

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS DA MAMONA (*RICINUS COMMUNIS*) COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Mayara Gonçalves Motta¹, Roseli Aparecida de Mello²

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

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

Resumo: O presente trabalho tem como objetivo isolar e identificar fungos endofíticos de tecidos sadios presentes nas plantas da mamona (*Ricinnus Comunnis*). O uso de microrganismos endofíticos como biocontroladores favorece o crescimento da planta e o controle dos organismos fitopatogênicos. Os fungos endofíticos habitam mais frequentemente no interior dos tecidos aéreos de seus hospedeiros, recebendo nutrientes da planta e proporcionam resistência contra patógenos, causado por fatores bióticos e abióticos. Para o isolamento de fungos endofíticos foram utilizados cultivares de mamona sadios, com idades semelhantes transferidos para placas de Petri, contendo o meio de cultura e incubadas. Após o período de incubação, foi determinada a taxa de colonização e identificação dos isolados, feitas com base na morfologia de suas estruturas vegetativas e reprodutivas, de acordo com chaves de identificação encontradas na bibliografia específica.

Palavra-chave: Endofíticos, Isolamento, Caracterização.

Abstract: This work aims isolate and identify endophytic fungi of healthy tissues presents in plants of castor beans (*Ricinnus Comunnis*). The use of Endophytic microorganisms as biocontrol, favors the growth and control of pathogenic organisms. The Endophytic fungi live more frequent inside of air tissue their hosts, taking nutrients from the plant and provides resistance against pathogens caused by biotics and abiotics factors. To isolation of Endophytic fungi were used cultivars of healthy castor beans, with similar ages and transferred to Petri plates, containing the means of culture and incubated. After the incubation period, was determined the colonization rate and identification of isolates, basead on the morphology of their vegetatives and reproductive in accordance with identification Keys found in specific bibliography.

Keywords: Endophytics, Isolation and Characterization.

INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são micro-organismos resultantes da simbiose de metabólicos secundários extremamente benéficos para o hospedeiro, como toxinas, antibióticos e outros fármacos que atuam no crescimento dos órgãos, defesa e também podem ser isolados e utilizados pelo homem na indústria e na medicina.

Podem apresentar também relações neutras dependendo das condições ambientais e fisiológicas do hospedeiro.

Atualmente entre as espécies vegetais estudados, todos apresentaram micro-organismos endofíticos e conseqüentemente a possibilidade de encontrar novos endófitos e diferentes interações fungos-plantas.

Diante da grande diversidade de plantas existentes na Terra, somente algumas foram estudadas quanto à presença e biologia dos micror-organismos endofíticos nestas. Segundo estudos, os micro-organismos endofíticos vêm sendo encontrados com maior quantidade nas folhas mais velhas das plantas e estes podem apresentar inúmeros metabólicos com propriedades biológicas.

Pesquisas vêm sendo realizadas com a finalidade de obter substâncias bioativas deste grupo tão diversificado, sendo assim os fungos endofíticos poderão ser utilizados para o controle de pragas e doenças, enzimas bioativas, antagonistas microbianos, entre outras finalidades.

Entre as plantas de interesse da indústria da bioenergia e da academia científica é a *Ricinus communis L.*, uma planta da família Euforbiácea, e popularmente chamada de Mamona, Carrapateira, Rícino e Palma-de-Cristo. A Mamoneira é encontrada vegetando desde o Rio Grande do Sul até a Amazônia. Nas décadas de 70 e 80, a Mamona ganhou destaque pela possibilidade de utilização como substituto dos derivados do petróleo. Hoje é colocada como uma planta de excelente potencial, principalmente nas regiões carentes do Brasil. A sustentabilidade de um programa de biodiesel baseado na mamona exigirá fortalecimento substancial da base agrícola tecnológica, de suporte para o desenvolvimento e indicação de novas cultivares. A folha da mamona é desprezada na produção do biodiesel, porém, conforme estudos ela apresenta uma população microbiana diversificada formada por fitopatógenos, epifíticos e endofíticos, estes últimos conforme a literatura pode ter um potencial biotecnológico promissor, principalmente no que tange a produção de enzimas para purificação de bioconversão de lípases e outras moléculas de interesse industrial, medicinal, biotecnológico e econômico, por apresentar atividade antimicrobiana, antifúngica, parasitaria

ou ainda farmacologia e enzimática, endofíticos como definição são organismos que vivem em associação simbiótica com plantas e podem conferir benefícios as plantas e estes benefícios podem ser recíprocos (CARROLL 1986, PETRINI *et al.*, 1991, HALLMANN *et al.*, 1997, 2003; SILVA *et al.*, 2002).

A mamona (*Ricinus Communis*) é uma planta típica do clima tropical sendo componente mais abundante o ácido recinuléico, uma das proteínas mais tóxicas ao homem. Relatos recentes mostram resultados promissores de uma resina poliuretana derivada do óleo da semente, com possibilidade de aplicação em ortopedia, cirurgias plásticas e na indústria, sendo considerada uma fonte de alternativa para substituição dos produtos e subprodutos originários do petróleo, como o biodiesel.

