



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA
AMAZÔNIA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DO JAMBÚ (*Acmella ciliata* (Kunth) Cass.) PARA CONTROLE
DE MICRORGANISMOS PATÓGENOS

CINTHYA PAOLA ORTIZ OJEDA

MANAUS

2017

CINTHYA PAOLA ORTIZ OJEDA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE PLANTAS DE JAMBU (*Acmella ciliata* (Kunth) Cass.) PARA
CONTROLE DE MICRORGANISMOS PATÓGENOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Orientador: Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio

Co-orientadora: Dr^a. Suanni Lemos de Andrade

MANAUS

2017

RESUMO

A floresta amazônica possui grande biodiversidade de espécies, entre animais, plantas e microrganismos. Muitos destes microrganismos ainda não são conhecidos assim como os potenciais usos e propriedades destes. Entre estes se encontram os microrganismos endofíticos que habitam no interior das plantas, muitos deles apresentando as mesmas propriedades dos hospedeiros. A planta “jambu” *Acmella ciliata* é conhecida por suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas entre outras, e é usada na gastronomia e na medicina natural na região Amazônica. Para o isolamento dos endófitos, primeiro foi realizada a desinfecção superficial dos galhos e folhas da planta *Acmella ciliata*, para semear e incubar posteriormente os pedaços deste material vegetal durante 15 dias a 28°C. Os microrganismos isolados foram avaliados em ensaios de antagonismo (*Fusarium decemcellulare* e *Colletotrichum gloeosporioides*) e atividade antimicrobiana (*Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*). Foram isolados um total de 104 microrganismos endofíticos (fungos filamentosos, bactérias e leveduras), deste universo, 22 fungos filamentosos e 16 bactérias apresentaram inibição de crescimento dos fitopatógenos, e seis bactérias apresentaram atividade antimicrobiana para *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*. Evidenciou-se que os microrganismos endofíticos isolados da planta *Acmella ciliata* produzem metabólitos com atividade antimicrobiana e antifúngica.

ABSTRACT

The Amazon rainforest has great biodiversity of species, including animals, plants and microorganisms. Many of these microorganisms are not yet known, as well as some of the potential uses and properties of these. Among these are the endophytic microorganisms who live inside the plants, many of them showing the same properties of the host. The plant "jambu" *Acmella ciliata* is known for its antimicrobial, antifungal properties among others, and is used in food and natural medicine in the Amazon region. For the isolation of endophytes, first held low-level disinfection of the twigs and leaves of the plant *Acmella ciliata*, sow and incubate the pieces of this plant material during 15 days at 28°C. The isolated microorganisms were evaluated in trials of antagonism (*Fusarium decemcellulare* and *Colletotrichum gloeosporioides*) and antimicrobial activity (*Streptococcus pyogenes* and *Candida parapsilosis*). A total of 104 were isolated endophytic microorganisms (bacteria, filamentous fungi and yeasts), of this universe, 22 filamentous fungi and 16 bacteria showed inhibition of growth of plant pathogens, and six bacteria showed antimicrobial activity for *Streptococcus pyogenes* and *Candida parapsilosis*. Was shown that the endophytic microorganisms isolated from plant *Acmella ciliata* produce metabolites with antimicrobial and antifungal activity.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Gêneros dos fungos endofíticos isolados com bioatividade.....	26
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Colônia primaria de fungos endofíticos isolados.....	24
Figura 2: Fungos endofíticos isolados com diferentes morfologias.....	24
Figura 3: Vista ao microscópio (40X) do micro-cultivo dos fungos endofíticos..	25
Figura 4: Inibição de crescimento de <i>C. gloeosporioides</i> e <i>F. decemcellulare</i> pelos fungos endofíticos.....	27
Figura 5: Índices de antagonismo dos fungos endofíticos no pareamento com <i>C. gloeosporioides</i> e <i>F. decemcellulare</i>	28
Figura 6: Cambio na coloração do micélio e inibição de crescimento de <i>F. decemcellulare</i>	29

CAPÍTULO II

Figura 1: Crescimento de bactérias endófitas.....	42
Figura 2: Antagonismo das bactérias endófitas contra fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i>	43
Figura 3: Antagonismo das bactérias endófitas contra fitopatógeno <i>F. decemcellulare</i>	44
Figura 4: Índices de antagonismo das bactérias endofíticas isoladas no pareamento com fitopatógenos <i>C. gloeosporioides</i> e <i>F. decemcellulare</i>	46
Figura 5: Inibição de crescimento de <i>S. pyogenes</i>	47
Figura 6: Comparação da ZA na inibição de crescimento de <i>S. pyogenes</i>	48
Figura 7: Inibição de crescimento de <i>C. parapsilosis</i>	49
Figura 8: Comparação da ZA na inibição de crescimento de <i>C. parapsilosis</i> ...	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
2. REFERENCIAL TEÓRICO
 - 2.1 *Acmella ciliata* (Kunth) Cass.
 - 2.2 Microrganismos endofíticos
 - 2.3 Atividade antimicrobiana
 - 2.4 Controle biológico
3. OBJETIVO GERAL
 - 3.1 Objetivos Específicos
- CAPITULO I
- CAPITULO II
4. DISCUSSÃO GERAL
5. CONCLUSÃO GERAL
6. REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande parcela da biodiversidade mundial, a qual se encontra localizada principalmente na floresta Amazônica, que é a maior fonte de matérias-primas. Esta diversidade biológica está composta por espécies de plantas, animais e microrganismos, muitos deles pouco conhecidos, como é o caso principalmente dos microrganismos (SOUZA *et al.*, 2004). Dentro desta diversidade biológica existem plantas que têm propriedades de interesse para as comunidades indígenas, a sociedade e o setor industrial. Uma destas plantas é a *Acmella ciliata*, conhecida comumente como “planta da dor de dente” ou “jambú”. É uma erva importante da família Asteraceae, conhecida por suas propriedades antiinflamatórias (DAISY *et al.*, 2013) e antibacterianas (SILVA *et al.*, 2014).

Segundo RANI e MURTY (2006), “a família Asteraceae é uma das maiores famílias de plantas vasculares, contendo 30.000 espécies e mais de 1100 gêneros. A maioria das plantas pertencente a esta família possui atividade antimicrobiana devido à presença do metabólito secundário sesquiterpeno”. Existem estudos onde foi observado que o gênero *Acmella* possui atividade antifúngica, antifitopatogênica, inseticida e antimicrobiana (MORENO *et al.*, 2012; RANI e MURTY, 2006; PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2009; RINCÓN *et al.*, 2012; DAISY *et al.*, 2013).

Foram realizados estudos onde se estudaram os microrganismos endofíticos que habitam plantas com propriedades medicinais ou antimicrobianas, devido aos supostos benefícios provenientes da interação hospedeiro-microrganismo, inclusive muitas substâncias com interesse econômico foram encontradas nessas plantas e também foram isoladas de seus endófitos (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Os microrganismos endofíticos, segundo PETRINI (1991), colonizam os tecidos saudáveis da planta em algum tempo do seu ciclo de vida sem lhes causar danos aparentes. Os microrganismos endofíticos têm um alto potencial para ser usados na agricultura e na indústria por possuírem características de inibição de patógenos como *Fusarium* sp. (MELLO *et al.*, 2010), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SOUZA *et al.*, 2013), produzir

metabólitos bioativos com atividade contra fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e antitumoral contra tumor cervical humano (HeLa) (ZANARDI *et al.*, 2012) entre outras.

Porém, apesar de que os microrganismos endófitos presentes no jambu (*Acmella ciliata*) provavelmente possuem o mesmo potencial antifúngico, antibacteriano, antifitopatogênico e inseticida que seu hospedeiro tem, não existem na literatura estudos sobre o potencial biotecnológico dos endófitos dessa planta da Amazônia. Neste contexto, pretende-se avaliar o potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos isolados da *Acmella ciliata*, para possível aplicabilidade destes no sector agroindustrial procurando-se a descoberta de microrganismos com características antifitopatogênicas para poder ser utilizado nas correntes de produção orgânica e tradicional da agricultura e assim evitar o uso indiscriminado de produtos químicos que contaminam e degradam o meio ambiente.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Tanto as plantas como os animais precisam de capacidades para se adaptar ao meio ambiente onde habitam, e assim ter sucesso na perpetuação da sua espécie. No caso das plantas, estabelecem associações com diferentes organismos para conseguir proteção e a cambio brindam outros benefícios aos seus inquilinos. Um desses exemplos de associação ocorre entre microrganismos que habitam dentro delas e a cambio eles produzem compostos que ajudam na sanidade e crescimento da planta (NETO *et al.*, 2002)

2.1 *Acmella ciliata* (Kunth) Cassini

A planta do “jambu” (*Acmella ciliata*) pertence à família das Asteraceae. Segundo RANI e MURTY (2006), “a família Asteraceae é uma das maiores famílias de plantas vasculares, contendo 30.000 espécies e mais de 1100 gêneros. A maioria das plantas pertencentes a esta família possuem atividade antimicrobiana devido à presença do metabólito secundário sesquiterpeno”.

O gênero *Acmella* está composto por 30 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (JANSEN, 1985). As plantas deste gênero são conhecidas por seu uso na medicina natural para aliviar a dor de dente e infecções de garganta e gengivas.

A planta *Acmella ciliata* (Kunth) Cass., uma das espécies pertencentes a este gênero, é uma erva perene, nativa da parte norte de América do Sul, e é naturalizada no Celebes, Índia, Sumatra e Tailândia. Possui flores durante toda época do ano, é encontrada em ambientes úmidos e onde tem presença de outras ervas, geralmente encontra-se aos lados de estradas e caminhos, campos cultivados e áreas montanhosas (DAS 2013). Antigamente foi classificada erroneamente como *Spilanthes ciliata*. Esta planta é nativa da parte norte de América do Sul e naturalizada no Celebes, Índia, Sumatra e Tailândia (JANSEN 1985, CHUNG *et al.*, 2008).



Figura: *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. (Fonte: Gurcharan Singh, Fotografada no Herbal Garden, Yamuna Nagar, Delhi)

A planta *Acmella ciliata*, é conhecida como planta medicinal pelas suas propriedades antibacterianas, essa característica foi evidenciada num ensaio onde foram testados os estratos metanólicos da planta contra os patógenos *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, resultando na inibição do crescimento destes (DAISY et al., 2013). Esta planta é utilizada geralmente contra qualquer tipo de inflamação (SILVA et al., 2014).

No trabalho realizado por RINCÓN e colaboradores (2012), foi extraído o óleo essencial das flores e folhas da *Acmella ciliata*, tendo como característica pH azedo, sendo isso um fator importante para ter uma atividade antibacteriana. Depois de uma análise química, se encontraram maioritariamente os compostos trans- β -cariofileno, D-germacreno e óxido de cariofileno. Finalmente se comprovou que o óleo possuía atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebisella ozaenae* e *Candida albicans*. Assim mesmo, DUARTE et al., (2005) comprovou que os compostos trans-

β -cariofileno, D-germacreno e óxido de cariofileno possuem uma forte atividade anti-*Candida*.

Existem vários estudos realizados com plantas do gênero *Acmella* onde foram evidenciadas propriedades contra doenças em humanos e plantas. Por exemplo, MORENO e colaboradores (2012) encontraram que o extrato da planta *Acmella oleracea* pode ser usado como inseticida para o controle da praga *Tuta absoluta* em cultivos convencionais e orgânicos, PRACHAYASITTIKUL e colaboradores (2009) demonstraram a existência de compostos bioativos presentes em *Spilanthes acmella* com efeitos antioxidantes, vasorelaxantes e atividades antimicrobianas incluindo seus efeitos relacionados. RANI e MURTY (2006) demonstraram que as flores de *S. acmella* possuem atividade antifúngica contra muitos patógenos humanos e fitopatógenos. Finalmente, THOMPSON e colaboradores (2012) obteve evidência que *Acmella oleracea* tem a capacidade de inibir o crescimento das bactérias responsáveis pelas caries dentais.

2.2 Microrganismos endofíticos

Os endófitos são microrganismos que habitam o interior das plantas em pelo menos um período de seu ciclo de vida e sem causar algum prejuízo aparente (AZEVEDO *et al.*, 2000). Estes microrganismos endofíticos (fungos e bactérias) conferem características importantes como: resistência às condições de estresse, alteração das propriedades fisiológicas, produção de metabólitos de interesse biotecnológico, entre outros (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Acredita-se que maneira de penetrarem nas plantas é através de aberturas naturais e ferimentos. Uma das mais utilizadas é pelas raízes; o surgimento destas resulta em uma abertura, que serve como entrada para os microrganismos. Além disso, o crescimento das raízes, na fricção com o solo, gera abrasões que facilitam a entrada de microrganismos (SANTOS e VARAVALLLO, 2011). Outra entrada comum é através dos estômatos das folhas, que são aberturas naturais presentes nas plantas (AZEVEDO, 1998;

SANTOS e VARAVALLO, 2011). Se vem evidenciado através dos anos a presença dos endófitos em diferentes tipos de plantas medicinais, ervas, árvores frutais, plantas domesticadas e selvagens (CHRISTINA *et al.*, 2013).

A relação entre o microrganismo e a planta favorece o surgimento de novas vias metabólicas, portanto, uma ampla produção de metabólitos bioativos. É por isso que os microrganismos endofíticos são considerados como uma fonte promissora de compostos de interesse para medicina, agricultura e outros setores da indústria (CANUTO *et al.*, 2012).

Devido a colonização de microrganismos endofíticos nos nichos ecológicos semelhantes aos que habitam os fitopatógenos, então, é possível uma interação entre eles, surgindo a competição do espaço físico e com isso se converter em uma ferramenta potencial para o controle das doenças causadas por fitopatógenos na agricultura (LACAVA *et al.*, 2006). Trivedi *et al.* (2010) também evidenciou que ocorre uma competição entre patógenos e microrganismos associados com a planta, resultando isso em uma mudança na composição da população microbiana.

Por estas características dos endófitos, vem sendo realizados vários estudos onde foram comprovadas as capacidades como biocontroladores de doenças em plantas e como produtores de compostos bioativos para ser usados em outros ramos da indústria. Por exemplo, estudos comprovam a ação antifitopatogênica de alguns microrganismos, como é no caso do Mello *et al.* (2010), onde verificaram que bactérias e fungos endofíticos (*Curvularia* sp.) isolados de milho crioulo inibem, *in vitro*, o crescimento do fitopatógeno *Fusarium* sp.

