



## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam. EM TRÊS LOCALIDADES NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

Igor Felipe Andrade Costa de Souza<sup>1</sup>; Bruno Henrique de Sousa Leite<sup>1</sup>; Danyele Costa de Mello<sup>1</sup>; Luanna de Ângelis Correia de Sousa<sup>1</sup>; Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho<sup>2</sup>

1. Faculdade Integrada de Pernambuco, igor\_souza\_@hotmail.com
2. Universidade Federal de Pernambuco, luanacassandra@terra.com.br

**Resumo:** *Moringa oleifera* Lamarck é uma planta pertencente à Família das Moringaceae, caracterizada como uma planta arbórea. Os vegetais possuem uma microbiota característica que tem importância para a sua sanidade e manutenção. Sendo esses micro-organismos denominados de endofíticos. Destaca-se a presença das actinobactérias, como produtores de metabólitos bioativos. O presente trabalho teve por objetivo a bioprospecção, através do isolamento e identificação de actinobactérias endofíticas de folhas da *M. oleifera*. As folhas foram coletadas no *campus* Recife da Universidade Federal de Pernambuco, no Jardim Botânico do Recife do Recife e na cidade de Caruaru no Estado de Pernambuco, Brasil. Sendo processadas no prazo de 24 horas, através da metodologia de desinfecção. O isolamento foi realizado por maceração. A observação macroscópica foi realizada através da observação de características das colônias. A caracterização micromorfológica foi realizada através da técnica de microcultivo em placa. Testes fenotípicos para classificação taxonômica foram realizados. Foram isolados 33 actinobactérias endofíticas, sendo 21 (63,6%) linhagens provenientes das folhas coletadas da *M. oleifera* no Jardim Botânico do Recife; 8 (24,2%), no *campus* Recife da UFPE; e 4 (12,2%), na Cidade de Caruaru. A análise macroscópica verificou-se que não houve diversidade em relação aos aspectos observados. A análise microscópica permitiu inferir que em apenas 13 (39,4%) isolados foi possível determinar o gênero, sendo eles: *Streptomyces* e *Actinomadura*. Não houve a identificação dos demais isolados devido a características inerentes a mais de um gênero. Os ensaios fenotípicos foram inconclusivo devido à grande quantidade de testes requeridos para uma correta identificação taxonômica e os diferentes gêneros pertencentes ao Filo Actinobacteria. Conclui-se que a análise através de instrumentos da Biologia Molecular é necessária para a determinação da diversidade de micro-organismos endofíticos presentes nas folhas de *M. oleifera*.

**Palavras-chave:** *Moringa oleifera*, isolamento, identificação, endofíticos, actinobactérias.

### INTRODUÇÃO

A moringa (*Moringa oleifera* Lamarck) pertence ao gênero *Moringa*, à família Moringaceae, ordem Capparidales, classe Magnoliophyta, subclasse Dilleniidae. Das quatorze espécies pertencentes a este gênero, onze são originárias da África, uma da Arábia e duas da Índia, estando a *M. oleifera* dentre essas últimas. É uma planta de porte arbóreo e pode crescer até 10 a 12 metros de altura. As folhas são bipenadas com sete folíolos pequenos em cada pina. São verdes pálidas, decíduas alternadas, pecioladas e compostas. Os folíolos laterais possuem formas elípticas enquanto que os terminais são ligeiramente maiores que os laterais (PATERNIANI et al., 2009). A moringa é bastante cultivada pela sua importância econômica, com multiplicidade de uso alimentar, agrícola, medicinal e industrial (PAIVA et al., 2011).



As plantas possuem uma microbiota característica que tem importância para a sua sanidade e manutenção. Novos micro-organismos endolíticos estão sendo constantemente descritos na literatura mundial atestando ser essa diversidade ainda não explorada convenientemente. São considerados micro-organismos endofíticos, aqueles que vivem pelo menos um período de seu ciclo de vida no interior de uma planta, sem causar, aparentemente, quaisquer danos aos seus hospedeiros, podendo ser encontrados em folhas, sementes, ramos e raízes de vegetais (AZEVEDO, 2013).