Portanto é fundamental a compreensão da função que os fungos exercem em seus hospedeiros, por isso fez-se necessário a realização de pesquisas voltadas para a interação endófitos-plantas e ao controle dos organismos fitopatogênicos.

Os fungos endofíticos habitam mais frequentemente o interior dos tecidos aéreos de seus hospedeiros, desempenhando várias e estreitas relações ecológicas sem demonstrar sintomas visíveis (CARROLL 1986, PETRINI *et al.*, 1991, HALLMANN *et al.*, 1997). Esta característica dificulta a avaliação desses organismos, havendo a necessidade do isolamento e cultivo em laboratório. Estes microrganismos colonizam um nicho ecológico semelhante aos ocupados por fitopatógenos, apresentando uma interação mutualística, onde os endófitos recebem nutrientes da planta hospedeira, e em troca, proporcionam resistência contra patógenos (LEMANCEAU & ALABOUVETTE, 1993), maior resistência em ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos e abióticos (SAIKKONEM *et al.*, 1998, CLAY 1992), maior proteção contra insetos e pragas. 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, 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

Primeiramente foi realizada a coleta do material botânico, que foi coletado de diferentes locais da cidade de Curitiba, e após coletados, foram processados no prazo de 24 horas.

Após a coleta as folhas 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 evitar que os agentes de desinfecção penetrem por essa abertura, alterando o resultado real do isolamento. Em seguida, em câmara asséptica, as folhas foram lavadas em água destilada esterilizada por duas vezes e posteriormente o material foi imerso em álcool 70 % por 1 minuto, 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 será retirado 5 µL para fazer o controle da assepsia (SOUZA *et. al.*, 2004).

Dando sequência as folhas foram cortadas em fragmentos circulares de aproximadamente 6 mm. Estes fragmentos transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo Sabouraud (Merck KgaA, Germany), acrescido de clorofenicol (500 mg/L) para isolamento de fungos. As placas com os fragmentos incubadas a 28° C e 37 ° C.

O crescimento das colônias fúngicas foi acompanhado diariamente.

As colônias de morfologia similar foram agrupadas, com a finalidade de facilitar o estudo. Para melhor observação, os grupos foram repicados para tubos de ensaio inclinado contendo meio Sabouraud e cultivados a temperatura ambiente (28 ± 2° C), e depois armazenadas a 4°C, para garantir a presença de apenas um exemplar na amostra a ser posteriormente identificada.

Posteriormente realizou-se a técnica de microcultivo. A cultura fúngica que foi utilizada era recente e cultivada em meio sólido, em seguida foi transferido um bloco do Ágar com o auxílio de uma pinça estéril para a lâmina montada sobre o suporte de vidro (Tubo em L) contido dentro de uma placa de Petri, sob condições de assepsia, foi retirado pequenas porções da colônia e semeado nos quatro lados do bloco de meio, o bloco foi coberto com uma lamínula estéril, e cuidadosamente a gaze foi molhada com água destilada estéril (cerca de 2 ml). A placa funciona como uma câmara úmida. As placas foram incubadas a temperatura ambiente e observado o crescimento da cultura, quando houve desenvolvimento satisfatório, foi retirado 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. Alternativamente pode-se utilizar a lâmina do microcultivo (se houver crescimento) (KONEMAN *et. al.*, 1997). Após a coloração as lâminas do microcultivo foram analisadas em microscópio para a identificação e caracterização dos fungos.

Por fim foi realizado o teste da atividade antibacteriana onde os fungos endofíticos foram submetidos ao ensaio antimicrobiano em meio sólido baseado na metodologia descrita por Ichikawa *et al.* (1971), a qual permite uma seleção rápida e qualitativa de microorganismos bioativos. Cada fungo foi cultivado na superfície de BDA em placa de Petri a 28°C por sete dias. Após este período, discos cortados da colônia foram transferidos para o meio Muller Hinton previamente semeados com bactérias. As placas de Petri foram incubadas a 37° C por 24 h.

As linhagens bacterianas para o teste de atividade antimicrobiana provenientes da ATCC (American Type Culture Collection) foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Tuiuti do Paraná.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados do presente trabalho foram divididos em duas partes, primeiramente foram realizados o isolamento e a identificação prévia dos fungos endofíticos através da incubação de fragmentos de folhas saudáveis da mamona, obtendo um total isolado de 11 colônias fúngicas classificadas de acordo com suas características macroscópicas tais com tipo de micélio, cor, e textura, e microscópicas através da presença de estruturas de reprodução caracterizadas, através do microcultivo.

Dois grupos de fungos endofíticos foram identificados e um agrupou aqueles não identificados, totalizando 11 colônias de morfotipos de fungos endofíticos conforme descritos na (tabela 1).

Tabela 1. Número de colônias de gêneros de fungos endofíticos isolados de folhas da mamona.