Num outro estudo, realizado por SELIM *et al.* (2011), com os endófitos isolados de plantas (entre eles *Acremonium* sp. e *Aspergillus* sp.) medicinais do Egito, acharam que o 55,5% dos isolados totais (99) obtiveram resultados positivos para a inibição de microrganismos patógenos *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

subtilis, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Alcaligenes faecalis*. Ding et al (2011) isolaram a bactéria endofítica *Streptomyces* sp. (HKI0595) presente na árvore *Kandelia candel*, encontrada na parte sul do continente asiático. Após da produção a escala por fermentação, achou-se que a bactéria produz quatro compostos indolesquiterpenos onde três deles (xiamicina, indosispeno e sespenina) apresentaram atividade antibacteriana contra os patógenos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium vaccae*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina. Mais um trabalho realizado por Jalgaonwala et al (2010) comprovou a presença de microrganismos endófitos no interior de várias espécies de plantas medicinais nativas da Índia tais como *Curcuma longa*, *Eucalyptus globulus*, *Aloe vera* entre outras. Estes microrganismos apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana contra os patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *A. avamori*, *Trichoderma konningi*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium fumicalsuri*.

Em trabalhos realizados com plantas encontradas na região amazônica, encontramos que Banhos et al (2014) isolaram 46 fungos endofíticos da planta *Myrcia guianensis*, dos quais, os extratos brutos de quatro destes apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Penicillium avellaneum*. Consta num outro trabalho realizado com a planta nativa da América do Sul, *Bauhinia forficata*, planta usada na medicina natural no Brasil. Desta, foram isolados um total de 95 fungos endofíticos de 28 espécies diferentes, destacando *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Myrothecium* sp., destes somente 11 apresentaram atividade antibacteriana, inibindo os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas vulgaris* e *Escherichia coli*, alguns dos fungos endofíticos tiveram a capacidade de inibir a mais de um patógeno (BEZERRA et al., 2015).

Existem um grande número de plantas usadas na medicina natural, especialmente na região Amazônica, que ainda não foram estudadas pelos endófitos que habitam nelas, sendo assim, estas representam uma grande probabilidade de achar microrganismos que produzam novos antibióticos e antifúngicos (CHRISTINA *et al.*, 2013).

2.3 Atividade antimicrobiana

A superpopulação do mundo é um problema que vem sendo cada vez mais preocupante, já que isso leva, além da escassez de recursos, a aparição de novas doenças e perigos para a saúde humana (CHRISTINA *et al.*, 2013). A busca de novos agentes antimicrobianos vem sendo uma linha de pesquisa muito procurada e onde vem adquirindo maior importância pelo surgimento de patógenos cada vez mais resistentes aos antibióticos atualmente usados. A resistência aos antibióticos está aumentando mundialmente, isso põe em perigo nossa capacidade para tratar as doenças mais comuns como a pneumonia, tuberculose, septicemia ou gonorreia (OMS 2016). É por esse motivo que a busca de novas fontes de antimicrobianos tem sido importante e de grande interesse mundial.

A busca de novos agentes antimicrobianos é feita principalmente nas plantas e nos microrganismos que estão associados a elas. Incluso existem gêneros de microrganismos que são considerados como comuns e embora apresentam características potenciais para ser utilizados na obtenção de novos metabólitos antimicrobianos, como no caso de *Preussia* sp. que é um microrganismo comumente achado no meio ambiente, achou-se que alguns microrganismos pertencentes a este gênero, que foram isolados de bosque seco australiano, produzem metabólitos derivados de poliquetidos com bioatividade contra *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, MRSA e *Candida albicans* (MAPPERSON *et al.*, 2014).

2.4 Controle biológico

O uso de organismos vivos que têm a capacidade de competir com outros organismos nocivos para os cultivos agrícolas é definido como Controle Biológico (MONARCO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2009). Também,

segundo MAKI (2006), “o controle biológico é a regulação de populações de organismos vivos como um resultado de interações antagônicas como parasitismo, predação e competição”. O Controle Biológico é uma estratégia usada tanto em sistemas agroecológicos como também na agricultura convencional baseada no Manejo Integrado de Pragas (MIP) (ROCHA *et al.*, 2009). Pelo anteriormente mencionado, o controle biológico é uma boa alternativa para o manejo sustentável na agricultura.

O uso de Agentes de Controle Biológico (ACB) é uma boa alternativa para ser usada no controle de pragas nos cultivos (VRIJE *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2009). O Controle Biológico dos fitopatógenos, e de outras doenças nas plantas, é buscado geralmente usando microrganismos específicos ou introduzindo microrganismos especificamente selecionados nos sistemas das plantas (ROCHA *et al.*, 2009).

As plantas amazônicas, pela diversidade de estas, têm um alto potencial de ser hospedeiras de microrganismos que possuam capacidades e características importantes para serem aproveitadas pelo sector agrícola, isso através da descoberta de novos metabólitos com atividade para combater fungos e bactérias fitopatogênicos (BANHOS *et al.*, 2014). O trabalho realizado por Hanada *et al.* (2010) com plantas de *Theobroma cacao* (cacao) e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), objetivou isolar fungos endofíticos e verificar e comprovar suas características como biocontroladores da doença ocasionada pelo fitopatógeno *Phytophthora palmivora*, responsável de muitas perdas e baixos rendimentos nestes cultivos. Se isolaram um total de 160 endófitos das duas espécies, mas somente foi possível trabalhar com 103 isolados por problemas de viabilidade e falta de esporulação dos outros isolados. Os principais gêneros achados foram Trichoderma, Pestalotiopsis e Fusarium para cacao, e para cupuaçu só se acharam os gêneros Acremonium, Asteromella, Lasiodiplodia, Pestalotiopsis e Phoma. Somente 74 isolados do total de testados apresentaram algum grau de redução na severidade da doença.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos do jambu (*Acmella ciliata* (Kunth) Cass.) para ser usados como agentes de controle de patógenos.

3.1 Objetivos específicos

- Isolar os fungos e as bactérias endofíticas presentes na planta *Acmella ciliata* (Kunth) Cass.
- Avaliar a atividade antifitopatogênica, contra *Fusarium decemcellulare* e *Colletotrichum gloeosporioides*, dos fungos e bactérias endofíticas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana, contra *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*, de fungos e bactérias endofíticas.
- Identificar as bactérias e os fungos capazes de inibir os microrganismos patógenos e fitopatógenos

CAPÍTULO I

**Avaliação da atividade antimicrobiana dos
fungos endofíticos isolados da *Acmella ciliata*
contra *Fusarium decemcellulare* e
*Colletotrichum gloeosporioides***

Identificação e avaliação da atividade antifitopatogénica dos fungos endofíticos isolados da *Acmella ciliata* contra *Fusarium decemcellulare* e *Colletotrichum gloeosporioides*

Ortiz P.¹, Andrade S. L.¹, Procópio R.L.¹

(1) Universidade do Estado do Amazonas

Resumo

O Brasil, especificamente a floresta Amazónica, possui uma grande parcela da biodiversidade mundial, entre animais, plantas e microrganismos. A planta “jambu” *Acmella ciliata*, por suas propriedades antibacterianas, pode ser um hospedeiro promissório para albergar endófitos com bioatividade. O estudo dos microrganismos que habitam o interior das plantas (endófitos) tem adquirido maior importância por seu potencial para produzir metabólitos bioativos. O objetivo do trabalho foi isolar fungos endofíticos da planta jambu e avaliar sua capacidade de inibir patógenos. Foram isolados 56 fungos endofíticos da *A. oleracea* depois de uma desinfecção superficial, a maioria provenientes das folhas. Seguidamente, os fungos diferentes, foram testados num ensaio de pareamento contra os fitopatógenos *Fusarium decemcellulare* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Se obteve que o 39,29% dos isolados apresentou inibição do crescimento nos fitopatógenos, alcançando valores de IA (índice de antagonismo) mais altos contra *F. decemcellulare*. No pareamento com *C. gloeosporioides*, o fungo UEA246 obteve o maior IA (80,36%), e nos ensaios com *F. decemcellulare*, o maior IA o apresentou o fungo UEA212 (75,33%). A identificação dos endófitos com bioatividade através do micro-cultivo evidenciou quatro gêneros: *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus niger* e *Acremonium* sp. Os resultados obtidos dos ensaios de pareamento demonstraram que os fungos endofíticos isolados de *Acmella oleracea* possuem um potencial para ser utilizados no biocontrole para combater os fitopatógenos *Fusarium decemcellulare* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Palavras chave: endofíticos, inibição, fitopatógenos

1. INTRODUÇÃO

A floresta amazônica apresenta uma grande parcela de toda diversidade mundial, sendo uma das maiores fontes de matérias-primas. Esta diversidade biológica está composta por espécies de plantas, animais e microrganismos, muitos deles pouco conhecidos, como é o caso principalmente dos microrganismos (SOUZA *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, se vem realizando estudos com a microfauna que habita no interior das plantas. Estes microrganismos são conhecidos como endofíticos. Os microrganismos endofíticos, segundo PETRINI (1991), colonizam os tecidos saudáveis da planta em algum tempo do seu ciclo de vida sem lhe causar danos aparentes. Sabe-se que os endófitos que habitam plantas com propriedades medicinais ou antimicrobianas de maneira geral compartilham as mesmas propriedades que seus hospedeiros, devido aos supostos benefícios provenientes da interação hospedeiro-microrganismo (AZEVEDO *et al.*, 2000). Os microrganismos endofíticos têm um alto potencial para ser usados na agricultura e na indústria por possuir características de inibição de patógenos como *Fusarium* sp. (MELLO *et al.*, 2010), *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* (SOUZA *et al.*, 2013), produzir metabólitos bioativos com atividade antifitopatogênica e antitumoral (ZANARDI *et al.*, 2012).

A “jambu”, é uma erva importante da família Asteraceae, usada na gastronomia e na medicina natural da região amazônica. A maioria das plantas pertencentes a esta família possui atividade antimicrobiana (RANI e MURTY, 2006). Existem estudos onde foi observado que *Acmella ciliata* e outras plantas deste gênero possuem atividades antibacterianas (RINCÓN *et al.*, 2012), antifitopatogênica (RANI e MURTY, 2006), inseticida e antimicrobiana (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2009).

Porém, apesar de que os microrganismos endófitos presentes na *Acmella ciliata* provavelmente possuem o mesmo potencial

antimicrobiano que seu hospedeiro, não existe na literatura estudos sobre o potencial biotecnológico dos endófitos dessa planta. Neste contexto, pretende-se avaliar o potencial biotecnológico quanto a atividade antimicrobiana dos microrganismos endofíticos isolados da *Acmella ciliata*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de biotecnologia do Programa do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (PPGMBT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus-Brasil.

Material vegetal

Foram selecionados aleatoriamente 5 indivíduos sadios da planta “jambu”, obtidas da feira de produtores de Autazes-Amazonas (3°57'97" S, 59°13'06"). A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Ramos J. F. e uma exsicata (OJEDA, CPO 1, tombo INPA N° 274113) encontra-se depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa Amazônica (INPA), Amazonas-Manaus, Brasil.

Isolamento dos endófitos

De cada planta, foram selecionadas aleatoriamente seis folhas e seis pedaços de caule, duas do extremo superior da planta, duas do meio e duas do extremo inferior, foram um total de 30 folhas e 30 caules. O material botânico coletado da foi processado no prazo de 24 horas. A superfície do material vegetal foi lavada com água corrente para retirar os microrganismos epifíticos e a sujeira da planta. Depois foi esterilizado por imersão em etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2-2,5% por 4 minutos e etanol 70% por 30 segundos. O material vegetal foi submergido em água destilada estéril três vezes por 1 minuto cada vez, da qual uma alíquota será semeada em meio de cultura BDA e TSA para fazer o controle da assepsia (PIMENTEL *et al.*, 2006). Seis fragmentos de folha e caule (5 x 5 mm) foram cortados para isolamento dos endófitos. Os fragmentos foram

colocados em placas Petri contendo BDA (Batata Dextrose Agar acrescido com 100 µg/ml Cloranfenicol para evitar o crescimento de bactérias) e foram incubadas a 28°C entre sete até 15 dias.

Identificação dos fungos

Para a identificação taxonômica clássica dos fungos endófitos, foi realizado através de micro-cultivo (KERN *et al.*, 1999, SBRAVATTI *et al.*, 2013) dos isolados selecionados. Estes foram depois identificados pela Dra. Ana Claudia Cortez (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia).

Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos dos endófitos

Foram escolhidos os fungos com características morfológicas diferentes, cultivados em placas de Petri com meio BDA, foram semeadas alíquotas destes microrganismos em 50 mL de BD a 28°C, a 120 r.p.m., entre 24 e 72 horas. Foi separada a biomassa do líquido metabólico por filtração e finalmente armazenado a 4°C, obtendo-se os extratos brutos de cada endófito. Em triplicata, se avaliou a antibiose dos metabólitos extracelulares contra *Candida parapsilosis* e *Streptococcus pyogenes*. Os microrganismos-teste foram cultivados em meios líquidos, e semeados em placas Petri contendo o meio específico para cada um deles a uma concentração aproximada de 10⁸ células/mL. Foram vertidos 100 µL do líquido metabólico em poços de 8 mm de diâmetro seguindo-se a incubação por 24-72 horas (KAWAMOTO e LORBEER, 1976; SOUZA *et al.*, 2004).

Determinação de atividade antifitopatogênica dos endófitos

Os fungos fitopatógenos teste foram doados pelo Dr. Rogério Hanada, pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisa Amazônica (INPA). O ensaio foi realizado em meio BDA, onde foram inoculados discos de 0,5 cm de diâmetro, dos fungos endófitos e dos fitopatógenos teste *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium*

decemcellulare, em placas de Petri. A distância entre o fitopatógeno e o fungo endofítico foi de 4 cm. Como controle negativo colocou-se um disco do patógeno e um disco de BDA na mesma distância. A incubação foi a 28°C durante 14 dias em triplicata. Os diâmetros dos fungos foram medidos com um dia de intervalo, até que os fungos do controle negativo alcançarem a borda da placa. O índice de antagonismo (IA) será calculado segundo a fórmula (CAMPANILE *et al.*, 2007).

$$AI = \left(\frac{(RM - rm)}{RM} \right) * 100$$

Onde:

rm = raio da colônia em direção ao antagonismo.

