

Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açazeiro

Isolation and antimicrobial activity evaluation of endophytic fungi of açazeiro

DOI 10.5935/2446-4775.20180015

Batista, Bárbara Nunes^{1*}; Raposo, Nádia Verçosa de Medeiros²; Silva, Ingrid Reis da³.

¹Universidade do estado do Amazonas. Escola Superior de Tecnologia, Av. Darcy Vargas, s/nº, Chapada. CEP: 69050-020, Manaus, AM, Brasil.

²Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior da Ciências da Saúde. Av. Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha, CEP: 69065-001, Manaus, AM, Brasil.

³Centro de Biotecnologia da Amazônia, Av. Governador Danilo Areosa, Distrito Industrial I, 69075-351, Manaus, AM, Brasil.

*Correspondência: barbara_sing@hotmail.com

Resumo

Os fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior vegetal e são potenciais fontes de compostos, com capacidade de aplicação na indústria, agricultura e medicina, além de atuarem em simbiose com seus hospedeiros. Assim, o presente estudo teve como objetivo isolar fungos endofíticos de açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart) e avaliar seu potencial quanto à produção de substâncias antimicrobianas com técnica de difusão em disco, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klensilla pneumoniae* ATCC 700603. Para isso, foram coletadas amostras de folhas, caules e raízes de açazeiro para o isolamento dos fungos. Cinquenta fungos foram isolados, sendo possível identificar seis gêneros distintos: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* e *Aspergillus* sp. Dois fungos isolados (C₄ e R₁₃) apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*. Assim, os dados indicaram espécies produtoras de substâncias bioativas com forte potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. *Euterpe precatoria* Mart. Fungos endofíticos.

Abstract

The endophytic fungi are microorganisms that inhabit the plant interior and are potential sources of compounds, being able to be apply in industry, agriculture and medicine, besides acting in symbiosis with their hosts. Therefore, the present study aims to isolate endophytic fungi from açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart) and to evaluate the potential for the production of antimicrobial substances by disc diffusion technique against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klensilla pneumoniae* ATCC 700603. For this,

samples of leaves, stalk and roots of açazeiro were collected for the isolation of fungi. Fifty fungi were isolated, and it was possible to identify six different genus: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* and *Aspergillus* sp. Two fungi isolated (C4 and R13) presented antimicrobial activity against *S. aureus*. Thus, the data indicated species that produce bioactive substances of strong antimicrobial potential.

Keywords: Antimicrobial activity. *Euterpe precatoria* Mart.. Endophytic fungi.

Introdução

Popularmente conhecida como açai do Amazonas, açai-solitário ou Juçara, a *Euterpe precatoria* Mart. (Arecaceae) apresenta característica de estipe único, além de fornecer matéria prima para a construção de casas, confecção de biojoias e produção de alimentos⁽¹⁻²⁾.

As raízes do açazeiro são utilizadas no tratamento de doenças hepáticas e dores musculares, sendo potencial produtora de compostos de interesse biotecnológico como os antibióticos, uma característica que pode ter sido herdada pelos microrganismos que as habitam ^(3,4,5).

Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior das plantas sem causar danos ao hospedeiro, sendo as raízes sua principal porta de entrada ^(5,6). Relacionados a interação simbiótica, induzem proteção e desenvolvimento morfológico do hospedeiro, ambas estimuladas pela síntese de metabólitos como enzimas líticas pectinases, celulases e lipases, além de antimicrobianos, como os compostos sordaricina e coronamicina isolados de gênero *Xylaria* e *Streptomyces*, que apresentam atividade antifúngica contra *Candida albicans* e fungos pitiáceos, respectivamente^(7,8,9).

O mercado de novos compostos de atividade antimicrobiana a partir de endofíticos no Brasil é promissor, principalmente na Amazônia, onde existe grande diversidade de plantas e microrganismos ainda não estudados, o que inspira a pesquisa por novas substâncias antimicrobianas produtoras ⁽⁷⁾.

Neste sentido, dada a relevância do tema, este estudo teve como objetivo isolar e avaliar fungos endofíticos de açazeiro, quanto à produção de antibióticos frente a microrganismos patogênicos, a fim de ampliar o conhecimento a respeito dos fungos endofíticos presentes no açazeiro e possível potencial antimicrobiano.