Entre os micro-organismos endofíticos identificados têm se dado um maior destaque as actinobactérias devido a sua importância biotecnológica como produtores de dois terços de compostos antibióticos. As actinobactérias são classificadas como bactérias gram-positivas, podendo ser aeróbias estritas, microaerófilas, anaeróbias estritas ou facultativas. Apresentam um crescimento seco, com formação de micélio aéreo e vegetativo, velocidade de crescimento variável (entre 48 e 120h) e apresentam uma alta relação guanina-citosina (G-C) na constituição do ácido desoxirribonucleico (DNA) (STACKEBRANDT & SCHUMANN, 2006; VENTURA et. al., 2007). Esses micro-organismos exibem morfologias variadas, podendo apresentar-se nas formas cocóides ou cocobacilos, formas variadas de fragmentação de hifas ou com micélio diferenciado e altamente ramificado (VENTURA et. al., 2007).

Esse trabalho teve por objetivo isolar e identificar, através da taxonomia clássica, actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* Lam., determinar a densidade populacional referentes ao sítio de coleta do material, bem como quantificar esses micro-organismos em três localidades do Estado de Pernambuco, Brasil.

## **METODOLOGIA**

### **Coleta das Folhas de *M. oleifera***

Folhas de *M. oleifera* foram coletadas no *campus* Recife da Universidade Federal de Pernambuco, no Jardim Botânico do Recife e na cidade de Caruaru no Estado de Pernambuco, Brasil. Amostras do material já se encontram arquivadas sob o número de espécime 63184, IPA, no herbário “Dárdano de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brasil).

### **Isolamento das Actinobactérias Endofíticas**

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas, após a coleta, tendo sido lavado abundantemente com água corrente e detergente neutro para retirar o excesso de epifíticos e outros resíduos. Em seguida, em câmara asséptica, o material foi submetido ao processo de desinfecção, sendo imerso em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 2,6% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos, para retirar o excesso de hipoclorito,



as folhas foram lavadas duas vezes consecutivas em água destilada por 30 segundos, sendo a última água de lavagem utilizada para controle do processo de desinfecção, através de semente em placa de Petri com diferentes meios de cultura utilizados no isolamento das actinobactérias (ARAÚJO et al., 2002). O isolamento foi realizado por maceração utilizando a solução Tampão Fosfato Salina (PBS) na proporção de 1 g de folhas para 3 ml de tampão, as quais foram maceradas e em seguida o homogenato foi colocado na mesa agitadora durante 1 h e 30 min, processo que ajuda na liberação dos micro-organismos. Nas placas foram colocados 100  $\mu\text{L}$  da solução de folhas maceradas, nas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e sem diluição, sendo semeadas com a alça de Drigalski sobre o meio de cultura e incubadas em temperatura ambiente, durante 20 dias. O ensaio foi realizado em triplicata. Para o isolamento das actinobactérias endofíticas foram utilizados cinco meios de cultura: Nutriente Ágar (NA), *Triptic Soy Agar* (TSA), L-Arginina Ágar (ALA), Meio Completo (MC) e o meio *Inorganic Salt Starch* (ISP-4), todos contendo o antifúngico nistatina a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Identificação Clássica - Análise Macroscópica**

O aspecto macromorfológico da colônia dependente do meio de cultura foi verificado através da observação da cor dos micélios aéreo e vegetativo, da presença ou ausência de bordas com cores diferentes, bem como de pigmentos produzidos pelos micro-organismos.

#### **Identificação Clássica – Análise Microscópica**

A visualização de várias características micromorfológicas das actinobactérias, como a ramificação do micélio sobre o substrato, a formação de micélio aéreo e a sua fragmentação ou a formação de esporos foram observadas em microscópio óptico, através da técnica de mirocultivo em placa (SHIRLING & GOOTTLIEB, 1966).