RM = meio dos raios nas outras três direções.

Dos resultados obtidos, será avaliada a habilidade antagonista usando uma escala com três tipos de reações (A, B, C) e 4 subtipos (CA1, CB1, CA2 e CB2), sendo, o tipo A e B de inibição mútua (onde nenhum dos dois microrganismos cresceu sobre o outro), A com contato de micélios e B a distância. O tipo C é de substituição sem inibição inicial. Os subtipos CA1 e CA2 indicam substituição parcial e completa, respectivamente, com contato de micélios. E os subtipos CB1 e CB2 substituição parcial e completa, respectivamente, depois de inibição à distância (BADALYAN *et al.*, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento de fungos endofíticos

Foi isolada uma totalidade de 56 fungos endofíticos a partir dos 480 fragmentos de folha e caule, onde o 67,86% foram obtidos das folhas e só o 32,14% dos caules (Figura 1). A diferença da quantidade de isolados entre estas duas partes da planta pode ser devido à presença dos estômatos das folhas que podem significar uma entrada natural dos microrganismos (AZEVEDO, 1998; SANTOS e

VARAVALLO, 2011). Foi obtido um resultado similar no trabalho de SOUZA *et al* (2004), onde isolaram fungos endófitos de plantas tóxicas da Amazônia (*Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*), com a maior frequência de microrganismos obtidos das folhas, em comparação com a quantidade de microrganismos obtidos do caule e raiz.

Deste total de isolados, se selecionaram 28 fungos diferentes em relação às diferenças nas características morfológicas (cor da colônia, consistência, pigmentação, bordas, topografia e aspecto) que apresentaram entre eles (Figura 2). Através do micro-cultivo foram identificados principalmente quatro gêneros: *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Acremonium* sp. e *Aspergillus* sp. (Figura 3).

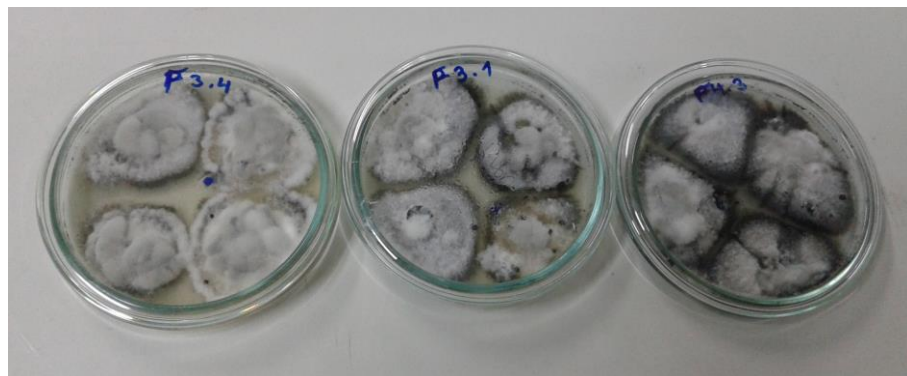


Figura 1: Colônia primaria de fungos endofíticos isolados.

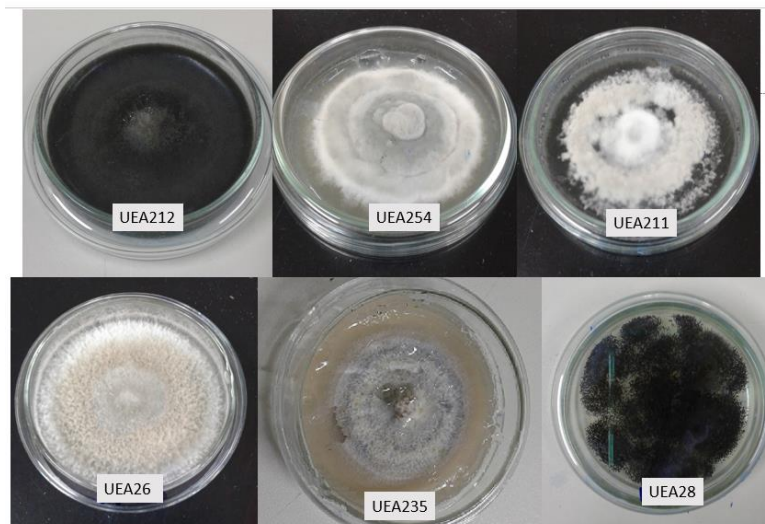


Figura 2: Fungos endofíticos com diferentes morfologias.

Existem estudos onde se trabalharam com estes quatro gêneros, o qual demonstra a bioatividade destes. Um deles foi o estudo com *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Piper nigrum* L. demonstrou a produção do metabólito piperina com atividade antifúngica, antibacteriana, inseticida entre outras (CHITHRA *et al.*, 2014). No caso do *Curvularia* sp., foi evidenciado que este gênero, isolado da planta do gênero *Garnicia*, possui bioatividade para inibir *Mycobacterium tuberculosis* (PHONGPAICHIT *et al.*, 2007). ANISHA e RADHAKRISHNAN (2015) isolaram de *Zingiber officinale* (gingibre) o fungo endofítico *Acremonium* sp. e foi demonstrada a atividade inibitória de crescimento do fungo fitopatógeno *Pythium myriotylum* responsável das maiores perdas no cultivo de gengibre. Finalmente para o gênero *Aspergillus* sp., achou-se o fungo endofítico *Aspergillus niger* isolado de *Rosa damacena* (rosa) produz o metabólito 2-feniletanol que é usado na indústria farmacêutica como antimicrobiano, antisséptico e desinfetante (WANI *et al.*, 2010).

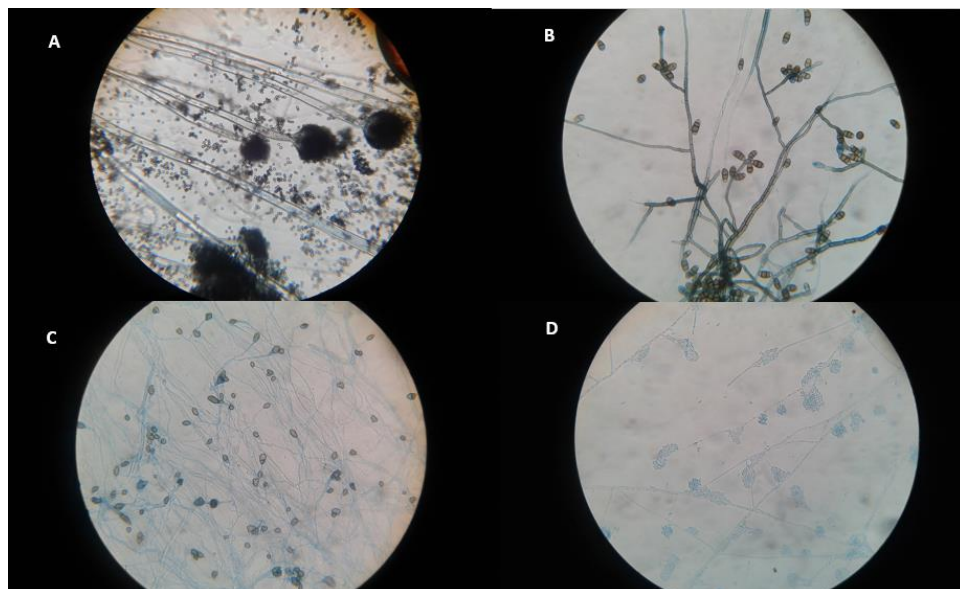


Figura 3: Vista ao microscópio (40X) do micro-cultivo dos fungos endofíticos. A: *Aspergillus niger*; B: *Curvularia* sp.; C: *Colletotrichum* sp.; D: *Acremonium* sp.

Atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos

Depois do tempo de incubação (72 horas) no meio de cultura contendo os microrganismos teste, *Candida parapsilosis* e *Streptococcus pyogenes*, observou-se que nenhum líquido metabólico, obtido da filtração da biomassa de cada um dos 28 fungos escolhidos, apresentou atividade positiva para a inibição do crescimento da bactéria *Streptococcus pyogenes*, nem para a levedura *Candida parapsilosis*. Porém, no estudo de SOUZA e colaboradores (2004), um ensaio antimicrobiano realizado com os extratos brutos de fungos endofíticos isolados de plantas amazônicas, uma porcentagem destes isolados apresentaram atividade antagônica contra os patógenos *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Aspergillus flavus*.

Bioatividade contra *Fusarium decemcellulare* e *Colletotrichum gloeosporioides*

Dos 28 fungos endofíticos testados em enfrentamento de colônias versus os fungos fitopatogênicos *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare*, o 78,57% (Tabela 1) deles apresentaram inibição no ensaio de pareamento (Figura 4).

Tabela 1: Gêneros dos fungos endofíticos isolados com bioatividade.

GÊNERO	CÓDIGO
<i>Curvularia</i> sp.	UEA21
	UEA23
	UEA24
	UEA212
<i>Colletotrichum</i> sp.	UEA25
	UEA26
	UEA27
	UEA218
	UEA222
	UEA227
	UEA229
	UEA230
	UEA234
	UEA241
UEA249	

	UEA253
<i>Aspergillus niger</i>	UEA28
	UEA231
<i>Acremonium</i> sp.	UEA255
	UEA235
Não esporulou	UEA246
	UEA256

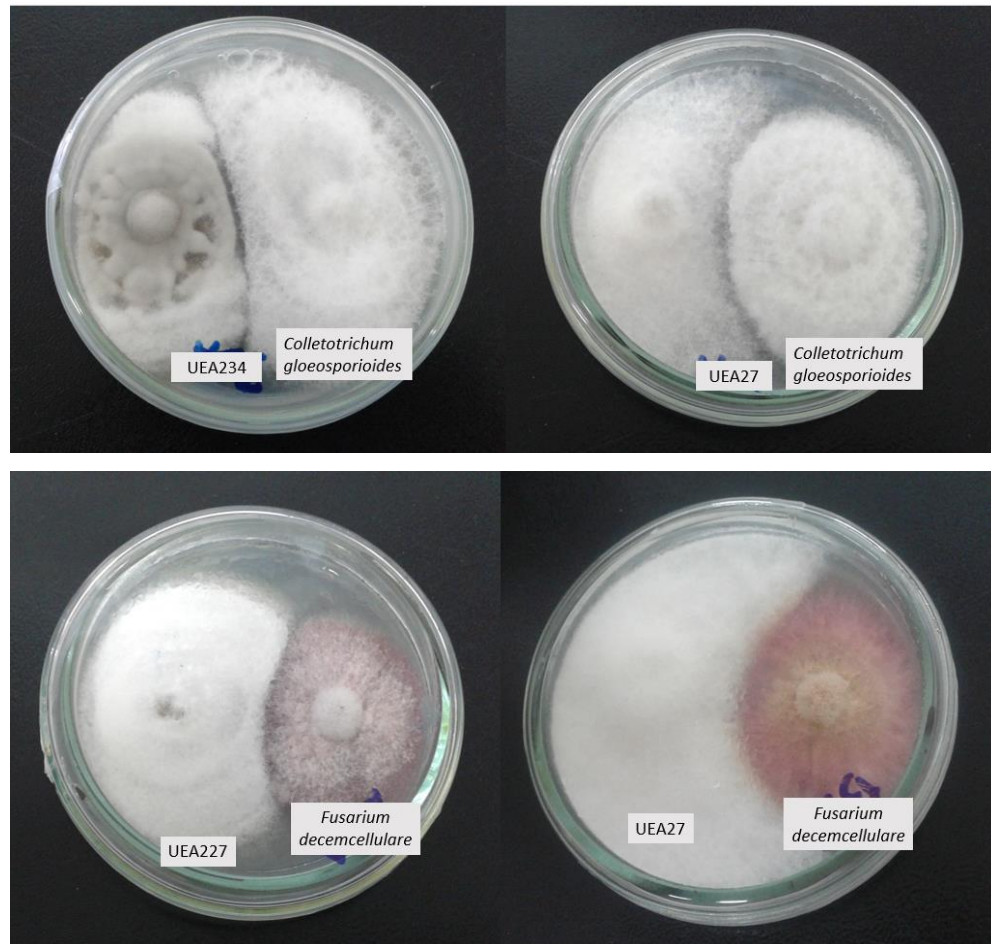


Figura 4: Inibição de crescimento de *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare* pelos fungos endofíticos.

No enfrentamento contra o *C. gloeosporioides*, o fungo endofítico UEA246 apresentou o maior índice de antagonismo (IA) obtendo 80,36% de inibição, e aquele que apresentou o menor índice de antagonismo foi UEA235 com 17,14% de IA. No caso dos enfrentamentos contra *F. decemcellulare*, o fungo endofítico UEA212 obteve um IA de 75,33%, sendo o maior IA apresentado para estes

pareamentos; o fungo endófito UEA235 obteve o menor IA alcançando um valor de 8,26%.

O 81,81% dos fungos endófitos com atividade de inibição positiva, obtiveram índice de antagonismo maior nos pareamentos contra o fitopatógeno *F. decemcellulare* em comparação com os valores obtidos nos pareamentos contra *C. gloeosporioides* (Figura 5). Em estudos prévios de inibição do crescimento do fitopatógeno *C. gloeosporioides*, achou-se que um dos endófitos, isolados da semente de guaranazeiro, obteve um IA de 52,41% (SILVA, 2015), sendo esse valor o máximo obtido entre todos os endófitos isolados. Em comparação com os resultados obtidos no presente trabalho, se evidencia que o maior IA superou quase o dobro o IA achado no trabalho de SILVA (2015).

