

## **Atividade enzimática em fungos endofíticos isolados seletivamente de *Eichhornia crassipes* coletada em área portuária de Manaus – AM**

Souza R.D.N<sup>2</sup>, Batista I.H<sup>1</sup>, Ferreira F. S.<sup>1</sup>, Santos J.C.<sup>2</sup>, Marinho, M.P.S.<sup>1</sup>, Araújo, S.P.<sup>2</sup>, Lima, J.M.S.<sup>27</sup>, Pereira, J.O.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Estado do Amazonas- UEA, Manaus, AM, <sup>2</sup> Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, AM. E-mail: rayane\_a14@hotmail.com, iedahbatista@hotmail.com, fransferreirauaea@gmail.com, jucileuzasantos@hotmail.com, priscila\_marinho18@hotmail.com, soldearaujo@hotmail.com, jlima873@gmail.com, joseodairpereira@yahoo.com.br

### **Resumo**

Microrganismos endofíticos vivem no interior das plantas sem causar danos aparentes, estabelecendo com seus hospedeiros uma relação simbiótica potencialmente vantajosa. A espécie *Eichhornia crassipes* é uma das macrófitas mais abundantes na Amazônia, tendo importante função ecológica nos ecossistemas. Este estudo teve o objetivo de isolar fungos endofíticos a partir da referida macrófita coletada no porto da cidade de Manaus e realizar ensaios de atividade enzimática com os isolados. O isolamento foi realizado em meio mineral acrescido de petróleo, utilizando-se fragmentos de folha e raiz da planta. Realizaram-se ensaios de atividade enzimática para amilase e lipase. Os fungos que apresentaram resultados positivos foram caracterizados morfológicamente para identificação preliminar. Foram isolados 28 fungos e selecionados 11 para os ensaios enzimáticos. Para o ensaio de amilase quatro fungos revelaram atividade e para lipase apenas um. Os fungos que apresentaram produção enzimática foram identificados como possivelmente pertencentes aos gêneros: *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp. e *Verticillium* sp. Os fungos isolados que apresentaram atividade enzimática são de gêneros que potencialmente podem ser promissores para uso em processos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** Microrganismos endofíticos, atividade enzimática, Amazônia

### **Introdução**

A Amazônia é mundialmente conhecida pela sua diversidade biológica, seja de espécies vegetais, animais ou microrganismos. Do ponto de vista biotecnológico, essa biodiversidade apresenta uma importante ferramenta para o desenvolvimento de tecnologias e alternativas que venham a servir para os mais variados setores da vida humana.

A região amazônica, em grande parte de sua área, sofre constantemente com ações antrópicas. Como exemplo, pode ser citada a contaminação dos corpos d'água por derivados de petróleo causando assim um impacto considerável na fauna e flora aquática. Porém, mesmo em locais extremamente poluídos, é comum notar-se a prevalência de plantas aquáticas. Isso acontece devido à capacidade do vegetal de resistir e se adaptar à poluição química da água. Muitas vezes essa capacidade de resistência da planta em ambientes contaminados está associada à existência de microrganismos em seus tecidos vegetais.

As macrófitas são plantas com ampla dispersão, podendo habitar desde brejos até locais totalmente submersos. Elas são definidas como formas de vegetação aquáticas visíveis a olho nu (Rejmánková, 2011). São encontradas em áreas com diferentes níveis de poluição, o que evidencia a sua capacidade de sobreviver em locais extremamente degradados.

Os microrganismos são agentes principais na ciclagem de nutrientes na região amazônica, desempenhando papel fundamental na manutenção de ecossistemas por meio dos ciclos biogeoquímicos por exemplo. A prospecção desses organismos tem fundamental importância para se manter o conhecimento da diversidade da microbiota existente nesta região.

