

**Avaliação da atividade antimicrobiana de *Clonastachys rosea* WLB18 frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* ESBL**

**Antimicrobial activity of *Clonastachys rosea* WLB18 against strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* ESBL**

DOI: 10.34188/bjaerv6n3-076

Recebimento dos originais: 05/05/2023

Aceitação para publicação: 30/06/2023

**Walter Oliva Pinto Filho Segundo**

Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia pelo Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Rede BIONORTE

Universidade: Universidade Estadual do Amazonas – UEA

Local de trabalho: Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas - Dra. Rosemary Costa Pinto - FVS-RCP/AM

Endereço: Av. Torquato Tapajós, 4.010 - Colônia Santo Antônio, Manaus - AM, 69093-018

E-mail: waltsegundo@gmail.com

**Rildo Mendes Lima**

Mestre em Ciências Farmacêuticas

Universidade: Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Local de trabalho: Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amazonas – LACEN/AM

Endereço: Rua Emílio Moreira, 528 - Centro, Manaus - AM, 69020-040

E-mail: rildoml@hotmail.com

**Luciana Aires de Oliveira**

Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia pelo Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Rede BIONORTE

Universidade: Universidade Estadual do Amazonas – UEA

Local de trabalho: Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT/HDV

Endereço: Av. Pedro Teixeira, s/n - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000

E-mail: airesluciana01@gmail.com

**Ana Cláudia Alves Cortez**

Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia pelo Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Rede BIONORTE

Universidade: Universidade Estadual do Amazonas – UEA

Local de trabalho: Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Endereço: Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis, Manaus - AM, 69067-375

E-mail: accortez@inpa.gov.br

**Érica Simplício de Souza**

Doutora em Biotecnologia Industrial

Universidade: Faculdade de Engenharia Química de Lorena – EEL/USP

Local de trabalho: Escola Superior de Tecnologia – EST, Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Endereço: Av. Darcy Vargas, 1.200 - Parque Dez de Novembro, Manaus - AM, 69050-020

E-mail: ericasimpliciosouza@yahoo.com.br

**João Vicente Braga de Souza**

Titulação: Doutor em Biotecnologia Industrial

Universidade: Faculdade de Engenharia Química de Lorena – EEL/USP

Local de trabalho: Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia –  
INPA

Endereço: Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis, Manaus - AM, 69067-375

E-mail: joavcentebragasouza@yahoo.com.br

**RESUMO**

Antibióticos são compostos produzidos por bactérias e fungos que inibem o crescimento de outros microorganismos. Entre os fungos, os Ascomycota destacam-se como um dos principais organismos produtores de antibióticos e um dos grupos mais diversos. *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo comumente encontrado na microbiota intestinal de seres humanos e animais de sangue quente, associado a várias infecções clínicas. O uso indevido crescente de antibióticos levou ao surgimento de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos, incluindo cepas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de *Clonostachys rosea* WL8B19 (Ascomycota) contra cepas patogênicas de *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ESBL. O isolado fúngico *Clonostachys rosea* WL5B18 foi obtido a partir de amostras de água em Manaus, Brasil. Extratos de cultura foram preparados usando bioprocessos submersos, e a atividade antimicrobiana foi avaliada por difusão em ágar e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O isolado fúngico foi identificado como *Clonostachys rosea* WL8B18. Ensaios antimicrobianos revelaram que o extrato bruto de *C. rosea* WL8B18 apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922, enquanto o extrato de acetato de etila mostrou zonas de inibição para ambas as cepas de *E. coli*. O mecanismo de ação é atribuído à degradação enzimática da parede celular e à produção de metabólitos secundários com propriedades antibióticas. O extrato de acetato de etila apresentou uma CIM de 400 µg/mL, sugerindo inibição potente. Os extratos de *Clonostachys rosea* WL5B18 demonstram potencial para aplicações farmacêuticas. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar a citotoxicidade e os perfis de composição química.

**Palavras-chave:** antimicrobianos, ascomycota, bactérias, *Escherichia coli***ABSTRACT**

Antibiotics are compounds produced by bacteria and fungi that inhibit the growth of other microorganisms. Among fungi, Ascomycota stand out as one of the main antibiotic-producing organisms and one of the most diverse groups. *Escherichia coli* is a Gram-negative bacillus commonly found in the intestinal microbiota of humans and warm-blooded animals, associated with various clinical infections. The increasing misuse of antibiotics has led to the emergence of antibiotic-resistant strains of *E. coli*, including extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of *Clonostachys rosea* WL8B19 (Ascomycota) against pathogenic strains of *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* ESBL. The fungal isolate *Clonostachys rosea* WL5B18 was obtained from water samples in Manaus, Brazil. Culture extracts were prepared using submerged bioprocesses, and antimicrobial activity was assessed through agar diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) determination. The fungal isolate was identified as *Clonostachys rosea* WL8B18. Antimicrobial assays revealed that the crude extract of *C. rosea* WL8B18 exhibited antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 25922, while the ethyl acetate extract showed inhibition zones for both *E. coli* strains. The mechanism of action is attributed to enzymatic degradation of the cell wall and production of secondary metabolites with antibiotic properties. The ethyl acetate extract exhibited a MIC of 400 µg/mL, suggesting potent inhibition. *Clonostachys rosea* WL5B18 extracts demonstrate potential for pharmaceutical applications. However, further studies are necessary to evaluate cytotoxicity and chemical composition profiles.