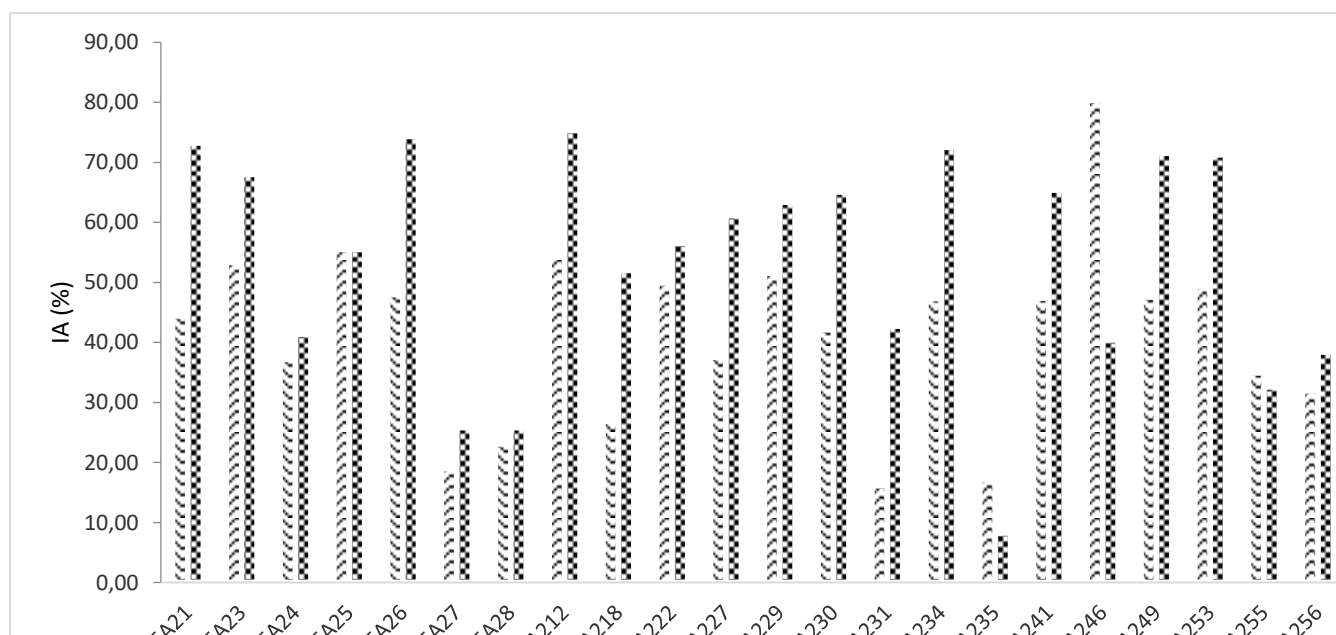


Figura 5: índices de antagonismo dos fungos endófitos no pareamento com *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare*. IA: Índice de antagonismo.

A os quatro dias de iniciado o ensaio de pareamento entre *F. decemcellulare* com os endófitos UEA21, UEA23, UEA24, UEA25, UEA27, UEA28, UEA210, UEA212, UEA214, UEA229 e UEA253, o fitopatógeno mudou a coloração rosa por uma coloração amarela (Figura 6), isso pode acontecer devido à produção de algum composto, por parte dos endófitos, que ocasionam essa

descoloração. Num estudo com bactérias endófitas isoladas de *Echinodorus scaber*, foi obtida a inibição de fitopatógenos, entre eles *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*, além da inibição do crescimento se observou a alteração na coloração do micélio, acredita-se que isso acontece devido a que na confrontação com os endófitos ocorre uma vacuolização e ruptura celular ocasionando esse efeito no micélio dos fungos (SOUZA et al., 2015).

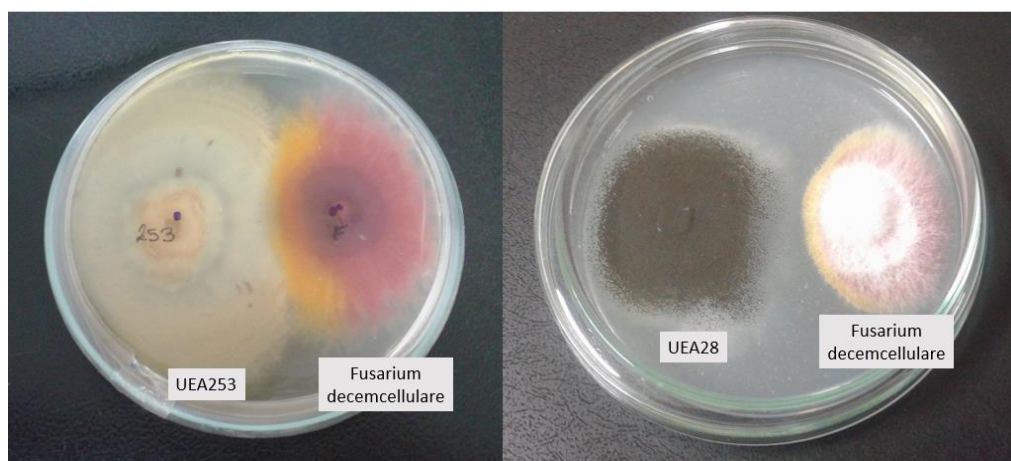


Figura 6: Cambio na coloração do micélio e inibição de crescimento de *F. decemcellulare*.

Recém ao sexto dia de avaliação conseguiu-se observar a interação entre o fitopatógeno e o endófito. O 100% dos fungos avaliados apresentou uma interação tipo “A” ao sexto dia, o que significa uma inibição mútua com contato de micélios entre o endófito de o fitopatógeno *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare*, mas no dia 14 de avaliação, os endófitos UEA28, UEA27 e UEA231 começaram a apresentar uma interação tipo “CA₁” (substituição parcial depois de uma inibição mútua com contato de micélios). No trabalho realizado por WICKLOW *et al.* (2005), no teste de pareamento o endófito *Acremonium zeae*, isolado de milho, contra *Fusarium verticillioides* mostraram uma inibição mútua com contato de micélios, mas deixando um pequeno espaço entre eles, resultados similares aos obtidos no presente trabalho. Outro trabalho realizado com o fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* isolado de *Melia azedarach*,

demonstrou que os estratos metanólicos do caldo de fermentação de este fungo teve atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Gibberella saubinetii* (Li et al., 2012).

4. CONCLUSÕES

- Dos fungos endofíticos isolados, 22 possuem potencial para ser utilizados como agentes de biocontrole contra os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium decemcellulare*.
- Na maioria dos casos o índice de antagonismo para *F. decemcellulare* foi superior que o índice de antagonismo para *C. gloeosporioides*.
- Não se obteve evidencia de que o líquido metabólico bruto, resultante da filtração, apresentara inibição contra *Candida parapsilosis* nem *Streptococcus pyogenes*.

5. REFERÊNCIAS

Anisha C., Radhakrishnan E.K. (2015) Gliotoxin-producing endophytic *Acremonium* sp. from *Zingiber officinale* found antagonistic to soft rot pathogen *Pythium myriotylum*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 175 (7) 3458-3467.

Azevedo, J. L. (1998). Microrganismos endofíticos. Em: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.) Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, pp. 117-137.

Azevedo J.L., Maccheroni W.J., Pereira J.O., Araújo W.L. (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent

advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, (3) 40-65.

Badalyan S.M., Innocenti G., Garibyan N.G. (2002) Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathologia Mediterranea*, Bologna (41) 200-225.

Campanile G., Ruscelli A. e Luisi N. (2007) Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and in plant test. *European Journal of Plant Pathology*, 117 (3) 237-246.

Chithra S., Jasmin B., Sachidanandan P., Jyothis M., Radhakrishnan E.K. (2014) Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. *Phytomedicine*, 21(2014) 534-540.

Kawamoto S.O., Lorbeer J.W. (1976) Protection of onion seedling from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease*, Vol. 60, pp. 189–191.

Kern M.E., Blevins K.S. (1999) *Micologia médica – Texto e Atlas*. 2. ed, São Paulo: Editorial Premier.

Li X., Zhang Q., Zhang A., Gao J. (2012) Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012 (60) 3424-3431.

Mello V.K., Medeiros G.L., Diniz J.M.P., Stringari D., Terasawa L.V.G, Jaccoud D.S.F., Matiello R.R., Rudnik S., Pileggi M., Pileggi S.A.V. (2010) Antagonismo *in vitro* e obtenção dos extratos brutos de microrganismos endofíticos isolados do milho crioulo frente ao fungo fitopatogênico *Fusarium* sp. I51-2. I Congresso de Iniciação Científica de Pós-Graduação – Florianópolis (SC).

Prachayasittikul S., Suphamong S., Worachartcheewan A., Lawung R., Ruchirawat S., Prachayasittikul V. (2009) Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules*, Vol. 14, pp. 850-867.

Petrini O. (1991). Fungal endophyte of tree leaves. En: Andrews, J.; Hirano, S. S. (Eds). *Microbial Ecology of Leaves*. New York. Springer Verlag. pp.179-197.

Pimentel I., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Makowiecky R., Azevedo J. L. (2006) Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Internationas Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (5) 705-711.

Phongpaichit S., Nikom J., Rungjindamai N., Sakayaroj J., Hutadilok-Towatana N., Rukachaisirikul V., Kirtikara K. (2007) Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garnicia* plants. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51(2007) 517- 525.

Rani S.A., Murty S.U. (2006) Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. *African Journal of Biomedical Research*, Vol. 9, pp. 67-69.

Rincón C.A.M., Castaño J.C.O., Ríos E.V. (2012) Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17 (2) 160-171.

Santos, T.T. e Varavallo, M.A. (2011). Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse económico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, Vol. 32, Nº 2, pp. 199-212.

Sbravatti J.A., Garcia C., Chapaval I., Figueredo A., Schultz B. (2013) Seleção *in vitro* de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. *Floresta*, 43 (1) 145 – 152.

Silva M.C.S. (2015) Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.). Tese para obter o grau de Mestre em Ciências. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. Piracicaba. pp. 76.

Sousa K.A., Orlanda J.F., Bezerra G., Sousa T. (2013) Estudo do potencial de fungos endofíticos no controle do agente causal da fusariose em tomateiro. *Agroecossistemas*, 5 (1) 50-55.

Souza A., Souza A., Astolfi S.F., Pinheiro M.L.B., Sarquis M.I., Pereira J. (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham, 34 (2) 185-195.

Souza R.D., Mendonça E.A.F., Soares M.A. (2015) Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. *Summa Phytopathologica*, 41 (3) 229-232.

Wani M.A., Sanjana K., Kumar D.M., Lal D.K. (2010) Short Communication. GC-MS analysis reveals production of 2-phenylethanol from *Aspergillus niger* endophytic in rose. *Journal of Basic Microbiology*, 2010 (50) 110-114.

Wicklow D.T., Roth S., Deyrup S.T., Gloer J.B. (2005) A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109 (5) 610-618.

Zanardi L., Bolzani V., Cavalheiro A., Silva D.H., Trevisan H.C., Araujo A.R. (2012) Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis cassia* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. *Quimica Nova*, 35 (11) 2233-2236.

CAPÍTULO II

Potencial das bactérias endofíticas isoladas de *Acmella ciliata* para combater microrganismos patógenos

Bioatividade das bactérias endofíticas isoladas de *Acmella ciliata* para combater microrganismos patógenos

Ortiz P.¹, Andrade S. L.¹, Procópio R.L.¹

(1) Universidade do Estado do Amazonas

Resumo

A planta *Acmella ciliata*, de nome comum “jambu”, é conhecida por suas propriedades medicinais e antimicrobianas, é hospedeira potencial de microrganismos endófitos com bioatividade e produção de metabólitos de interesse. Nos últimos anos vem se incrementando o interesse pelo estudo dos microrganismos endófitos, pelo potencial de achar novas linhagens assim como novos compostos com potencial utilidade na área clínica e agrícola. O objetivo do trabalho foi isolar, identificar e avaliar o potencial antimicrobiano das bactérias endófitas presentes no jambu. Foram isoladas 39 bactérias endofíticas da *A. ciliata* depois de uma desinfecção superficial, a maioria provenientes das folhas. Seguidamente, foram testadas num ensaio de pareamento contra os fitopatógenos *Fusarium decemcellulare* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Se obteve que o 41% dos isolados apresentou inibição do crescimento contra os fitopatógenos, alcançando valores de IA (índice de antagonismo) mais altos contra *C. gloeosporioides*. O maior valor de IA foi alcançado por UEA135 para *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare* (46,26% e 44,65%) respectivamente. No bioensaio realizado contra *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*, só o 7,69% e 10,26% respectivamente obtiveram resultados de inibição, onde a temperatura ótima de inibição foi 28°C. Os resultados obtidos dos ensaios demonstraram que as bactérias endofíticas isoladas de *Acmella ciliata* possuem um potencial para ser utilizadas como inibidoras do crescimento dos patógenos *Fusarium decemcellulare*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*.

Palavras chave: endófito, jambu, patógeno, inibição.

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia está composta por uma grande diversidade. Dentro desta diversidade existem plantas que produzem compostos bioativos de interesse para a sociedade e o setor industrial. Uma das plantas encontradas na Amazônia é a *Acmella ciliata* conhecida comumente como “jambú”, pertencente à família Asteraceae e usada na gastronomia e na medicina natural. Segundo RANI e MURTY (2006), a maioria das plantas pertencentes à família Asteraceae possui atividade antimicrobiana.

Entre a diversidade de microrganismos, existem os que vivem em simbiose com as plantas, e produzem compostos úteis para prover proteção às condições ambientais, proteção contra predadores, doenças, entre outras (DHANYA e PADMAVATY, 2014). Estes microrganismos são conhecidos como endófitos, segundo PETRINI (1991), estes colonizam os tecidos saudáveis da planta em algum tempo do seu ciclo de vida e não lhe causam danos aparentes.

Sabe-se que alguns microrganismos endofíticos possuem a característica de produzir as mesmas substâncias, ou similares que a planta hospedeira (ZHAO *et al.*, 2011). Estudos prévios demonstraram que o extrato de metanol das flores e folhas de *Acmella oleracea* possui uma boa atividade antibacteriana contra *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (BORATE e DISALE, 2013). Ensaio para determinar atividade antifúngica foram realizados com os extratos de *Spilanthes acmella*, foi demonstrado que o extrato de acetato de etilo apresentou fraca atividade contra *Penicillium chrysogenum*, o extrato de etanol mostrou atividade contra *Rhizopus arrhizus*, e finalmente, o extrato aquoso apresentou melhor atividade que o controle positivo na inibição de *Rhizopus stolonifer* (ARORA *et al.*, 2011). Também num estudo realizado com *Acmella ciliata*, foi evidenciada a capacidade antibacteriana, onde foram testados os extratos metanólicos da

planta contra os patógenos *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, resultando na inibição do crescimento destes (DAISY *et al.*, 2013)

É devido a estas características interessantes que possui a planta *Acmella oleracea*, que representa ser um hospedeiro de microrganismos com um potencial para produzir substâncias com bioatividade e que possam ser utilizadas no setor industrial para gerar novas fontes de antimicrobianos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de biotecnologia do Programa do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (PPGMBT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus-Brasil.