#### **Crescimento e Fermentação em Única Fonte de Carbono**

A avaliação da capacidade das actinobactérias endofíticas de crescer em meio de cultura basal de sais (para 1.000 mL, 2,64g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2,38g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5,65g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 1g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1mL de solução de traço de sais, com 0,64g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,11g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,79g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,15g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em 100mL de água destilada; 15g de ágar; pH 6,8), contendo apenas uma única fonte de carbono, como recurso nutricional, adicionado na proporção de 1,0% p/v, além do indicador vermelho de fenol, foi realizada. Foram utilizadas as seguintes fontes de carbono: D-glicose, D-sacarose, D-xilose, D-lactose, D-manitol, D-sorbitol, D-arabinose, D-maltose, L-ramnose, L-arabinose, trealose, meso-inositol, dextrina e adonitol.

A semeadura foi realizada em estrias com o auxílio de uma alça bacteriológica em “O”. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura de 30°C por 14 dias. Foi



analisada a utilização ou não da fonte de carbono comparando-se o crescimento das bactérias, bem como a fermentação dos carboidratos pelas linhagens testadas, através da verificação da mudança de cor do meio de vermelho para amarelo ou alaranjado, indicativo da produção de ácido.

### **Crescimento em Diferentes Concentrações de Cloreto de Sódio**

A habilidade das actinobactérias endofíticas de crescerem em diferentes concentrações de NaCl foi realizada semeando os micro-organismos em meio Glicose Extrato de Levedura Ágar (para 1.000mL, 10g de peptona; 3g de extrato de carne; 10g de extrato de levedura; 10g de glicose; 15g de ágar; pH 6,9-7,1), com a adição de NaCl nas seguintes concentrações: 1%, 3%, 5% e 7%. As linhagens foram semeadas em estrias com o auxílio de alça bacteriológica em “O”. Após 7 dias de incubação a 30°C, foram consideradas positivas as placas que apresentaram algum tipo de crescimento.

### **Crescimento em Diferentes pH**

A avaliação da capacidade das actinobactérias endofíticas de crescerem a diferentes pHs foi realizada semeando os micro-organismos em meio Glicose Extrato de Levedura Ágar, com concentração dobrada dos constituintes. Após autoclavado, foi adicionado para cada 200mL de meio de cultivo, 200mL de solução tampão (Tampão Fosfato de Potássio a 0,2M). Sendo esta solução composta de diferentes proporções de Solução A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2M) e Solução B ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,2M), devidamente autoclavadas. Utilizou-se as seguintes proporções para o pH 4,0, 199,7mL de Solução A:0,3mL de Solução B; para o pH 5,0, 197,3mL de Solução A:2,7mL de Solução B; para o pH 9,0, 1,4mL de Solução A:198,6mL de Solução B; e para o pH 10,0, 0,1mL de Solução A:199,9mL de Solução B. As linhagens foram semeadas em estrias com o auxílio de alça bacteriológica em “O”. Após 14 dias de incubação a 30°C foram consideradas positivas as placas que apresentaram algum tipo de crescimento.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A metodologia utilizada para o isolamento das actinobactérias endofíticas das folhas de *M. oleifera*, oriundas das três localidades no Estado de Pernambuco, mostrou-se eficiente, visto que os tempos utilizados nos processo de desinfecção com o hipoclorito de sódio não acarretaram oxidação dos tecidos foliares, corroborando com o trabalho de Dhanalakshmi e colaboradores (2013), no qual utilizando folhas e caules de *M. oleifera*, para o isolamento de fungos endofíticos, não observou oxidação desses tecidos durante a desinfecção.

A escolha de cinco meios de cultura diferentes para a realização do isolamento das actinobactérias endofíticas possibilitou a obtenção de melhores resultados, com um número maior de isolados, ratificando a diversidade presente na microbiota dessas folhas, o que,



também, é corroborado pelo estudo de Randall e colaboradores (2009), que afirmam que a escolha do meio de cultivo é essencial para o sucesso do processo de crescimento e metabolismo microbiano, bem como para o aumento na frequência dos micro-organismos isolados (QIN et al., 2012)..

