



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO METABÓLITO SECUNDÁRIO DO FUNGO ENDÓFITICO DE *Morus nigra* L. PELO MÉTODO DO BLOCO DE GELOSE

Angela Aparecida da Silva¹, Julio Cesar Polonio², Aline Maria Bulla³, Halison Correia Golias⁴, Benício Alves de Abreu Filho⁵, João Alencar Pamphile⁶

Os microrganismos endofíticos são fungos e bactérias presentes nos tecidos ou órgãos vegetais, em pelo menos um período de sua vida, sem trazer qualquer tipo de dano ou doença à planta. Os fungos endofíticos produzem metabólitos secundários com potencial biotecnológico, como agentes antibacterianos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana da linhagem endofítica MN-G26/MN03 isolado de *Morus nigra* L. contra bactérias patogênicas e de interesse alimentar, através da metodologia do bloco de gelose. O endófito apresentou alta atividade antibacteriana contra a maioria das bactérias avaliadas, sendo que o maior halo de inibição foi contra *Aeromonas hydrophila* com 29 mm de diâmetro. Quando comparado à tetraciclina, a maior eficiência foi obtida contra *Enterococcus faecalis* com 125% em relação ao controle. Portanto, observou-se que o endofítico avaliado apresentou potencial biotecnológico como agente antibacteriano, especialmente contra *E. faecalis*.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antibacteriana; Fungos endofíticos; Metabólitos secundários.

1 INTRODUÇÃO

São considerados endofíticos fungos ou bactérias que colonizam o interior dos tecidos ou órgãos vegetais de plantas, como folhas, caule e raiz. Eles podem colonizar a planta em todo o seu período de vida ou apenas em parte do seu ciclo, sem lhes causarem danos ou doenças (AZEVEDO et al., 2002; RHODEN et al., 2012b). Azevedo e Araújo (2007) definiram como microrganismos endofíticos todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar prejuízo ao hospedeiro, e que não desenvolvem estruturas externas visíveis.

Um grande número de compostos bioativos pode ser produzido por microrganismos endofíticos, podendo ser utilizadas no desenvolvimento de novas drogas. Estas substâncias podem ter aplicações agroindustriais auxiliando no controle biológico de pragas e doenças causadas por fitopatógenos, através da atividade antagonista/fitossanitária de patógenos de plantas, na produção de hormônios de crescimento, como vetores - hospedeiros para transformação genética em plantas (AZEVEDO et al., 2002; PAMPHILE et al., 2004).

Devido ao grande aumento da resistência bacteriana, e ao surgimento de novas doenças infecciosas, a corrida por compostos bioativos vem aumentando cada vez mais, apresentando uma área de pesquisa em expansão, cujos fungos endofíticos apresentam grande potencial em aplicações biomédicas.

Morus nigra L. pertence à família Moraceae, conhecida popularmente por amora são muito apreciadas pela avifauna devido aos seus frutos comestíveis. Tem origem na Ásia com maior intensidade e abundância de frutificação principalmente na Ásia Menor, esta plenamente aclimatizada no Brasil (CRUZ, 1979).

O objetivo deste trabalho foi realizar a avaliação prévia da capacidade de produção de metabólitos secundários, com atividade antibacteriana da linhagem endofítica MN-G26/MN03 isolada de *Morus nigra* L., contra bactérias patogênicas e de interesse alimentar, através da metodologia do bloco de gelose.

¹ Doutoranda Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – PR. angela-bio1@hotmail.com

² Mestrando Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – PR. Bolsista CAPES. julioc.polonio@hotmail.com

³ Mestranda Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – PR. aline-bulla@hotmail.com

⁴ Doutorando Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – PR. halisontj@hotmail.com

⁵ Professor Adjunto do Departamento de Ciências Básicas da Saúde – UEM, Maringá – PR. baafilho@uem.br

⁶ Professor Associado Nível C do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular – UEM, Maringá – PR. prof.pamphile@gmail.com



2 MATERIAL E MÉTODOS

Fungos endofíticos e condições de cultura

Foi utilizado uma linhagem de fungo endofítico MN-G26/MN03 extraído de folhas de *Morus nigra* L., pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá (LBIOMIC)-UEM, estocados em frasco âmbar pelo método Castellani (ARAÚJO et al., 2002).

A cultura endofítica foi ativada e cultivada em BDA (Batata-Dextrose-Ágar:) com período de incubação de 7 dias à 28 °C.

Cepas bacterianas e condições de cultura

As cepas bacterianas utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Salmonella enterica* (ATCC 13076), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022). Estes microrganismos encontram-se estocados em meio Nutriente a -20 °C em criotubos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) com 30% de glicerol no Laboratório de Microbiologia da Água, Ambiente e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá. As bactérias / estoque utilizadas nos ensaios foram mantidas em tubos de ensaio com meio nutriente inclinado à 4 °C.

Antes de cada ensaio foi realizado um subcultivo bacteriano em meio LB (Luria Bertani) (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) com período de incubação de 24 horas à 37 °C.

Avaliação da atividade antibacteriana pelo método do bloco de gelose

A atividade antibacteriana pelo método do bloco de gelose foi avaliada conforme descrito por Ichikawa et al. (1971) com modificações. Através dos resultados obtidos neste ensaio foi possível avaliar a atividade antibacteriana do extrato bruto produzido pela linhagem endofítica MN-G26/MN03 de *Morus nigra*.

