

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Avaliação de atividade enzimática em isolados do gênero *Bipolaris*

Guilherme Rosa Pereira

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand

Porto Alegre, julho de 2019

**Artigo Científico:**

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas formatado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Biociências, à exceção das figuras e tabelas, que estão dispostas no corpo do texto afim de facilitar a compreensão.

**Avaliação de atividade enzimática em isolados do gênero *Bipolaris***

Guilherme Rosa Pereira <sup>1</sup>, Sueli Teresinha Van Der Sand <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico do curso de graduação em Ciências Biológicas, UFRGS.

<sup>2</sup> Professora Orientadora do Instituto de departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

**Endereço para correspondência:** Av. Sarmiento Leite, 500.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

CEP: 90050-170

**Banca Examinadora:****Heloísa Giacomelli Ribeiro**

Doutoranda em Microbiologia Agrícola e Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Priscila Monteiro Pereira**

Doutoranda em Microbiologia Agrícola e Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## **Avaliação de atividade enzimática em isolados do gênero *Bipolaris***

Guilherme Rosa Pereira<sup>1\*</sup> e Sueli Teresinha Van Der Sand<sup>2</sup>

1. Acadêmico do curso de graduação em Ciências Biológicas, UFRGS. Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Av. Sarmiento Leite, 500. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.CEP: 90050-170

2. Professora Orientadora do Instituto de departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

\* E-mail: [grpereira92@gmail.com.br](mailto:grpereira92@gmail.com.br)

## RESUMO

O gênero *Bipolaris* compreende diversas espécies de fungos fitopatogênicos que crescem associados a vegetais cultivados de elevada importância econômica, como trigo, arroz, cevada e milho. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção das enzimas amilase, lipase, esterase e celulase em 10 isolados de fungos do gênero, provenientes de diferentes origens. Os isolados foram crescidos durante 5 dias em meios de cultura com fontes de carbono específicas e então avaliados quanto a presença ou ausência de atividade enzimática. No teste de amilase todos os isolados apresentaram resultado positivo, enquanto 9 dos 10 isolados tiveram atividade enzimática de celulase. Tanto lipase quanto esterase foram expressas em 7 isolados. Os resultados demonstraram hábitos generalistas para o grupo, assim como alta variação intraespecífica para a produção enzimática.

**Palavras-chave:** Fitopatógeno, amilase, celulase, esterase, lipase.

## ABSTRACT

The genus *Bipolaris* comprises several species of phytopathogenic fungi that grows associated with cultivated vegetables of great economic importance, such as wheat, rice, barley and maize. The objective of this work was to evaluate the production of amylase, lipase, esterase and cellulase enzymes in 10 isolates of fungi of the genus from different origins. The isolates grown for 5 days in culture media with specific carbon sources and then evaluated for the presence or absence of enzymatic activity. In the amylase test, all the isolates presented a positive result, while 9 of the 10 isolates had cellulase enzymatic activity. Both lipase and esterase were expressed in 7 isolates. The results showed generalist habits for the group, as well as high intraspecific variation for the enzymatic production.

**Key-words:** Phytopathogen, amylase, cellulase, esterase, lipase.

## INTRODUÇÃO

Os fungos formam um grupo complexo, diverso e heterogêneo, de modo que ainda existem diversas lacunas no conhecimento sobre seus mecanismos e interações biológicas. Sabe-se que, das quase 100 mil espécies descritas para o grupo, cerca de 15.000 são potenciais causadoras de patologias (González-Fernández et al. 2010). As espécies que causam doenças em vegetais são denominadas de fitopatogênicas e compõem um elemento de grande importância para a agricultura. Anualmente, atribuem-se perdas superiores a €\$ 200 bilhões, a nível mundial, a doenças fúngicas pré e pós-colheita (González-Fernández et al. 2010). Na safra 2010/2011 foram utilizados no Brasil 936 mil toneladas de agrotóxicos, sendo que 14% deste volume é composto por fungicidas. Naquele ano o setor movimentou mais de US\$8,5 bilhões (Rigotto et al. 2014).

