



Prospecção de actinomicetos endofíticos em espécies nativas do cerrado

Eloan Mendes Vieira, Ronize Viviane Jorge, João Carlos Gomes Figueiredo, Sergio Avelino Mota Nobre

Introdução

Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de tecidos vegetais, habitando suas partes aéreas como caules e folhas, sem causar dano aos seus hospedeiros. Estes microrganismos se distinguem dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos, que vivem saprofiticamente na superfície dos vegetais.

Os microrganismos de interesse neste estudo é um Filo de bactérias na sua maioria gram-positivas, conhecidas como actinomicetos pertencentes à ordem *Actinomycetales* [1] Estas bactérias têm organização filamentosa, muitas vezes ramificada ou em forma de cachos. Dada sua semelhança com fungos e por produzirem, como estes, cadeias de esporos semelhantes a conídios, os actinomicetos são com frequência erroneamente classificados como tais. Ao contrário dos fungos, porém, são organismos procarióticos, em sua grande maioria aeróbia, mas podendo ser anaeróbios facultativos, podem ser autotróficos ou heterotróficos, em função dos diversos tipos de metabolismo por eles apresentado [2].

Os actinomicetos apresentam características próprias como alto índice de C:G no DNA cromossômico, parede celular composta por peptidoglicana, mureína e ácidos micólicos (critério taxonômico); esporos exógenos e presença de septo transversal.

Os actinomicetos ocorrem amplamente no solo, e agora estudados como endofíticos encontrados também em tecidos vegetais, nos espaços intercelulares ou mesmo intracelulares, onde vivem em simbiose com os hospedeiros onde desempenham relevante papel no controle biológico.

Há também cepas de actinomicetos termofílicos que são promissoras devido à sua capacidade de produzir enzimas estáveis a temperaturas elevadas e em uma ampla faixa de pH [3]. Como podemos notar os *actinomicetos* tem um alto potencial de produzir metabólitos secundários de grande interesse biotecnológico e importância para o ser humano.

Este trabalho teve como objetivo, isolar *actinomicetos* endofíticos, em cultura pura, utilizando diferentes meios seletivos, a partir de plantas do cerrado e composição de uma coleção de isolados com potencial biotecnológico.

Material e Métodos

A. Amostragem

Para o isolamento dos endófitos foram coletadas folhas inteiras e sadias que se mostraram integras e sem ação predatória, tais como: *Acrocomia aculeata* (Macaúba) na



região de MONTES CLAROS-MG no campus da Universidade Estadual de Montes Claros, (UNIMONTES), *Genipa americana* (Jenipapo), *Eugenia dysenterica* (Cagaita), *Solanum lycocarpum* (Lobeira), *Guazuma ulmifolia* Lam (Mutamba), *Caryocar brasiliens* (Pequi), na região de UBAÍ-MG. As amostras foram coletadas aleatoriamente pegando folhas de varias partes da planta em media oito a dez folhas que foram colocadas em sacos plásticos para o transporte.

B. Isolamento dos endofíticos

As folhas coletadas foram lavadas com água destilada estéril (ADE) para remoção da sujidade, em seguida foram cortados dez discos foliares com um cortador estéril, os discos foram desinfetados para a remoção dos microrganismos epífitos, isso foi feito através de imersões em hipoclorito a 2% durante cinco minutos, após isso imerso em álcool 70% por mais cinco minutos e depois lavado três vezes em ADE para a remoção dos agentes desinfetantes, [4].

Logo após a desinfestação, os discos foliares foram macerados em pistilo esterilizado quimicamente com hipoclorito 2% e álcool 70%, o macerado foi suspenso em 10ml de ADE, e foram colocados 200µl da suspensão e distribuídos com a alça de Drigalski em placas de petri contendo os respectivos meios de cultura: Meio Agar amido-amônio nutriente (MAAN) constituído de: Amido 10,0 g, Extrato de levedura 0,5 g, K_2HPO_4 1,0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0 g, NaCl 1,0 g, $CaCO_3$ 3,0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2,0 g, Agar 15,0g e ADE 1000 ml. Ágar Starch-Nitrate-Casein (SCN) constituído de: Amido 10,0g, KNO_3 2,0g, Caseína 0,3g, Cloreto de sódio NaCl 2,0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05g, $CaCO_3$ 0,02g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01g, Agar 20,0g e (ADE) 1000 ml. Ágar M615 constituído de Dextrose $C_6H_{12}O_6$ 50,0 g, $CaCO_3$ 10,0 g, Agar 15,0 g, Leite se soja 332 ml, e ADE 668 ml.

