

Avaliação de enzimas extracelulares em isolados de *Trichoderma* sp.

JULIANA DALMAGRO PANDOLFO¹
AIDA TERESINHA SANTOS MATSUMURA²
PAULO TADEU CAMPOS LOPES³
ANA MARIA PUJOL VIEIRA DOS SANTOS⁴

RESUMO

O antagonista *Trichoderma* sp. tem sido cada vez mais utilizado na agricultura, conseqüentemente sendo submetido a uma grande diversidade de substratos. Para que esse agente de biocontrole seja eficiente é necessário que consiga degradar o substrato no qual está crescendo. Assim, é importante a avaliação do potencial de degradação de substratos por diferentes isolados deste biocontrolador. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, em isolados obtidos de lavoura de fumo, a atividade enzimática extracelular de amilase, lipase e protease. Foram utilizados 5 isolados de *Trichoderma* sp. repicados a partir de culturas axênicas em meios de cultura específicos para cada atividade enzimática avaliada. A incubação foi em temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 hs. O delineamento experimental foi totalmente casualizado com 4 repetições. Para as avaliações foi medido o diâmetro da colônia e dividiu-se este pelo diâmetro do halo no 2^o, 3^o e 9^o dias após a incubação, para atividade amilolítica, proteolítica e lipolítica, respectivamente. Os resultados mostraram que, quanto à atividade lipolítica, não houve diferença significativa, entre os isolados testados (Tukey 5%). No caso das atividades amilolítica e proteolítica, não houve formação de halo.

Palavras-chave: amilase, protease, lipase.

¹ Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

² Professora Colaboradora do PPG – Fitotecnia/UFRGS

³ Professor do Curso de Educação Física/ULBRA

⁴ Professora – Orientadora do Curso de Educação Física/ULBRA (anapujol@ulbra.br)

ABSTRACT

The antagonist *Trichoderma* sp. has been used more in agriculture, consequently being submitted to a great substratum diversity. To be an efficient biocontrol agent it is necessary to degradate the substratum in which is growing. Thus, the evaluation of the potential of different substratum degradation is important to characterize this antagonist. This work aimed to investigate the extracellular enzymatic activity of amylase, lipase and protease, in specific solid substrates. Five isolates of *Trichoderma* sp were selected from tobacco culture. The incubation was at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and 12 hours of fotoperiod. The bioassay was done in quadruplicate. Enzyme activity was expressed as the halo-diameter/colony-diameter ratio after two, three and nine days after incubation, for amilolytic, proteolytic and lipolytic activity, respectively. The results showed lipolytic activity, but did not vary between the isolates (Tukey 5%). In the case of the amilolytic and proteolytic activities, the halo was not formed.

Key words: amylase, protease, lipase.

INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores orgânicos que participam das reações químicas nos processos vitais, por isso são capazes de atuar, especificamente, em todos os processos e reações biológicas que envolvem proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, como também em moléculas menores, como os aminoácidos, açúcares e vitaminas. As enzimas microbianas apresentam um custo de produção relativamente baixo, quando comparado às enzimas de origem animal ou vegetal (LOWE, 1992; TUCKER & WOODS, 1995).

A habilidade de um fungo em produzir enzimas varia entre espécies, como também entre isolados de uma mesma espécie, e depende grandemente de seu potencial genético, podendo ser induzida pelo seu ambiente de cultivo. Portanto, a capacidade de produzir ou não determinada enzima, em condições padronizadas, serve como base para diferenciar ou agrupar os isolados de uma espécie fúngica em níveis subespecíficos. Em adição, o uso de meios espe-

cíficos para detecção da atividade enzimática permite a caracterização de populações de fungos e da variabilidade genética, de forma simples e relativamente rápida, podendo ser complementado e comparado com outros métodos de importância de estudo taxonômico, para maior segurança e exatidão intra e interespecífica de fungos (COUTO et al, 2002).

O antagonista *Trichoderma* sp. tem sido cada vez mais utilizado na agricultura, conseqüentemente sendo submetido a uma grande diversidade de substratos. Entre as vantagens para o uso de *Trichoderma*, como possível indutor, caracteriza-se este microrganismo como um micoparasita de fitopatógenos, produzindo enzimas, tais como celulase e hemicelulase, capazes de degradar materiais lignolíticos e lisar paredes de células de fungos fitopatogênicos (MELO, 1996), e glucanases e quitinases (LORITO et al., 1998).