O gênero *Bipolaris* possui aproximadamente 45 espécies de fungos filamentosos, incluindo um significativo número de fitopatógenos de distribuição global (Manamgoda et al. 2014). As espécies do gênero têm hábito saprófito e costumam se apresentar associadas a sintomas como mancha foliar, podridão da raiz e podridão do pé, afetando principalmente plantas de alto valor econômico da família *Poaceae*, como trigo, milho, arroz e sorgo (Sivanesan, 1987; Berbee et al. 1999). Além de *Poaceae*, espécies de *Bipolaris* já foram encontrados associadas a hospedeiros das famílias *Anacardiaceae*, *Arecaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Rutaceae* e *Zingiberaceae*, se apresentando como sapróbios ou patógenos (1971, Sivanesan, 1987, Manamgoda et al., 2011).

Infestações por espécies de *Bipolaris* já foram responsáveis por episódios catastróficos na agricultura mundial, chegando a causar epidemia de fome em grandes populações ao redor do mundo (Manamgoda et al. 2014). Um caso emblemático

aconteceu em Bengala, na Índia (1943), onde doenças provocadas pela infestação de *B. oryzae* inviabilizaram as lavouras de arroz da região. Estima-se que neste episódio cerca de 4 milhões de pessoas morreram de fome ou desnutrição (Scheffer, 1997). Em decorrência de episódios como estes, *Bipolaris sorokiniana* foi declarado o patógeno de trigo com maior importância econômica do mundo na conferência “Wheat for the National Warm Areas”, que foi sediada no Brasil em 1990 (Duveiller & Gilchrist, 1994).

No modelo convencional de agricultura atual o controle de patógenos como *Bipolaris* é feito quase que exclusivamente através do uso extensivo e em larga escala de agrotóxicos fungicidas. Porém, este tratamento gera diversos problemas ambientais, como contaminação de alimentos, solo, água e animais, intoxicação de agricultores, resistência de patógenos a certos princípios ativos, surgimento de doenças iatrogênicas, desequilíbrio biológico com alterações da ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica, eliminação de organismos benéficos e redução da biodiversidade (Morandi et al. 2009).

Neste contexto, se faz necessária a real compreensão dos organismos tidos como pragas. Conhecer suas interações com o ambiente e outras espécies, seus ciclos biológicos e seus padrões fisiológicos é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas e metodologias de controle que sejam eficientes e que não causem prejuízos ambientais.

O presente estudo busca então elucidar parte do mecanismo fisiológico de alguns isolados do gênero *Bipolaris* através da avaliação de suas atividades enzimáticas, determinando se cada um dos isolados produz ou não as enzimas analisadas: celulase, amilase, esterase e lipase. O conhecimento sobre estes aspectos da biologia dos fungos pode indicar que tipo de matéria é utilizada como recurso para os fungos, determinando assim em que tipos de ambientes estes são capazes de se proliferar.

## OBJETIVO

Avaliar a produção enzimática em isolados do gênero *Bipolaris* afim de fornecer dados para a compreensão da fisiologia destes organismos, possibilitando a criação de novas ferramentas e metodologias para seu controle.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo analisou a produção das enzimas amilase, lipase, celulase e esterase em 10 isolados de fungos do gênero *Bipolaris* depositadas na coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Tabela 1: Identificação dos isolados e seus respectivos locais de origem**

Código do isolado	Identificação	Laboratório de origem	Local de origem
LMA323BIS903	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Embrapa	Uberaba, Minas Gerais, Brasil
LMA323BIS98004P	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	LMA - UFRGS	Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil
LMA323BIS98007P	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	LMA - UFRGS	Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil
LMA323BIS98012P	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	LMA - UFRGS	Lagoa Vermelha, Rio Grande do Sul, Brasil
LMA323BIS98028P	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	LMA - UFRGS	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil
LMA323BIS98034P	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	LMA - UFRGS	Vitória, Paraná, Brasil
LMA323BISA20P	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	CIMYTT	Saskatoon, Saskatchewan, Canadá
LMA323BISCF0201P	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	CIMYTT	África do Sul
LMA323BIS15M2P	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	CIMYTT	Delicias, Chihuahua, México
LMA323BIO1	<i>Bipolaris oryzae</i>	UFPel	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

