

# ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Amanda Lopes Lago<sup>1</sup>, Roseli Aparecida de Mello<sup>2</sup>.

1. Acadêmica do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

2. Orientadora e Coordenadora do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

---

**RESUMO:** Este estudo teve como objetivo analisar o efeito inibidor de fungos endofíticos provenientes de folhas saudáveis de mamona (*Ricinus communis L.*), sob a ação de diversas bactérias nocivas ao ser humano, tais como *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, e *Enterobacter aerogenes*. Estes micro-organismos (fungos endofíticos) foram devidamente isolados, cultivados, identificados e testados de acordo com a metodologia descrita no artigo, de forma que pudessem revelar seu potencial antibacteriano esperado.

**Palavras-chave:** fungos endofíticos; mamona; potencial antibacteriano.

---

**ABSTRACT:** This study aimed to analyze the inhibitory effect of endophytic fungi from healthy leaves of mammon (*Ricinus communis L.*) on the action of various bacteria harmful to humans, such as *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, e *Enterobacter aerogenes*. These microorganisms (endophytes) were effectively isolated, cultured, identified and tested in accordance with the methodology described in the article, so that they could reveal their potential antibacterial expected.

**Key words:** endophytic fungi; mammon; antibacterial potential.

---

## INTRODUÇÃO

O Brasil oferece cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente na floresta Amazônica, a maior do planeta e fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus micro-organismos e suas interações com outros seres.

A mamona (*Ricinus communis L.*), pertencente à família Euphorbiaceae, é uma planta oleaginosa, que pode ser encontrada em diversas regiões do Brasil. Destaca-se por sua importância econômica e social com inúmeras aplicações industriais, tais como: fertilizantes, fibras sintéticas, lubrificantes, próteses, dentre outras.

Por ser uma planta que possui grande quantidade de óleo, a mamona vem sendo considerada uma fonte alternativa para a substituição dos produtos originários do petróleo, tendo uma atenção especial voltada atualmente para o Biodiesel.

Como toda planta, a mamona também sofre a ação de doenças e predadores que acarretam em perda na produtividade dos frutos e dos cultivares. A grande dificuldade da agricultura é aumentar a produção das culturas sem a utilização do uso abusivo de agrotóxicos que causam grandes prejuízos ao meio ambiente.

Uma das alternativas é o uso de micro-organismos endofíticos como biocontroladores, favorecendo o crescimento da planta e o controle dos organismos fitopatogênicos (CARROLL 1986, PETRINI *et al.*, 1991, HALLMANN *et al.*, 1997).

Recentemente, o interesse pela utilização de micro-organismos endofíticos como ferramentas de biocontrole de fitopatógenos em diferentes agroecossistemas tem aumentado significativamente, a fim de suprir a necessidade de se buscar alternativas viáveis ao uso de agroquímicos e dos problemas decorrentes de sua utilização indiscriminada, como a contaminação ambiental dos alimentos e dos consumidores, o aparecimento de populações resistentes de patógenos e diminuição de populações de organismos benéficos ou não-alvos (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003; SILVA *et al.*, 2002).

Na literatura encontram-se algumas referências de estudos envolvendo micro-organismos endofíticos isolados de plantas medicinais, mas poucas utilizando fungos isolados de mamona com potencial antimicrobiano.

Para Siqueira (2008) a descoberta de novos antibióticos se faz necessária devido ao aparecimento de patógenos multirresistentes, bem como a evolução de novas doenças virais com a AIDS e as novas Gripes. Considerando que seis entre vinte novos medicamentos são de origem fúngica, micro-organismo endofíticos oferecem um potencial promissor para o desenvolvimento de novos produtos com ação antibacteriana, antifúngica, antitumoral dentre outras (STROBEL *et al.*, 2004; GUNATILAKA 2006).

Desta forma, justifica-se o interesse em isolar e identificar fungos endofíticos e testar sua capacidade de produção de metabólitos bioativos com potencial antimicrobiano.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os procedimentos foram realizados no laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná.

### Coleta do material botânico

O material botânico foi coletado de diferentes locais da cidade de Curitiba, e em seguida foram processados num prazo máximo de 24 horas.