As bactérias/estoque foram ativadas em meio LB, incubadas por 24 horas à 37°C. Em seguida, foi preparada uma solução bacteriana em salina à 0,85% previamente autoclavada e, ajustada à concentração de aproximada de 5×10^8 UFC.mL⁻¹ com o auxílio da escala de McFarland 0,5. Posteriormente, foi inoculado um volume de 100 µL de cada suspensão bacteriana em placas de Petri contendo meio ágar LB, pelo método de espalhamento por superfície com auxílio da alça de Drigalski.

Tabela 1 - Medida do halo de inibição do ensaio da avaliação da atividade antibacteriana pelo método do bloco de gelose.

Tipo de Inibição	Tamanho do Halo de Inibição	Intensidade da Inibição
Ausente	0	-
Baixa	7,0-10,0 mm	+
Moderada	11,0-14,0 mm	++
Alta	>14,0 mm	+++

O bloco de gelose de 6 mm de diâmetro obtido com auxílio de um furador estéril foi retirado do endofítico crescido por 7 dias em meio BDA. Os blocos de gelose foram transferidos para placas de Petri semeadas com a suspensão bacteriana e incubadas por 24 horas à 37 °C. Após este período foram medidos os halos de inibição em milímetro (mm) e comparados ao controle com Tetraciclina (30 µg mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O halo de inibição foi classificado conforme escala sugerida por Matsuura (2004) (Tab. 1).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O endófito MN-G26/MN03 apresentou alta atividade antibacteriana contra a maioria das bactérias avaliadas com halos de inibição variando entre 17 a 29 mm para *S. flexneri* e *A. hydrophila* respectivamente. No entanto apresentou atividade antibacteriana ausente para *E. coli* e *P. aeruginosa* (Tab. 2).

Tabela 2 - Atividade antibacteriana da linhagem endofítica MN-G26/MN03, pelo método do bloco de gelose.

Bactérias	TRATAMENTO			
	Metabólito Secundário		Tetraciclina (30 µg mL ⁻¹)	
	HI*	II**	HI*	II**
<i>Escherichia coli</i>	0	-	25	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	+++	40	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	15	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	+++	27	+++



<i>Bacillus subtilis</i>	21	+++	27	+++
<i>Aeromonas hydrophila</i>	29	+++	33	+++
<i>Salmonela enterica</i>	18	+++	35	+++
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	+++	16	+++
<i>Shigella flexeri</i>	17	+++	32	+++

*Halo de Inibição em milímetros (mm); *Intensidade de Inibição.

No trabalho realizado por Souza et al. (2004) a maioria dos fungos endofíticos avaliados apresentaram atividade frente ao *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli*. De acordo com Rhoden et al. (2008), o extrato de metabólitos secundários do endófito isolado de *Trichilia elegans* conseguiu inibir o crescimento das bactérias *Enterococcus hirae*, *Micrococcus luteus* e *E. coli*. Portanto, fica evidente que estes compostos bioativos apresentam atividade antibacteriana, tanto em microrganismos Gram positivos quanto nos Gram negativos.

Tabela 3- Tabela de comparação entre o halo de inibição dos tratamentos em relação ao controle com Tetraciclina.

Bactérias	TRATAMENTO	
	Metabólito Secundário	Tetraciclina (30 µg mL ⁻¹)
	I%*	I%*
<i>Echerichia coli</i>	0	100,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	55,0	100,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	100,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	70,4	100,0
<i>Bacillus subtilis</i>	77,8	100,0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	87,9	100,0
<i>Salmonela enterica</i>	51,4	100,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	125,0	100,0
<i>Shigella flexeri</i>	53,1	100,0

*I% = Porcentagem de Inibição do metabólito em relação ao antibiótico (%).

Quando comparado o tratamento do endófito à tetraciclina, nota-se a eficiência desta linhagem quanto a sua atividade antibacteriana, que apresentou para a maioria das bactérias inibição superior a 50% quando comparado ao halo de inibição do controle (Tab.3). O melhor tratamento foi contra *E. faecalis* com atividade antibacteriana superior ao controle, no entanto não houve ação contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

4 CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados, observa-se um grande potencial biotecnológico como agente antibacteriano do fungo endofítico avaliado. Portanto, futuros trabalhos são necessários para avaliar a atividade “*in vivo*” destes compostos. São necessárias mais pesquisas acerca desta linhagem fungica, incluindo a sua identificação assim como uma avaliação da citotoxicidade destes compostos bioativos.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K; LACAVA, P. T. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**, Piracicaba. 86p, 2002.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants**. In B.D. Ganguli and S.K. Deshmukh (Edts.) *Fungi: multifaceted microbes*, Aramaya Publish. New Delhi p. 189-207, 2007.

AZEVEDO, J. L.; BARROS, N. M.; SERAFINI, L. A. **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, Caxias do Sul – RS, Brasil, 2002.

CRUZ, G. L. **Dicionário de plantas úteis no Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira. 599 p, 1979.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T; OZAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the Agar piece method and prototroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, p. 218-224, 1971.



MATSUURA, T. **Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro** (*Theobroma grandiflorum* Schum.). Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2004.

PAMPHILE, J. A.; ROCHA, C. L. M. S. C.; AZEVEDO, J. L. Co-transformation of a tropical maize fungal endophyte isolate of *Fusarium verticillioides* (synonym *F. moniliforme*) with *gusA* and *nia* genes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 253-258, 2004.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; BONGIORNO, V. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss. **Journal of applied Pharmaceutical Science**, v. 02, n. 08, p. 57-59, 2012a.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; RUBIN-FILHO, C. J.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. . Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (Meliaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 2513-2522, 2012b.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York, N.Y., USA, 2001.

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.