Material vegetal

Foram selecionados aleatoriamente 5 indivíduos sadios da planta “jambu”, obtidas da feira de produtores de Autazes-Amazonas (3°57'97" S, 59°13'06"). A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Ramos J. F. e uma exsicata (OJEDA, CPO 1, tombo INPA N°274113) encontra-se depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Amazonas-Manaus, Brasil.

Isolamento dos endófitos

Foram selecionados aleatoriamente 5 indivíduos sadios da planta “jambu” (*Acmella ciliata* (Kunth) Cass.). O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas. De cada planta, se selecionaram aleatoriamente seis folhas e seis pedaços de caule, duas do extremo superior da planta, duas do meio e duas do extremo inferior, forma um total de 30 folhas e 30 caules. A superfície do material vegetal foi lavada com água corrente para retirar os microrganismos epifíticos e a sujeira da planta. Depois foi esterilizado por imersão em etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2-2,5% por 4 minutos e etanol 70% por 30 segundos. O material vegetal foi

enxugado em água destilada estéril três vezes por 1 minuto cada vez, da qual uma alíquota foi semeada em meio de cultura BDA e TSA para fazer o controle da assepsia (PIMENTEL *et al.*, 2006). Seis fragmentos de folha e caule (5 x 5 mm) foram cortados para isolamento dos endófitos. Os fragmentos foram colocados em placas Petri contendo TSA (Tryptone Soja Agar, acrescido com 100 µg/ml de Ciclohexemida para evitar o crescimento de fungos) e foram incubadas a 28°C entre 2 até 5 dias.

Extração de DNA

Cada bactéria endofítica isolada foi semeada em tubos contendo caldo tripton de soja (TSB) e foi incubado a 28°C em agitação constante durante 1 a 2 dias. Depois se coletou 1 mL de cada amostra e foi colocada num microtubo de 1,5 mL de capacidade, para logo adicionar aproximadamente 0,5 g de sílica estéril. Os microtubos foram agitados em vórtex durante 5 minutos para quebrar a membrana celular das bactérias. Posteriormente as amostras se centrifugaram por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi descartado e ao pellet resultante se adicionou 500 µL de tampão de extração CTAB (1M Tris-HCl pH 8.0, 0,5 M EDTA, 1,4 M NaCl, CTAB 2%, PVP 1%). Adicionou-se 4 µL de RNase (20 mg/mL) e se homogeneizou a solução por 5 minutos para depois incubar a 37°C por 30 minutos. A seguir, se adicionou 5 µL de Proteinase K (10 mg/mL) e as amostras foram incubadas à 55°C *overnight* com agitação constante. O lisado foi extraído com 500 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1) e misturado suavemente por inversão durante 5 minutos, para depois ser centrifugado a 10000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido num tubo estéril, o DNA foi precipitado com a adição de 2x o volume do sobrenadante de isopropanol 100% previamente esfriado e incubado a -20°C por duas horas, depois centrifugado 15 minutos a 13000 RPM. O pellet obtido foi lavado com etanol 70% e secado a 37°C e finalmente diluído em 50 µL de água Millipore estéril.

Identificação molecular

A região 16S das bactérias foi amplificada com os *primers* 63F e 1389R, 63F (5' CAGGCCTAACACATGCAAGTC 3') e 1389R (5' ACGGGCGGTGTGTACAAG 3'), usando a reação em cadeia da polimerase (PCR). As condições usadas foram as seguintes: desnaturação inicial 94°C por 10 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, e a extensão final a 72°C por 7 minutos. Os 25 µL da mistura da reação conteve 1 x PCR buffer, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, 1-5 ng de DNA e 2,0 U de *Taq* DNA polimerase. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% para confirmar a presença de só uma banda amplificada. Estes produtos da amplificação foram purificados usando o Minikit de Purificação Purelink. Os produtos da amplificação foram sequenciados e alinhados com as sequencias no GenBank pelo programa BLASTN para achar a homologia com sequencias de organismos relacionados.

Ensaio de antagonismo contra fungos fitopatógenos

Os fungos fitopatógenos teste foram doados pelo Dr. Rogério Hanada, pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Primeiro foi realizado uma análise qualitativa, onde no centro duma placa de Petri (Ø 90 mm) foi inoculado, em placas diferentes, um disco de ágar (Ø 0,5 cm) contendo os fitopatógenos teste (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium decemcellulare*). Após 72 horas, foram inoculadas, em quatro quadrantes, as bactérias endofíticas isoladas, finalmente, as placas foram incubadas a 28°C durante 7 dias. As bactérias que apresentaram antagonismo contra os fitopatógenos foram testadas em ensaios individuais, os quais consistiram na inoculação de 10µL da solução bacteriana (10⁸ células bacterianas/ml ou 0,5 na escala de McFarland) num extremo da placa de Petri e no centro da placa um disco (Ø 0,5 cm) de ágar contendo o fitopatógeno. As placas foram incubadas de 5 a 7 dias a

28°C por triplicata (SILVA, 2015). A inibição foi calculada pela fórmula:

$$IA = 100 - \left\{ \frac{X1}{\left[\frac{X2 + X2' + X2''}{3} \right] \times 100} \right\}$$

Onde:

X1 = raio do crescimento fúngico em direção ao isolado endofítico bacteriano.

X2 = meia dos raios do crescimento fúngico nas laterais da placa e na direção oposta do isolado bacteriano.

Bioensaio antibacteriano

Para este ensaio usou-se a técnica de MA *et al.*, 2013 (modificado). Foram semeadas as bactérias patógenas teste (*Candida parapsilosis* e *Streptococcus pyogenes*) no meio de cultura ágar triptona de soja (TSA) dispersando 100 µL do líquido de fermentação, com alça de Digralski, na superfície da placa de Petri. Em cada placa foram feitos quatro poços (diferentes quadrantes) de 0,5 cm de diâmetro. As bactérias endofíticas foram cultivadas em caldo triptico de soja (TSB) a uma temperatura de 28°C durante 24 horas a 120 RPM, para obter uma concentração de células de 0,5 na escala de McFarland (aproximado de 10⁸ células bacterianas/mL). Logo, foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana dos endófitos isolados em cada poço, como controle negativo foi usado o mesmo volume de caldo TSB sem inocular, e como controle positivo, no caso do ensaio com *C. parapsilosis*, foi usado Fluconazol (1mg/mL), e para o ensaio usando *S. pyogenes* utilizou-se Gentamicina (1mg/mL). Todos os tratamentos foram realizados por triplicata, e foram incubados de 24-48 horas. Os resultados foram avaliados em duas temperaturas, 28°C e 37°C. Depois do tempo de incubação foram medidos os diâmetros das zonas antibacterianas (ZA) para expressar a eficiência antibacteriana dos isolados endofíticos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento de bactérias endofíticas

Foram isoladas uma totalidade de 39 bactérias endofíticas viáveis a partir de 480 fragmentos de folha e caule obtidos da planta *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. (Figura 1).

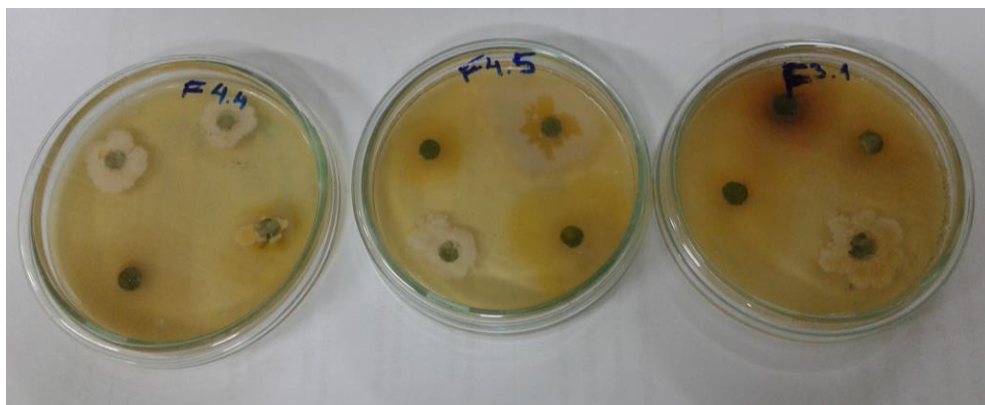


Figura 1: Crescimento de bactérias endofíticas.

Ensaio de antagonismo contra fungos fitopatogênicos

Do ensaio qualitativo, 16 bactérias apresentaram resultados positivos para a inibição do crescimento do fitopatógeno *C. gloeosporioides* e 15 para *F. decemcellulare*. Posteriormente foram realizados os ensaios semi-quantitativos individuais com cada uma destas bactérias endofíticas.

Nos ensaios individuais com *C. gloeosporioides*, as 16 bactérias inibiram o crescimento do fitopatógeno (Figura 2). As bactérias UEA120, UEA135 e UEA139 foram as que obtiveram os maiores índices de antagonismo (IA) com valores de 40,11%, 46,26% e 43,47% respectivamente, porém, UEA15 e UEA16 apresentaram antagonismo quase depressível (6,54% e 7,5% respectivamente). Num ensaio de pareamento entre isolados de *Bacillus* sp., obtidos de amostras do solo, contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*, três destes isolados reduziram significativamente o crescimento micelial do fitopatógeno, onde este efeito inibitório foi atribuído à possível

produção de quitinases e outras enzimas com ação contra a parede celular fúngica (FUGA *et al.*, 2011). Outro estudo, com bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* (chapéu de couro), demonstrou que duas bactérias (BREI-92 e BREIII-107) inibiram os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *Corynespora cassicola* e *Fusarium solani*. Acredita-se que a inibição das bactérias contra estes fitopatógenos pode ser devido a diferentes mecanismos, tais como síntese de substâncias antimicrobianas, competição por espaço e nutrientes, secreção de enzimas líticas, alteração de pH ou síntese de compostos voláteis, além disso, acredita-se também que a diferença na porcentagem de inibição do crescimento destes fungos pode ser causada por a utilização de estes mecanismos ou pelo grau de utilização destes (SOUZA *et al.*, 2015).

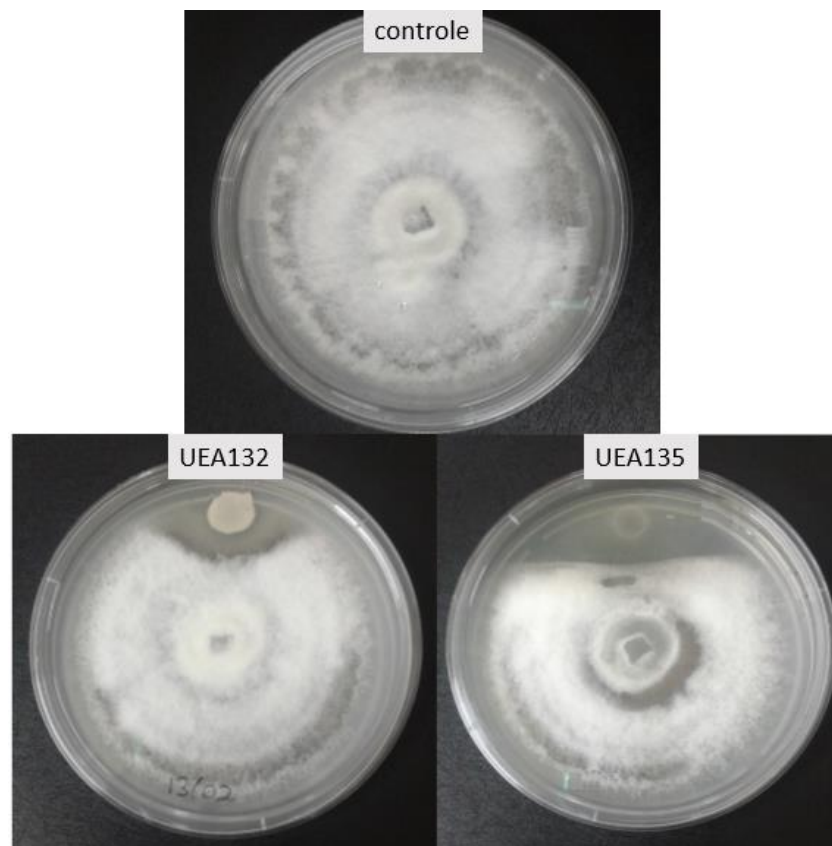


Figura 2: Antagonismo das bactérias endófitas contra fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Controle: *Colletotrichum gloeosporioides*; UEA132 e UEA135: bactérias endofíticas.

No caso dos ensaios individuais realizados com *F. decemcellulare*, as bactérias UEA135 e UEA139 obtiveram as maiores porcentagens de inibição de crescimento do fitopatógeno (44,65% e 44,29% respectivamente), neste caso, a bactéria UEA120 não apresentou inibição nenhuma contra *F. decemcellulare* (Figura 3). No estudo realizado por CHAN *et al.* (2003), uma bactéria isolada de amostras do solo, identificada como *Bacillus subtilis*) apresentou inibição do crescimento micelial de oito espécies de *Fusarium* sp. (*Fusarium avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporium*, *F. solani*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*) conhecidos como fitopatógenos de diferentes plantas. A bactéria causante da inibição ocasionou anormalidades morfológicas nas hifas, como inchaço dos filamentos e pontas das hifas, estas hifas sofreram vacuolização.