### Atividade enzimática

Foram formulados 4 tipos diferentes de meios de cultura, cada um deles contendo uma das seguintes fontes de carbono: amido, carboximetilcelulose, tween 80 e

óleo de oliva. Cada um dos isolados foi repicado em duplicata para todos os diferentes meios.

#### *Atividade da Amilase*

Avaliou-se atividade da amilase em pH 7 sendo que meio usado foi Amido: 1,0g/L; Peptona: 5,0g/L; Extrato de Carne: 3,0g/L; NaCl: 0,5g/L; Agar: 15g/L (Rodrigues, 1999). Após período de incubação de 5 dias, lugol foi adicionado ao redor das colônias. Zonas claras ao redor das colônias indicaram a degradação do amido, enquanto a porção mais externa do meio de cultura se manteve roxa, indicando a região da placa onde o amido não havia sido metabolizado.

#### *Atividade de Celulase*

A produção de celulase foi detectada em meio de cultura sugerido por Tuncer (1999): carboximetilcelulose: 5,0g/L; extrato de levedura: 6,0g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 0,1g/L;  $\text{MgSO}_4$ : 0,1g/L; NaCl: 0,3g/L;  $\text{CaCO}_3$ : 0,02g/L; ágar: 15g/L; solução traço: 1mL/L ( $\text{FeSO}_4$ : 0,1%;  $\text{ZnSO}_4$ : 0,09%;  $\text{MnSO}_4$ : 0,02%). Após os 5 dias de incubação, a presença de celulase extracelular foi detectada pela aplicação de Vermelho Congo ao redor da colônia, o qual agiu durante 2 horas. Após este período, verificou-se a formação de halo de hidrólise transparente na região do meio de cultura mais próxima à colônia nas placas que apresentaram atividade da enzima.

#### *Atividade de Esterase*

A habilidade de hidrólise de ésteres foi testada seguindo o protocolo de Rodrigues (1999). O meio de cultura constitui de: peptona: 5g/L; extrato de levedura: 1g/L; NaCl: 5g/L;  $\text{CaCl}_2$  0,01%; tween 80: 1%; ágar: 15g/L. A presença da atividade de



esterase foi verificada com a formação de um halo opaco com a formação de grânulos ao redor das colônias.

