



3º Simpósio Nacional de Fruticultura

Vila Real, 4 e 5 de dezembro de 2014



Associação
Portuguesa de
Horticultura



Centre for the Research and Technology of
Agro-Environment and Biological Sciences



Centro Operativo e Tecnológico
Hortofrutícola Nacional

Ficha Técnica:

Título: 2º Simpósio Nacional de Fruticultura

Colecção: Actas Portuguesas de Horticultura, nº 23

Editor: ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE HORTICULTURA

Rua da Junqueira, 299 – 1300-338 Lisboa

Coordenação: Raúl Rodrigues e Ana Paula Silva

Autores: vários

Edição e Coordenação: Raúl Rodrigues e Ana Paula Silva

Tiragem: 200 exemplares

ISBN: 978-972-8936-16-7

Avaliação do potencial antimicrobiano de fungos endofíticos da oliveira

Cynthia Malhadas¹, Paula Guedes² & Paula Baptista¹

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO) / Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, *Campus* de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal. pbaptista@ipb.pt

²REQUIMTE / Laboratório de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal.

Resumo

Atualmente, a pesquisa de compostos bioativos naturais com aplicação no tratamento e prevenção de doenças humanas tem vindo a ganhar cada vez mais importância. Alguns destes estudos centram-se na bioprospeção de produtos naturais de origem microbiana. De entre os microrganismos com maior importância como fonte de produtos naturais destacam-se os fungos, sendo responsáveis por 38% do total dos compostos biologicamente ativos de origem microbiana descritos. A maioria destes metabolitos é explorada pela sua atividade como antibióticos. Assim, o objetivo geral deste trabalho consistiu na avaliação do potencial antimicrobiano de fungos endofíticos isolados de folhas de oliveira. As espécies fúngicas estudadas foram *Penicillium commune*, *Penicillium canescens* e *Alternaria alternata*. A atividade antimicrobiana foi avaliada em condições *in vitro* utilizando como microrganismos teste bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*), gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e leveduras (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*). Como testemunha utilizou-se cloranfenicol (30 µg/ml) para bactérias e fluconazol (25 µg/ml) para leveduras. As três espécies de fungos endofíticos testados inibiram o crescimento de pelo menos quatro dos microrganismos utilizados. A espécie *A. alternata* foi a que apresentou maior atividade antagónica contra as leveduras, originando percentagens de inibição superiores a 90% quando comparado com a testemunha. As espécies *P. commune* e *P. canescens* foram mais eficazes contra as bactérias. Face a testemunha, *P. commune* originou percentagens de inibição a variar entre 11% para *B. subtilis* e 242% para *C. parapsilosis*; já no caso de *P. canescens* a variação situou-se entre 26% para *E. coli* e 112% para *C. glabrata*. Os resultados obtidos abrem novas perspectivas para a utilização destas espécies endófitas no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e leveduras.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, atividade antifúngica, *Candida*, *Penicillium*, *Alternaria*.

Abstract:

Evaluation of the antimicrobial potential of endophytic fungi from olive tree

Actually, the research on the use in the treatment and prevention of human diseases of natural bioactive compounds, has earned a lot of importance. Some of these studies focus on the bioprospection of natural products of microbial origin. The most important microorganisms as sources of natural products stand out fungi, being responsible for 38% of biologically active compounds total as it is described. Most of these metabolites are exploited for their activity as antibiotics. Therefore, the aim of this study was the evaluation of the antimicrobial potential of endophytic fungi that were isolated from olive leaves. The studied fungal species were *Penicillium commune*, *Penicillium canescens* and *Alternaria alternata*. The antimicrobial activity was evaluated under *in vitro* conditions using as microorganisms tests Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), Gram-positive bacteria

(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*) and yeasts (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata*). As control we used chloramphenicol (30 mg / ml) for bacteria and fluconazole (25 mg / ml) for yeasts. The three species of endophytic fungi tested inhibited the growth of, at least, four microorganisms. The species *A. alternata* showed the highest antagonistic activity against yeasts, yielding percentages of inhibition higher than 90% when compared to control. The species *P. commune* and *P. canescens* were more effective against bacteria. Compared to the control, *P. commune* gave percentages of inhibitions that ranged between 11% for *B. subtilis* and 242% for *C. parapsilosis*, while, for *P. canescens* they ranged from 26% for *E. coli* and 112% for *C. glabrata*. The results open new perspectives for the use of these endophyte species in the treatment of infectious diseases caused by bacteria and yeasts

Keywords: Antibacterial activity, antifungal activity, *Candida*, *Penicillium*, *Alternaria*.