Fungos filamentosos destacam-se pelo seu potencial biotecnológico na síntese de diversos compostos bioativos de interesse para o homem e para o ambiente. Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior dos tecidos vegetais, inclusive de macrófitas, e que não causam nenhum dano aparente ao seu hospedeiro (Azevedo, 1999). Os fungos endofíticos diferem dos epifíticos (que vivem na superfície da planta, exteriormente), e dos fitopatógenos, (que lhes causam doenças). As interações entre endófitos e plantas ainda não são claramente conhecidas, mas estudos revelam a produção de metabólitos secundários por parte dos microrganismos que auxiliam a planta em diversos setores (diminuição de herbivoria, de ataques de insetos e aumento da resistência da planta) (Souza *et al*, 2004). Dentre os metabólitos produzidos, as enzimas são amplamente estudadas atualmente. Enzimas são catalisadores orgânicos que participam de reações químicas nos processos vitais (Cuzzi *et al.*, 2011). As enzimas são estritamente específicas, e para cada substrato existe uma enzima. No caso do amido, a enzima responsável por sua quebra é a amilase. As amilases são enzimas facilmente encontradas na natureza e de grande importância biotecnológica tais como indústria têxtil, produção de bebidas, indústrias químicas e farmacêuticas. A utilização de enzimas produzidas por microrganismos vem sendo ampliada devido as maiores facilidades quando comparados a animais e vegetais. A produção em larga escala e a aplicação quase completa da hidrólise do amido são características das enzimas sintetizadas por

microrganismos (Soares *et al.*, 2009). As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na aceleração dos processos de clivagem das ligações ésteres de trigliceraldeídos liberando ácidos graxos e glicerol (Garcia, 2011). As lipases são encontradas na natureza em animais, vegetais e microrganismos. Por serem compostos específicos e de fácil regulação, estão sendo bastante utilizadas em indústrias de modo geral. As enzimas naturais são interessantes pela ampla diversidade bioquímica, facilidade quanto à manipulação genética e possibilidade de produção das mesmas em larga escala. O estudo de endófitos em macrófitas aquáticas de ecossistemas amazônicos representa significativo conhecimento dos mecanismos de adaptação destes vegetais aos peculiares ambientes desta região, desvendando suas vias biossintéticas que podem ser exploradas com fins biotecnológicos.

### Material e Métodos

Foram coletadas folhas e raízes de *Eichhornia crassipes* do porto do centro da cidade de Manaus-AM. As amostras foram submetidas à higienização e em câmara de fluxo laminar, o material foi lavado em água destilada e mergulhado em álcool 70% por 1 minuto, introduzido em solução de hipoclorito a 2,5% por 1 minuto, submerso em álcool 70% por 30 segundos e por último lavado em água destilada (figura 1). O material foi inoculado em 18 placas de Petri com meio BH (L/g: sulfato de magnésio: 0,20, cloreto de cálcio: 0,02, fosfato monopotássico: 1,0, fosfato dipotássico: 1,0, nitrato de amônio: 1,0, cloreto férrico: 0,05, ágar: 20,0) acrescido de antibiótico e petróleo. Todas as placas foram identificadas e incubadas em BOD à temperatura de 18° C, onde permaneceram de três a dez dias.