#### *Atividade de Lipase*

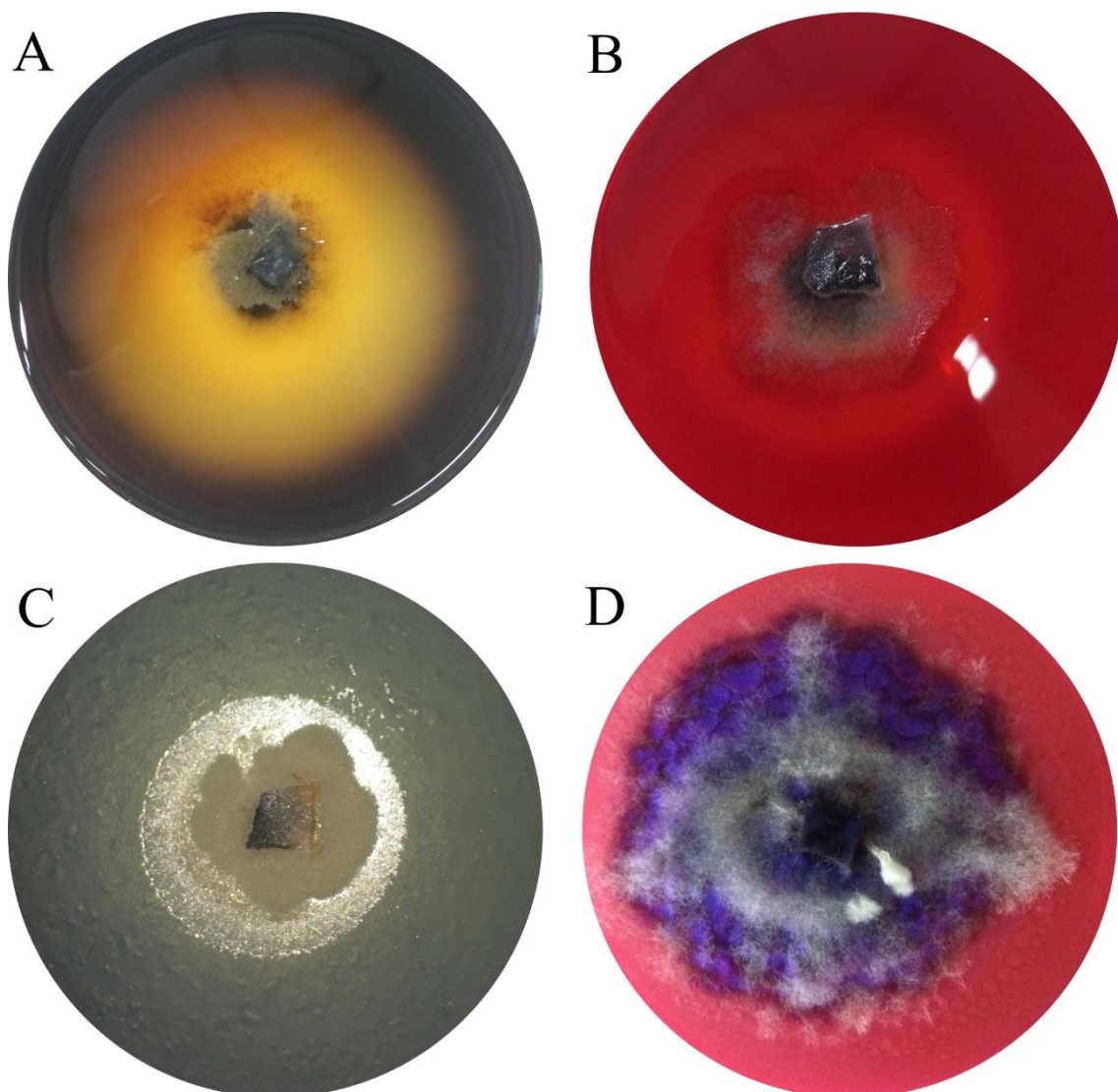
O meio para atividade lipolítica foi realizado conforme Menezes e Assis (2004): peptona: 15g/L; extrato de levedura: 5g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,75g/L; MgSO<sub>4</sub>: 0,5g/L; Azeite extra virgem: 1%; Rhodamina: 0,1%. Após o período de incubação os isolados com atividade lipolítica apresentaram uma fluorescência laranja ao redor das colônias ou no interior das mesmas quando observados sob radiação Ultravioleta de 350 nm.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**Tabela 2: Resultados da produção enzimática para cada um dos isolados por meio de cultura.**

<b>Código do isolado</b>	<b>Amilase</b>	<b>Celulase</b>	<b>Lipase</b>	<b>Esterase</b>
LMA323BIS903	+	+	+	-
LMA323BIS98004P	+	+	+	+
LMA323BIS98007P	+	+	-	-
LMA323BIS98012P	+	+	+	+
LMA323BIS98028P	+	+	+	+
LMA323BIS98034P	+	+	+	+
LMA323BISA20P	+	+	+	+
LMA323BISCF0201P	+	+	-	+
LMA323BIS15M2P	+	+	+	-
LMA323BIO1	+	-	-	+

Os resultados obtidos nas análises sugerem que os organismos do gênero *Bipolaris* apresentam hábitos bastante generalistas, já que a maioria dos isolados demonstrou capacidade de utilizar como substrato a todos os meios propostos, conforme mostra a Tabela 2. Além disso, o estudo evidencia variação intraespecífica dos isolados quanto à atividade enzimática. Ou seja, isolados da mesma espécie apresentaram capacidades diferentes de produção enzimática.