### Desinfecção das folhas

Após a coleta, as folhas foram lavadas abundantemente com água corrente e detergente neutro para retirar o excesso de epifíticos, matéria orgânica e resíduos sólidos. Antes do processo de desinfecção externa, os pecíolos foram vedados com parafina, a fim de se evitar que os agentes de desinfecção penetrassem por essa abertura, podendo assim alterar os resultados esperados do isolamento. Em seguida, em câmara asséptica, as folhas foram lavadas com água destilada esterilizada por duas vezes, e posteriormente o material foi imerso em álcool 70% por 1 minuto, em seguida em hipoclorito 2% por 5 minutos e, novamente, em álcool 70% por 1 minuto, para retirar o excesso de hipoclorito. Então o material foi lavado três vezes em água destilada estéril da qual se retirou 50 µL para fazer o controle da assepsia (SOUZA *et al.*, 2004).

### Inoculação

As folhas de mamona foram cortadas em pequenos fragmentos, e estes transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo Sabouraud (Merck KgaA, Germany), acrescido de clorofenicol (500 mg/L) para isolamento de fungos, e estas placas então foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C, por um período que variou de 5 a 14 dias.

### Isolamento

Acompanhou-se o crescimento das colônias fúngicas diariamente. À medida que surgiram novas colônias, estas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio Sabouraud inclinado, e cultivadas a temperatura ambiente  $28 \pm 2$  °C. Depois, foram armazenadas a 4°C, para a garantia de que houvesse a presença de apenas um exemplar na amostra que seria posteriormente identificada, com a finalidade de facilitar o estudo (PIMENTEL *et al.*, 2006).

### Microcultivo

A cultura fúngica que foi utilizada era recente e cultivada em meio sólido, em seguida foi transferido um bloco de meio Sabouraud com o auxílio de uma pinça estéril para uma lâmina contida dentro de uma placa de Petri, sob condições de assepsia; após foram retiradas

pequenas porções das colônias, que foram devidamente semeadas em toda a superfície deste bloco; esta lâmina foi sobreposta por uma lamínula, cobrindo o bloco, abaixo desta estrutura foram postas gazes com água destilada estéril (cerca de 2 ml), formando assim uma câmara úmida. Incubaram-se as placas a temperatura ambiente até a observação do crescimento da cultura; quando houve desenvolvimento satisfatório, retirou-se a lamínula do microcultivo, transferindo-a para uma nova lâmina contendo o corante lactofenol azul de algodão em quantidade suficiente para corar o material fúngico aderido na lamínula. (KONEMAN *et. al.*, 1997).

### Microscopia

Após a coloração, as lâminas do microcultivo foram analisadas em microscopia óptica para a identificação e caracterização dos fungos.

### Screening de atividade antibacteriana

Para que se pudesse observar se houve ação dos fungos endofíticos sob as bactérias, foi usada a metodologia descrita por Ichicawa *et. al.* (1971), a qual permite uma seleção rápida e qualitativa de micro-organismos bioativos. Cada fungo foi cultivado na superfície de Sabouraud em placa de Petri a 28°C por sete dias. Após este período, discos cortados da colônia foram transferidos para o meio de cultura Muller Hinton, previamente semeados com bactérias. As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 24 horas, para que posteriormente fosse feita sua leitura, verificando a presença ou não de halos de inibição.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