Materiais e Métodos

Coleta e isolamento dos fungos do açazeiro

Mudas de *Euterpe precatoria* Mart., identificadas pelo doutor Valdely Ferreira Kinupp, do Instituto Federal do Amazonas – IFAM (número de depósito 16782 no herbário do IFAM), foram coletadas dos viveiros localizados na Escola Superior de Tecnologia (EST-UEA) e CBA (Centro de Biotecnologia da Amazônia), enquanto as sementes foram fornecidas pela fábrica Waku Sese Amazônia, sendo posteriormente lavadas, com detergente neutro e água corrente, e submetidas ao processo de desinfecção superficial.

Pequenos fragmentos de folhas, caules, raízes e embriões de sementes foram desinfetados superficialmente com álcool 70% (durante 1 minuto) e hipoclorito de sódio a 2% (durante 3 minutos),

seguido de imersão durante 30 segundos em álcool 70%, e lavagem em água destilada esterilizada. Um ml da água de lavagem foi inoculada em placa como controle negativo (10).

Após a desinfecção superficial, os fragmentos foram inoculados em placas de petri (5 fragmentos em cada placa) contendo o meio Ágar Batata Dextrose (BDA) acrescido de ampicilina (50 mg/mL). As placas foram incubadas em B.O.D (Biochemical Oxygen Demand ou Demanda Bioquímica de Oxigênio) sob temperatura de 28°C durante uma semana. Diariamente as placas foram analisadas quanto ao início do crescimento das colônias fúngicas e, ao observar o surgimento de colônias, estas foram cultivadas em placas com meio BDA e incubadas em B.O.D nas mesmas condições descritas anteriormente.

A frequência dos microrganismos foi determinada relacionando o número de fragmentos com o número do total de fragmentos multiplicado por 100 (10).

Preservação dos isolados

Após a purificação, os fungos foram armazenados em triplicata utilizando duas metodologias: método de Castellani e Óleo Mineral (11). O método de Castellani consistiu na fragmentação em cubos de 1 cm³ da cultura fúngica em placa e adição de 10 cubos em frascos com água destilada esterilizada. No método com óleo mineral, o fungo foi cultivado, de forma estéril, em frascos com meio BDA – Batata Dextrose Agar com aplicação de uma camada de óleo mineral sobre a cultura do microrganismo. Em ambos os casos, os frascos puderam ser mantidos em temperatura ambiente.

Caracterização Macromorfológica e Micromorfológica de Fungos endofíticos

Após o crescimento nas placas, as colônias fúngicas foram caracterizadas e catalogadas através da macromorfologia, observação de características como superfície, cor do micélio e do verso da colônia, textura, pigmentação e estrutura da borda.

A micromorfologia foi analisada através do uso de placas de petri esterilizadas com duas lâminas cruzadas e um chumaço de algodão em seu interior, sendo em seguida adicionado meio BDA cortado em quadrados de 3 cm³ com bisturi em cada placa. Duas pequenas porções de micélio foram cultivadas equidistantes entre si sobre o meio BDA e uma lamínula foi posta sobre cada bloco de meio. O processo foi realizado em triplicata.

As placas foram incubadas em B.O.D. a 28°C e a cada 24 horas as lâminas foram observadas em lâmina de microscopia com uma gota azul de lactofenol e observadas na objetiva de 40X (aumento total de 400X), procurando identificar estruturas de reprodução sexuais e assexuais dos fungos. Os fungos que permaneceram em sua forma miceliana, não puderam ser identificados.

Inóculo das bactérias indicadoras

Foram utilizadas bactérias como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klensilla pneumoniae* ATCC 700603, cultivadas em caldo nutritivo *lysogeny broth* (LB) durante 16 horas, diluído com solução salina 0,9% padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1% + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1%), para 10⁸ UFC/mL.

Preparo do pré-inóculo

Foi feita a adição de pedaços de meio com isolados em frascos com 20 mL de meio BD líquido (batata dextrose) e incubado em shaker (INNOVA™ 4335) durante 14 dias a 28°C, 120 rpm. Deste cultivo foi feita a coleta de 1 mL do metabólito em microtubos, que foi centrifugado (Eppendorf 5417R) a 10000 rpm, 4°C. O sobrenadante, contendo os metabólitos de interesse, foi utilizado nos testes de atividade antimicrobiana (10).