Introdução

Nos últimos anos os fungos endofíticos têm sido alvo de estudo tendo em vista a pesquisa e deteção de novos compostos com atividade biológica de interesse a nível farmacêutico e medicinal. Este interesse deve-se sobretudo ao facto destes fungos representarem uma fonte rica e diversa de compostos bioativos naturais, contribuindo para a produção de uma vasta gama de metabolitos biologicamente ativos, tais como antibióticos, compostos antitumorais, imunossuppressores, antivirais, agentes antiparasíticos e compostos inativadores de enzimas (Gunatilaka, 2006; Olano et al., 2008; Donnez et al., 2009). Estes fungos, caracterizam-se por colonizarem inter- e intracelularmente os tecidos internos das plantas, durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele, sem causarem sintomas aparentes de doença no hospedeiro (Hyde & Soyong, 2008). É precisamente durante esta interação que o fungo endofítico produz uma grande diversidade de metabolitos que favorecem o crescimento vegetativo e a competitividade da planta hospedeira. No que concerne especificamente aos metabolitos secundários produzidos por fungos endofíticos e relacionados com atividade antimicrobiana, destacam-se sobretudo os compostos fenólicos (e.g. quinonas e flavonóides), alcalóides, peptídeos, terpenóides e esteróides (Yu et al., 2009).

Estima-se que a diversidade de fungos endofíticos seja enorme, cerca de 1,5 milhões de espécies. Deste total, apenas 10% foram descobertas e estudadas até ao momento, e apenas 1% foram alvo de estudo quanto à sua capacidade de produção de metabolitos secundários (Guo et al., 2008). O desconhecimento da diversidade fúngica associada às suas potencialidades biotecnológicas sugere a existência de uma grande quantidade de compostos bioativos naturais que se encontram ainda por explorar. A bioprospeção de novos compostos antimicrobianos ao nível de fungos endofíticos reveste-se, neste âmbito, de enorme importância. Na atualidade, muitos dos antibióticos e antifúngicos disponíveis no mercado têm-se mostrado ineficazes no tratamento de infeções causadas por bactérias e fungos, respetivamente. Tendo em vista esta estratégia, o grupo de investigação AgroBiotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança iniciou, em 2012, o estudo da diversidade de fungos endofíticos em diferentes órgãos (raiz, caules e folhas) da oliveira (*Olea europaea* L.). Os resultados obtidos indicaram a existência de uma grande diversidade de fungos endofíticos (Martins, 2013). O presente trabalho pretende avaliar as potencialidades biotecnológicas de alguns dos isolados obtidos e selecionar os mais promissores para trabalhos futuros com vista à sua utilização na indústria farmacêutica como produtores de antibióticos e antifúngicos naturais. Para tal, procedeu-se à avaliação do potencial antimicrobiano de três fungos endofíticos, *Penicillium commune*, *Penicillium canescens* e *Alternaria alternata*, isolados da folha de oliveira contra bactérias Gram -, Gram +, e leveduras.

Material e Métodos

Estirpes microbianas

Os ensaios da atividade antimicrobiana foram efetuados contra bactérias Gram + (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), bactérias Gram – (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), e leveduras (*Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*). Todos os microrganismos tiveram proveniência do Departamento de Biologia da Universidade do Minho (Braga, Portugal). As leveduras foram cultivadas a uma temperatura de 25°C durante 24 h, em meio de cultura YPDA [extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glucose 2% (p/v) e agar 2% (p/v)]. As bactérias foram cultivadas a 37°C durante 24 h, em meio de cultura LB [triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), e agar 2% (p/v)].