Para a seleção e separação das actinobactérias dos demais micro-organismos endofíticos isolados durante o processo, foram observadas as características macroscópicas intrínsecas desse grupo de bactérias (GOODFELLOW, 2012). Foram isoladas 33 actinobactérias endofíticas, sendo 21 linhagens provenientes das folhas coletadas da *M. oleifera* no Jardim Botânico do Recife; 8, no *campus* Recife da UFPE; e 4, na Cidade de Caruaru.

Observou-se que uma maior densidade de isolamento de actinobactérias pertencente as folhas oriundas do Jardim Botânico, isso se deve em parte pela grande diversidade e interação da fauna e da flora encontrada nesse local. Outro fator responsável pela grande diferença na densidade no número de isolados pode ser devido à exposição da folha à luminosidade, pois as espécies vegetais encontradas no Jardim Botânico do Recife estão dentro da mata, protegida da radiação solar, o mesmo não ocorrendo com aqueles vegetais presentes numa área urbanizada, como no *campus* Recife da UFPE, nem aquelas espécies vegetais cultivadas na Cidade de Caruaru, as quais estão sujeitas a uma maior exposição à luz. Essa diferença de intensidade e período de exposição podem repercutir diretamente na população das actinobactérias. A umidade do ambiente é outro fator que pode afetar diretamente essas densidades. Sob a mata, existe um ambiente mais úmido, mais propício à sobrevivência desse grupo de micro-organismos, enquanto que, a pleno sol, a umidade tende a ser menor, ocorrendo o ressecamento da folha, inviabilizando a sobrevivência de um número maior de endofíticos.

Estudos relatam que a interação existente entre o micro-organismo e a planta pode ser influenciada por diversos fatores, como o clima, a concentração de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, disponibilidade de nutrientes, tipo de solo, estrutura do solo, susceptibilidade a diferentes adversidades ambientais, afinidade com o hospedeiro, estágio de desenvolvimento da planta hospedeira, distribuição geográfica, condições ecológicas, sazonalidade, altitude, precipitação, umidade, entre outros. Consequentemente, a presença, a distribuição, a densidade e a diversidade desse grupo microbiano estarão relacionadas a essas variáveis (BERG & SMALLA, 2009; PROCÓPIO et al., 2009; MATSUMURA & FUKUDA, 2013).

Convém salientar que os números encontrados provavelmente não revelam a realidade, pois foram “selecionados” as actinobactérias capazes de se desenvolverem nos meios de



cultura utilizados. Tais limitações estão presentes na maioria dos estudos baseados em métodos de cultivo, entretanto, essas metodologias fornecem indicações relativas da densidade e distribuição da população de micro-organismos endofíticos (KAEWKLA & FRANCO, 2013).

Lechevalier (1989) afirma que na identificação das actinobactérias é importante levar em consideração diferentes características dessas bactérias filamentosas, o que implica na utilização de várias técnicas diferentes para esse fim. Em relação à morfologia deve-se observar a cor do micélio aéreo e o tipo de esporo. Para tanto é importante utilizar um meio de cultura que possibilite uma boa esporulação e diferenciação da cor do micélio aéreo.

A análise macroscópica das colônias de actinobactérias isoladas através da observação da cor do micélio aéreo e do micélio vegetativo e a produção de pigmentos. Verificou-se que não houve diversidade em relação aos aspectos observados, apresentando como coloração do verso, que corresponde ao micélio aéreo, as cores cinza, branco, amarelo e marrom; para o reverso, o micélio vegetativo, as seguintes cores, bege, branco e marrom. Apenas o isolado “CC4” produziu um pigmento de coloração amarelada, o que pode inferir ser algum tipo de composto químico, esses resultados podem ser observados nas Tabelas 1, 2 e 3, correspondentes a cada sítio de coleta do material botânico.

