



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## RELATÓRIO FINAL

# **ESTUDO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PRODUTORAS DE ANTIBIÓTICOS ISOLADAS DE ALFACE D'ÁGUA (*Pistia stratiotes* L.)**

BOLSISTA: Anne Laredo Jezini, CNPq

- Manaus, 2009 -



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB – S/0060/2008

**ESTUDO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS  
PRODUTORAS DE ANTIBIÓTICOS ISOLADAS DA  
ALFACE D'ÁGUA (*Pistia stratiotes* L.)**

BOLSISTA: Anne Laredo Jezini, CNPq

ORIENTADOR: Prof. Doutor Takeshi Matsuura

MANAUS - AM

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

# SUMÁRIO

RESUMO .....	3
1. INTRODUÇÃO .....	4
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. Geral .....	6
2.2. Específicos.....	6
3. JUSTIFICATIVA .....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4.1. Amostra .....	8
4.2. Processamento das amostras e isolamento das bactérias .....	8
4.3. Caracterização de atividade antimicrobiana dos isolados .....	9
4.4. Identificação das bactérias .....	10
4.5. Preservação das bactérias .....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	12
5.1. Isolamento das bactérias endofíticas.....	12
5.2. Identificação das bactérias endofíticas.....	12
5.3. Caracterização da atividade antimicrobiana dos isolados .....	13
6. CONCLUSÕES .....	14
7. CRONOGRAMA .....	15
ATIVIDADES DO BOLSISTA.....	15
8. REFERÊNCIAS .....	16
9. APÊNDICE .....	18

## RESUMO

O estudo da diversidade microbiana da região Amazônica, em especial de bactérias, ainda é pouco conhecida e pouco explorada. Entre estas bactérias, destaca-se o grupo dos actinomicetos, que são bactérias reconhecidas por produzirem uma grande variedade de antibióticos e estão distribuídos de forma cosmopolita, nos mais variados habitats, como o solo, a água, animais e vegetais. No entanto, dentre estes habitats, o que tem despertado grande interesse científico é o ambiente interno dos vegetais, no qual constitui o habitat dos chamados microrganismos endofíticos. Consideramos que o estudo de novas fontes de isolamento de microrganismos seja a premissa para a descoberta de novos compostos bioativos de importância ao setor biotecnológico, a alface-d'água (*Pistia stratiotes*), que é uma macrófita aquática, não estudada sob a ótica de suas bactérias endofíticas e pode representar um novo nicho com grande potencial. Neste trabalho, foram isoladas o total de 19 linhagens bacterianas, das folhas e raízes de *Pistia stratiotes*, dos quais a maioria dos isolados foram identificados como bacilos Gram-positivos, mas poucos actinomicetos. Os resultados permitem inferir que o isolamento de actinomicetos em *Pistia stratiotes*, tem baixa frequência quando utilizados os meios Ágar Ágar e Ágar Matsuura.

# 1. INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são bactérias ramificadas filamentosas semelhantes a fungos filamentosos, em geral, Gram-positivas e representam microrganismos de grande importância biotecnológica devido à capacidade em produzir inúmeros metabólitos secundários, como enzimas, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgânicos, mas principalmente, a versatilidade em produzir inúmeros antibióticos.

Os actinomicetos distribuem-se por todos os tipos de habitats e embora sua função majoritária, seja de sapróbio estrito, alguns formam associações parasíticas ou simbióticas com plantas ou animais (GOODFELLOW & WILLIAMS, 1983).

Os microrganismos ditos endofíticos são aqueles isolados no interior dos órgãos vegetais durante todo o seu ciclo de vida, ou somente parte dele. Usualmente esses microrganismos vivem numa associação que embora possa ser antagônica, muitas vezes é neutra ou benéfica para o hospedeiro. A natureza destas associações é diversa e via de regra exhibe vários graus de interdependência fisiológica e ecológica (SOUZA, 1996).