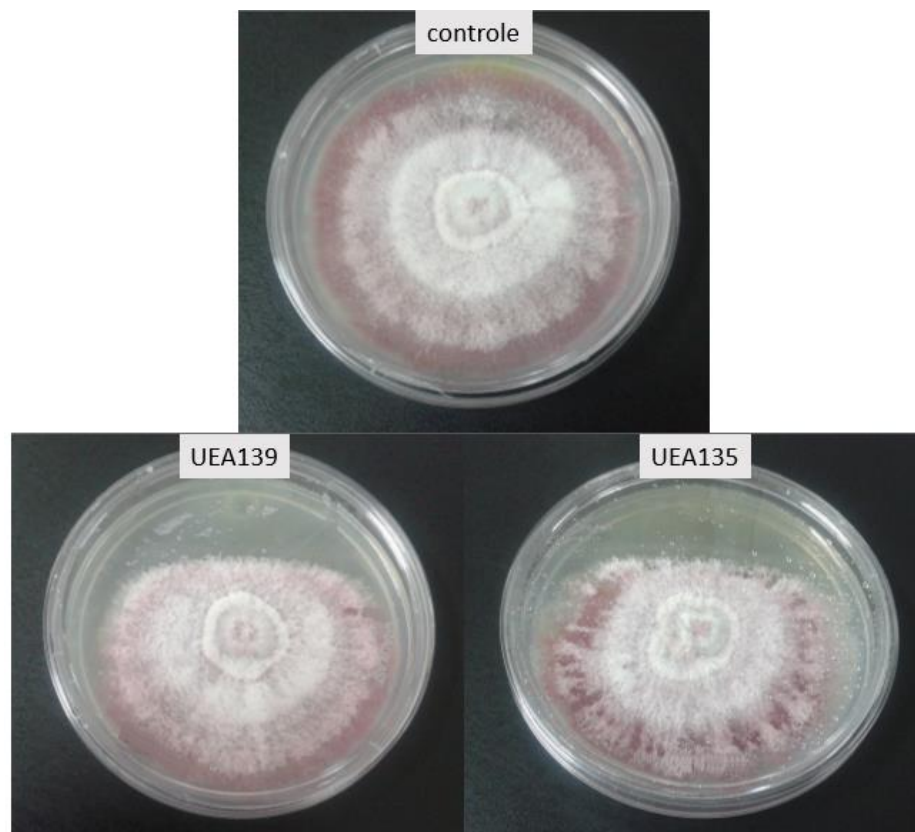


Figura 3: Antagonismo das bactérias endófitas contra fitopatógeno *F. decemcellulare*. Controle: *Fusarium decemcellulare*; UEA139 e UEA135: bactérias endofíticas.

Observou-se que a inibição das bactérias endofíticas contra *C. gloeosporioides* foi superior em comparação com a inibição apresentada por estas mesmas contra *F. decemcellulare* (Figura 4). A inibição observada das bactérias UEA135 e UEA139 foi muito similar para os dois fungos fitopatógenos, onde, só no caso das bactérias UEA15 e UEA139 o índice de antagonismo contra *F. decemcellulare* foi superior ao índice de antagonismo apresentado contra *C. gloeosporioides*, em todos os outros casos a inibição de crescimento foi superior para *C. gloeosporioides*.

Nenhuma das bactérias endofíticas, com resultados positivos para a inibição de crescimento, superou o 50% de índice de antagonismo. Segundo o trabalho realizado por SILVA (2015), as bactérias endofíticas isoladas de semente de guaranazeiro, apresentaram porcentagens de inibição de crescimento contra *Colletotrichum gloeosporioides* entre os valores de 32%, sendo o menor valor encontrado, até 63,78% como valor máximo encontrado, demonstrando nesse caso uma maior porcentagem de inibição comparado com os resultados achados no presente trabalho.

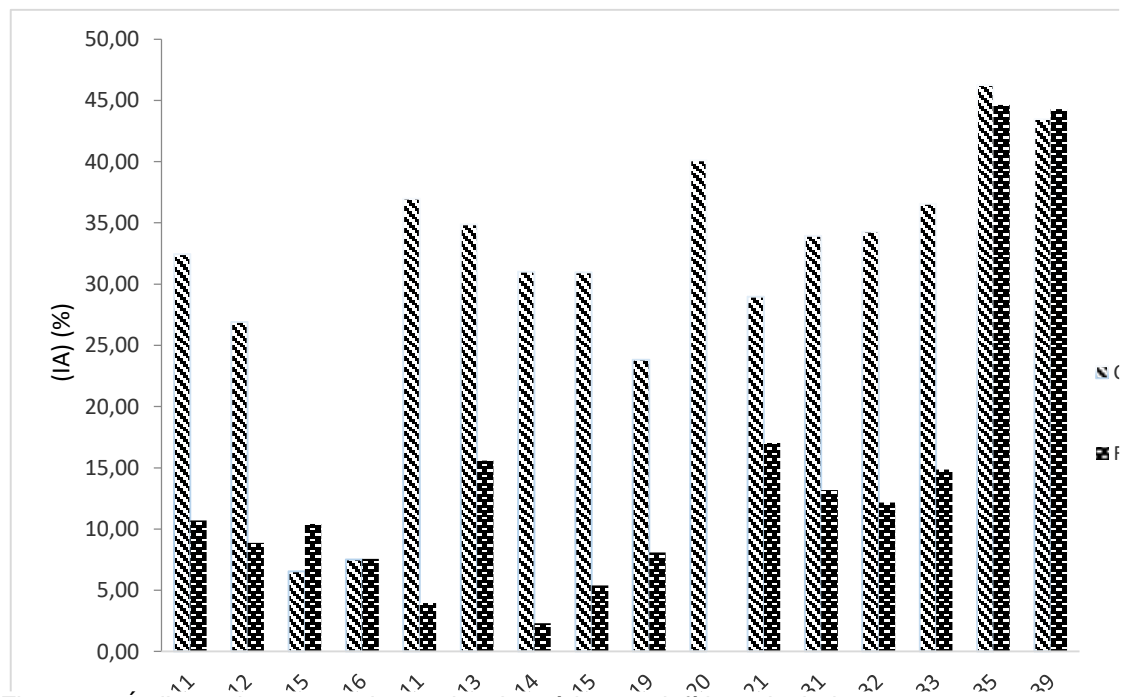


Figura 4: Índices de antagonismo das bactérias endofíticas isoladas no pareamento com fitopatógenos *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare*.

Bioensaio antibacteriano

Das 39 bactérias endofíticas isoladas, sete obtiveram resultados positivos no primeiro ensaio qualitativo contra *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis* a 28°C e 37°C.

Em quanto aos ensaios realizados contra *S. pyogenes*, somente as bactérias endofíticas UEA113, UEA114 e UEA134 apresentaram atividade antibacteriana. Observou-se que a temperatura ótima para a atividade antibacteriana dos endófitos foi 28°C, devido a que os resultados de inibição foram maiores a esta temperatura em comparação com os resultados obtidos a 37°C (Figura 5).

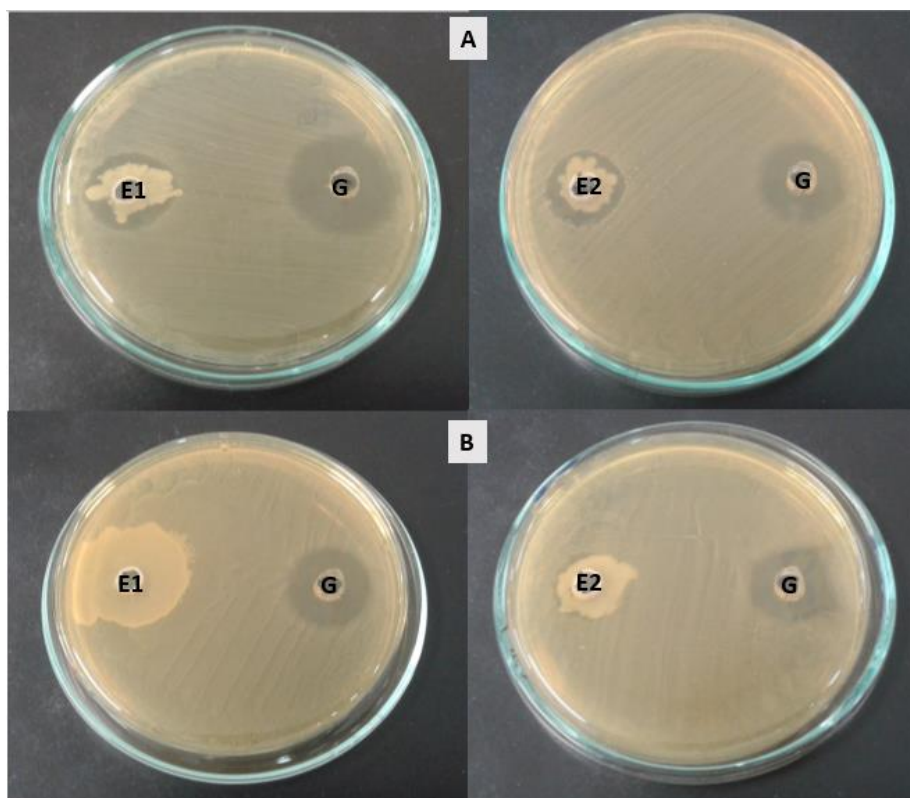


Figura 5: Inibição de crescimento de *S. pyogenes*. A: ensaio a 28°C; B: ensaio a 37°C; G: controle positivo Gentamicina; E1: bactéria endofítica UEA114; E2: bactéria endofítica UEA134.

Na temperatura de 28°C as bactérias que apresentaram maior inibição do crescimento do patógeno foram UEA113 e UEA134, que obtiveram o mesmo tamanho de zona antibacteriana (ZA) (0,23 cm). UEA114 não inibiu o patógeno à temperatura de 37°C. O controle positivo Gentamicina, produz maior inibição à 28°C que a 37°C, isso pode ser porque a temperatura ótima de crescimento de *Streptococcus* sp. é 37°C, e o mesmo acontece para os outros valores obtidos pelos endófitos (Figura 6).

No trabalho feito por CASTILLO *et al.*, (2002), o actinomicete endofítico *Streptomyces* NRRL 30562, isolado da planta medicinal *Kennedia nigriscans*, utilizada para promover o fechamento de feridas e na cura de infecções da pele, produz o metabólito Munumbicina e foi demonstrado que possui atividade inibitória contra *Streptococcus pneumoniae*, entre outros patógenos humanos.

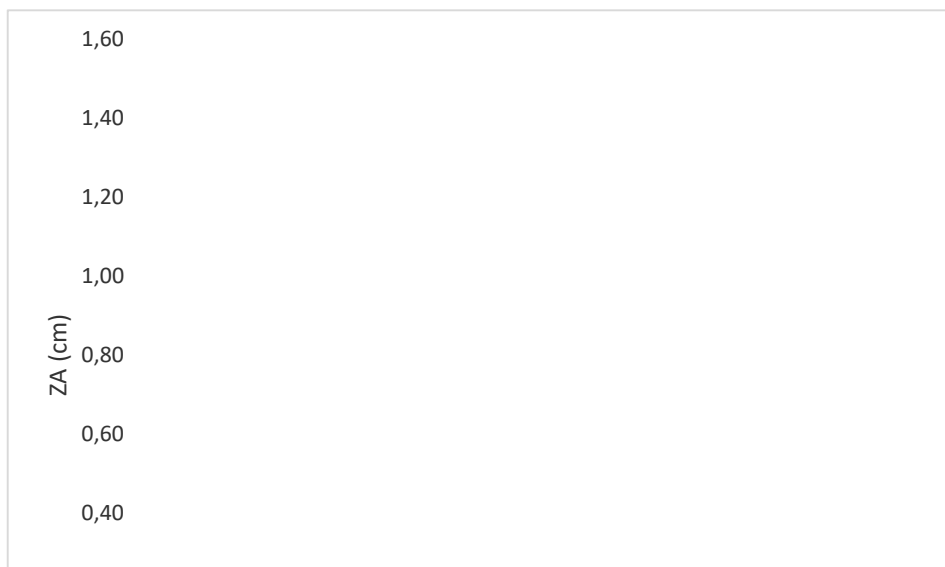


Figura 6: Comparação da ZA na inibição de crescimento de *S. pyogenes*. ZA: zona antibacteriana (cm); GENTAMICINA: controle positivo; UEA113, UEA114 e UEA134: bactérias endofíticas isoladas do jambu.

No caso dos ensaios realizados contra *C. parapsilosis*, os endófitos UEA15, UEA111, UEA134 e UEA135 apresentaram atividade antibacteriana. A temperatura ótima para a inibição apresentada pelos endófitos contra *C. parapsilosis* foi 28°C, exceto para a bactéria endofítica UEA135 que a melhor temperatura foi 37°C (Figura 7).

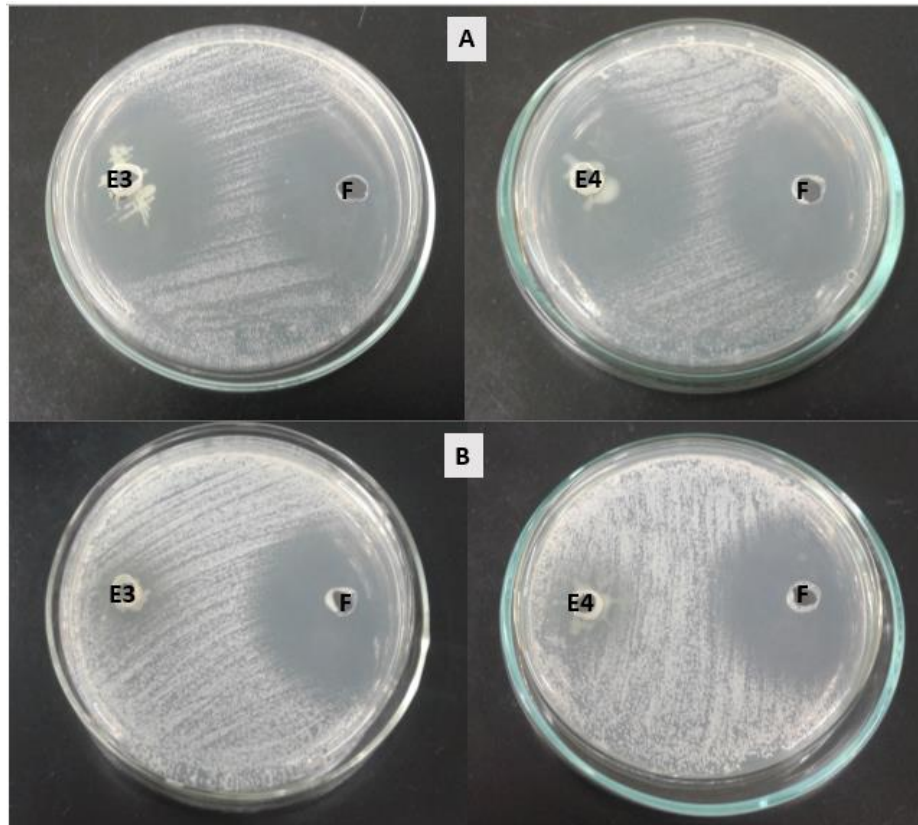


Figura 7: Inibição de crescimento de *C. parapsilosis*. A: ensaio a 28°C; B: ensaio a 37°C; F: controle positivo Fluconazol; E3: bactéria endofítica UEA15; E4: bactéria endofítica UEA111.