Seleção de fungos endofíticos com potencial antimicrobiano

Na avaliação de potencial antimicrobiano foi utilizada a técnica de difusão em ágar, onde as bactérias indicadoras foram semeadas em placa de petri contendo meio LBA – lysogeny broth agar. Em seguida foram feitas perfurações no meio, seguidas da adição de 100 µl do extrato fúngico em cada poço. As placas foram incubadas a 35°C por 16h e então feita a medição do halo de inibição.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo composto de 5 tratamentos, sendo 3 repetições cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância em programa Minitab® 17.3.1 (Copyright© 2003-2006 by Minitab Inc., USA), sendo submetidos ao teste de Tukey para as médias de índice, ao nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

Nenhuma das estruturas sofreu oxidação quanto aos tempos de imersão em álcool ou hipoclorito, porém observou-se um baixo número de fungos.

Isolamento de Fungos endofíticos

Foram isolados 50 fungos endofíticos das mudas de *E. precatória* (tanto das amostras da UEA – Universidade do Estado do Amazonas quanto CBA – Centro de Biotecnologia da Amazônia) a partir de 150 fragmentos (50 fragmentos de folhas, 50 de raízes e 50 fragmentos de caule), porém, não foram isolados fungos de nenhum dos 50 embriões inoculados (TABELA 1). Foi observado que o número de fungos isolados de caule era maior (44%) em comparação aos de outras estruturas (30% dos fungos isolados de folhas e 26% isolados de raízes).

TABELA 1. Isolamento de Fungos endofíticos dos respectivos locais.

Local Coleta	Estrutura isolada (Código)	Mês	Localização	Número de isolados
Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA)	Caule (C ₁₁ a C ₂₆)	Setembro	3°08'17,7"S 59°59'02,1"W	16
	Folha (F ₁₁ a F ₁₆)			6
Escola Superior de Tecnologia (EST-UEA)	Caule (C ₁ a C ₆)		6	
	Folha (F ₁ a F ₉)		9	
	Raiz (R ₁ a R ₁₃)		13	

Caracterização Macromorfológica e Micromorfológica de Fungos endofíticos

Na caracterização macromorfológica foi observado predominância da característica de coloração de micélio aéreo verde escuro e textura granulosa, seguido de isolados de coloração micelial aérea cinza e textura aveludada (**TABELA 2**). 16% dos isolados apresentaram estruturas reprodutivas que permitiram a caracterização micromorfológica e o agrupamento em seis gêneros: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* e *Aspergillus* sp.

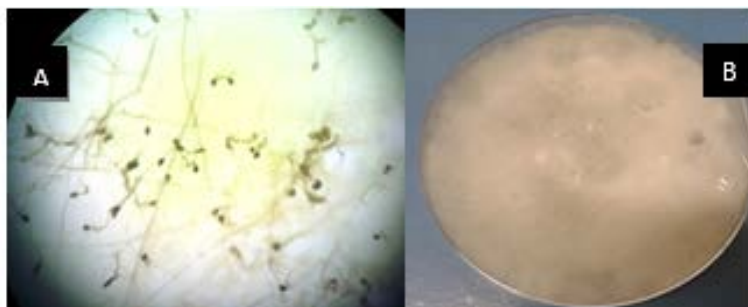
TABELA 2. Características macromorfológicas dos isolados de açaizeiro.

Amostra	Coloração do micélio aéreo	Produção de pigmentos	Coloração micelial reversa	Textura colonia	Borda
F1	Cinza	Não	Preta	Algodonosa	Regular
F2	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F3	Marrom	Não	Creme	Pulverulenta	Regular
F4	Cinza	Não	Preta	Granulosa	Regular
F5	Cinza	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F6	Cinza	Não	Preta	Granulosa	Regular
F7	Cinza	Não	Preta	Granulosa	Regular
F8	Cinza	Não	Preta	Aveludada	Irregular
F9	Cinza	Não	Preta	Aveludada	Irregular
F11	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F12	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F13	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F14	Branco	Não	Creme	Cotonosa	Regular
F15	Branco	Não	Creme	Cotonosa	Irregular
F16	Cinza	Não	Preta	Aveludada	Irregular
R1	Creme	Não	Creme	Membranosa	Regular
R2	Cinza	Não	Preta	Cotonosa	Regular
R3	Cinza	Não	Preta	Aveludada	Regular
R4	Branco	Não	Preto	Algodonosa	Irregular
R5	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R6	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R7	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R8	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R9	Marrom	Não	Preto	Aveludada	Regular