**Tabela 1 – Análise macroscópica e determinação do gênero pelo microcultivo das actinobactérias isoladas de folhas de *M. oleifera* do Jardim Botânico do Recife**

Isolado	Cor do Micélio Aéreo	Cor do Micélio Vegetativo	Pigmento	Gênero
JB1	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB2	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i>
JB3	Branco	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB4	Cinza	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB5	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB6	Cinza, com bordas brancas	Cinza	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB7	Branco	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB8	branco	Cinza	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB9	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB10	Cinza	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB11	Branco	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB12	Cinza, com bordas branca	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB13	Amarelo	Bege	Não	<i>Nocardiosis</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB14	Cinza, com bordas branca	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB15	Branco	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB16	Branco	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB17	Amarelo	Marron	Não	<i>Streptomyces</i>
JB18	Branco	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB19	Cinza, com bordas branca	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB20	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
JB21	Cinza, com bordas branca	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>



**Tabela 2 – Análise macroscópica e determinação do gênero pelo microcultivo das actinobactérias isoladas de folhas de *M. oleifera* do campus Recife da UFPE**

Isolado	Cor do Micélio Aéreo	Cor do Micélio Vegetativo	Pigmento	Gênero
UFPE1	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE2	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
UFPE3	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
UFPE4	Marrom	Branco	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE5	Marrom, com bordas branca	Branco	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE6	Marrom, com bordas branca	Branco	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE7	Cinza	Marrom	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE8	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>

**Tabela 3 – Análise macroscópica e determinação do gênero pelo microcultivo das actinobactérias isoladas de folhas de *M. oleifera* da Cidade de Caruaru**

Isolado	Cor do Micélio Aéreo	Cor do Micélio Vegetativo	Pigmento	Gênero
CC1	Marrom	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
CC2	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
CC3	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
CC4	Branco	Bege	Sim	<i>Streptomyces</i>

A análise microscópica, através da metodologia do microcultivo, permitiu observar os esporos e estruturas relacionadas e inferir que 12 isolados pertencem ao gênero *Streptomyces*, pois foram observados esporos espiralados, 1 isolado, o JB13, apresentou características morfológicas referentes ao gênero *Nocardiosis*, devido à observação de hifas longas com esporos ao longo de toda a hifa. Contudo, em 20 actinobactérias endofíticas não foi possível determinar o gênero, pois apresentaram semelhança entre os gêneros *Actinomadura* e *Streptomyces*, por apresentarem esporos curtos ao longo da hifa. Sendo assim, é necessário o estudo molecular do rRNA 16S para uma identificação mais precisa quanto ao gênero e possível espécie desses micro-organismos endofíticos isolados.

A análise da micromorfologia das actinobactérias isoladas de folhas de *M. oleifera* permitiu inferir, de modo preciso, que 36,3% pertencem ao gênero *Streptomyces*. (Isso pode ser explicado por ser um micro-organismo de crescimento rápido, que esporula facilmente e não apresenta muitas exigências nutricionais VELHO-PEREIRA & KAMAT, 2012). Verma e colaboradores (2009) isolaram actinobactérias, das folhas e hastes de *Azadirachta indica* A. Juss., e o gênero *Streptomyces* (49,09%) também foi predominante. Sonashia e colaboradores (2011) isolaram 30 actinobactérias, das quais 53,33% se classificaram como sendo do gênero *Streptomyces*, 10% como *Actinomadura* e 13,33% como *Micromonospora*. As características



comuns a esses gêneros são, por ordem: cadeia de esporos com enrolamento espiral, e em loop; cadeias de esporos retas e abertos, e aglomerados de conídios únicos em micélio.

Gangwar e colaboradores (2014) isolaram 40 actinobactérias endofíticas de três espécies vegetais medicinais: *Aloe vera*, *Mentha arvensis* e *Ocimum sanctum*, sendo o gênero *Streptomyces* o mais isolado, correspondendo a uma taxa de 60%, seguido do gênero *Micromonospora* com 25% , *Actinopolyspora* e *Saccharopolyspora* com 7,5%, cada.