Tipos fúngicos	Total de isolados
<i>Aspergillus sp.</i>	3
<i>Penicillium sp.</i>	6
<i>Fungos não identificados</i>	2
<i>(Mycelia sterilia)</i>	

Os grupos *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Xylaria*, *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Cladosporium* foram encontrados por Castro *et.al* (2001).

Pereira *et al.* (1993) isolaram de *Stylosantes guianensis* e *Musa* spp.: *Aspergillus* e *Trichoderma* entre outros fungos endofíticos.

Um dos grupos encontrados é semelhante ao encontrado por Castro *et.al* (2002) e Pereira *et. al* (1993).

A segunda etapa realizada no trabalho foi de atividade antibacteriana, onde primeiramente foi feita a escolha de quatro bactérias sendo: *Escherichia coli* ATCC (bactéria Gram-negativa, patogênica para humanos e animal); *Candida albicans* ATCC (fungo leveduriforme, patogênico, responsável pela candidíase no trato vaginal e oral); *Staphylococcus epidermidis* ATCC (bactéria [gram-positiva](#) responsável principalmente por infecções hospitalares, através de catéteres, sondas (material de plástico), bem como próteses, devida sua capacidade de formar biofilmes); *Burkholderia cepacea* ATCC (bactéria gram-negativa, cujo habitat é o meio ambiente, esta relacionada a surtos de contaminação de anti-séptico, medicamentos, gel, água para hemólise, e lipídeos).

Destas, apenas nas positivas, os fungos endofíticos apresentaram potencial antibacteriano.

Na *Candida Albicans* e *Staphylococcus epidermidis*, todos os grupos de fungos endofíticos apresentaram atividade antibacteriana.

Já nas bactérias negativas como *Escherichia coli* e *Burkholderia cepacia* nenhum dos grupos apresentaram atividade.

Este estudo demonstra que estes fungos com atividade antimicrobiana podem produzir metabolitos bioativos com promissores resultados frente à patógenos humanos.

Uma das propriedades mais importantes dos fungos, esta associada à capacidade metabólica de produzir uma imensa diversidade de moléculas bioativas, de uso clínico em varias patologias, estas moléculas tem demonstrado capacidade de inibir ou matar uma ampla variedade de agentes patogênicos, tais como vírus, fungos e bactérias, além de insetos e fitopatógenos, ainda pode apresentar atividades antitumorais, agentes antidibéticos e imunossupressores (STROBEL, *et al*, 1999; GUO *et al*, 2000; SIQUEIRA 2008).

Os fungos são conhecidos pela sua capacidade de produzir uma diversidade de moléculas bioativas com potencial antimicrobiano (GULLO *et al.* 2006). Dentre os

medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas destacam-se os antibióticos: penicilinas, cefalosporinas exemplos mais conhecidos.

CONCLUSÃO

O presente trabalho conclui que através da análise e estudo dos isolados da mamona foram encontrados fungos das linhagens de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mycelia sterilia* quais desempenham importantes papéis no hospedeiro, apresentando atividades antimicrobiana, com grande efeito terapêutico nas doenças infecciosas, destacando-se como antibióticos, Atuando também no controle de pragas, agindo como fungicidas proporcionando maior resistência ao vegetal contra invasões. Novos ensaios deverão ser realizados para comprovar a atividade observada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUBLINCKY-SOBRAL, J.; LACAVAL, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CalQ, 86p, 2002.

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

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Ecological Endophyte

Symbiosis With Grasses. **Am. Nat.**, v. 160, p. 99-127, 2002.

GULLO, V. P.; MCALPINE, J.; LAM, K. S. BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 33, n° 7, p. 523-531, 2006.

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.

GUO, B.; DAÍ, J.; HUANG, Y. LEONG, C.; ONG, W.; CARTE, B. K. Cytonic Acids A and B: novel tridpside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. **Journal of Natural Products**, n° 63: 602-604, 2000.

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

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° 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^a ed. Philadelphia New York: Lippincott, p. 983-1069, 1997.

LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE, C. (1993). **Suppression of *Fusarium* with by fluorescent *Pseudomonads* mechanisms and applications**. *Biocontrol Science and Technology*, 3: 219-234.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. **Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae)**. *Quím. Nova* [online], vol.32, n.7, pp. 1710-1712. 2009.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. **Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report**. *Mycologia*, New York, v. 85, n. 3, p. 362-364, 1993.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDRENA, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. Berlin: 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.

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.

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.

SAIKKONEN. K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. (1998). **Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants**. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 319-343.

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.

STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE Jr., J.F. **An overview of endophytic microbes: endophytic microbe: endophytism defined.** In: Bacon, C.W. Whit Jr. J.F. (Eds) *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, p 3-29, 2000.

STROBEL, G. A.; FORD, E.; LI, J. Y.; SEARS, J.; SIDHU, R.S.; HESS, W. M. ***Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov. a unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System.** *Applied Microbiology*, n° 22, p 426-433, 1999.