Para que esse agente de biocontrole seja eficiente, é necessário que consiga degradar o substrato no qual está crescendo. Assim, é im-

portante a avaliação do potencial de degradação de substratos por diferentes isolados deste biocontrolador. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, em isolados obtidos da lavoura de fumo, a atividade enzimática extracelular de amilase, lipase e protease.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados de *Trichoderma* sp.

A obtenção dos isolados de *Trichoderma* sp. foi realizada a partir de solos da cultura do fumo. O material foi processado em laboratório através da seguinte metodologia: a partir da amostra de solo devidamente identificada, fora retiradas 10 g, e esta quantidade diluída em 90 ml de água destilada estéril. Retirou-se 1 ml desta suspensão e diluiu-se novamente em 9 ml de água destilada estéril, contida em tubo de ensaio, obtendo-se assim uma solução 10^2 . Desta suspensão foi transferido 0,2 ml para placas de Petry contendo meio de cultura Batata – Dextrose – Agar (BDA) e espalhados com auxílio da Alça de Drigalsky. As placas foram incubadas por 4 dias a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 hs. Foram selecionados somente os isolados de *Trichoderma* sp. após a identificação através da observação morfológica, coloração da colônia, análise microscópica e verificação por comparação com chaves taxonômicas de fungos. Posteriormente, os isolados de *Trichoderma* foram repicados em placas de Petry contendo BDA, obtendo-se então culturas axênicas dos isolados.

Análise da atividade enzimática

Para a análise da atividade enzimática extracelular, foram utilizados 5 isolados de *Trichoderma* sp. (T1, T2, T3, T4 e TJ). Estes foram repicados, a partir de culturas axênicas, em meios de cultura específicos para as atividades amilolítica, lipolítica e proteolítica (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975). Para todos os substratos, discos de micélios de 6 mm de diâmetro, retirados de colônias jovens dos isolados do antagonista, foram individualmente transferidos para o centro da placa de Petri, contendo o meio específico. A incubação foi feita com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 hs. As avaliações foram realizadas medindo-se o diâmetro do halo formado em torno da colônia, dividindo-se este pelo diâmetro da colônia.

As placas contendo meio específico para análise da atividade amilolítica foram mantidas em BOD por dois dias. Para ocorrer a formação do halo amarelo foram adicionados 10 ml de solução alcoólica de iodo em cada placa.

As placas contendo meio para análise da atividade proteolítica foram mantidas em BOD durante 3 dias. Para a formação do halo transparente foram acrescentados 10 ml de solução saturada de sulfato de amônia em cada placa.

As placas contendo meio de cultura para análise da atividade lipolítica foram mantidas em BOD por dois dias e logo após permaneceram em geladeira por 7 dias, para que ocorresse a formação do halo de cristais.

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com 5 repetições. Os dados foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Meios de cultura utilizados para atividade enzimática

Atividade amilolítica

Meio amilase pH 6,0

Nutriente agar 23 g

Amido solúvel 2,0 g

Completar com água destilada para 1000 ml

- Solução alcoólica de iodo 1%

Iodo ressublimado 1,0 g

Álcool absoluto 100 ml

Atividade lipolítica

Meio lipase

Peptona 10 g

Cloreto de sódio 5,0 g

Cloreto de cálcio 0,1 g

Agar 20 g

Tween 20 10 ml

* adicionado no momento do uso

Completar com água destilada para 1000 ml

Atividade proteolítica

Meio mínimo pH 6,0

Nitrato de sódio 6,0 g

Fosfato de potássio dibásico 1,5 g

Cloreto de potássio 0,5 g

Sulfato de magnésio 0,01 g

Sulfato de ferro 0,01 g

Sulfato de zinco 0,01 g

Agar 15 g

Completar com água destilada para 1000ml

Gelatina 4% no momento do uso.