Os actinomicetos endofíticos em vegetais terrestres vem sendo cada vez mais estudado. Onde destaca-se o trabalho de ARAÚJO, SILVA & AZEVEDO (2000), onde relatam o isolamento de 53 actinomicetos endofíticos de folhas e raízes de milho (*Zea mays* L.), dos quais, o mais isolado foi *Microbispora*, seguido por *Streptomyces* e *Streptosporangium*. Destes isolados 43,4% mostrou atividade contra leveduras e bactérias.

COOMBS & FRANCO (2003) expõem o isolamento de 49 actinomicetos em raízes de trigo (*Triticum aestivum* L.), dos quais 88% são pertencentes ao gênero *Streptomyces* e 12% pertencentes aos gêneros *Microbispora*, *Micromospora* e *Nocardioides*.

Mais recentemente, JOSEPH *et al.* (2012) e HUANG *et al.* (2012) relataram o isolamento de actinomicetos endofíticos, principalmente do gênero *Streptomyces* de diversas espécies vegetais terrestres.

A *Pistia stratiotes*, pertencente à família Araceae, é uma macrófita aquática de distribuição pantropical, e podem formar densos tapetes na superfície da água, onde servem de abrigo para peixes e alimento para outros animais e é considerada uma espécie cosmopolita nas regiões tropicais e subtropicais (ROCHA, 2012).

A descoberta da penicilina e sua aplicação causou um aumento significativo na busca por novas substâncias antimicrobianas, posteriormente, com a descoberta da estreptomicina, as pesquisas visando screening de novos antibióticos atingiu seu auge (TAVARES, 2009).

Dentre os antibióticos comercializados, aproximadamente 60% são elaborados por actinomicetos, principalmente do gênero *Streptomyces*, 12% por fungos imperfeitos (Aspergillales), e próximo do mesmo valor por bactérias do gênero *Bacillus*, cerca de 7% são sintetizados por Basidiomycetes e Ascomycetes, menos de 1% por líquens e cerca de 15% por vegetais superiores e um pouco mais de 2% de origem animal (KURYLOWICS, 1981).

Estes antibióticos apresentam um largo espectro de ação em relação a célula alvo, onde tem-se observado antibióticos com atividade contra bactérias, fungos, protozoários, vírus e inclusive células tumorais (PHAFF, 1991).

O aumento dos casos de resistência aos antibióticos pelos microrganismos patogênicos vem se tornando uma premissa mundial para a busca de novos antimicrobianos que possam diminuir o avanço dos casos de resistência e/ou busca por novas drogas com menores efeitos colaterais graves que acometem os enfermos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Conhecer os actinomicetos endofíticos de *Pistia stratiotes* (alface d'água) e suas aplicações biotecnológicas.

### **2.2. Específicos**

- Isolar os actinomicetos endofíticos de folha e raiz de alface d'água;
- Identificar os actinomicetos isolados;
- Caracterizar os actinomicetos quanto à produção de antibióticos.



### 3. JUSTIFICATIVA

Sendo o Brasil, o país com a maior biodiversidade do planeta, e uma parcela considerável se encontra na região Amazônica, os microrganismos, em especial as bactérias, podem apresentar um grande potencial biotecnológico, principalmente para o setor farmacêutico, pois muitas espécies microbianas ainda são desconhecidas (SEIDL, 1993).

Dentre esta biodiversidade microbiana destacam-se os actinomicetos, um grupo de grande interesse biotecnológico devido a sua importância em produzir inúmeros metabólitos secundários, principalmente antibióticos.

Buscando valorizar a flora regional de interesse amazônico, inicialmente, procurou-se isolar os actinomicetos endofíticos do guaranazeiro (*Paullinia cupana*), mas a dificuldade em conseguir as sementes da planta, associado à baixa taxa de germinação, dificuldade de acesso ao fornecedor das sementes, dificuldade de manutenção da planta pela bolsista, e outras dificuldades que surgiram no início do projeto, optou-se por substituir a amostra vegetal de estudo por outra mais acessível à mesma, assim redefiniu-se a macrófita *Pistia stratiotes*, conhecida vulgarmente como Alface d'água.

Até o presente estudo não foi realizado trabalhos sobre endofíticos desta macrófita aquática, assim representa um universo novo e uma lacuna a ser preenchida para o estudo dos endofíticos, tendo sido escolhida para este estudo.