Os isolados endófitos com maior tamanho da ZA foram UEA15 e UEA111 com valores de 1,30 cm e 1,77 cm respectivamente a 28°C. A bactéria UEA111 não inibiu *C. parapsilosis* à temperatura de 37°C. O controle positivo Fluconazol, produz maior inibição à 28°C que a 37°C, isso pode ser porque a temperatura de crescimento mais adequada para *C. parapsilosis* é 37°C. A bactéria endofítica UEA135 foi a única que a 37°C obteve inibição maior nestas condições (Figura 8).

No trabalho realizado por HARRISON *et al.* (1991), onde foi purificada a substância Pseudomicina A, obtida da bactéria endofítica *Pseudomonas syringae*, foi demonstrado que esta substância, além de possuir atividade inibitória contra fungos fitopatogênicos, também inibe o crescimento de patógenos humanos, entre eles *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

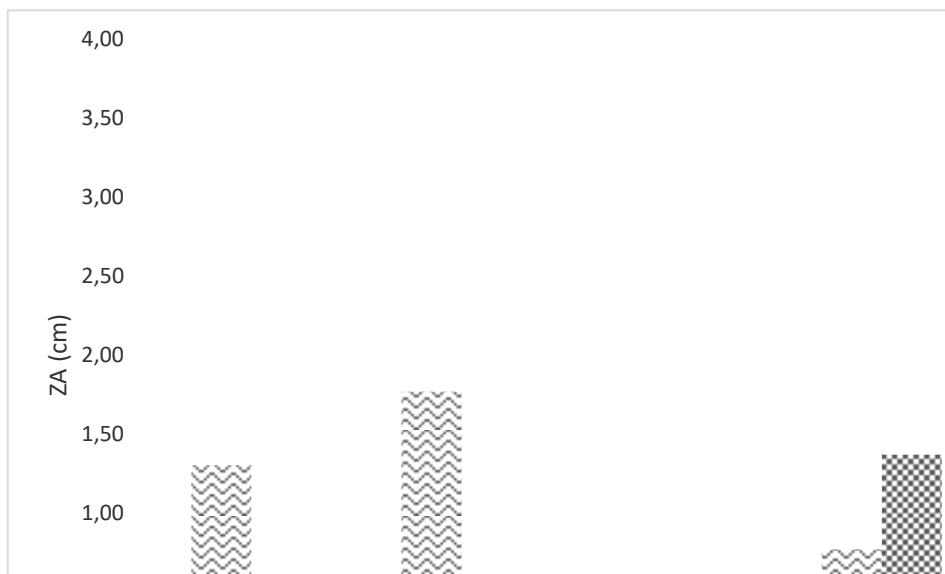


Figura 8: Comparação da ZA na inibição de crescimento de *C. parapsilosis*. ZA: zona antibacteriana (cm); FLUCONAZOL: controle positivo; UEA15, UEA111, UEA134 e UEA135: bactérias endofíticas isoladas do jambu.

O isolado UEA134 foi o único que apresentou inibição contra os dois patógenos, embora, a ZA foi maior na inibição de *S. pyogenes* em comparação com *C. parapsilosis*.

Em todos os testes, às duas temperaturas avaliadas, a atividade antibacteriana apresentada pelos endófitos foi menor que a atividade do controle positivo (Gentamicina e Fluconazol) (Figura 6 e 8).

Identificação molecular

Das 39 bactérias endofíticas isoladas, somente o 43,59% (17) apresentaram atividade antifúngica ou antibacteriana. Estas foram identificadas molecularmente, obtendo três gêneros principais: *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp. Para todas as bactérias foi obtida uma identidade de 99-100% no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Existem trabalhos onde foram isoladas bactérias endofíticas pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. e demonstraram atividade inibitória contra fungos e bactérias patogênicas, é o caso do trabalho realizado por JASIM *et al.* (2016) onde a bactéria CaB5 (*Bacillus* sp.) isolada de *Capsicum annuum* apresentou inibição contra *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*. Assim mesmo, SUN *et al.* (2006) isolaram a bactéria endofítica *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, isolada da planta medicinal *Scutellaria baicalensis* Georgi, que exibiu antagonismo contra vários fitopatógenos e patógenos humanos presentes nos alimentos entre outros, dando um total de 37 microrganismos que foram inibidos demonstrando sensibilidade ao líquido de fermentação previamente filtrado, entre os microrganismos inibidos podem-se destacar: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus*, etc., e entre os fungos inibidos encontram-se *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc. Achou-se que os metabólitos responsáveis da atividade antimicrobiana são Fengicina e Surfactina, que são lipopeptídeos que apresentam atividade antimicrobiana, antiviral e antitumoral. Num estudo realizado nas cidades de Henan e Shanxi, China, foram isoladas três espécies endofíticas de *Bacillus thuringiensis* a partir de plantas de trigo. Conseguiu-se comprovar que duas das três espécies de *Bacillus* sp. obtiveram uma eficiência no controle do fitopatógeno *Urocystis tritici* Körn, causante da doença WFS (wheat flag smut), significando isso como uma alternativa amigável com o ambiente para combater esta doença que ocasiona perdas nos cultivares de trigo (AILI *et al.*, 2014).

Enquanto ao gênero *Pseudomonas* sp., também há antecedentes de estudos realizados com endófitos pertencentes a este gênero. Num trabalho realizado por ZHOU *et al.* (2014), avaliaram a atividade da bactéria endofítica *Pseudomonas fluorescens* contra o crescimento micelial do fungo fitopatógeno *Athelia rolfsii* (fungo patógeno achado no solo e responsável de podridão e murcha em várias espécies de

plantas medicinais da China). Os resultados demonstraram que *P. fluorescens* foi capaz de inibir o crescimento de *A. rolfsii* por contato e também pela produção de metabólitos voláteis, as observações no microscópio revelaram a ruptura e dissolução parcial do micélio, impossibilitando o crescimento.

De maneira semelhante, SANTI *et al.* (2012), no trabalho realizado com enterobactérias rizosféricas e endofíticas, com características promotoras de crescimento, isoladas de cana de açúcar, acharam que uma das enterobactérias endofíticas possui a capacidade de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *Verticillium dahliae*.

4. CONCLUSÕES

- Só 16 e 15 bactérias endofíticas possuem o potencial para inibir o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium decemcellulare* respectivamente.
- As bactérias UEA135 e UEA139 são as melhores cepas com atividade antifitopatogênica.
- Somente uma pequena porcentagem de bactérias endofíticas do jambu possuem atividade inibitória para o crescimento de *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*.
- Os endófitos UEA113 e UEA114 podem ser utilizadas como potencial antimicrobiano contra *S. pyogenes*, *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare*.
- O endófito UEA135 pode ser considerada como potencial antimicrobiano para inibir *C. parapsilopsis*, *C. gloeosporioides* e *F. decemcellulare*.

5. REFERÊNCIAS

Aili T., Fahu P., Siliang H., Gongming Y., Bin L., Tan W. (2014) Characterisation of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut. *Biocontrol Science and Technology*, 24 (8) 901-924.

Arora S., Vijay S., Kumar D. (2011) Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3 (5) 145-150.

Borate P.P., Disale S.D. (2013) Studies on antibacterial activity of *Acmella oleracea* (L.) Murr. *International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care* 3 (5) 36-42.

Castillo U. F., Strobel G. A., Ford E. J., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Albert H., Robison R., Condrón M. A. M., Teplow D. B., Stevens D., Yaver D. (2002) Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology* 148 (9) 2675-2685.

Chan Y-K., McCormik W.A., Seifer K.A. (2003) Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 253-262.

Daisy M.J., Raju A.R., Subin M.P. (2013) Qualitative phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of *Acmella ciliata* (H.B.K.) Cassini and *Ichnocarpus frutescens* (Linn.) R.Br. against two pathogenic bacteria. *Nature Environment and Pollution Technology*, 12 (1) 167-170

Dhanya, N. Nair e Padmavathy, S. (2014) "Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans" *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 250693, 11 pages.

Fuga C.A.G., Gonçalves D.C., Cunha W.V. (2011) Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* por *Bacillus* spp."in vitro". Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão, 1 (8) 188-194.

Harrison L., Teplow D. B., Rinaldi M., Strobel G. (1991) Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. Journal of General Microbiology, 137 (12) 2857-2865.

Jasim B., Mathew J., Radhakrishnan E. K. (2016) Identification of a novel endophytic *Bacillus* sp. from *Capsicum annuum* with highly efficient and broad spectrum plant probiotic effect. Journal of Applied Microbiology, 121 (4) 1079-1094.

Ma L., Cao Y.H., Cheng M.H., Huang Y., Mo M.H., Wang Y., Yang J.Z., Yang F.X. (2013) Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. Antonie van Leeuwenhoek, 103: 299-312.

Petrini, O. (1991). Fungal endophyte of tree leaves. En: Andrews, J.; Hirano, S. S. (Eds). Microbial Ecology of Leaves. New York. Springer Verlag. pp.179-197.

Pimentel, I., Glienke-Blanco, C., Gabardo, J., Makowiecky, R. e Azevedo, J. L. (2006). Identification and Colonization of Endophytic Fungi from Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under Different Environmental Conditions. Internationas Journal Brazilian Archives of Biology and Technology Vol. 49, N° 5, pp. 705-711

Rani, S.A. e Murty, S.U. (2006). Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. African Journal of Biomedical Research, Vol. 9, pp. 67-69.

Santi F.I.F., Machado Z.O., Soto H.H.G, Segal E.I.F., Ramos H.B. (2012). Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. Plant Soil, 353 (1) 409-417.

Silva M.C.S. (2015) Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.). Tese para obter o grau de Mestre em Ciências. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. Piracicaba. pp. 76.

Sun L., Lu Z., Bie X., Lu F., Yang S. (2006) Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22 (12) 1259-1266.

Souza R.D., Mendonça E.A.F., Soares M.A. (2015) Atividade antagonista a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. Summa Phytopathologica, 41 (3) 229-232.

Zhao J., Shan T., Mou Y., Zhou L. (2011) Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11 (2) 159 - 168.

Zhou J.Y., Zhao X.Y., Dai C.C. (2014) Antagonistic mechanisms of endophytic *Pseudomonas fluorescens* against *Athelia rolfsii*. Journal of Applied Microbiology, 117 (4) 1144-1158.

4. DISCUSSÃO GERAL

Foram isoladas, a partir de 480 fragmentos de folha e caule obtidos da planta *Acmella ciliata* (Kunth) Cass., uma totalidade de 56 fungos, 284 bactérias e 54 leveduras, obtendo uma frequência de isolamento (FI) total de 0,82. Embora, quando foi realizada uma segunda purificação das bactérias e leveduras, só resultaram viáveis 39 bactérias, 9 leveduras e 56 fungos filamentosos, dando um total de 104 microrganismos viáveis. Onde a maioria, a origem destas foi: bactérias: 51, 28% de galho e 48,72% folha; fungos: 32,14% galho, 67,86% folha; leveduras: 100% de galho. As folhas ao possuir os estômatos, que servem no intercambio de gases na planta, estes representam uma entrada natural para os microrganismos (AZEVEDO, 1998; SANTOS e VARAVALLO, 2011). Assim como este existem outros estudos onde o isolamento de microrganismos teve uma maior frequência em folhas que em galhos (SOUZA *et al.*, 2004). Do universo dos microrganismos viáveis (104), depois do primeiro isolamento, os que apresentaram bioatividade só foram o 37,5% (21,15% fungos; 16,35% bactérias).

Na identificação dos microrganismos, para os fungos predominaram os gêneros *Curvularia* sp. e *Colletotrichum* sp., no caso das bactérias foram os gêneros *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. Diversos estudos com isolamento de endófitos revelam que estes gêneros são comuns em diversas plantas, além disso, apresentam propriedades antifúngicas e antibacterianas, e tendo como hospedeiro, a maioria das vezes, plantas com propriedades medicinais (PHONGPAICHIT *et al.*, 2007, WANI *et al.*, 2010, CHITHRA *et al.*, 2014, ANISHA e RADHAKRISHNAN, 2015, SUN *et al.*, 2006, AILI *et al.*, 2014, ZHOU *et al.* 2014, JASIM *et al.*, 2016). Bogas *et al.* (2015) acharam uma diferença na população de microrganismos em plantas saudáveis de *Paullinia cupana* (guaraná) comparadas com plantas doentes, evidenciando uma presença maior dos gêneros *Pseudomonas* sp. e

Bacillus sp. nas primeiras, achando esses gêneros interessantes para ser usados no controle biológico contra fitopatógenos.

Enquanto aos bioensaios antibacterianos, testados contra os microrganismos patogênicos *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*, os extratos brutos dos fungos isolados não apresentaram nenhuma bioatividade contra os patógenos, embora existem trabalhos onde os extratos brutos obtiveram resultados positivos de inibição contra patógenos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Aspergillus flavus* (SOUZA *et al.*, 2004), também foi evidenciada bioatividade inibitória dos extratos do meio fermentado para *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Shigella flexneri* (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Os resultados dos ensaios antimicrobianos avaliando as bactérias endofíticas, foram mais promissórios, onde seis bactérias apresentaram resultados positivos. Estas foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp., e inibiram crescimento de *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*. As zonas de inibição foram maiores na temperatura de 28°C, isso pode ser porque a temperatura ótima para patógenos é de 37°C. No trabalho realizado por CASTILLO *et al.*, (2002), foi demonstrada a inibição da bactéria *Streptococcus pneumoniae* (patógena) pela ação do endófito *Streptomyces* NRRL 30562. O gênero *Pseudomonas* sp., vem sido achado como endófito, como o caso da *Pseudomonas syringae* que possui atividade inibitória contra fungos fitopatógenos e também inibe o crescimento da *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (HARRISON *et al.*, 1991). Em todos os testes, às duas temperaturas avaliadas, a atividade antibacteriana apresentada pelos endófitos foi menor que a atividade do controle positivo (Gentamicina e Fluconazol).