**Keywords:** antimicrobials, Ascomycota, bacteria, *Escherichia coli*.

## 1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são compostos que podem ser produzidos por bactérias e fungos que inibem o crescimento de outros microorganismos. Dentre os fungos, os Ascomycota destacam-se como um dos principais organismos produtores de antibióticos e um dos grupo mais diversificado [1]. Segundo Lal et al., [2] os Ascomycota são considerados os produtores mais frequentes de produtos antimicrobianos com cerca de 6.400 substâncias conhecidas.

*Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo da família das Enterobacteriaceae mais isolado e é conhecido por habitar a microbiota intestinal de seres humanos e animais de sangue quente. As células são tipicamente em forma de bastonete medindo de 1,0-2,0 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro e são associadas a uma variedade de infecções clínicas como infecções gastrointestinais, infecções do trato urinário (ITUs) e bacteremias [3]. Para o tratamento dessas patologias os antimicrobianos são utilizados como drogas de primeira escolha.

O uso crescente de antimicrobianos de maneira excessiva e indiscriminada por parte da população, na agricultura e agropecuária tem sido apontados causadores de pressão seletiva em cepas de *E. coli*, contribuindo para o surgimento de linhagens resistentes por transferência de plasmídios e transposons [4]. Alguns isolados desta espécie desenvolveram padrões de resistência ao tratamento com antibióticos, sendo capazes de produzir enzimas chamadas “*β-lactamase de espectro estendido*” (ESBL), que hidrolizam anel β-lactâmicos dos antibióticos mais conhecidos como as penicilinas e as cefalosporinas, se tornando um grave problema de saúde pública [5,6].

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antimicrobiana do isolado *Clonostachys rosea* WL8B19 (Ascomycota) frente a cepas patogênicas de *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ESBL.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção do isolado Clonostachys rosea WL5B18*

Foi utilizado nesse estudo o isolado fúngico *Clonostachys rosea* WL5B18 obtido de amostras de água realizadas no igarapé do Mindú Manaus - Amazonas - Brasil (3°04'28.4 "S 59°58'57,7"W) [7]. Para o isolamento, 0,1 µL de água foi semeada por superfície em duplicata em placas de Petri contendo meio ágar Sabourad (peptona 10g/L, dextrose 20g/L, ágar 20 g/L e cloranfenicol 250 mg/L) e incubados a 25 °C e observados de 7 a 15 dias. A espécie foi identificada pelas características macro/micro morfológicas [8] e pelo sequenciamento da região espaço interno transcrito (ITS) do DNAr. O DNA fúngico foi extraído do micélio pelo método fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico [9]. Reações de PCR foram realizadas utilizando os primers ITS1(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [10]. O

sequenciamento foi realizado no Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. As sequências obtidas foram analisadas pelo BioEdit Sequence Alignment Editor e comparadas com as do banco de dados GenBank.

#### *Obtenção dos extratos de cultura e avaliação da atividade antimicrobiana*

Foram realizados bioprocessos submersos onde  $1 \times 10^4$  esporos fúngicos foram inoculados em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio BDA (ágar + batata + dextrose) e incubados a  $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$  por 14 dias em condições estáticas. Para obtenção dos filtrados de cultura foi realizada a separação da biomassa dos fungos em uma partição líquida-líquida, pelo métodos de extração com os solventes hexano (HEX) e acetato de etila (AcOEt) – (SYNTH®) 1:1v/v e filtrados em papel Whatman n. °4 e armazenados a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em ágar [11] e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo [12] com modificações.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As sequências obtidas a partir da região ITS do rDNA foram analisadas por bioinformática e comparadas com as do banco de dados GenBank e exibiram 97% de similaridade com cepas conhecidas de *Clonostachys rosea* (Acesso MT55748.8). Portanto, o isolado do presente trabalho foi designado *Clonostachys rosea* WL8B18.