Passari e colaboradores (2015) isolaram 42 actinobactérias endofíticas de sete plantas medicinais, presentes em parques públicos na Índia, entre todos os isolados, o gênero *Streptomyces* foi o mais abundante em todos os vegetais com 66,6% do total de micro-organismos endofíticos.

Nos ensaios fenotípicos, quanto à fermentação dos açúcares foi observado que as actinobactérias endofíticas do Jardim Botânico do Recife apresentam certa similaridade no padrão de fermentação dos açúcares. É interessante salientar que o D-Sorbitol não foi fermentado por nenhum dos micro-organismos. D-Maltose e o D-Manitol os mais facilmente fermentados. A linhagem JB17 apresentou certa dificuldade na utilização desses açúcares. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Fermentação de carboidratos por actinobactérias endofíticas isoladas de folhas de *M. oleifera* provenientes do jardim Botânico do Recife

AÇÚCARES	JB1	JB2	JB3	JB4	JB5	JB6	JB7	JB8	JB9	JB10	JB11	JB12	JB13	JB14	JB15	JB16	JB17	JB18	JB19	JB20	JB21
Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	NC	+	+	+	++	NC	++	+	++	+
D-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	NC	-	-	+++	+++
L-Arabinose	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	NC	++	++	++	++	++	++	++	++
Dextrina	+	++	+	+	+	+	++	+	-	+	+	+	NC	++	++	++	NC	++	++	++	++
Glicose	-	-	-	-	++	++	++	++	+	++	+	++	NC	++	++	++	NC	++	++	++++	++++
Meso-Inositol	+	+	+	+	+	+	+	NC	-	-	-	-	NC	-	-	+	NC	NC	+	++	+
D-Lactose	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	NC	+++	+++	++	+++
D-Maltose	++	++	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	NC	+++	+++	+++	+++
D-Manitol	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	NC	+++	+++	+++	NC	++++	++++	++++	++++
L-Raminose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	NC	-	NC	+	+	+	+	++	+
Sacarose	-	NC	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	NC	-	+	++	NC	+	+	++	+
D-Sorbitol	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Trealose	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NC	+++	+++	+++	NC	+++	+++	+++	+++
D-Xilose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	NC	+++	+++	+++	++	++	++	++	++

Legenda: (+) Pouca Fermentação; (++) Boa Fermentação; (+++) Ótima fermentação; (++++) Excelente Fermentação; (-) Não fermentou; (NC) Não cresceu

Os isolados do *campus* Recife da UFPE, também, apresentaram repetições nos padrões de fermentação dos açúcares. Novamente, o D-Sorbitol não foi fermentado por nenhuma das linhagens e o D-Maltose e D-Manitol facilmente fermentados. Todas as linhagens apresentaram algum grau de crescimento através da utilização desses carboidratos, como pode ser observado na Tabela 5.





**Tabela 5 - Fermentação de carboidratos por actinobactérias endofíticas isoladas de folhas de *M. oleifera* provenientes do campus Recife da UFPE**

açúcares	UFPE1	UFPE2	UFPE3	UFPE4	UFPE5	UFPE6	UFPE7	UFPE8
Adonitol	++	++	++	++	++	++	+	++
D-Arabinose	+++	+++	+	+	+	+	++++	++++
L-Arabinose	++	++	++	++	++	++	++	++
Dextrina	++	++	++	++	++	++	+	+
Glicose	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Meso-Inositol	+	+	-	-	-	-	-	-
D-Lactose	++	++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
D-Maltose	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
D-Manitol	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
L-Raminose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	-	-	-
D-Sorbitol	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Trealose	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++
D-Xilose	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++

Legenda: (+) Pouca Fermentação; (++) Boa Fermentação; (+++) Ótima fermentação; (++++) Excelente Fermentação; (-) Não fermentou; (NC) Não cresceu

As mesmas observações feitas para as actinobactérias do Jardim Botânico do Recife e do campus Recife UFPE também são realizadas nos isolados da Cidade de Caruaru, de acordo com a Tabela 6.