Foram testadas três espécies de fungos endofíticos, *Penicillium commune*, *Penicillium canescens* e *Alternaria alternata*, previamente isolados de folha de oliveira cv. Cobrançosa. Estes fungos encontram-se depositados na Coleção de Culturas da Escola Agrária, do Instituto Politécnico de Bragança. A sua identificação baseou-se na amplificação e sequenciação da região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA nuclear ribossomal utilizando os *primers* universais *ITS1* e *ITS4* (White et al., 1990), seguindo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2012). A obtenção de inóculo para os ensaios da atividade antimicrobiana foi feita a partir de culturas fúngicas em crescimento ativo em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA), a 25°C no escuro.

Análise da atividade antimicrobiana

Os ensaios da avaliação da atividade antimicrobiana foram efetuados segundo a metodologia descrita por Pereira et al. (2011). Prepararam-se suspensões de esporos das espécies endofíticas a testar em solução aquosa de Tween 80 (0,02% v/v), à concentração final de 10⁶ esporos/mL. 10µL desta suspensão foi transferida para o centro de uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 10 mL de meio de cultura BDA. As placas de Petri foram postas a incubar a 25°C, no escuro, durante 3 dias para *P. commune*, 6 dias para *A. alternata* e 8 dias para *P. canescens*. Após incubação, a superfície das placas de Petri contendo as colónias fúngicas, foi coberta uniformemente com 3 mL de uma suspensão de bactérias ou leveduras preparada em meio de agar-água (0,8%, p/v), à concentração de 10⁷ UFC (unidades formadoras de colónias)/mL. A suspensão de bactérias e leveduras foi obtida transferindo a biomassa de uma cultura de 24h de crescimento para 5 mL de NaCl 0,85% (p/v). Um volume desta suspensão foi adicionado ao meio de agar-água 0,8% (p/v) de forma a obter a concentração pretendida. Para a contagem de microrganismos/esporos foi utilizado uma câmara de Neubauer. Após 24h de incubação a 25°C (para leveduras) ou 32°C (para bactérias) no escuro, avaliou-se a atividade antimicrobiana de cada espécie fúngica, pela determinação da área dos halos de inibição à volta das colónias fúngicas. Como testemunha utilizou-se cloranfenicol (30 µg/ml) para bactérias e fluconazol (25 µg/ml) para leveduras. Efectuaram-se três repetições de cada combinação (fungo endofítico x microrganismo) e cada ensaio foi repetido três vezes.

Análise de dados

A partir dos valores dos raios dos halos de inibição determinaram-se as respectivas áreas sendo, estes resultados apresentados na forma de diferenças percentuais face à testemunha. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa SPSS v.18 e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p <0,05).

Resultados e discussão

O aumento da resistência por parte dos microrganismos aos antibióticos/antifúngicos existentes, tem potenciado a procura de novos agentes antimicrobianos (Pavithra et al., 2012; Phongpaichit et al., 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um dos maiores problemas de saúde pública na atualidade advém precisamente das limitações dos antibióticos

disponíveis no mercado para o tratamento de infecções causadas por microrganismos. Para este problema, poderá haver uma possível solução que passa pela descoberta de novos antibióticos e antifúngicos, com mecanismos de ação distintos dos que estão, neste momento, disponíveis no mercado. Esta medida, foi recentemente reforçada pela Sociedade Americana de Doenças Infeciosas ao solicitar a descoberta de 10 novas classes de antibióticos até 2020 (Wright, 2012). O mesmo autor considera que a bioprospeção de metabolitos bioativos de origem natural (microrganismos, plantas e animais) apresenta um enorme potencial para a obtenção de novos antibióticos e antifúngicos. A descoberta de novos metabolitos produzidos por fungos endofíticos poderá assim dar um enorme contributo para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos. No presente estudo avaliou-se a capacidade de três espécies fúngicas endofíticas (*P. commune*, *A. alternata* e *P. canescens*) inibirem o crescimento de bactérias Gram +, Gram - e leveduras. Verificou-se que o poder inibitório dos fungos endofíticos foi variável consoante a espécie. O endófito *A. alternata* demonstrou ser mais eficaz contra as leveduras (fig. 1), enquanto *P. commune* e *P. canescens* foram mais eficazes contra as bactérias (figs 2 e 3). De entre as leveduras analisadas *C. parapsilosis* demonstrou ser a mais sensível e *C. albicans* a mais resistente aos endófitos estudados (fig. 1). Ao nível das bactérias, *B. cereus* (gram +) e *P. aeruginosa* (gram -), foram as mais sensíveis aos endófitos testados (figs 2 e 3).

