



Investigação de fungos endofíticos associados a espécies vegetais aquáticas

Investigation of endophytic fungi associated with aquatic plant species

Lorena Kozan Klimpel¹, Giselle Maria Maciel², Lucia Regina Rocha Martins³.

RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior de plantas sem causar danos aparentes e são capazes de produzir uma grande variedade de compostos bioativos que podem trazer benefícios para as plantas hospedeiras como maior resistência a doenças, tolerância a estresses bióticos e abióticos e promoção do crescimento vegetal. A aplicação de fungos endofíticos na biotransformação de contaminantes ambientais é considerada de grande importância devido a sua capacidade de metabolizar (e, em alguns casos, bioacumular) compostos orgânicos tóxicos (ex.: pesticidas, organoclorados), metais pesados e contaminantes emergentes diversos. Este trabalho teve como objetivo a investigação de fungos endofíticos em macrófitas aquáticas que se desenvolvem em lagoas do Parque Barigui (Curitiba – PR), sendo analisada a espécie flutuante do gênero *Salvinia*. Após a coleta, as amostras foram descontaminadas e seções das folhas inoculadas em Ágar Batata Dextrose suplementado com antibiótico, os crescimentos miceliais foram transferidos para meio de cultivo líquido, seguido de etapas de purificação e isolamento dos endófitos por microcultivo. As características estruturais macroscópicas e microscópicas têm sido utilizadas para a identificação no nível de gênero.

PALAVRAS-CHAVE: Biotransformação; fungos endofíticos; macrófitas aquáticas.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that inhabit the interior of plants without causing apparent damage and are capable of producing a wide variety of bioactive compounds that can bring benefits to host plants such as greater resistance to diseases, tolerance to biotic and abiotic stresses and promotion of plant growth. The application of endophytic fungi in the biotransformation of environmental contaminants is considered of great importance due to their ability to metabolize (and, in some cases, bioaccumulate) toxic organic compounds (e.g.: pesticides, organochlorines), heavy metals and various emerging contaminants. This work aimed to investigate endophytic fungi in aquatic macrophytes that develop in lagoons in Barigui Park (Curitiba – PR), analyzing the floating species of the genus *Salvinia*. After collection, the samples were decontaminated and sections of the leaves inoculated in Potato Dextrose Agar supplemented with antibiotic, the mycelial growths were transferred to liquid culture medium, followed by purification steps and isolation of endophytes by microculture. Macroscopic and microscopic structural features have been used for identification at the genus level.

KEYWORDS: Biotransformation; endophytic fungi; aquatic macrophytes.

REVISÃO DA LITERATURA

Os fungos endofíticos são microrganismos que habitam o parênquima vegetal e se desenvolvem de forma simbiótica, sendo considerados específicos pois apenas poucos fungos são dominantes em cada hospedeiro (Madigan et al., 2010). A transmissão se dá

¹ Bolsista do CNPq. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: lorenakozan@gmail.com. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1977946475375284>.

² Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: gisellemariam@gmail.com. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1525661213489573>.

³ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: luciaregi@utfpr.edu.br. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0301804822998646>.



através da penetração na planta hospedeira pelos estômatos, raízes e ferimentos ou, até mesmo, por meio das sementes (Aly *et al.*, 2011).

Na relação fungo endofítico e seu hospedeiro, o endófito pode estabelecer uma relação de mutualismo com a planta conferindo aumento da resistência a fatores bióticos e abióticos a partir da produção de metabólitos secundários, alteração de propriedades fisiológicas, bioquímicas e também conferir promoção do crescimento vegetal através da produção de fitohormônios (Waqas *et al.*, 2012).

A localização geográfica, umidade e temperatura ambiente, estágio de desenvolvimento vegetal e outros fatores podem afetar a diversidade e frequência de fungos endofíticos, entretanto as regiões de clima tropical são consideradas *habitats* de maior abundância (Bezerra *et al.*, 2013). Sendo assim, o desenvolvimento de estudos sobre as interações biofisiológicas estabelecidas entre a planta e fungos endofíticos são consideradas relevantes tendo em vista o potencial de obtenção de substâncias bioativas específicas, produzidas a partir da associação dos organismos.