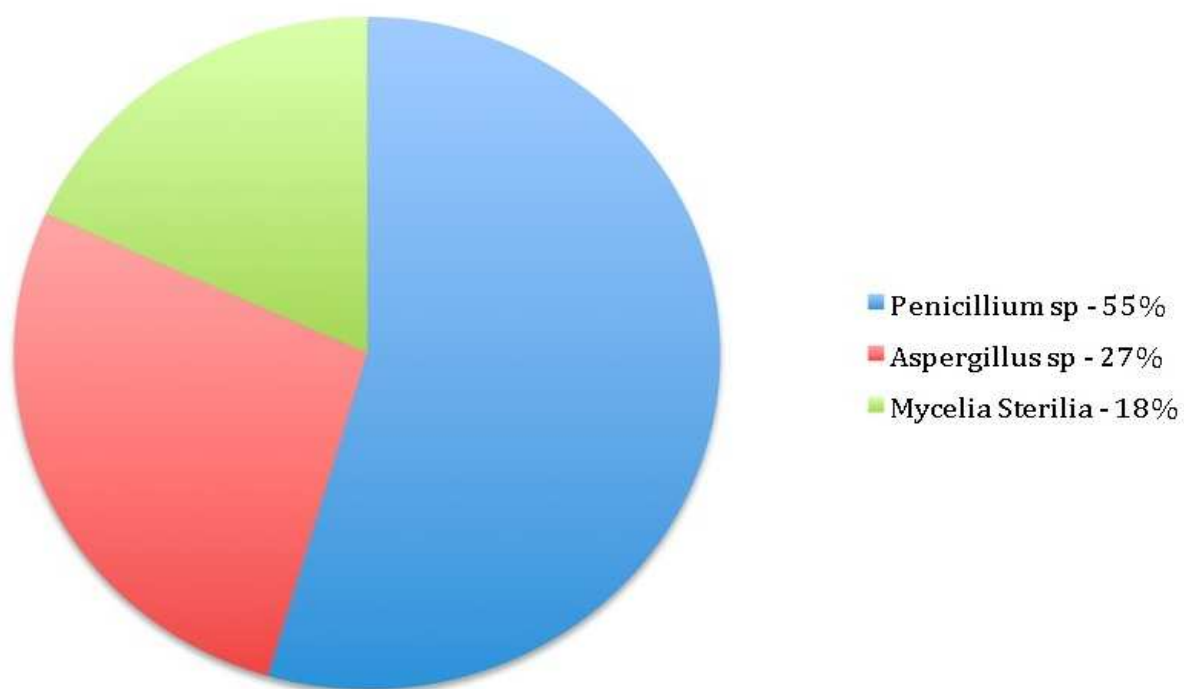
Os fungos endofíticos obtidos foram facilmente isolados das folhas da mamona, ocasionando um total de 11 colônias fúngicas independentes.

Entre os fungos isolados foram identificados os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, alguns fungos endofíticos não apresentaram estruturas de reprodução, dificultando assim sua identificação até o presente momento, estes foram denominados *Mycelia sterilia* (tabela 1), assim como nos estudo de Pimentel *et. al.* (2006), e Penna (2000), que também identificaram estes grupos de fungos, além de outros como *Acremonium*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Phyllosticta*, *Ascochyta*, *Xylaria*, *Nodulisporium*, *Cladosporium* e outros não identificados das famílias *Dematiaceae* e *Moniliaceae*. O fungo com maior incidência observada neste estudo foi do gênero *Penicillium* (gráfico 1).

**Tabela 1.** Identificação microscópica de fungos endofíticos de folhas de mamona.

<i>FUNGOS</i>	<i>GÊNERO</i>
1	<i>Penicillium sp</i>
2	<i>Aspergillus sp</i>
3	<i>Penicillium sp</i>
4	<i>Penicillium sp</i>
5	<i>Mycelia sterilia</i>
6	<i>Aspergillus sp</i>
7	<i>Mycelia sterilia</i>
8	<i>Aspergillus sp</i>
9	<i>Penicillium sp</i>
10	<i>Penicillium sp</i>
11	<i>Penicillium sp</i>

**Gráfico 1.** Identificação microscópica de fungos endofíticos de folhas de mamona.



Grande parte dos fungos apresenta baixa tolerância ou mostra-se pouco tolerante à radiação, o que poderia explicar a menor diversidade encontrada nas plantas cultivadas. Além disso, o ambiente em que vivem as plantas nativas está muito mais favorável à colonização, pois é um ambiente mais sombreado e úmido, o que pode aumentar o número e, conseqüentemente, a diversidade de fungos (MELO; AZEVEDO, 1998).

Neste trabalho, foi observada a ação antibacteriana desses fungos sob bactérias gram positivas e gram negativas tais como *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (gram positivas) e *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (gram negativas).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, são encontradas no solo, na água, frutas, vegetais, grãos, flores e árvores, e em animais, desde insetos ao homem. Habitam os intestinos do homem e animais, como membros da microbiota normal ou como agentes infecciosos. Os sítios comuns de colonização nos humanos são os tratos gastrintestinal, respiratório e genitourinário (QUINN *et. al.*, 1994; DRANCOURT *et. al.*, 2001).