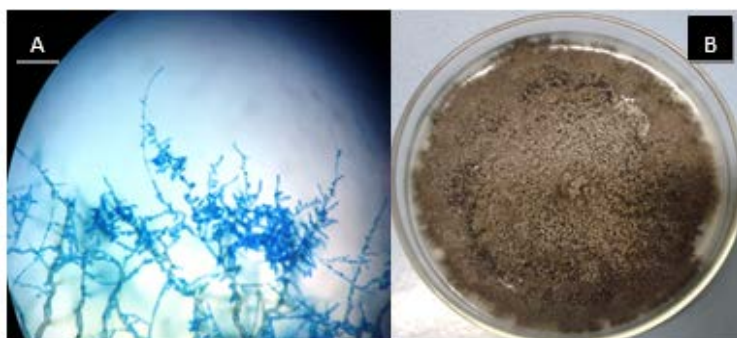
R10	Marrom	Não	Preto	Cotonosa	Regular
R11	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R12	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R13	Verde escuro	Não	Creme	Pulverulenta	Irregular
C1	Branco	Não	Preta	Algodonosa	Regular
C2	Branco	Não	Branca	Algodonosa	Regular
C3	Branco	Não	Cinza	Membranosa	Irregular
C4	Branco	Não	Creme	Algodonosa	Regular
C5	Branco	Não	Creme	Membranosa	Regular
C6	Branco	Não	Creme	Cotonosa	Regular
C11	Branco	Não	Marrom	Algodonosa	Regular
C12	Branco	Não	Preta	Algodonosa	Regular
C13	Branco	Não	Preta	Algodonosa	Regular
C14	Branco	Não	Creme	Algodonosa	Irregular
C15	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C17	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C18	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C19	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C20	Branco	Não	Branco	Aveludada	Irregular
C21	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C22	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C23	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C24	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C25	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C26	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular

Isolado C₁

Característico do gênero *Colletotrichum*. O isolado apresentou na análise micromorfológica hifas hialinas septadas, conídios simples e grandes, além de apressórios (**FIGURA 1A**). Enquanto na análise macromorfológica, apresentou textura algodonosa, borda regular, coloração branca a cinza do micélio aéreo, sem produção de pigmentos e coloração preta micelial reversa (**FIGURA 1B**).

FIGURA 1. Micromorfologia - Apressórios (A) e Macromorfologia (B) do isolado C₁.**Isolado C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₂₂, C₂₃, C₂₅, C₂₆, F₂, F₈, F₁₁ e R₉.**

Característicos do gênero *Guignardia*, as amostras listadas apresentam na análise micromorfológica hifas septadas hialinas e apressórios (**FIGURA 2A**). Já na análise macromorfológica, apresentaram textura granulosa, borda irregular, coloração dos micélios aéreos verde escuro, sem produção de pigmentos e coloração micelial reversa preta (**FIGURA 2B**).

FIGURA 2. Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra F₁₁.**Isolado F₃**

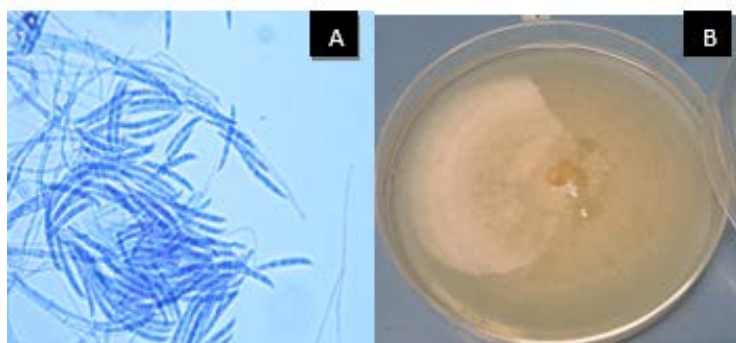
Característico do gênero *Penicillium*, o isolado F₃ apresentou na análise micromorfológica (**FIGURA 3A**) hifas hialinas e septadas, conidióforo isolado ramificado perto do vértice, terminando num grupo de fiáides e conídios hialinos globosos ou ovóides formando cadeias, os quais não foram ilustrados. Enquanto na análise macromorfológica (**FIGURA 3B**) observou-se textura pulverulenta, borda regular, coloração do micélio aéreo marrom, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa creme.