**Tabela 6 - Fermentação de carboidratos por actinobactérias endofíticas isoladas de folhas de *M. oleifera* provenientes da Cidade de Caruaru**

açúcares	CC1	CC2	CC3	CC4
Adonitol	++	++	++	++
D-Arabinose	++++	++++	+++	+++
L-Arabinose	++	++	+	+
Dextrina	+	+	++	++
Glicose	+	-	++	++
Meso-Inositol	-	+++	+	+
D-Lactose	++++	+++	+++	+++
D-Maltose	+++	+++	+++	+++
D-Manitol	+++	+++	+++	+++
L-Raminose	++	+	+	++
Sacarose	-	+	+	+
D-Sorbitol	NC	NC	NC	NC
Trealose	+++	+++	+++	+++
D-Xilose	++	++	+++	+++

Legenda: (+) Pouca Fermentação; (++) Boa Fermentação; (+++) Ótima fermentação; (++++) Excelente Fermentação; (-) Não fermentou; (NC) Não cresceu

Os ensaios para a observação da capacidade das actinobactérias endofíticas crescerem em diferentes faixas de pH e concentrações de NaCl foram realizado e os resultados podem ser observados nas Tabelas 7, 8 e 9. Observa-se que a linhagem JB13 não cresceu em pH 4,0,



tendo o seu melhor crescimento no pH 5,0. A linhagem JB21 cresceu apenas nos valores de pH 5,0 e 9,0. A actinobactéria JB2 não cresceu na concentração de 7% de NaCl, assim como a JB21, que apresentou crescimento apenas na concentração de 3% do sal, sendo portanto uma linhagem sensível a variação desses parâmetros. Observa-se que as linhagens UFPE5 e UFPE6 foram inibidas pela alta concentração de NaCl. Contudo, os isolados desse sítio apresentaram um crescimento sem a formação do micélio aéreo. Os micro-organismos isolados das folhas de *M. oleifera* da Cidade de Caruaru foram idênticos quanto ao seu desenvolvimento nos meios de culturas com essas variáveis.

**Tabela 7 - Crescimento de actinobactérias endofíticas folhas de *M. oleifera* do Jardim Botânico do Recife em diferentes concentração de pH e NaCl**

		JB1	JB2	JB3	JB4	JB5	JB6	JB7	JB8	JB9	JB10	JB11	JB12	JB13	JB14	JB15	JB16	JB17	JB18	JB19	JB20	JB21
pH	4,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	NC	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	NC
	5,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C
	9,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C
	10,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	NC
NaCl	1%	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	NC
	3%	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C
	5%	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C	C*	C*	C	C	C	C	C	C*	C	C	NC
	7%	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C*	C	C	C	C	C	C*	C	C	NC

Legenda: C\* - Crescimento com formação de micélio aéreo; C - Crescimento sem a formação do micélio aéreo; NC - Não cresceu

**Tabela 8 - Crescimento de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* do campus Recife da UFPE em diferentes faixas de pH e concentrações de NaCl**

		UFPE1	UFPE2	UFPE3	UFPE4	UFPE5	UFPE6	UFPE7	UFPE8
pH	4,0	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*
	5,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*
	9,0	C	C	C*	C	C	C	C	C
	10,0	C	C	C*	C	C	C	C	C
NaCl	1%	C	C	C*	C	C	C	C	C
	3%	C	C	C*	C	C	C	C	C
	5%	C	C	C*	C	C	C	C	C
	7%	C	C	C	C	NC	NC	C	C

Legenda: C\* - Crescimento com formação de micélio aéreo; C - Crescimento sem a formação do micélio aéreo; NC - Não cresceu

**Tabela 9 - Crescimento de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* da Cidade de Caruaru dem diferentes faixas de pH e concentrações de sais**

		CC1	CC2	CC3	CC4
pH	4,0	C*	C*	C*	C*
	5,0	C*	C*	C*	C*
	9,0	C	C	C	C
	10,0	C	C	C	C
NaCl	1%	C	C	C	C
	3%	C	C	C	C
	5%	C	C	C	C
	7%	C	C	C	C

