

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FOSFATASES ÁCIDAS POR *Trichoderma* spp.

Suelen Lorena da Silva, Cirano José Ulhoa

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas

74001-970, Brasil

suelenlorena@hotmail.com; ulhoa@icb.ufg.br

Palavras – chave: produção; fosfatase ácida; *Trichoderma* spp.,

1-INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo de fungos filamentosos encontrados no solo sobre matéria orgânica em decomposição e em raízes de várias espécies de plantas. São saprófitas, possuem esporos de coloração verde e caracterizam-se principalmente por utilizarem uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio (Papavizas, 1985). São fungos anamórficos por não possuírem uma fase sexual conhecida e são naturalmente isolados de solos de regiões tropicais e temperados. A fase teleomórfica é formada pelo gênero *Hypocrea*, o qual pode ser encontrado colonizando árvores e herbáceas (Harman et al., 2004; Samuels, 2006).

Desde 1930 a ação do *Trichoderma* como biocontrolador vem sendo estudada e o sucesso do gênero é devido a agressividade no combate aos fungos fitopatogênicos do solo (Ribeiro, 2010). Há estudos que indicam o *Trichoderma* como promotor do crescimento de plantas podendo ocorrer o aumento da área foliar e do peso fresco da planta (Chácon *et al.*, 2007) os benefícios proporcionados por esses fungos são devidos a sua capacidade de colonizar raízes (Harman *et al.*, *apud* Ribeiro, 2010). Esta interação pode ocorrer através de dois mecanismos diferentes: (i) indução dos mecanismos de resistência da planta, controlando assim a população de fitopatógenos do solo; (ii) influência direta na fisiologia da planta através da solubilização de minerais e produção de hormônios (Verma *apud* Ribeiro, 2010).

A absorção de fósforo do ambiente e sua utilização eficiente exigem a atuação de uma grande classe de enzimas denominadas de fosfatases. Estas enzimas são geralmente classificadas como fosfatases alcalinas e fosfatases ácidas (Dickman e Yarden, 1999). No solo a hidrólise de fosfatos orgânicos é

Revisado pelo orientador.

predominantemente mediada pela atividade de fungos e bactérias (Yadav e Tarafdar, 2003). Os fungos são capazes de converter fósforo insolúvel em formas solúveis durante o processo de acidificação ou quelação, ou por hidrólise mediada pelas enzimas fosfatases. Fosfatases ácidas e alcalinas existem no solo podem ser classificadas com base nas faixas de pH de atuação e normalmente são secretadas em condições de ausência de Pi (Kapri, *et al.*,2010). A maioria das fosfatases ácidas relatadas na literatura são provenientes dos fungos *Aspergillus*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium* e *Metarhizium* (Guimarães *et al.*,2004).

Fosfatase ácida (Fosfoidrolase monoéster-ortofosfórico, EC 3.1.3.2) é uma hidrolase que promove a hidrólise do fosfato monoéster, transformando fosfato orgânico em uma forma solúvel inorgânico. Essas enzimas são amplamente distribuídas em plantas, células animais e microorganismos (Palacios *et al.*,2005; Dickman e Yarden, 1999).

As fosfatases são classificadas baseadas em seu modo de expressão, podendo ser constitutiva ou induzida. As fosfatases constitutivas são caracterizadas por serem essenciais para a sobrevivência e por não serem afetadas pelas concentrações de pH externo (Ribeiro, 2010). Entretanto as fosfatases induzidas são expressas em resposta a fatores ambientais, como a deficiência de Pi (Esposito & Azevedo, 2004).

Inúmeros estudos sobre fosfatase ácida de fungos estão associados à forma reprimida pelo fosfato inorgânico (Aleksieva e Micheva- Viteva *apud* Ribeiro,2010). No solo, a concentração de fósforo solúvel varia de 0,05 a 10 ppm e mais de 80% torna-se inviável para a absorção pela planta devido à absorção, precipitação ou conversão para forma orgânica (Kapri *et al.*,2010) Os microorganismos secretam fosfatases que clivam compostos de fósforo orgânico, o qual pode então ser utilizado para seu crescimento (Tasaki *et al.*, 2006).

2 – OBJETIVOS

Avaliar a produção de fosfatase ácida e alterações do pH do meio de cultura de isolados de *Trichoderma spp.* durante diferentes tempos de indução.

Identificar bons produtores de fosfatases para estudos posteriores de solubilização de fosfato.