Nos ensaios antimicrobianos, o extrato bruto (EB) de *C. rosea* WL8B18 apresentou atividade antimicrobiana apenas na cepa sensível de *E. coli* ATCC 25922 e nenhuma atividade para a cepa de *E. coli* ESBL. O extrato de acetato de etila (AcOEt) mostrou halos de inibição para *E. coli* ATCC 25922 ( $19,8 \pm 0,3$ ) e *E. coli* ESBL ( $4 \pm 1,4$ ). Neste estudo, os extratos hexânicos (HEX) não mostraram nenhuma atividade frente as cepas testadas (Tabela 1). O mecanismo de ação por *C. rosea* contra patógenos é atribuído principalmente à secreção de enzimas que degradam a parede celular e à produção de metabólitos secundários com propriedades antibióticas [13].

O extrato de AcOEt foi selecionado para determinação da CIM apresentando valor de inibição de  $400 \text{ } \mu\text{g/mL}$ . Holetz et al., [14] descreve que padrões de valores de CIM inferiores a  $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$  como potente inibidor, valores de  $100\text{-}500 \text{ } \mu\text{g/mL}$  como inibidores moderados e  $500\text{-}1000 \text{ } \mu\text{g/mL}$  considerados inibidores fracos e acima de  $1000 \text{ } \mu\text{g/mL}$  são considerados sem atividade. Substâncias como quitanases, glucanases, terpenóides e trioxipiperazinas produzidas por *C. rosea* são alguns metabólitos secundários já relatados com atividade frente a microorganismos, incluindo bactérias [15].

Tabela 1 - Atividade antibacteriana demonstrando halos de inibição dos caldos e extratos testados de Hexano (Hex) e Acetato de etila (AcOEt) e Concentração Inibitória Mínima (CIM µg/mL) do extrato de AcOEt do isolado de *C. rosea* WL8B18.

Isolado	Halo de inibição (mm)						CIM do extrato de AcOEt	
	Cepas bacterianas						<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ESBL
	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>E. coli</i> ESBL				
	EB	Hex	AcOEt	EB	Hex	AcOEt	AcOEt (µg/mL)	
<i>C. rosea</i> WL8B18	13,9 ± 01	-	19,8±0,3	-	-	4±1,4	400 µg/mL <sup>a</sup>	400 µg/mL <sup>a</sup>
Concentração	100 µg/ml			100 µg/ml			25 µg/mL	25 µg/mL
Tempo	24h							

Legenda: Controle + Amoxicilina (25 µg/mL); Controle – DMSO 10%; Atividade bacteriostática – a.

#### 4 CONCLUSÃO

Os extratos obtidos a partir de *Clonostachys rosea* WL5B18 sugerem que esse isolado pode ser uma fonte promissora de substâncias com interesse farmacêutico. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para a atividade citotóxica e avaliação do perfil dos seus constituintes químicos.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento da pesquisa no âmbito da chamada CT&I ÁREAS PRIORITÁRIAS - Edital Nº 010/2021.

## REFERÊNCIAS

- [1] Ho W, Pui C, Hyde K. Induction of antibiotic production of freshwater fungi using mixture fermentation. **Fungal Divers** 2003;12:45–51.
- [2] Lal M, Tia N, Dutta D, MD D. Bioactive metabolites obtained from endophytes bacterial isolate. **Int J Innov Res Sci Eng Technol** 2016;5.
- [3] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic Escherichia coli. **Nat Rev Microbiol** 2004;2:123–40.
- [4] Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. **Curr Opin Microbiol** 2019;51:72–80.
- [5] Pitout J. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. **Expert Rev Anti Infect Ther** 2012;10:1165–76.
- [6] Mitchel E, Mark SP, Anthony R. Infecções Gram-negativas da corrente sanguínea e sepse: fatores de risco, ferramentas de triagem e vigilância. **Bol Médico Britânico** 2019.
- [7] APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. APHA Washingt DC, USA 2005;21.
- [8] SEIFERT K, MORGAN-JONES G, GAMS W, KENDRICK B. The genera of hyphomycetes. **Persoonia** 2011;27:119–29.
- [9] Ferrer C, Coloms F, Frases S, Mullet E, Abad JL, Alió JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **J Clin Microbiol** 2001;39:2873–9.
- [10] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protoc A Guid to Methods Appl. San Diego: **Academic Press** 1990:315–22.
- [11] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. **CLSI document M02-A11**. Wayne, PA. CLSI Doc M02-A11 2012.
- [12] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. **CLSI document M7A6**. Wayne, PA. Clin Lab Stand Inst 2003.
- [13] Fatema U, Broberg A, Jensen DF, Karlsson M, Dubey M. Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. **Sci Rep** 2018;1:1–17.
- [14] Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez A, Nakamura C, Prado B. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Em Inst Oswaldo Cruz** 2002;97:1027–1031.
- [15] Borel, Filipe Constantino. **Metabólitos de *Clonostachys rosea* inibidores a *Botrytis cinerea*, sobrevivência do antagonista e efeito sobre o microbioma foliar de tomateiro**. 2018. Tese. (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Câmpus Viçosa, Minas Gerais, 2018.