COMPETÊNCIA METABÓLICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Segundo Chapla, Biasetto e Araújo (2016), os fungos endofíticos têm sido encontrados em quase todas as plantas vasculares e estão relacionados com a produção de substâncias de grande interesse biotecnológico em diversas aplicações, como na agricultura, farmacologia, biorremediação entre outros.

No que tange ao potencial de utilização de fungos para a biorremediação ambiental, entre os temas atuais que mais demandam estudos científicos vigoram os poluentes emergentes, que são substâncias (sintéticas ou de origens naturais) cujo monitoramento ainda não está previsto na legislação ambiental vigente, mas que estão presentes nos compartimentos ambientais e podem causar efeitos nocivos nos ecossistemas e/ou na saúde humana. Destacam-se como poluentes emergentes os pesticidas, plastificantes, conservantes de madeira, polímeros, compostos organoclorados, subprodutos de desinfecção, produtos de higiene pessoal e fármacos (Geissen *et al.*, 2015).

Os fármacos são poluentes emergentes comumente encontrados em ambientes hídricos e que apresentam potenciais riscos ao meio ambiente. Baixas concentrações dessas substâncias inalteradas podem estar presentes em consequência do descarte incorreto de medicamentos, efluentes de indústrias farmacêuticas ou da fração não metabolizada e excretada após consumo pelos seres vivos, podendo atingir águas superficiais. Os sistemas de tratamento de esgotos são inaptos à remoção dos fármacos e de seus metabólitos e, por serem introduzidos no meio ambiente de forma contínua, mesmo em baixas concentrações, a absorção dessas substâncias pelos organismos de diferentes níveis tróficos ocorre de forma progressiva e crônica (Jones *et al.*, 2005). Dessa forma, são necessárias medidas para remediação e diminuição de fármacos presentes no ambiente.

A biotransformação de contaminantes emergentes por fungos endofíticos pode ser uma estratégia útil na remoção desses compostos e minimização de seus efeitos prejudiciais ao ambiente e à saúde humana. Consiste em um conjunto de reações que produzem modificações estruturais de substâncias pelo aparato metabólico disponível no micro-organismo exposto, que dispõe de sistemas enzimáticos e oxidativos aptos à degradação e perda de toxicidade (Castro, 2004).



Além da biorremediação ambiental, o metabolismo realizado pelos fungos endofíticos pode apresentar um papel importante na biotransformação de fármacos e formação de estruturas com novas atividades biológicas, o que tem sido uma possibilidade inesgotável de novas substâncias bioativas (Chapla, Biasetto e Araújo, 2016).

PRESENÇA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM MACRÓFITAS AQUÁTICAS.

Macrófitas aquáticas são vegetais que possuem um papel muito importante nos ecossistemas aquáticos como fornecimento de alimento e habitat para animais associados a esses ambientes, ajudam no controle de erosões das margens, fornecem oxigênio pela fotossíntese e ajudam a manter a qualidade da água. Há uma grande diversidade dentre as espécies vegetais e, conforme sua forma biológica são classificadas em: anfíbias, emergentes, flutuantes fixas, flutuantes livres, submersas fixas, submersas livres e epífita (Xavier *et al.*, 2021).

Dentre os diversos sistemas de tratamento de água residual, as tecnologias que utilizam macrófitas aquáticas destacam-se por sua capacidade de reduzir a concentração de poluentes inorgânicos, metais pesados e substâncias tóxicas, melhorando a qualidade das águas residuais. Esse tratamento alternativo por macrófitas aquáticas tem revelado grande potencial devido a esses vegetais absorverem nutrientes funcionando como biofiltros e gerando um efluente com menores níveis de contaminantes. Estas características de algumas macrófitas aquáticas podem estar relacionadas aos fungos endofíticos presentes nelas, uma vez que possuem capacidade de sequestro, absorção e degradação de poluentes e contaminantes (Sezerino, P.H.; Pelissari, C., 2021).

MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta de espécimes flutuantes do gênero *Salvinia* foi realizada no Parque Barigui na cidade de Curitiba-PR (autorização para pesquisa emitida pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente sob número 04-024486/2022), na lagoa localizada nas coordenadas geográficas 25°25'13"S 49°18'26"W. Alguns espécimes foram utilizados na confecção de exsiccatas para posterior identificação e depósito em herbário.