3 – METODOLOGIA

3.1 - Manutenção dos fungos

Os isolados do fungo *Trichoderma* spp. utilizados pertencem à coleção do Laboratório de Enzimologia – ICB/UFG, extraídos de solos de diferentes regiões do Brasil. Os fungos foram mantidos em placas, com repiques periódicos em meio MYG (p/v: 0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocados em temperatura ambiente (Ulhoa & Peberdy, 1992).

3.3 – Produção de fosfatase ácida

Os esporos de *Trichoderma* spp. (1.10^7 . mL⁻¹) foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo meio 50 mL TLE modificado, autoclavado {CaCl₂.6 H₂O 0,3g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ 1,4 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,3 g L⁻¹, glicose 2,5%} pH 6,5. Os frascos foram mantidos em agitador rotatório a 28°C com velocidade de 180 rpm durante 96 horas. Alíquotas de 5mL foram retiradas após 48 horas, 72 horas e 96 horas de indução para determinar a atividades enzimática e pH.

3.4 – Ensaio enzimáticos e determinação de proteína

A atividade de fosfatase ácida foi determinada segundo a metodologia descrita por Haran (2000) usando p-nitrofenilfosfato (p-NPP) (Sigma Chemical Company) como substrato na concentração de 5mM. A mistura de ensaio contém 10 µL da enzima a 20 µL de solução de p-NPP. Após incubação da mistura a 37 °C por 15 minutos, adicionou-se 100 µL de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 0,1M. Em seguida, a leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 405 nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para degradar 1 µmol de substrato por minuto. Os testes foram feitos em duplicatas.

A concentração de proteínas foi determinada pela metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA-Sigma) como padrão. Amostras de

100 µL do sobrenadante de cultura foram adicionados a 1 mL da solução de Bradford. Após incubação por 15 minutos, à temperatura ambiente foi realizada a leitura de absorbância das amostras à 595nm.

RESULTADOS

Os isolados apresentaram pouca ou nenhuma atividade enzimática no intervalo de 48 horas da indução. A maioria dos isolados aumentou a secreção de fosfatases ácidas no intervalo de 72 horas e o isolado 494/01 aumentou a secreção de outras proteínas, situação que pode ser visualizada na Figura 2. O isolado 17/06 destacou-se na produção da enzima fosfatase ácida. No intervalo de 96 horas de indução houve uma queda da atividade enzimática, com exceção dos isolados 479/01 e 483/02 (Figura 1), o que difere dos resultados encontrados por Kapri *et al.* (2010), onde a atividade da enzima de todos os isolados declinou com 96 horas de indução.