Outro fator de relevância para o screening de novos antibióticos é o aumento dos casos de resistência aos antimicrobianos dos microrganismos patogênicos, desta maneira tornou-se uma premissa para a busca de novas drogas que possam diminuir o avanço da resistência ou novos antibióticos que possam amenizar os efeitos colaterais que acometem os enfermos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Amostra**

Foram coletadas cinco espécimes da macrófita aquática alface d'água (*Pistia stratiotes*) no Rio Negro, na cidade de Manaus (AM), em frente ao porto do Distrito Industrial, local conhecido como Boca do Paraná, e armazenadas em caixas isotérmicas contendo água do local de coleta. Em seguida, foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia para o devido processamento.

### **4.2. Processamento das amostras e isolamento das bactérias**

Os procedimentos foram realizados conforme MATSUURA (2004), onde as amostras foram encaminhadas ao laboratório, foram lavadas, tendo duas folhas e duas raízes submetidas ao processo de esterilização de superfície. As folhas foram submersas em:

- Solução de álcool etílico a 70% v/v, durante 1 minuto;
- Solução de hipoclorito de sódio a 2,5% v/v, por 5 minutos;
- Solução de álcool etílico a 70% v/v, por 1 minuto;
- Solução salina estéril, durante 1 minuto;

Após este tratamento, as folhas foram cortadas em pequenos fragmentos, de aproximadamente 5 mm.

O mesmo procedimento descrito para as folhas foi efetuado para as raízes.

Os fragmentos foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Matsuura (Apêndice 9.1.1), desenvolvido para o isolamento de actinomicetos aquáticos. O mesmo procedimento descrito para as folhas será efetuado para as raízes. Após a esterilização de superfície, foi inoculado no mesmo meio 100µL da solução salina estéril presente no último recipiente para controle.

As placas foram incubadas a 30° C por 30 dias, e observadas a cada dia. O mesmo procedimento descrito para as folhas foi efetuado para as raízes.

As linhagens obtidas no isolamento foram então repicadas para outra placa de Petri contendo Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte (Apêndice 9.1.2), e conforme a necessidade purificadas pela técnica de *spread-plate* (Clark, 1965) que consiste basicamente no espalhamento de uma alíquota da diluição sobre a superfície do meio. As bactérias que, aparentemente, não possuíam a morfologia da colônia típica de actinomicetos foram inoculadas em placas contendo Ágar Nutriente (Apêndice 9.1.3) para posterior identificação.

#### **4.3. Caracterização de atividade antimicrobiana dos isolados**

A caracterização da atividade antimicrobiana ainda será realizada em meio sólido conforme a descrição a seguir. Os microrganismos-teste serão inoculados em meios de cultivo específicos e obedecerão a uma temperatura e período de incubação, conforme observa-se abaixo:

- *Staphylococcus aureus*  
Ágar Nutriente, 37° C por 24 horas
- *Bacillus subtilis*  
Ágar Nutriente, 37° C por 24 horas
- *Pseudomonas aeruginosa*  
Ágar Glicose-Extrato de levedura, 37° C por 24 horas
- *Escherichia coli*  
Ágar Nutriente, 37° C por 24 horas
- *Candida albicans*  
Ágar Sabouraud, 37° C por 48 horas
- *Aspergillus flavus*  
Ágar Sabouraud, 37° C por 72 horas

#### A) Ensaio em meio sólido

Proceder-se-á ao teste de atividade antimicrobiana segundo a metodologia clássica descrita por Ichikawa, Ishikura & Ozaki (1971). A metodologia também conhecida como "Método do Bloco de Gelose" consiste em inocular 1 mL da suspensão da bactéria, na concentração de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL, pela técnica de *pour-plate*, que consiste na incorporação de uma alíquota da diluição ao meio de cultura em temperatura de *melting*, adicionando-se 15 mL do meio de cultura ISP2A na placa de Petri. Após 5 a 7 dias de incubação a  $30^\circ\text{C}$ , blocos de gelose circulares de 5 mm de diâmetro, serão transferidos para cada placa contendo, previamente, os microrganismos-teste, obtidos por uma suspensão de células padronizadas na concentração aproximada de  $1,2 \times 10^6$  células/mL, semeados pela técnica de *spread-plate*. As placas serão incubadas respeitando-se as características fisiológicas de cada microrganismo-teste.