O material vegetal foi transportado para o laboratório imediatamente após a remoção da superfície da água, em sacos plásticos descartáveis. Os procedimentos adotados para o preparo das amostras foram adaptados da literatura (Chapla, Biasetto e Araújo, 2016). As folhas foram inicialmente lavadas em água corrente e então realizou-se a esterilização da superfície do tecido visando a eliminação de microrganismos epifíticos (comunidade externa) da amostra. Nesta etapa a amostra é imersa em etanol 70% por cerca de dois (2) minutos, e posteriormente em hipoclorito de sódio 1% por um (1) minuto e em seguida são novamente mantidas em etanol 70% por trinta (30) segundos. Por fim, o material é lavado com água destilada.

A inoculação foi feita utilizando pequenos fragmentos de tecidos foliares asépticamente retirados e aplicados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Ágar Batata Dextrose) suplementado com ciprofloxacino (2 mg/mL). As placas permaneceram incubadas em câmara de germinação a 20°C com fotoperíodo de doze



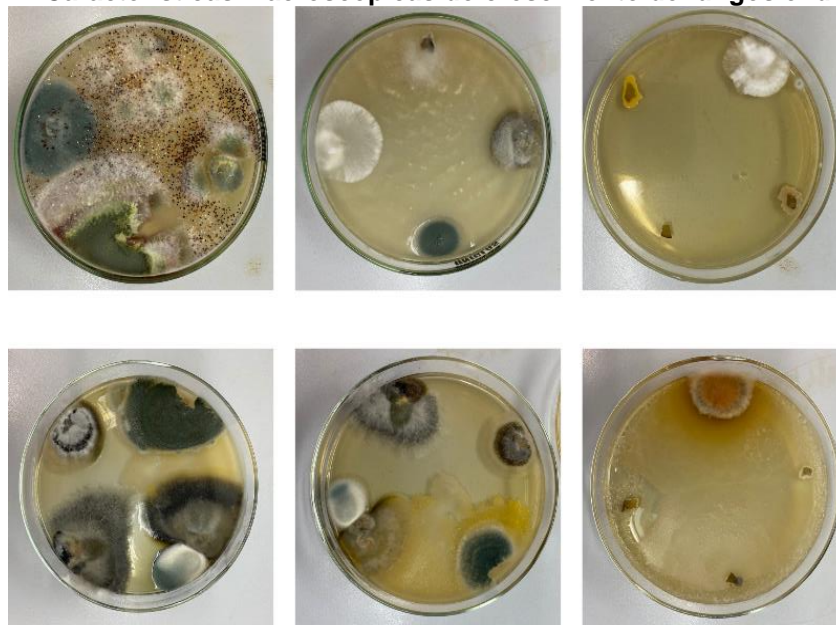
(12) horas por cerca de sete (7) dias. O crescimento micelial obtido foi transferido para frascos Ernelmeyer contendo meio líquido Sabouraud Dextrose (com ciprofloxacino 2mg/mL), que permaneceu sob incubação por 14 dias nas mesmas condições de cultivo.

O crescimento fúngico foi analisado quanto a suas características macroscópicas (aspectos de colônias) e aspectos estruturais morfológicos por microscopia ótica. As lâminas foram preparadas retirando-se fragmentos do crescimento micelial obtido do crescimento em meio líquido, utilizando corante azul-algodão. A identificação ao nível de gênero requer análise de estruturas de propagação (esporângios, conídios) e, para propiciar esse desenvolvimento, procedeu-se a técnica de microcultivo em lâminas contendo ágar PDA (Silva, 2009).

RESULTADOS

Após o período de incubação, alguns fragmentos foliares inoculados de *Salvinia* sp. apresentaram crescimento fúngico. Os aspectos macroscópicos das colônias, coloração, presença de gotículas e texturas puderam ser observadas como mostrado na Figura 1.