**Figura 1.** Colônias crescidas e reveladas. **A:** teste para atividade de amilase. Ao redor da colônia nota-se halo de hidrólise, indicando a região do meio de cultura onde o fungo metabolizou o amido, indicando atividade enzimática. **B:** teste para celulase. Semelhante à A, nota-se o halo onde a celulose foi consumida pela colônia. **C:** teste para esterase. A presença de grânulos cristalinos ao redor da colônia indica atividade positiva da enzima. **D:** teste para lipase. As regiões fluorescentes na colônia indicam onde os lipídios estão sendo metabolizados.

As enzimas que demonstraram ser menos expressas pelos fungos foram lipase e esterase. Cada uma delas foi observada em 7 dos 10 isolados testados, sendo que o isolado LMA323BIS98007P não mostrou atividade para nenhuma das duas enzimas.

O isolado LMA323BIO1, único do estudo descrito como *B. oryzae*, chama atenção por ser o único também a não demonstrar atividade de celulase. Esta espécie

costuma ser encontrada associada a arrozais, enquanto os outros microrganismos estudados são fitopatógenos de plantas de trigo.

Os resultados obtidos para atividade lipolítica apresentam semelhança relativa com o trabalho de Rodrigues et al. (2015), que descreveu atividade positiva em todos os 50 isolados de *Penicillium* sp. testados. Porém, contrasta com os resultados obtidos por Wenzel et al. (2013), em que nenhum dos 32 isolados de diferentes espécies e gêneros de fungos testados demonstraram atividade da enzima lipase.

O amido aparece como a fonte de carbono mais aproveitável para o grupo, uma vez que todos os isolados analisados demonstraram capacidade de degradá-lo. Este resultado era esperado, já que as plantas de cultivares como trigo e arroz, que costumam ser alvo das infecções dos microrganismos testados, produzem estruturas extremamente ricas em amido, utilizando-o como substância de reserva energética.

A Carboximetilcelulose também se mostra uma fonte de carbono interessante para os organismos, já que apenas um deles não conseguiu degradar o substrato. Este também era um resultado esperado, uma vez que a celulose é um carboidrato presente em todas as espécies vegetais, se apresentando como uma abundante fonte energética. Além disso, a celulose é formadora da parede celular das plantas. Assim, sua degradação auxilia no processo de estabelecimento do fungo em seu hospedeiro.

Alguns autores como Pereira et al. (2001), McKeen (1974), Nicholson et al. (1972), demonstraram para os microrganismos *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Botrytis cinerea* e *Venturia inaequalis*, respectivamente, através de estudos histoquímicos, a presença de atividade esterásica próximo ao sítio de penetração das células hospedeiras. Deste modo, a atividade da enzima pode ter relação com a patogenicidade do isolado.

Zaferanloo et al. (2013) constataram que a produção de enzimas extracelulares por fungos endofíticos isolados de *Eremophila longifolia*, uma planta nativa da Austrália, variou de acordo com as condições do meio de cultivo, sendo que cada enzima necessita de um pH e temperatura diferentes para serem produzidas. Deste modo, os resultados aqui apresentados podem se expressar de maneira diferente para os isolados em seu habitat natural, já que estes não estarão crescendo em ambiente controlado, estando expostos a interações com outros organismos e diversas variações ambientais.

A compreensão da fisiologia e biologia dos organismos fitopatogênicos se faz necessária para o estabelecimento da segurança alimentar e econômica. O uso de medidas paliativas, como aplicação de fungicidas, já não é eficiente, uma vez que os microrganismos demonstram capacidade de desenvolver ferramentas de imunidade aos seus compostos, além do evidente risco biológico decorrente da utilização destes produtos. Por tanto, se faz urgente o desenvolvimento de metodologias aplicáveis ao atual modelo de agricultura que sejam eficientes e seguras.