O estudo dos efeitos antifúngicos (fig. 1) revelou que apenas o endófito *A. alternata* teve a capacidade de inibir significativamente o crescimento das três leveduras testadas, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. albicans*, em mais de 90% quando comparado com a testemunha (fluconazol 25 µg/mL). O fungo *P. canescens* inibiu significativamente *C. glabrata* em 112% comparativamente à testemunha, enquanto *C. albicans* e *C. parapsilosis* apresentaram maior resistência. Similarmente, o endófito *P. commune* exibiu unicamente capacidade para inibir a levedura *C. parapsilosis*, em cerca de 242% face ao antifúngico comercial fluconazol, apresentando as espécies *C. glabrata* e *C. albicans* maior resistência. Os resultados dos ensaios antibacterianos, indicam que o fungo *P. canescens* e *P. commune* apresentam uma maior atividade contra bactérias Gram + (fig. 2) e a segunda espécie adicionalmente contra bactérias Gram- (Fig. 3). Quando comparado com a testemunha (cloranfenicol 30 µg/ml), *P. canescens* inibiu significativamente o crescimento de *B. subtilis*, *S. aureus* e *B. cereus*, em 44%, 28% e 35%, respetivamente (fig. 2). A atividade inibitória de *P. commune* contra as bactérias gram+ fez-se sentir sobretudo nas espécies *S. aureus* e *B. cereus*, registando-se reduções significativas do seu crescimento em 26% e 48%, respetivamente, face à testemunha. Ao nível das bactérias Gram - (fig. 3) o endófito *P. commune* inibiu significativamente o crescimento de *P. aeruginosa* em 77% e o endófito *P. canescens* o de *E. coli* em 26%, comparativamente à testemunha.

De uma maneira geral, a atividade antimicrobiana exibida pelos fungos endofíticos encontra-se associada à produção de compostos pertencentes a várias classes químicas incluindo esteróides (Dai et al., 2006), sesquiterpenos, diterpenos e triterpenóides (Yu et al., 2010), peptídeos (Cui et al. 2008), alcalóides (Qin et al. 2009) e compostos fenólicos (Han et al., 2008). À semelhança do observado no presente estudo, espécies pertencentes ao género *Penicillium*, tinham já demonstrado a capacidade antimicrobiana (Rancic et al., 2006; Nicoletti et al., 2007). A atividade antimicrobiana exibida pelo por *P. canescens* no presente estudo pode ser atribuída, entre outros fatores, à produção de compostos fenólicos (e.g. ácido clavulânico) e de alcalóides, anteriormente referenciados como possuindo propriedades antifúngicas e antibacterianas (Nicoletti et al., 2007; Bertinetti et al., 2009).

Conclusões

Todos os fungos endofíticos isolados da folha de oliveira e testados no presente estudo apresentaram atividade antimicrobiana. De entre as espécies estudadas, *A. alternata* pareceu ser a mais promissora no tratamento de doenças infecciosas causadas pelas leveduras, originando halos de inibição significativamente superiores aos antifúngicos comerciais. Por sua vez, as espécies *P. canescens* e *P. commune*, mostraram ser mais eficazes contra as bactérias. Este

estudo confirma o potencial dos fungos endofíticos como uma fonte promissora na procura de antibiótico/antifúngicos naturais.

Agradecimentos

Este trabalho é financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto “EndoBio - Isolamento e seleção de fungos endofíticos da oliveira para luta biológica contra *Colletotrichum acutatum* e *Verticillium dahliae*” (PTDC/AGR-PRO/4354/2012).