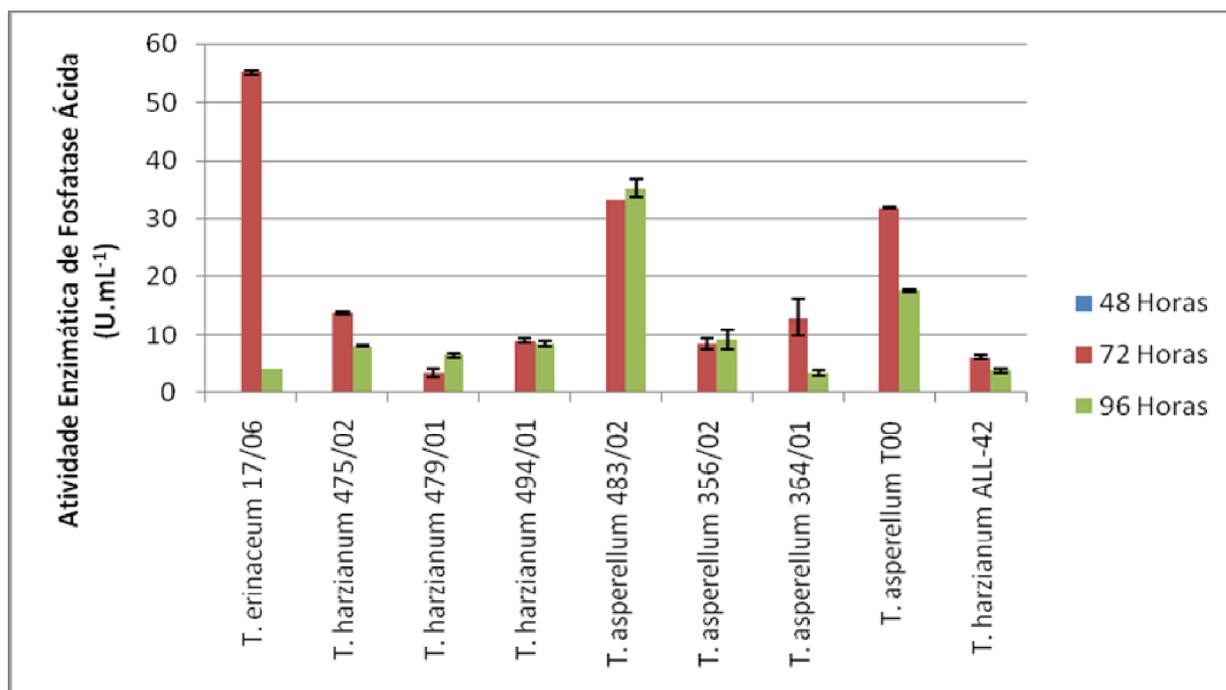


Figura 1. Atividade enzimática de fosfatase ácida dos isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes intervalos da indução.

Os resultados - aumento na atividade enzimática no intervalo de 72 horas - são corroborados com dados encontrados na literatura, onde a máxima atividade enzimática foi encontrada no intervalo de 72 horas de incubação (Kapri *et al.*,2010).

O *Trichoderma harzianum* ALL-42 apresentou baixa atividade enzimática de fosfatase em todos os intervalos, o que é condizente com os dados encontrados por Ribeiro (2010) para a mesma concentração de fosfato (0% de KH_2PO_4) e condições de cultivo semelhantes.

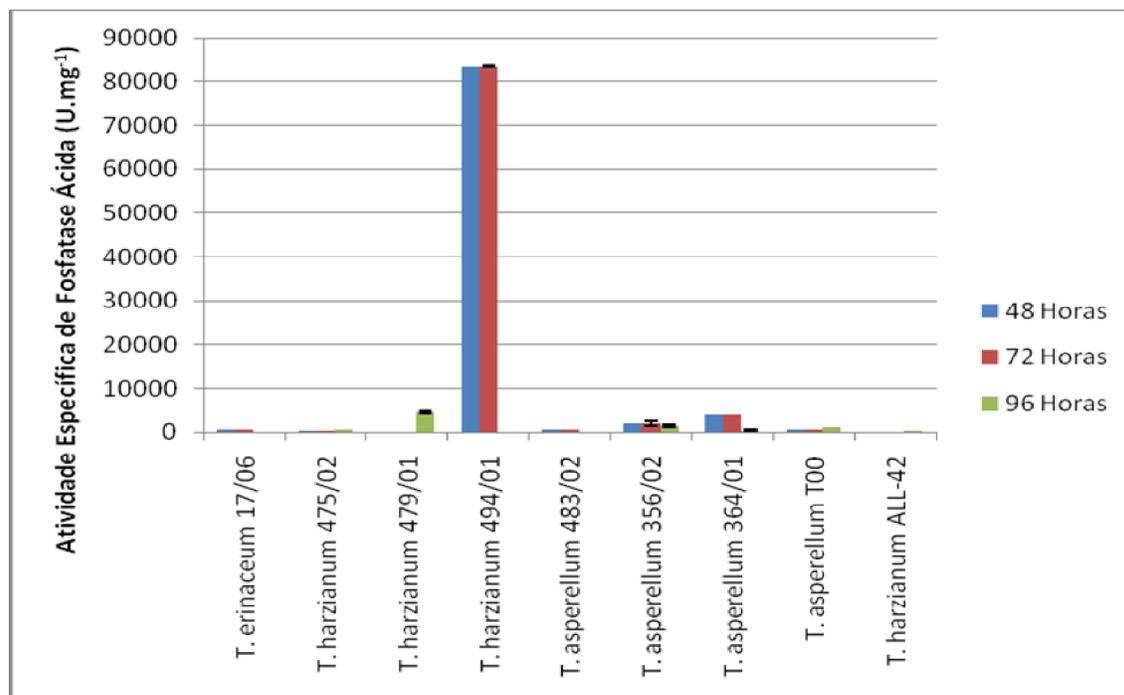
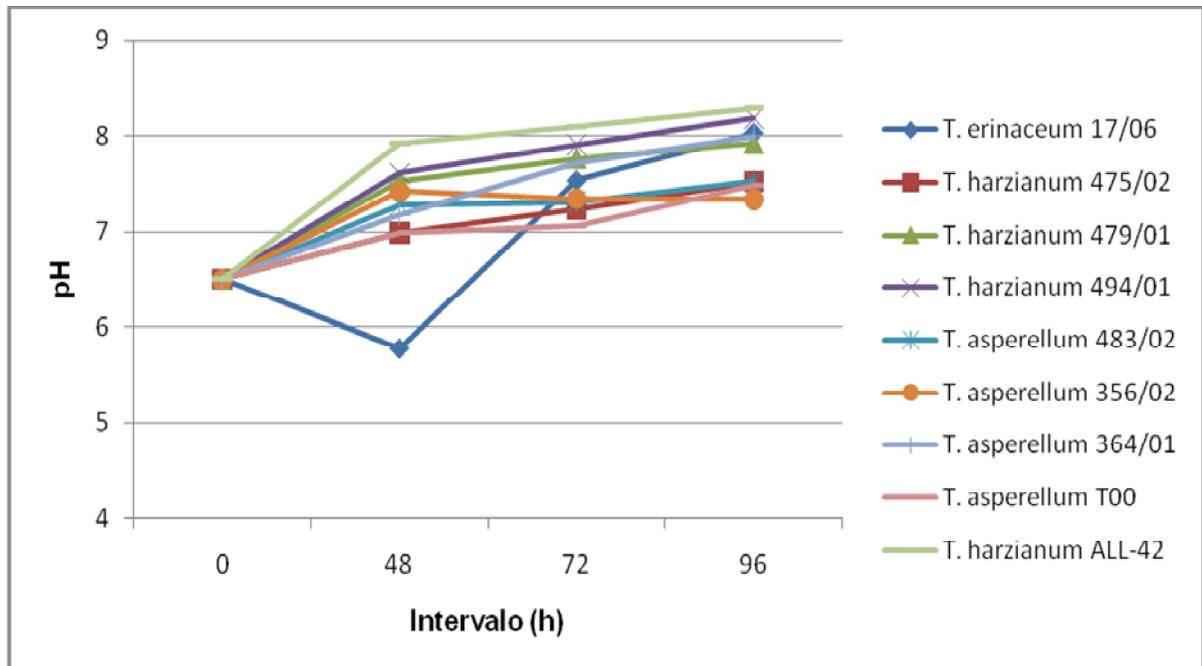