FIGURA 3. Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra F₃.

Isolado R₁

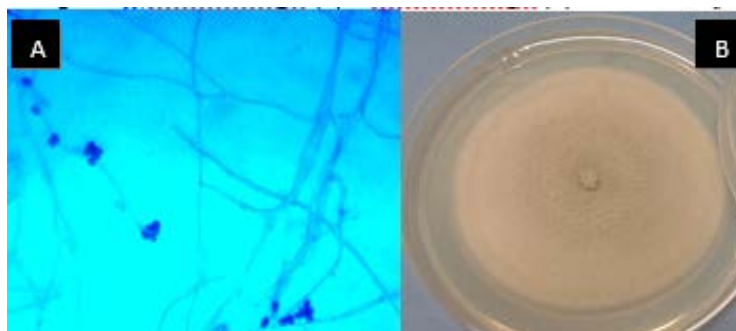
Característico do gênero *Fusarium*, o isolado apresentou na análise micromorfológica (**FIGURA 4A**) hifas septadas hialinas, macroconídios hialinos ligeiramente curvados na extremidade pontiaguda, geralmente em forma de canoa. Enquanto na análise macromorfológica (**FIGURA 4B**) apresentou micélio cotonoso, borda regular, coloração do micélio aéreo creme, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa creme.

FIGURA 4. Micromorfologia– Macroconídios(A) e Macromorfologia (B) da amostra R₁.

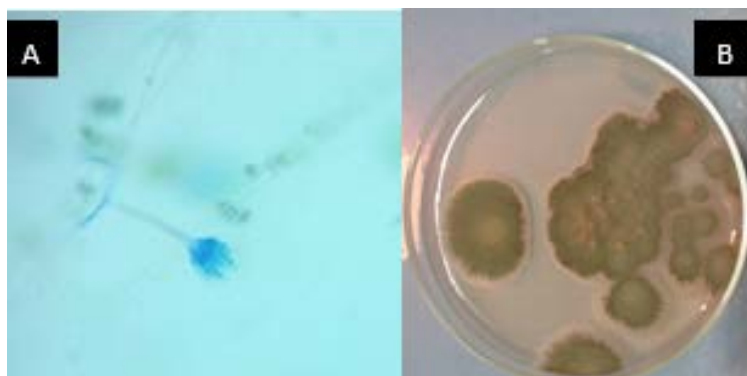
**Isolado R₂**

Característico do gênero *Ulocladium*, o isolado apresentou na análise micromorfológica (**FIGURA 5A**) hifas septadas, conidióforos simples ou ramificado, conídios escuros do marrom ao preto, liso ou áspero, e oval, com septos transversais e longitudinais. Enquanto que na análise macromorfológica (**FIGURA 5B**) apresentou textura cotonosa, borda regular, coloração do micélio aéreo cinza, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa preta.

FIGURA 5. Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra R₂.

**Isolado R₁₃**

Característico do gênero *Aspergillus*, o isolado R₁₃ apresentou na análise micromorfológica hifas hialinas e septadas, conidióforo vertical simples, terminando em uma globosa e fiálide, além de conídios hialinos globosos ou ovoides em cadeias. Enquanto na análise macromorfológica (**FIGURA 6B**) apresentou, borda regular, textura pulverulenta, coloração do micélio aéreo verde escuro, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa creme.

FIGURA 6. Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra R₁₃.**Isolado C₄**

De gênero não classificado, o isolado C₄ apresentou na análise micromorfológica hifas hialinas septadas, conídios grandes e elípticos, com septos transversais ou longitudinais. Enquanto na análise macromorfológica (**FIGURA 7B**) apresentou textura algodoadosa, borda irregular, coloração do micélio aéreo branco, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa creme.

FIGURA 7: Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra C₄.**Avaliação dos isolados com atividade antimicrobiana**

Dos extratos fúngicos obtidos a partir dos 50 isolados, observou-se atividade antagonista de 4% dos isolados endofíticos (C₄ e R₁₃) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (**TABELA 3**).