Referências

- Cui HB, Mei WL, Miao CD, Lin HP, Hong K. & , Dai HF. 2008. Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium sp.*0935030 of mangrove plant *Acrostichum aureum*. Chemical Journal of Chinese Universities, 33: 407-10.
- Dai JQ, Krohn K, Flörke U, Draeger S, Schulz B, KissSzikszai A, et al. 2006. Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium sp.* from *Juniperus cedre*. European journal of organic chemistry, 3498–506.
- Donnez, D.; Jeandet, P.; Clement, C. & Courot, E. 2009. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. Trends in Biotechnology, vol. 27, no. 12, p. 706-713
- Gunatilaka AA. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. J Nat Prod, 69(3):509-26
- Guo L, Wu JZ, Han T, Cao T, Rahman K, Qin LP. 2008. Chemical Composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. Molecules, 13:2114–25.
- Han Z, Mei WL, Cui HB, Zeng YB, Lin HP, Hong K, et al. 2008. Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium sp.* Of mangrove plant *cerbera manghas*. Chemical Journal of Chinese Universities, 29(4): 749-752
- Hongsheng Yu, Lei Zhang, Lin Li, Chengjian Zheng, Lei Guo, Wenchao Li, Peixin Sun, Luping Qin. 2009. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. Microbiological Research. 2009; e.g. 32(165):437-449
- Hyde, K. D. and Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. Fungal Diversity, 33: 163-173.
- Martins Fátima, Pereira José Alberto, Bento Albino & Baptista Paula. 2013. Diversity and distribution pattern of fungal endophytes in *Olea Europaea L.* VII Congresp Ibérico de agroingeniería y Ciencias Hortícolas, Madrid, Spain 26-29 August.
- Nicoletti, R., Lopez-Gresa, M.P., Manzo, E., Carella, A., Ciavetta, M.L. 2007. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia*, 163 (5): 295-301.
- Olano, C., Méndez, C., and Salas, J.A. 2008. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by Metabolic engineering. *Metab Eng* 10 : 281-292.
- Oliveira, I., Pereira, A., Lino-Neto, T., Bento, A., Baptista, P. 2012. Fungal diversity associated to the olive moth, *Prays oleae* Bernard: a survey for potential entomopathogenic fungi. *Microbial Ecology*, 63: 964-974
- Pavithra, N., Sathish, L., Ananda, K. 2012. Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. *Journal of Pharmaceutical and biomedicalsciences*, 16 (12): 1-6.

- Pereira, E., Santos, A., Reis, F., Tavares, R., Baptista, P., Lino-Neto, T., Almeida-Aguiar, C. 2011. A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological Research*, 168: 1-5.
- Phongpaichit, V., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, V. 2013. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: a review. *EXCLI Journal*, 12: 291-312.
- Qin JC, Zhang YM, Gao JM, Bai MS, Yang SX, Laatschb H et al. 2009. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(6):1572-4.
- Rancic, A., Sokovic, M., Karioti, A., Vukojevic, J., Skaltsa, H. 2006. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(1): 80-84.
- White, T.J., Bruns T, Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand D.H., Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, 315-322.
- Wright, G. 2012. Antibiotics: A new hope. *Chemistry & Biology*, 19: 3-10.

Quadro e figuras

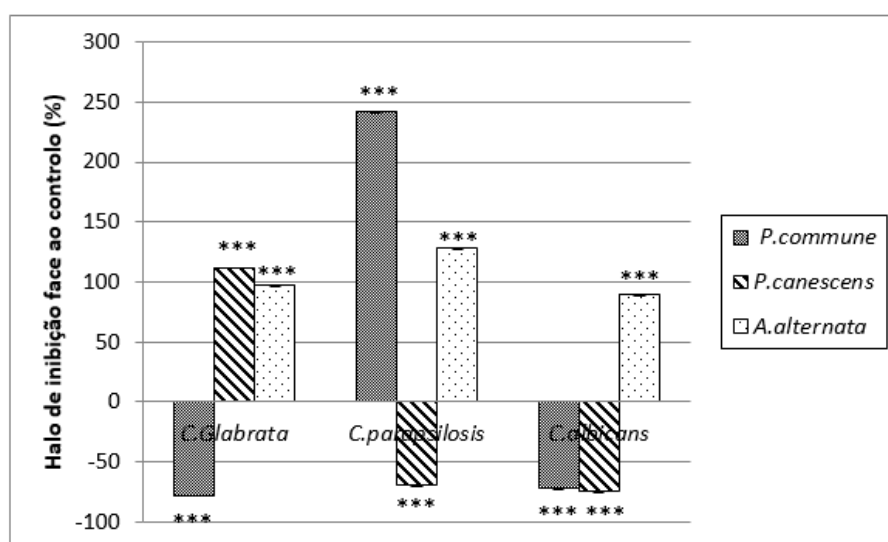


Figura 1 – Diferenças de área de halos de inibição exibida pelos fungos endofíticos *P. commune*, *P. canescens* e *A. alternata*, contra as leveduras *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*. A barra indica a média \pm erro padrão (n=3). Os asteriscos representam valores estatisticamente diferentes da testemunha (fluconazol 25 μ g/mL) em *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001.