As placas inoculadas foram incubadas, por sete dias, em B.O.D. a 37 °C e as colônias destacadas foram transferidas para placas contendo o meio de cultura de origem. Foram feitos subcultivos até se alcançar culturas purificadas de cada colônia destacada.

C. Conservação

A conservação dos mesmos foi feita através do método Castellane, onde por meio de um cortador estéril foram cortados discos do meio de cultura contendo as colônias, os mesmos foram colocado em solução salina a 0,9% complementada com 40% de glicerol em frascos criogênicos de 5ml e levado ao ultra freezer a -80°C e também foi feita uma conservação com as mesmas soluções que foram levados a -20°C onde serão avaliadas posteriormente a eficiência dos métodos de conservação propostos.

Resultados

O meio que se obteve um maior número de isolados foi o M615 no qual se isolou um total de vinte e três microrganismos seguido do meio MAAN que se obteve um total de treze isolados e por último o meio SCN com um total de sete isolados. Ao levar em consideração as plantas obtiveram-se os seguintes resultados: Macaúba (MEM*) isolou-se um total de nove microrganismos, Cagaita (MEC) doze microrganismos, Lobeira (MEL) cinco microrganismos,



Pequi (MEP) seis microorganismos, Jenipapo (MEJ) nove microorganismos e Mutamba (MEM) dez microorganismos. (Tabela 1)

Ao avaliar os resultados da diversidade biológica em relação a cada planta verificou-se que a Macaúba (MEM*) foi a mais promissora no isolamento de *actinomicetos* com um total de três isolados seguido do Pequi (MEP) e Mutamba (MEM) com dois isolados cada e Lobeira (MEL) com um isolado. As plantas Cagaita (MEC) e Jenipapo (MEJ) não foram promissoras no isolamento de *actinomicetos*. (Tabela 2)

Discussão

A maioria destes microrganismos são aeróbios, entretanto alguns poderão ser anaeróbios facultativos ou obrigatórios. Os actinomicetos são químico-heterotróficos e poderão utilizar uma ampla variedade de fontes de energia, inclusive polímeros complexos, segundo[5].

Conclusão

A eficiência do isolamento variou com o meio de cultura, sendo também variável com as espécies vegetais amostradas. Dentre as espécies que mais contribuiu para os isolamentos obtidos foi a macaúba seguida do pequi e da mutamba. O meio de cultura mais eficiente na prospecção foi o M615.

Referências

- [1] GONZÁLEZ, I. et al. Actinornycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiology Ecology. v.54, p.40-415, 2005.
- [2] USCÁTEGUI-NEGRONA, M.; SERRANO, J. A.; BOIRONB, P.; RODRIGUES-NAVAB, V.; COUBLEB, A.; MONIÉB, D.; HERRERAC, K. S.; SANDOVALC, H.; REVIKINAD, V.; PANIZOD, M. M.; MENDOZAE, M. **Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: um estúdio fenotípico comparativo**. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. n. 29, p. 91-97, 2009.
- [3] RODRIGUES, K. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos**. 2007. f. 79-97. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- [4] WILKINSON, K.G.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. **Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids**. New Phytologist, Cambridge, v.112, n.3, p.429-435, 1989.
- [5] FRANCO, M. N. **Produção de celulasas por actinomicetos em resíduos agro-industriais, visando a obtenção de bioetanol**. 2009. f. 29. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.



Tabela 1. Total de isolados por meios de cultura e por espécies vegetais.

Espécie vegetal	Meio de isolamento			Total
	SCN	M615	MAAN	
Macaúba (MEM*)	2	3	9	14
Cagaita (MEC)	2	7	3	12
Lobeira (MEL)	2	1	2	5
Pequi (MEP)	0	4	2	6
Jenipapo (MEJ)	0	7	2	9
Mutanba (MEM)	3	4	3	10
Total por meio	9	27	15	51

Tabela 2. Diversidade microbiológica referente às espécies vegetais.

<i>Espécies microbiológicas</i>	<i>Diversidade biológica observada</i>			
	<i>Bactérias</i>	<i>Fungos</i>	<i>Leveduras</i>	<i>Actinomicetos</i>
Macauba (MEM*)	3	2	1	3
Cagaita (MEC)	8	2	1	0
Lobo (MEL)	4	0	0	1
Pequi (MEP)	5	0	1	2
Jenipapo (MEJ)	9	0	0	0
Mutanba (MEM)	8	1	0	2
Total de microorganismos	37	5	3	8