TABELA 3: Atividade antagonista de 4% dos isolados endofíticos (C₄ e R₁₃).

Amostra	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klensilla pneumoniae</i> ATCC 700603
F1 c	-	-	-	-	-
F2 c	-	-	-	-	-
F3 c	-	-	-	-	-
F4 c	-	-	-	-	-
F5 c	-	-	-	-	-
F6 c	-	-	-	-	-
F7 c	-	-	-	-	-
F8 c	-	-	-	-	-
F9 c	-	-	-	-	-
F11 c	-	-	-	-	-

F12 c	-	-	-	-	-
F13 c	-	-	-	-	-
F14 c	-	-	-	-	-
F15 c	-	-	-	-	-
F16 c	-	-	-	-	-
R1 c	-	-	-	-	-
R2 c	-	-	-	-	-
R3 c	-	-	-	-	-
R4 c	-	-	-	-	-
R5 c	-	-	-	-	-
R6 c	-	-	-	-	-
R7 c	-	-	-	-	-
R8 c	-	-	-	-	-
R9 c	-	-	-	-	-
R10 c	-	-	-	-	-
R11 c	-	-	-	-	-
R12 c	-	-	-	-	-
R13 a	+++	-	-	-	-
C1 c	-	-	-	-	-
C2 c	-	-	-	-	-
C3 c	-	-	-	-	-
C4 b	++	-	-	-	-
C5 c	-	-	-	-	-
C6 c	-	-	-	-	-
C11 c	-	-	-	-	-
C12 c	-	-	-	-	-
C13 c	-	-	-	-	-
C14 c	-	-	-	-	-
C15 c	-	-	-	-	-
C17 c	-	-	-	-	-
C18 c	-	-	-	-	-
C19 c	-	-	-	-	-
C20 c	-	-	-	-	-
C21 c	-	-	-	-	-
C22 c	-	-	-	-	-
C23 c	-	-	-	-	-
C24 c	-	-	-	-	-
C25 c	-	-	-	-	-
C26 c	-	-	-	-	-

A atividade antimicrobiana foi classificada de acordo com o tamanho do halo de inibição: Inerte: (-) ausência de halo de inibição; Baixa: (+) diâmetro do halo de inibição entre 7 a 12 mm; Moderada: (++) diâmetro do halo de inibição entre 13 a 16 mm; Alta: (+++) diâmetro do halo de inibição superior a 17 mm. Análise de variância ($\alpha=0,05$).

Apresentando frequência de isolamento de 33%, observou-se um baixo número de fungos no presente estudo. O resultado difere do descrito na literatura ⁽¹²⁾, isolando-se 59 fungos endofíticos de *Strychnos cogens*, planta medicinal amazônica, tendo frequência de isolados de folhas (66,6%) seguido de fungos isolados de raízes (15%), superior ao obtido no presente trabalho com fungos isolados de *Euterpe precatoria* Mart. Tais resultados demonstram variedade de planta para planta quanto ao número de fungos obtidos, espécie do hospedeiro e região de coleta do vegetal.

Além disso, o fato de não haver isolados dos embriões pode estar relacionado a menor possibilidade de contaminação, já que o embrião não tem contato direto com o ambiente externo até a germinação ⁽⁶⁾, indicando, também, sucesso na metodologia de desinfecção.

De acordo com as características macro e micromorfológicas foi possível classificar 32% dos isolados em seis gêneros distintos *Colletotrichum* sp. (2%), *Guignardia* sp. (22%), *Penicillium* sp. (2%), *Ulocladium* sp. (2%), *Aspergillus* sp. (2%) e *Fusarium* sp. (2%), enquanto o restante não apresentou esporulação ou estruturas que permitiam sua diferenciação, sendo um problema comum na micromorfologia de fungos endofíticos ⁽¹³⁾. O Gênero *Colletotrichum* sp. é descrito como colonizador de plantas como laranja, banana e feijão, além de ser um gênero predominante em isolamento assim como o gênero *Xylaria* sp., gênero frequente de palmeiras, enquanto no presente estudo não foi constatada a presença deste gênero, tornando possível o resultado das condições utilizadas no isolamento que podem não ter sido favorecido ^(14,15,16,17).