Os *Enterococcus faecalis* são habitantes da microbiota do trato digestivo humano e de outros animais, apresentando baixa patogenicidade. No entanto, atualmente, são causas de infecções urinárias em pacientes internados em hospitais, comportando-se, muitas vezes, como agente oportunista em infecções hospitalares (HUYCKE *et. al.*, 1998).

*Staphylococcus aureus* é um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (LOWRY, 1998). Esta bactéria habita com freqüência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode facilmente contaminar as mãos do homem e penetrar no alimento, causando a intoxicação alimentar estafilocócica (MURRAY *et al.*, 2000).

Por fim, foi possível constatar que 50% das bactérias utilizadas, sendo estas *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, sofreram ação antibacteriana por todos os fungos endofíticos encontrados (tabela 2), o que torna significativo o interesse de se pesquisar ainda mais o potencial desses micro-organismos.

**Tabela 2.** Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de folhas de mamona.

	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Fungo 1	+	-	+	-
Fungo 2	+	-	+	-
Fungo 3	+	-	+	-
Fungo 4	+	-	+	-
Fungo 5	+	-	+	-
Fungo 6	+	-	+	-
Fungo 7	+	-	+	-
Fungo 8	+	-	+	-
Fungo 9	+	-	+	-
Fungo 10	+	-	+	-
Fungo 11	+	-	+	-

(+) positivo para ação antibacteriana.

## CONCLUSÃO

Este trabalho constata a presença de fungos endofíticos com ação antibacteriana provenientes de folhas de mamona (*Ricinus communis L.*), comprovando os relatos da literatura que foram aqui pontuados. Neste caso, foi observado o potencial de efeito inibidor desses fungos sob 50% das bactérias utilizadas, sendo estas *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, que são bactérias gram positivas patógenas ao ser humano, o que torna significativo o interesse de se pesquisar ainda mais o potencial desses micro-organismos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279 p. HIRASAWA, K.; UCHIMURA, K.; KASHIWA, M.; GRANT, W.; ITO, S.; KOBAYASHI, T.; HORIKOSHI, K. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 89, n. 2, p. 211-219, 2003.

CARROLL, G. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: **Microbiology of the Phylloplane**. Fokkema, N. J. and Van der Heavel, J. (eds). Cambridge University Press, London, UK. Pp 205-222, 1986.

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A.; ROUSSELIER, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 51: 925-932, 2001.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**. 69 (3): 509-526, 2006.

HALLMANN, J.; QUADT- HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 895-914, 1997.

HUYCKE MM, SAHM DF, GILMORE MS. **Multiple-drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future**. *Emerging Infectious Diseases* 4: 239-249, 1998.

ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin producing strains by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbial**, n<sup>o</sup> 16:218-224, 1971.

KONEMAN, E. W; ALLEN, S. D; JANDA, W. M; SCHRECKENBERGER, P. C; WINN JR, W. C. *Micology* In: chapter 19. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia New York: Lippincott, p. 983-1069, 1997.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**. V.339, p.520-532, 1998.



MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.1. 1998.

MURRAY, K. et al. Use of ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O 157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. **International Journal of Food Microbiology**. V. 57, p.147-158, 2000.

PENNA, E. B. da S. **Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. Por RAPD**. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leave. In: Andrews, J. & Hirano, S.S. Eds. **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, p. 179-197, 1991.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Fungos Endofíticos em Folhas de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.)**. FLORESTA, Curitiba, PR, v. 36, n. 1, jan./abr. 2006.

QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Mosby, 648p., 1994.

SILVA, K. L.;FILHO V.C. PLANTAS DO GÊNERO *Bauhinia*: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL FARMACOLÓGICO. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SIQUEIRA, V. M. **Fungos endofíticos de folha e caule de *Lippia sidoides* Cham. e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2008. 107 p. Dissertação de Mestrado em Biologia de Fungos. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2008.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA A. D. L., ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L. SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (AUBL.) RICH E *Strychnos cogens* BENTHAM. **ACTA AMAZONICA**, v. 34 n. 2 p. 185 – 195, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILHO, U.; HAEPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**.v. 2, n° 67, p. 257-268, 2004.