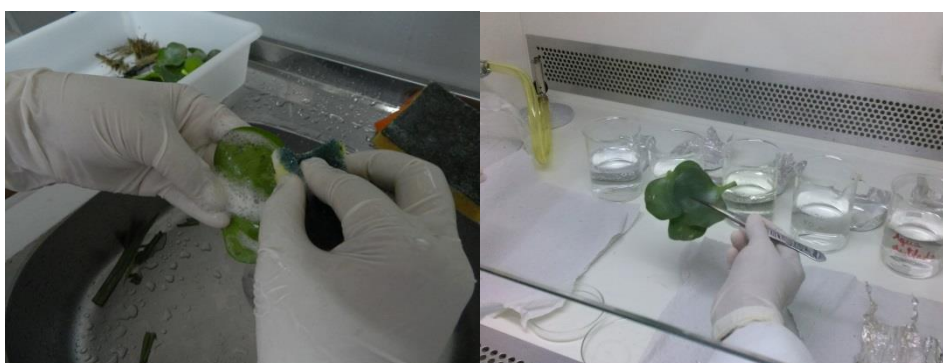


Figura 1: Assepsia da folha e desinfecção superficial

Conforme o crescimento, os fungos foram repicados para tubos de ensaio onde foram datados, identificados e guardados. O índice de colonização dos fungos isolados foi calculado dividindo o número total de fragmentos infectados pelo número total de fragmentos inoculados. A purificação foi feita por repique sucessivo. A análise qualitativa das enzimas lipase e amilase produzidas por fungos foi avaliada em placas de Petri contendo meio de

cultura específico para cada enzima. Os fungos endofíticos selecionados foram cultivados em meio BDA por oito dias a 28° C e transferidos para placas com meio específico. Para o teste de amilase, o meio de cultura foi acrescido de 10 g de amido de milho. Após o crescimento da cultura, as placas de Petri foram coradas com 5 ml de solução de lugol para verificação do halo de degradação, evidenciando a atividade amilolítica. Para testar a produção de lipase, o meio foi acrescido de 10 ml de azeite de oliva e as placas, após crescimento dos fungos, foram coradas com 2 ml de vermelho de fenol e submetidas a luz ultravioleta. A determinação da atividade enzimática decorreu da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia acrescido da zona de precipitação. (Hankin & Anagnostakis, 1975). Os resultados foram classificados em negativos (IE= 1), positivos ( $1 > IE > 0,64$ ) e fortemente positivos ( $IE < 0,64$ ). Após os testes enzimáticos, os fungos que apresentaram resultados positivos foram caracterizados quanto à morfologia das colônias, por meio de visualizações macroscópicas e também microscópicas com o uso da técnica de micro cultivo.

### Resultados e Discussão

Foram isolados 28 fungos endofíticos a partir dos fragmentos da folha e da raiz. O índice de colonização foi de 47% para a folha e 30% para a raiz. A princípio um número maior de fungos foi isolado, porém alguns não se tornaram viáveis após repiques sucessivos em meio BDA. Os fungos foram codificados quanto à origem de isolamento. Após a purificação, os fungos que demonstraram similaridade quanto às características macroscópicas foram agrupados, sendo selecionados 11 fungos para os ensaios enzimáticos. O teste para produção de amilase evidenciou atividade enzimática em quatro fungos e o de produção de lipase detectou atividade em um fungo. Os isolados que apresentaram atividade enzimática foram caracterizados morfologicamente após análise macro e microscópica, sendo possível a identificação preliminar dos gêneros: *Aspergillus* sp, *Chaetomium* sp. e *Verticillium* sp. havendo, no entanto, a necessidade de ser feita a caracterização molecular para confirmação desses resultados (tabela 1).

Tabela 1. Relação dos fungos endofíticos isolados.

Cód	Cor	Textura	Taxa
FEC 8	Anverso: Marrom Verso: Laranja claro	Arenosa	<i>Aspergillus</i> sp.
FEC 15	Anverso: Branco/cinza Verso: Bege	Algodonosa	<i>Chaetomium</i> sp.
REC	Anverso: Branco	Veludosa	<i>Verticillium</i> sp.

Cód	Cor	Textura	Taxa
14	Verso: Mista (marrom e verde)		
FEC 2	Anverso: Branco/cinza Verso: negro	Algodonosa	Não identificado

Estes gêneros apresentaram índice enzimático para amilase de 0,77, 0,67 e 0,53 respectivamente. Não foi possível identificar o isolado codificado como FEC 2 pois não foram visualizadas estruturas reprodutivas e/ou esporos nas lâminas. Este fungo apresentou para a amilase o índice enzimático de 0,54 (Figuras 2 e 3). Foi detectada atividade enzimática para lipase apenas no gênero *Chaetomium* sp. com o valor de 0,76 (tabela 2).