Assim como o gênero *Colletotrichum* sp., o gênero *Guignardia* sp. é frequentemente isolado de plantas, e conhecido por possuir espécies fitopatogênicas como a *Guignardia citricarpa*, que provoca doenças como a mancha preta de citrus em laranjeiras e limoeiros ⁽¹³⁾. No presente estudo, trabalhou-se com o gênero de maior frequência dentre os fungos isolados de caule, embora as mudas de açaizeiro não tenham apresentado os sintomas da mancha preta. Tal fato pode indicar a possibilidade da presença de espécie não patogênica, mas pertencente ao gênero, considerado um endófito.

A quantidade de isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, obtida no presente estudo com açaizeiros, foram semelhantes aos obtidos ⁽¹⁸⁾, uma vez que os fungos endofíticos de *Annona* spp. foram isolados, obtendo-se a presença de 3,45% de *Aspergillus* e 6,9% de isolados pertencentes ao gênero *Penicillium*. Porém, o nível de isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* foi de 31,03%, acima do obtido no presente estudo, além das mudas de açaizeiro não terem apresentado sintomas da fusariose, doença característica do gênero em trigo e bananeira, o que pode indicar que o gênero não é patógeno para a espécie vegetal do presente estudo ⁽¹⁹⁾.

Apesar da quantidade reduzida, os isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são passivos de testes de indução metabólica como antibióticos e enzimas, pois são gêneros descritos como vantajosos na aplicação biotecnológica na síntese de penicilina com o *Penicillium notatum* e na aplicação da produção de queijos com *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti* ⁽²⁰⁾.

Referente ao gênero *Ulocladium* sp., assim como no presente estudo, os resultados descritos foram semelhantes quanto a baixa quantidade de isolados do gênero a partir da planta medicinal *Hyoscyamus muticus* L ⁽²¹⁾ e, constatou-se que o gênero é endofítico ao realizarem o replantio da espécie, de modo asséptico, com o gênero. Assim, o gênero é passivo de testes quanto à síntese de metabólitos que influenciam no crescimento do hospedeiro, de forma simbiótica.

Nos ensaios de potencial antimicrobiano, apenas os endófitos R₁₃ e C₄, sendo o primeiro pertencente ao gênero *Aspergillus* enquanto o segundo não possui gênero identificado. Apesar da baixa frequência de isolados com bioatividade, as atividades foram consideradas de alta intensidade, com halo de inibição de 20 e 14 mm, respectivamente, frente a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com resultado interessante, pelo fato desta bactéria ser o patógeno causador do maior número de infecções hospitalares ⁽²²⁾.

Conclusão

O resultado contrastou com o descrito por Maria e colaboradores (2005) ⁽²³⁾, que testou endófitos do gênero *Aspergillus* sp. e constatou a inibição do crescimento de *Pseudomas aeruginosa* (11.1 ± 0.3 mm), *Enterococcus* sp. (11 ± 0.1 mm), *Salmonella typhi* (14.4 ± 0.9 mm), *Staphylococcus aureus* (11.3 ± 0.3 mm) e *Candida albicans* (12.3 ± 1.5 mm), enquanto no presente trabalho houve inibição apenas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pelos isolados R₁₃ e C₄. Porém, tal fato contribui para a continuação do estudo com estes isolados por apresentarem os maiores graus de inibição, permitindo estudos futuros que envolvam caracterização dos extratos, como também testes em outras condições com o restante dos isolados já que gêneros como *Penicillium* sp., apresentam espécies produtoras de antibióticos ⁽⁸⁾, como também a identificação de tais microrganismos de interesse a nível molecular contribuiria com o conhecimento dos endófitos presentes no açaizeiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e à Escola Superior de Tecnologia (EST-UEA) pelo material e espaço concedido à pesquisa.

