K., PEGGE, R. B., SCHEURWATER, J., ... & MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary microbiology**, v.146 n.1-2, p. 1-16, 2010.

VOLCÃO, L. M.; HALICKI, P. B.; BILIBIO, D.; RAMOS, D.F.; BERNARDI, E.; DA SILVA, F. M. R. Biological activity of aqueous extracts of Southern Brazilian mushrooms. **International Journal of Environmental Health Research**, Brasil.p.1369-1619, 2019.

NEOGEN Corporation. EXTRATO LEVEDURA – YEAST EXTRACT. PI 7184, **Rev. 3**, maio 2011.