Após o período de incubação dos microrganismos-teste, medir-se-á o diâmetro dos halos de inibição de cada bloco e efetuar-se-á uma média.

#### **4.4. Identificação das bactérias**

As linhagens bacterianas foram identificadas segundo as diretrizes de Holt et al. (1995), que se baseia na identificação através de características fenotípicas, onde foram utilizadas a morfologia, provas bioquímicas e fisiológicas das linhagens obtidas.

O estudo da morfologia abrange o estudo da macromorfologia que consistiu na determinação de características como cor, textura, elevação, exsudatos e pigmentação da colônia, e da micromorfologia que consistiu em determinar caracteres como forma, arranjo, presença de esporo, presença e tipo de cadeia de esporo, entre outros.

As provas bioquímicas realizadas foram o teste de catalase e oxidase, que visam detectar a produção destas enzimas pela bactéria; a

utilização de citrato como única fonte de carbono, a capacidade de fermentar vários açúcares; determinar o tipo de metabolismo oxidativo ou fermentativo; capacidade de hidrolizar a gelatina, etc.

#### **4.5. Preservação das bactérias**

Os isolados foram preservados através do método de congelamento a  $-20^{\circ}$  C, que consistiu em preparar uma suspensão bacteriana em solução de glicerol a 10% v/v e armazenamento em freezer a  $-20^{\circ}$  C (Muro e Luchi, 1989).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Isolamento das bactérias endofíticas**

Dos cinco indivíduos de *Pistia stratiotes* coletados, foram isoladas 19 linhagens de bactérias, sendo que deste total, quatro (21,05%) linhagens foram isoladas da folha e 15 (78,95%) foram obtidas da raiz.

A maior quantidade de linhagens isoladas do órgão raiz do que da folha coaduna com os resultados da maioria dos pesquisadores de endofíticos de plantas terrestres (MATSUURA, 2004; JOSEPH *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2012, MANGAMURI, 2012). Isto pode estar relacionado com a grande diversidade quantitativa e qualitativa de microrganismos na rizosfera que propicia um contato mais intenso e freqüente com o órgão.

### **5.2. Identificação das bactérias endofíticas**

As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com suas características fenotípicas, como morfologia, afinidade tintorial e provas bioquímicas/fisiológicas. Dentre as 19 linhagens isoladas, verificou-se que 17 são bactérias que consistência comum e apenas duas linhagens de actinomicetos. Onde determinou-se que entre as bactérias comuns, seis linhagens são cocos Gram-positivos e 11 são bacilos, dos quais dez são Gram-positivos e um Gram-negativo.

Dentre os seis cocos Gram-positivos, cinco foram identificados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e uma linhagem ainda não foi identificada. As características de cocos Gram-positivos formando agrupamentos irregulares semelhantes a cachos de uva, fermentadores de manitol, produtoras de catalase, com crescimento anaeróbio facultativo e halotolerante permitiram a identificação do gênero *Staphylococcus*.

Já entre os 11 bacilos, quatro pertencem ao gênero *Bacillus* e sete ainda não puderam ser identificados. O gênero *Bacillus* apresenta-se

como bacilos Gram-positivos, esporulados, com arranjo em estreptobacilos, catalase positivo e anaeróbio facultativo.

Os dois actinomicetos mostraram-se pertencentes ao gênero *Streptomyces*, com colônia de coloração cinza e apresentaram-se ramificados com longas cadeias de esporos. Acredita-se que devido a pouca exigência nutricional do gênero *Streptomyces*, este consegue se sobressair sobre os demais actinomicetos e desta forma torna-se o mais freqüente (SARDI *et al.*, 1992; MATSUURA, 2004).