Finalmente, no ensaio contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium decemcellulare*, somente

o 39,29% dos fungos isolados e o 41,03% das bactérias viáveis apresentaram atividade antifitopatogênica.

No enfrentamento ou pareamento dos fungos endófitos contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*, os índices de antagonismo (IA) maiores (inibição de crescimento) foram de 70-80%, e quando o *C. gloeosporioides* foi enfrentado contra as bactérias endofíticas, os IA obtidos foram de 40-46%.

No enfrentamento com o segundo fungo fitopatógeno, *Fusarium decemcellulare*, os fungos endofíticos obtiveram IA com valores entre 70-75%, e nos pareamentos contra as bactérias endofíticas, os resultados para IA variaram entre 15-44%, achando que houve uma menor inibição por parte das bactérias endofíticas em comparação com os fungos endofíticos. Na bibliografia podem-se achar estudos que foram feitos com fungos e bactérias endofíticas de diferentes plantas e que apresentaram inibição do crescimento dos fitopatógenos, com valores de inibição similares em alguns casos (SILVA, 2015). A diferença entre os valores de inibição deste trabalho com outros pode ser como consequência do uso de diferentes mecanismos de inibição (SOUZA *et al.*, 2015).

5. CONCLUSÃO GERAL

- O 39,29% e o 35,90% dos fungos e bactérias endofíticas isoladas possuem o potencial para ser utilizados como agentes de biocontrole contra os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium decemcellulare*.
- Somente algumas das bactérias endofíticas isoladas apresentaram atividade antibacteriana contra *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*.
- A bactéria UEA135 é a melhor candidata como inibidora de patógenos por sua capacidade de inibir o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium decemcellulare*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida parapsilosis*.
- Os gêneros predominantes dentre os fungos e bactérias endofíticos isolados foram *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp.

6. REFERÊNCIAS

Aili T., Fahu P., Siliang H., Gongming Y., Bin L., Tan W. (2014) Characterisation of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut. *Biocontrol Science and Technology*, 24 (8) 901-924.

Anisha C., Radhakrishnan E.K. (2015) Gliotoxin-producing endophytic *Acremonium* sp. from *Zingiber officinale* found antagonistic to soft rot pathogen *Pythium myriotylum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175 (7) 3458-3467.

Arora S., Vijay S., Kumar D. (2011) Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3 (5) 145-150.

Azevedo J. L. (1998) Microrganismos endofíticos. Em: Melo I. S., Azevedo J. L. (Ed.) *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA, pp. 117-137.

Azevedo J.L., Maccheroni W.J., Pereira J.O., Araújo W.L. (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3 (1) 15-16.

Badalyan S.M., Innocenti G., Garibyan N.G. (2002) Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathologia Mediterranea*, Bologna, 41 (3) 200-225.

Banhos E.F. dos, Souza A.Q.L. de, Andrade J.C. de, Souza A.D. de, Koolen H.H.F., Albuquerque P.M. (2014) Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (1) 153-161.

Bezerra J.D.P., Nascimento C.C.F., Barbosa R.do N., Silva D.C.V. da, Svedese V.M., Silva-Nogueira E., Gomes B.S., Paiva L.M., Souza-Motta C.M. (2015) Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. Brazilian Journal of Microbiology, 46 (1) 49-57.

Bogas A.C., Ferreira A.J., Araújo W.L., Astolfi-Filho S., Kitajima E.W., Lacava P.T., Azevedo J.L. (2015) Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of Amazon *Paullinia cupana* associated with asymptomatic and symptomatic anthracnose. Springerplus, 4: 258.

Borate P.P., Disale S.D. (2013) Studies on antibacterial activity of *Acmella oleracea* (L.) Murr. International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care, 3 (5) 36-42.

Campanile G., Ruscelli A., Luisi N. (2007) Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and in plant test. European Journal of Plant Pathology, 117 (3) 237-246.

Canuto K., Rodrigues T., Oliveira de F., Gonçalves F. (2012) Embrapa. Fungos endofíticos: Perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. Documentos 154. Brasília, DF.

Castillo U. F., Strobel G. A., Ford E. J., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Albert H., Robison R., Condrón M. A. M., Teplow D. B., Stevens D., Yaver D. (2002) Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. Microbiology, 148 (9) 2675-2685.

Chan Y-K., McCormik W.A., Seifer K.A. (2003) Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. Canadian Journal of Microbiology, 49 (4) 253-262.

- Chithra S., Jasmin B., Sachidanandan P., Jyothis M., Radhakrishnan E.K. (2014) Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. *Phytomedicine*, 21 (4) 534-540.
- Christina A., Christopher V., Bhore S.J. (2013) Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 7 (13) 11-16.
- Chung K.F., Kono Y., Wang C.-M., Peng, C.-I. (2008) Notes on *Acmella* (Asteraceae): Helianthaceae in Taiwan. *Botanical Studies*, 49 (1) 73-82.
- Daisy M.J., Raju A.R., Subin M.P. (2013) Qualitative phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of *Acmella ciliata* (H.B.K.) Cassini and *Ichnocarpus frutescens* (Linn.) R.Br. against two pathogenic bacteria. *Nature Environment and Pollution Technology*, 12 (1) 167-170.
- Das K.K. (2013) A new distributional record of *Acmella ciliata* (Kunth) Cassini (Asteraceae) from Assam, India. *Pleione*, 7 (1) 258-261.
- Dhanya N.N., Padmavathy S. (2014) Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. Review article. *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 250693, 11 pages.
- Ding L., Maier A., Fiebig H.H., Lin W.H., Hertweck C. (2011) A family of multicyclic indolosesquiterpenes from a bacterial endophyte. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9 (11) 4029-4031.
- Duarte M.C.T., Figueira G.M., Sartoratto A., Rehder V.L.G., Delarmelina C. (2005) Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 97 (2) 305-311.
- Fuga C.A.G., Gonçalves D.C., Cunha W.V. (2011) Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* por *Bacillus* spp. "in vitro". *Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão*, 1 (8) 188-194.

Hanada R.E., Pomella A.W.V., Costa H.S., Bezerra J.L., Loguercio L.L., Pereira J.O. (2010). Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology*, 114 (11-12) 901-910.

Harrison L., Teplow D. B., Rinaldi M., Strobel G. (1991) Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. *Journal of General Microbiology*, 137 (12) 2857-2865.

Jalgaonwala R.E., Mohite B.V., Mahajan R.T. (2010) Evaluation of endophytes for their antimicrobial activity from indigenous medicinal plants belonging to North Maharashtra region India. *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research*, 1 (5) 136-141.

Jansen R.K. (1985). The systematics of *Acmella* (Asteraceae-Heliantheae). *Systematic Botany Monographs*, 1-115.

Jasim B., Mathew J., Radhakrishnan E. K. (2016) Identification of a novel endophytic *Bacillus* sp. from *Capsicum annuum* with highly efficient and broad spectrum plant probiotic effect. *Journal of Applied Microbiology*, 121 (4) 1079-1094.

Kawamoto S.O., Lorbeer J.W. (1976) Protection of onion seedling from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease*, 60: 189–191.

Kern M.E., Blevins K.S. (1999) *Micologia médica – Texto e Atlas*. 2. ed, São Paulo: Editorial Premier.

Lacava P., Li W., Araújo W., Azevedo J., Hartung J. (2006) Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium

Methylobacterium mesophilicum in plants. Journal of Microbiological Methods, 65 (3) 535-541.

Li X., Zhang Q., Zhang A., Gao J. (2012) Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (13) 3424-3431.

Ma L., Cao Y.H., Cheng M.H., Huang Y., Mo M.H., Wang Y., Yang J.Z., Yang F.X. (2013) Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. Antonie van Leeuwenhoek, 103 (2) 299-312.

Maki C.S. (2006). Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). Tese para obter o título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. pp. 127.

Mapperson R.R., Kotiw M., Davis R.A., Dearnaley J.D.W. (2014) The diversity and antimicrobial activity of *Preussia* sp. endophytes isolated from australian dry rainforest. Current Microbiology, 68 (1) 30-37.

Mello V.K. de, Medeiros G.L., Diniz J.M.P., Stringari D., Terasawa L.V.G, Jaccoud Filho D. de S., Matiello, R.R., Rudnik, S., Pileggi, M., Pileggi, S.A.V. (2010). Antagonismo in vitro e obtenção dos extratos brutos de microrganismos endofíticos isolados do milho crioulo frente ao fungo fitopatogênico *Fusarium* sp. I51-2. I Congresso de Iniciação Científica de Pós-Graduação – Florianópolis (SC).

Monarco C., Sisterna M., Perelló A., Bello D.G. (2004) Preliminary studies on biological control of the Blackpoint Complex of wheat in Argentina. World Journal of Microbiology e Biotechnology, 20 (3) 285-290.

Moreno S.C., Carvalho G.A., Picanço M.C., Morais E.G.F., Pereira R.M. (2012) Bioactivity of compounds from *Acmella oleraea* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (*Lepidoptera: Gelechiidae*) and selectivity to two non-target species. *Pest Management Science*, 68 (3) 386-393.

Oliveira K.M. de, Boas E.V., Bonett L.P., Cardozo Júnior E.L., Bernardi-Wenzel J. (2015) Isolamento e atividade antibacteriana de fungos endofíticos de *Piper glabratum* Kunth. *Arquivos de Ciência e Saúde UNIPAR*, Umuarama, 19 (1) 3-9.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016) Nota descriptiva: Resistencia a los antibióticos. Octubre 2016 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>

Peixoto-Neto P.A.D.S.P., Azevedo J.L., Araújo, W. L. (2002) Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, 29, 62-77.

Petrini O. (1991). Fungal endophyte of tree leaves. En: Andrews J., Hirano S.S. (Eds). *Microbial Ecology of Leaves*. New York. Springer Verlag. pp.179-197.

Phongpaichit S., Nikom J., Rungjindamai N., Sakayaroj J., Hutadilok-Towatana N., Rukachaisirikul V., Kirtikara K. (2007) Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garnicia* plants. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51(3) 517- 525.

Pimentel I., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Makowiecky R., Azevedo J.L. (2006) Identification and Colonization of Endophytic Fungi from Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under Different Environmental Conditions. *International Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (5) 705-711.

Prachayasittikul S., Suphamong S., Worachartcheewan A., Lawung R., Ruchirawat S., Prachayasittikul V. (2009) Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules*, 14 (2) 850-867.

Rani S.A., Murty, S.U. (2006) Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. *African Journal of Biomedical Research*, 9 (1) 67-69.

Rincón C.A.M., Castaño J.C.O., Ríos E.V. (2012) Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17 (2) 160-171.

Rocha R., Eleutério D., Engels C., Veiga S.A., Jaccoud D., Rodrigues R., Pileggi M. (2009) Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 40 (1) 73-78.

Santi F.I.F., Machado Z.O., Soto H.H.G, Segal E.I.F., Ramos H.B. (2012) Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil*, 353 (1) 409-417.

Santos T.T., Varavallo M.A. (2011) Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse económico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, 32 (2) 199-212.

Sbravatti J.A., Garcia C., Chapaval I., Figueredo A., Schultz B. (2013) Seleção *in vitro* de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. *Floresta*, Curitiba, PR, 43 (1) 145 – 152.

Selim K.A., El-Beih A.A., AbdEl-Rahman T.M., El-Diwany A.I. (2011) Biodiversity and antimicrobial activity of endophytes associated with Egyptian medicinal plants. *Mycosphere* 2 (6) 669-678.

Silva M.P., Barbosa F.S.Q., Barros R. F. M. de (2014) Estudo taxonômico e etnobotânico sobre a família *Asteraceae* (Dumortier) em uma comunidade rural no Nordeste do Brasil. *Gaia Scientia*, 8 (2) 110-123.

Silva M.C.S. (2015). Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.). Tese para obter o grau de Mestre em Ciências. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. Piracicaba. pp. 76.

Sousa K.A. de, Orlanda J.F. de, Bezerra G., Sousa T. de (2013) Estudo do potencial de fungos endofíticos no controle do agente causal da fusariose em tomateiro. *Agroecossistemas*, 5 (1) 50-55.

Souza A., Souza A., Astolfi Filho S., Belém Pinheiro M.L., Sarquis M.I., Pereira J. (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, 34 (2) 185-195.

Souza R.D., Mendonça E.A.F., Soares M.A. (2015) Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. *Summa Phytopathologica*, 41 (3) 229-232.

Sun L., Lu Z., Bie X., Lu F., Yang S. (2006) Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (12) 1259-1266.

Thompson T., Sukesh K., Singh D. (2012) A study on the antimicrobial effect of *Acmella oleraceae* against dental caries bacteria. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 3 (4) 1194-1197.

Trivedi P., Duan Y., Wang N. (2010) Huanglogbing, a systemic disease, restructures the bacterial community associated with citrus roots. Applied and Environmental Microbiology, 76 (11) 3427-3436.

Vrije T., Antoine N., Buitelaar M.R., Bruckner S., Dissevelt M., Durand A., Gerlagh M., Jones E.E., Lüth P., Oostra J., Ravensberg W.J., Renaud R., Rinzema A., Weber F.J., Whipps J.M. (2001) The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: Production by solid-state fermentation, application and marketing. Applied Microbiology e Biotechnology, 56 (1-2) 58-68.

Wani M.A., Sanjana K., Kumar D.M., Lal D.K. (2010) Short Communication. GC-MS analysis reveals production of 2-phenylethanol from *Aspergillus niger* endophytic in rose. Journal of Basic Microbiology, 50 (1) 110-114.

Wicklow D.T., Roth S., Deyrup S.T., Gloer J.B. (2005) A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. Mycological Research, 109 (5) 610-618.

Zanardi L., Bolzani V., Cavalheiro A., Silva D.H., Trevisan H.C., Araujo A.R. (2012) Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis cassia* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. Quimica Nova, 35 (11) 2233-2236.

Zhao J., Shan T., Mou Y., Zhou L. (2011) Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11 (2) 159 - 168.

Zhou J.Y., Zhao X.Y., Dai C.C. (2014) Antagonistic mechanisms of endophytic *Pseudomonas fluorescens* against *Athelia rolfsii*. Journal of Applied Microbiology, 117 (4) 1144-1158.