Legenda: C\* - Crescimento com formação de micélio aéreo; C - Crescimento sem a formação do micélio aéreo



A análise das características fenotípicas através da comparação com os dados contidos nas tabelas presente no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* permite inferir que são necessários outros testes relacionados à fisiologia desses micro-organismos para uma correta identificação em relação ao gênero e possível espécie desses endofíticos. Portanto, esses resultados corroboram com a necessidade e importância de um estudo molecular para a identificação da microbiota presente no interior das folhas de *M. oleifera*.

## CONCLUSÕES

A metodologia utilizada para o isolamento das actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* foi adequada, isolando-se um total de 33 micro-organismos, sendo 21 (63,6%) isolados do Jardim Botânico do Recife, 8 (24,2%) do *campus* Recife da UFPE e 4 (12,2%) da Cidade de Caruaru.

Através da observação macroscópica e microscópica foi possível a determinação do gênero em 13 (39,4%) isolados, com predominância do gênero *Streptomyces* sp. Não foi possível a identificação dos demais devido a características inerentes a mais de um gênero.

A análise fenotípica apresentou dificuldade na identificação desses micro-organismos devido a grande diversidade de ensaios requeridos para uma correta identificação taxonômica.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, PT. **Manual de Isolamento de Micro-organismos Endofíticos**. Piracicaba, 86 p, 2002.
- DHANALAKSHMI, R.; UMAMAHESWARI, S.; SUGANDHI, P.; ARVIND PRASANTH, D. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Moringa oleifera* of yercaud hills. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 3, p. 1064-1068, 2013.
- GANGWAR, M.; DOGRA, S.; GUPTA, U. P.; KHARWAR, R. N. Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 2, p. 184-191, 2014.
- GOODFELLOW, M. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. Nov. In: **Bergey's Manual os Systematic Bacteriology**. Springer, p. 33-2028, 2012.
- KAEWKLA, O.; FRANCO, C. M. M. Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from Australian native trees. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 2, p. 384-393, 2013.
- LECHEVALIER, H. A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Williams & Wilkins, v. 4, 1989.
- MATSUMURA, E.; FUKUDA, K. A comparison of fungal endophytic community diversity in tree leaves of rural and urban temperature forests of Kanto district, eastern Japan. **Fungal Biology**, v. 117, n.3, p. 191-201, 2013.
- PAIVA, P. M. G.; SANTANA, G. M. S.; SOUZA, I. F. A. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; AGRA-NETO, A. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUZ, L. A.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. C. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 982-989, 2011.



- PASSARI, A. K.; MISHRA, V. K.; SAIKIA, R.; GUPTA, V. K.; SINGH, B. P. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-13, 2015.
- PATERNIANI J. E. S.; MANTOVANI M. C.; SANT'ANNA M. R. Uso de sementes de *Moringa oleifera* para tratamento de águas superficiais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 6, p. 765-771, 2009.
- QIN, S.; CHEN, H-H.; ZHAO, G-Z.; LI, J.; ZHU, W-Y.; XU, L-H.; JIANG, J-H.; LI, W-J. Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **Environmental Microbiology Reports**, v. 4, p. 522-531, 2012.
- RANDALL, H.T.; CARROLL, K.C.; TANG, Y.W.; WOLK, D.M. Diagnostic microbiology of the immunocompromised host. 1a Edição. **American Society for Microbiology**, ASM Press, Washington, 2009.
- SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v 16, p. 313-340, 1966.
- SONASHIA, V. P.; KAMAT, N. M.; Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.73, n.2, p.223-228.
- VELHO-PEREIRA, S.; KAMAT, N. M. Screening of actinobacteria for antimicrobial activities by a modified "Cross-Streak" method. **Nature Precedings**, p. 1-16, 2012.
- VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 495-548, 2007.
- VERMA, V. V.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R. N.; GANGE, A. C.; Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-microbial Activity. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 4, p.749-756, 2009.