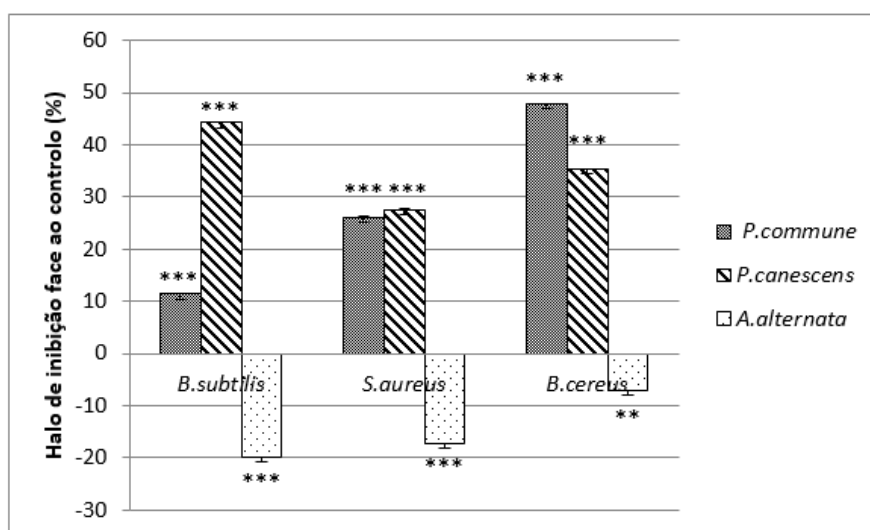


Figura 2 – Diferenças de área de halos de inibição exibida pelos fungos endofíticos contra as bactérias Gram+ *B. subtilis*, *S. aureus* e *B. cereus*. A barra indica a média ± erro padrão (n=3). Os asteriscos representam valores estatisticamente diferentes da testemunha (cloranfenicol 30 µg/mL) em *p <0,05, **p <0,01 e ***p <0,001.

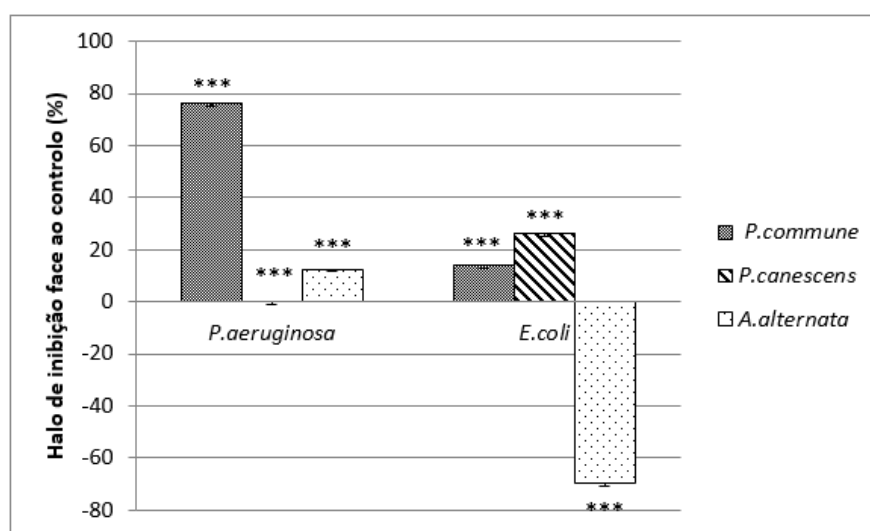


Figura 3 – Diferenças de área de halos de inibição exibida pelos fungos endofíticos contra as bactérias Gram - *P. aeruginosa* e *E. coli*. A barra indica média ± erro padrão (n=3). Os asteriscos representam valores estatisticamente diferentes da testemunha (cloranfenicol 30 µg/mL) em *p <0,05, **p <0,01 e ***p <0,001.e.