- Solução saturada de sulfato de amônia

Sulfato de amônia 50 g

Água destilada 100 ml

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi encontrada atividade para as enzimas amilolíticas e proteolíticas nos diferentes isolados testados, pois o halo não ultrapassou o limite da colônia, apresentando o índice 1. BARBOSA et al. (2001) também não encontraram atividade para a protease para diferentes espécies de *Trichoderma*, mas encontraram para amilase. O mesmo trabalho investigou isolados de *Cladosporium herbarium*, ocorrendo apenas a produção da protease. Para isolados de *Trichoderma*, provenientes do mangue, foi observada a produção de amilase nas primeiras 24 horas em apenas 3 amostras de 5 e em 48 hs as 5 amostras apresentaram a formação do halo característico (BATISTA et al., 2003).

As diferenças encontradas na detecção da enzima amilase poderiam ser devido à forma de inoculação nos meios. Nos isolados deste experimento, nas 24 hs após a inoculação não havia

crescimento da colônia e em 48 hs a mesma praticamente já tomava conta de toda a placa, o que dificultou a avaliação. Já BATISTA et al. (2003) adicionaram uma suspensão de esporos no meio de cultura, o que pode ter favorecido o crescimento nas primeiras 24hs, quando comparado com os discos de micélio.

Para isolados de *Aspergillus*, provenientes do mangue, diferentes resultados foram obtidos conforme o mês de coleta das amostras. Isolados do mês de janeiro não apresentaram atividade para enzima amilase nas primeiras 24hs. Em 48hs, apenas 4 de 16 amostras apresentaram a formação do halo. Nos isolados de fevereiro, apenas 5 amostras de 27 apresentaram atividade nas primeiras 24hs (BATISTA et al., 2003).

Para atividade lipolítica, os 5 isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram a formação do halo de cristais, porém, não foi encontrada diferença significativa entre eles (TUKEY 5%). Para a formação do halo foi necessária a permanência das placas na geladeira durante sete dias e com o aumento deste período o diâmetro do halo também aumentou. Segundo ASSIS et al. (2001) e LIMA et al. (2002) o período de incubação é também considerado de importância na atividade enzimática, proporcionando aumento significativo no diâmetro do halo formado após 10 dias de observação. SOSA-GÓMEZ et al. (1994), avaliando isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria*, encontraram atividade lipolítica em apenas um isolado.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora os meios avaliados não evidenciam atividade para as enzimas amilolíticas e

proteolíticas, novos meios poderão ser testados para verificação das atividades extracelulares, como por exemplo, substituindo amido solúvel por farinha de milho e gelatina por leite para testar a atividade amilolítica e proteolítica, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, T. C. et al. Estudos comparativos de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* quanto ao efeito da nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos e três variedades de mangueira. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 208-212, 2001.

BARBOSA, M. A. G.; REHN, K. G.; MENEZES, M.; MARIANO, R. L. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n.2, p. 98-104, 2001.

BATISTA, T. T. C.; MORAES FILHO, M. A.; NASCIMENTO, A. E. et al. Produção de amilase e urease em amostras de *Aspergillus* e *Trichoderma* isoladas de sedimentos de mangue. **Revista Química e Tecnologia**, Recife, n. 2, p. 39-45, 2003.

COUTO, E. F.; MENEZES, M.; COELHO, R. S. B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação enzimática em meio sólido específico de isolados de *Colletotrichum musae*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.28, p.260 - 266, 2002.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, L. The use of solid media for detection of enzyme

production by fungi. **Mycologia**, Bronx, v.67, p. 597-607, 1975.

LIMA, M. L. F.; MENEZES, M. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola*, através da análise eletroforética de padrões protéicos e isoenzimáticos. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, n. 1, p. 27-32, 2002.

LORITO, M., et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 95, p. 7860-7865, 1998.

LOWE, D. A. Fungal Enzymes. In: Handbook

of Applied Mycology. **Fungal Biotechnology**, v. 4, p.681-706, 1992.

MELO, I. S. Trichoderma e Gliocladium como bioprotetores de plantas. **RAPP**, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.

SOSA-GOMEZ, D.R.; ALVES, S.B.; MILANI, M.T. Characterization and phenetic analysis of geographical isolates of *Beauveria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 401-409, 1994.

TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. **Enzymes in food processing**. 2. ed. Editora: John Wiley Sons, p.320, 1995.