### **5.3. Caracterização da atividade antimicrobiana dos isolados**

Os dois actinomicetos foram testados quanto à capacidade de produzir compostos bioativos com atividade antimicrobiana e ambos mostraram-se ativos contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, com diâmetro do halo de inibição em 9 mm, 7 mm e 8 mm, respectivamente.

Estes resultados corroboram o amplo espectro de ação dos actinomicetos, tanto para bactérias Gram-positivas quanto para bactérias Gram-negativas conforme resultados de MATSUURA (2004) e HUANG *et al.* (2012).

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados ainda são escassos para alguma conclusão definitiva, mas podemos realizar as seguintes inferências:

- Dentre as bactérias comuns, a forma predominante nas raízes de *Pistia stratiotes* são bacilos Gram-positivos;
- Os actinomicetos mostraram-se de baixa frequência em *Pistia stratiotes* quando utilizado o meio de isolamento Ágar Matsuura.





## 8. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. M. de, SILVA, A. C. da & AZEVEDO, J. L. de. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 4, p. 447-451, 2000.

COOMBS, J. T. & FRANCO, C. M. M. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v 69, n. 9, p. 5603-5608, 2003.

GOODFELLOW, M. & WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**. v. 37. p. 189-216, 1983.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T. & WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUANG, X. L., ZHUANG, L., LIN, H. P., LI, J., GOODFELLOW, M. & HONG, K. Isolation and bioactivity of endophytic filamentous actinobacteria from tropical medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 41, p. 9855-9864, 2012.

ICHIKAWA, T., ISHIKURA, T. & OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, p. 218-224, 1971.

JOSEPH, B., SANKARGANESH, P., EDWIN, B. T. & RAJ, S. J. Endophytic Streptomycetes from plants with green chemistry: Review. **International Journal of Biological Chemistry**. v. 6, n. 2, p. 42-52, 2012.

KURYLOWICS, W. **Antibióticos, uma revisão crítica**. Recife: Universitária, 1981. 341 p.

MANGAMURI, U. K., MUVVA, V., PODA, S. & KAMMA, S. Isolation, Identification and Molecular Characterization of Rare Actinomycetes from Malaysian. **Journal of Microbiology**. v. 8, n. 2, p. 83-91, 2012.

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

MURO, M. & LUCHI, M. **Preservação de microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello", 1989.

PHAFF, H. J. **Industrial microorganisms**. Scientific American, v. 295, p. 52-65, 1991.

ROCHA, O. **Macrófitas aquáticas**. Disponível em: <[http://www.ufscar.br/~probio/macrofitas\\_page.html](http://www.ufscar.br/~probio/macrofitas_page.html)>. Acesso em: 01 ago. 2012.

SARDI, P., SARACCHI, M., QUARONI, S., PETROLINI, B., BORGONOV, G. E. & MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2691-2693, 1992.

SEIDL, P. R. The use of biodiversity for sustainable development: investigation of bioactive products and their commercial applications. **Proceedings of Workshop Amazonian Biodiversity**. Manaus, 1993.

SOUZA, A. O. **Bactérias endofíticas de milho (Zea mays L.) e sua variabilidade genética analisada por RAPD**. Dissertação de Mestrado. Piracicaba, 1996.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

## 9. APÊNDICE

### 9.1. Meios de Culturas

#### 9.1.1. Ágar Matsuura

Telurito de potássio.....	1,0g
Amido.....	10,0g
Extrato de levedura.....	4,0g
NaCl.....	5,0g
Glicose.....	5,0g
Triptose.....	5,0g
Ágar.....	20,0g
Água destilada.....	1000,0g

pH 7,0 ~ 7,4

#### 9.1.2. Ágar Extrato de Levedura - Extrato de Malte

Extrato de levedura .....	4,0 g
Extrato de malte .....	10,0 g
Dextrose .....	4,0 g
Ágar .....	20,0 g
Água destilada .....	1000,0 mL

pH 7,1 ~ 7,4

#### 9.1.3. Ágar Nutriente

Peptona .....	10,0 g
Extrato de carne .....	3,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Ágar .....	20,0 g
Água destilada .....	1000,0 mL

pH 6,9 ~ 7,1