Figura 2. Testes enzimáticos para amilase em três fungos (A) *Aspergillus* sp.; (B) FEC 2; (C) *Verticillium* sp.



Figura 3. Teste enzimático para lipase. Fungo *Chaetomium* sp.

Tabela 2. Resultados dos testes enzimáticos

Fungo	Valor do IE		Caracterização do IE	
	Amilase	Lipase	Amilase	Lipase
<i>Aspergillus</i> sp.	0,77	-	Positivo	-
<i>Chaetomium</i> sp.	0,67	0,76	Positivo	Positivo

<i>Verticillium</i> sp.	0,53	-	Fortemente positivo	-
FEC 2	0,54	-	Fortemente positivo	-

A metodologia para isolamento de endófitos utilizada neste trabalho é descrita também em outros estudos (Souza et al., 2004). Em meio seletivo, Batista (2009) obteve um índice de colonização de 48,1%, para folha, e se comparado a este trabalho evidencia uma semelhança. Já em meios não seletivos, a porcentagem de colonização é muito maior, podendo chegar até em 100% (Silva, 2006). Cuzzi et al (2011) realizaram ensaios para determinação enzimática usando fungos do gênero *Aspergillus* sp., que apresentaram um índice enzimático de 0,66 para amilase e do gênero *Chaetomium* sp., que para amilase teve um índice de 0,92 e para lipase de 0,93, resultados que corroboram com este trabalho. Neste estudo o fungo do gênero *Verticillium* sp. apresentou o maior índice de atividade enzimática que foi de 0,53 e o do gênero *Chaetomium* sp. apresentou resultados tanto para produção de amilase quanto para lipase, sendo 0,67 e 0,76, respectivamente. O gênero *Aspergillus* sp. é comumente encontrado em trabalhos de isolamento e identificação de fungos (Souza et al., 2004). Cuzzi et al (2011) evidenciam a versatilidade e o potencial enzimático dos gêneros *Chaetomium* sp. e *Aspergillus* sp., apresentando atividade enzimática para amilase, lipase e protease com resultados positivo para todas as enzimas ensaiadas. Um estudo sobre fungos endofíticos como fontes de metabólitos secundários relatou o isolamento de um fungo do gênero *Chaetomium* sp. e sua grande potencialidade de apresentar atividade biológica (Borges, 2008).

### Conclusões

A atividade enzimática detectada em quatro dos isolados apresentou índices positivos quando comparados a trabalhos semelhantes.

Os gêneros preliminarmente identificados podem ser promissores podendo ser avaliados em outras condições de cultivo e com o uso de outras metodologias.

Faz-se necessária a identificação molecular dos fungos isolados.

### Referências

Azevedo JL (1999) Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revista Brasileira de Botânica*. 22 n.2: 225-229.

Batista IH (2009) Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes* na Amazônia. Manaus, Brasil, 185p (Tese). Doutorado em Biotecnologia-UFAM

Borges WS (2008) Estudo de fungos endofíticos associados a planta da família Asteraceae como fonte de metabólitos secundários em processos de biotransformação. USP. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-27082008-092456/pt-br.php>

Cuzzi C, Link S, Vilani A, Onofre SB (2011) Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (asteraceae). *Global Science and Technology* 4(2):47-57.

Garcia, AK (2010). Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira. /Alexandre Kopte Garcia, São Paulo.

Hankin L, Anagnostakis SG (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*. 67:597-607.

Rejmánková E (2011) The role of macrophytes in wetland ecosystems. *Journal of Ecology and Field Biology*. 34(4):333-345.

Silva RLO, et al (2006) Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botânica Brasileira*. 20: 649-655.

Soares IA, Flores AC, Zanettin L, Pin HK, Mendonça MM, Barcelos RP, Trevisol LR, Carvalho RD, Schauren D, Rocha CLMSC, Baroni S, (2010). Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nudulans*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [ONLINE] 30(3):700-705.

Souza AQL, Souza ADL, Filho AS, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira, JO (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazonica*. 34:185-195.