No contexto de agricultura da agricultura atual, em larga escala e totalmente dependente de insumos externos, o gênero *Bipolaris* possui diversas espécies com alto potencial para gerar desequilíbrios ecológicos e perdas exorbitantes aos produtores rurais, gerando comprometimento da cadeia produtiva que alimenta a população. Deste modo, é recomendável a realização de mais estudos que forneçam conhecimento básico sobre estes organismos, como a avaliação da produção de enzimas que não foram aqui testadas e a análise de outras linhagens e outras espécies do gênero.

## **AGRADECIMENTOS**

À toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFRGS, em à Professora Sueli, pela paciência e auxílio incondicional.

## REFERÊNCIAS

- BERBEE M.L., PIRSEYEDI M. & HUBBARD S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91 (1999), pp. 964-977. 1999.
- DUVEILLER E. & GILCHRIST L.I. Production constraints due to *Bipolaris sorokiniana* in wheat: current situation and future prospects. *International Information System For The Agricultural Science And Technology*, 1994.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R., PRATS, E. & JORRÍN-NOVOJ. V. Proteomics of plant pathogenic fungi. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, [s. l.], v. 2010, 2010.
- HAWKSWORTH D.L. The Magnitude of Fungal Diversity: The 1.5 Million Species Estimate Revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432. 2001.
- KIRK P.M., CANNON P.F., DAVID J.C. & STALPERS J.A. *Dictionary of the Fungi*, 11th ed. Wallingford: CABI Publishing. 2008.
- LEWINSOHN T.M. & PRADO P.I. Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006.
- MANAMGODA D.S., CAIL. & BAHKALI A.H. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity*, 51 (2011), pp. 3-42. 2011.
- MANAMGODA D. S., ROSSMAN A. Y., CASTLEBURY L. A., CROUS P. W., MADRID H., CHUKEATIROTE E. & HYDE K.D. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 221–288, 2014.
- MCKEEN, W.E. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 64:461-467. 1974.

MENEZES, M. & ASSIS, S.M.P. Guia prático para fungos fitopatogênicos. *Imprensa Universitária UFRPE*. 106 p. 2004.

MORANDI, M.A.B.; PAULA JUNIOR T.J., BETTIOL, W. & TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, v.30, n.251, p.73-82, 2009.

NICHOLSON, R.L., KUC, J. & WILLIAMS, E.B. Histochemical demonstration of transitory esterase activity in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 62:1241-1247. 1972.

PEREIRA, A.J., LAPENTA, A.S., VIDIGAL-FILHO, P.S. & MACHADO, M.F. Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta* Crantz infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Biochemical genetics* 39:289-296. 2001.

RIGOTTO, R.M., VASCONCELOS, D.P. & ROCHA, M.M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Cad. Saúde Pública*. 2014; 30(7):1-3.

RODRIGUES, K. *Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos*. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS, Porto Alegre, 2006.

RODRIGUES M. L. F., DA SILVA E.A. & CARLOS EDUARDO BORBA C. E. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus communis* L. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v.4, p. 129- 145, 2015.

SCHEFFER R.P. The nature of disease in plants. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK, 1997.

SIVANESAN A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*, 158 (1987), pp. 1-261. 1987.

TUNCER, M., ROB, A., BALL, A.S. & WILSON, M.T. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermonospora fusca* BD25. *Enzyme na Microbial Technology*. W. 25: 38-47, 1999.

WENZEL J. B., MORESCO A. A., BOAS E. V., BURIN F. G. & SOUZA R. O. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. *Perspectivas Online: Ciências Biológicas e da Saúde*. Campos dos Goytacazes, 9 (3), 01-15, 2013.

ZAFERANLOO, B., VIRKAR, A., MAHON, P.J. & PALOMBO, E.A. Endophytes from an Australian native plant are a promising source of industrially useful enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.29, p.335–345, 2013.