Referências

1. Gama MMB, Ribeiro GD, Fernandes CF, Medeiros IM. Açai (*Euterpe* spp.): características, formação de mudas e plantio para a produção de frutos. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2005. 6p. Embrapa Rondônia. **Circular Técnica**, 80. [\[Link\]](#).
2. Yuyama LKO, Aguiar JPL, Filho DFS, Yuyama K, Varejão MJ, Fávoro DIT, Vasconcellos MBA, Pimentel SA, Caruso MSF. Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amaz.** Manaus. 2011; 41(4):545-552. ISSN: 0044-5967. [\[CrossRef\]](#).
3. Deharo E, Baelmans R, Gimenez A, Quenevo C, Bourdy G. *In vitro* immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolívia. **Phytomedicine.** 2004; 11:516-522. ISSN: 1618-095X. [\[CrossRef\]](#).
4. Smith N. **Palms and people in the Amazon.** 1th ed. Florida: Springer International Publishing. 2015. 500 p. ISBN: 978-3-319-35718-8.
5. Pamphile JA, Costa AT, Rosseto P, Polonio JC, Pereira JO, Azevedo JL. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Rev UNINGÁ.** 2017; 53(1):113-119. ISSN: 2318-0579. [\[Link\]](#).
6. Azevedo JL. **Microrganismos endofíticos.** In Ecologia microbiana (I.S. Melo & J.L. Azevedo, coords.). Editora Embrapa, CNPMA, Jaguariuna. 1998; p.117-137.
7. Neto PASP, Azevedo JL, Araújo WL. Microrganismos Endofíticos. **Biotec Ciên Desenv.** 2002; 29:62-77.

8. Orlandelli RC, Specian V, Felber AC, Pamphile JA. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev S Biol.** 2012; 7(3):97-109. ISSN:1980-0002. [\[Link\]](#).
9. Specian V, Orlandelli RC, Felber AC, Azevedo JL, Pamphile JA. Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungi of Pharmaceutical Interest. Unopar Científica. **Cienc Biol Saude.** 2014; 16(4):345-351.
10. Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J, Kuklinskysobral J, Lacava PT. **Manual: Isolamento de Microorganismos Endofíticos.** Piracicaba: USP, 2002. 86p.
11. Romeiro RS. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas.** Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006. [\[Link\]](#)
12. Souza AQL, Souza ADL, Astolfi Filho S, Belém Pinheiro ML, Sarquis IM, Pereira JO. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amaz.** 2004; 34(2):185-195. ISSN: 1809-4392. [\[CrossRef\]](#).
13. Santamaría J, Bayman P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microb Ecol.** 2005; 50:1-8. ISSN: 1432-184X. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
14. Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytol.** 2000; 147:617-630. [\[CrossRef\]](#)[\[Link\]](#).
15. Vega FE, Simpkins A, Aime MC, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A, Arnold AE. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fung Ecol.** 2010; 3:122-138. ISSN: 1754-5048. [\[CrossRef\]](#).
16. Chapla VM, Biasetto CR, Araujo AR. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Rev Virtual Quim.** 2013; 5(3):421-437. ISSN: 1984-6835. [\[CrossRef\]](#).
17. Gonzaga LL, Costa LE, Santos TT, Araújo EF, Queiroz MV. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **J Appl Microb.** 2014; 118:485–496. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
18. Silva RLO, Luz JS, Silveira EB, Cavalcante UMT. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Bot Bras.** 2006; 20(3):649-655. ISSN: 1677-941X. [\[CrossRef\]](#).
19. Summerell BA, Laurence MH, Liew ECY, Leslie, JF. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fung Diver.** 2010; 44:3-13. ISSN: 1560-2745. [\[CrossRef\]](#)[\[Link\]](#).
20. Chavez R, Bull P, Eyzaguirre J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **J Biotech.** 2006; 4:413-433. ISSN: 0168-1656. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
21. Abdel-Motaal FF, Nassar MSM, El-Zayat A, El-Sayed MA, Ito S. Antifungal activity of endophytic fungi isolatec from egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). **Pakistan J Bot.** 2010; 42(4):2883-2894. [\[Link\]](#).

22. Conde-Estévez D, Sorli L, Morales-Molina JA, Knobel H, Terradas R, Mateu-de Antonio J, Horcajada JP, Grau S. Differentiating clinical characteristics in bacteremia caused by *Enterococcus faecalis* or *Enterococcus faecium*. **Enferm Infec Microb Clin**. 2009; 7:37-43. ISSN: 0213-005X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

23. Maria GL, Sridhar KR, Raviraja NS. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **J Agr Tech**. 2005; 1(1): 67-80. [[Link](#)].

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 01/01/2018 | Aceite: 09/05/2018 | Publicação: 05/07/2018

Como citar este artigo: Batista BN, Raposo NVM, Silva IR. Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açazeiro. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2018; 12(2):161-174. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/595>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.