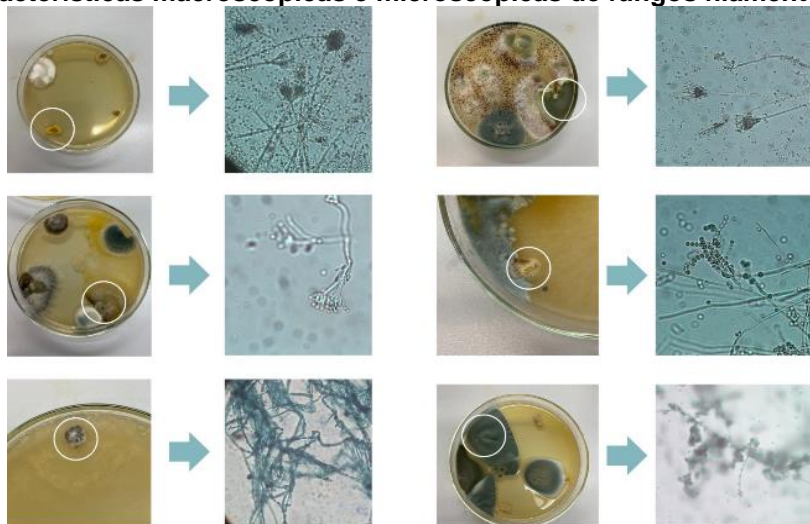
Figura 1 – Características macroscópicas do crescimento de fungos endofíticos.



Fonte: autoria própria.

A visualização microscópica permitiu evidenciar as estruturas de hifas confirmando a presença de fungos endofíticos. Algumas lâminas mostraram conidióforo verticilado, com formação de fiálide características do gênero *Penicillium*, porém em outras lâminas não foi possível a visualização de estruturas de propagação, o que dificultou a diferenciação de gêneros. Os experimentos de microcultivo estão em andamento.

Figura 2 – Características macroscópicas e microscópicas de fungos filamentosos isolados.



Fonte: Autor (2023).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo evidenciou a presença de fungos endofíticos em macrófitas aquáticas do gênero *Salvinia*. Os protocolos experimentais utilizados até o momento obtiveram pouco êxito na identificação taxonômica do gênero devido à dificuldade em induzir a esporulação, por isso têm-se como etapa em andamento a técnica de microcultivo com a finalidade de melhor visualização dos órgãos de frutificação destes fungos.

A identificação ao nível de espécie será realizada por técnica de sequenciamento genético para os endófitos que apresentarem resultados favoráveis nos experimentos de biotransformação de fármacos. Serão preparados extratos a partir da biomassa vegetal de espécimes de *Salvinia* e das biomassas fúngicas, para posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *tandem*.

Agradecimentos

Agradeço especialmente a Deus por me capacitar todos os dias. Agradeço à Fundação Araucária de Fomento à Pesquisa, pela bolsa concedida e ao CNPq pelo apoio ao Programa Institucional de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T.T. Potencial biorremediador do fungo endofítico *Mucor* sp. isolado da macrófita aquática *Eichornia crassipes* (Mart). Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2018



ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 6, Berlin, 2011.

BEZERRA, J. D. P.; SANTOS, M. G. S.; BARBOSA, R. N.; SVEDESE, V. M.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S.; GOMES, B. S.; PAIVA, L. M.; CORTEZ, J. S. A; MOTTA, C. M. S. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, v. 60, 2013.

BILLS, G.; DOMBROWSKI, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J.; AN, Z. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Quim. Nova**, V. 27, N. 1, 2004.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, 2013, 5 (3), 421-437.

FAIA, A. M.; Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água. Lisboa, 2011.

GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; UMLAUF, G.; NADAL, M.; VAN DER POEG; M., VAN DE ZEE, S.E.A.T.M; RITSEMA, C.J. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, 2015.

JONES, O.A.; LESTER, J.N.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 4, 2005.

KERN, M. E.; BLEVINS K.S. Medical Mycology: a self-instruction. 2.ed. Filadélfia: F.A. DAVIS COMPANY, 1999.

LACAZ-RUIZ, R. Manual Prático de Microbiologia Básica. São Paulo: Edusp, 2000.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Grupo A, 2010.

SEZERINO, P.H.; PELISSARI, C. (Org.) **Wetlands Construídos como Ecotecnologia para o Tratamento de Águas Residuárias**: experiências brasileiras. 1.ed. - Curitiba: Brazil Publishing, 2021. DOI: 10.31012/978-65-5861-293-3

XAVIER, J.O.; CAMPOS, M.C.S.; RIEIRO, S.T.M.; MOTA, H.R. **Macrófitas Aquáticas**: caracterização e importância em reservatórios hidrelétricos. Belo Horizonte: Cemig 2021.

WAQAS, M. et al. Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. **Molecules**, v. 17, n. 9, set. 2012.