Figura 2. Atividade específica de Fosfatase Ácida (U.mg^{-1}) por isolados de *Trichoderma* spp.

A baixa secreção desta hidrolase pode ser atribuída também ao mecanismo regulatório de pH, que garante a secreção somente das enzimas que são ativas no pH correspondente a sua função (Ribeiro, 2010). Sendo assim, a fosfatase ácida será secretada preferencialmente em pH ácido, o que difere das condições do meio de cultura do estudo, com pH 6,5, e com posterior basidificação ocorrida (Figura 3).

Observando o gráfico da figura 3 podemos notar uma queda inicial do pH no meio de cultivo do isolado 17/06, porém com 48 horas o *T.erinaceum* apresentou baixas taxas de atividade enzimática mesmo com pH aproximadamente em 5,77. Logo em seguida o isolado foi capaz de basidificar o meio ter uma boa produção de fosfatase ácida mesmo em pH básico.



CONCLUSÕES

O isolado 17/06 é um bom candidato para estudos de conversão de fosfato orgânico em P_i , pois a secreção de fosfatase ácida, mesmo em meio de cultivo com condições limitantes, foi bastante alta. Já o isolado ALL-42 não apresentou altas taxas de atividade enzimática apesar de alguns estudos apontá-lo com bom produtor de fosfatase, sendo assim, necessita-se mais estudos sobre o potencial de produção de fosfatases e posteriormente de solubilização de fosfato.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976.
- CHACÓN, M.R., RODRIGUEZ-GALÁN, O., BENÍTEZ, T., SOUSA, S., REY, M., LLOBEL, A., JARANA-DELGADO, J. **Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*.** International Microbiology, v.10, p.19-27, 2007.
- DICKMAN, M.B., YARDEN, O. **Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in filamentous Fungi.** Fungal Gen. Biol 26:99 – 117, 1999.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 510 p.
- GUIMARÃES, L.H.S., TERENCE, H.F., JORGE, J.A., LEONE, J.A., POLIZELI, M.D.T.M. **Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*.** Biotechnol Appl Biochem. 40:201-207. 2004.
- HARAN, S. **Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression.** American Society of Plant Physiologists, v. 124, p.615-626. 2000.
- HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, L. LORITO, M. ***Trichoderma* species-opportunistic, virulent plant symbionts.** Nature Reviews Microbiology n.2, p.43-56, 2004. (Harman et al., 2004; Samuels, 2006; Woo, et al., 2006).
- KAPRI, A. TEWARI, L., **Phosphate Solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma spp.*** Brazilian Journal of Microbiology, ISSN 1517-8382, 2010.
- PALACIOS, M.C., HAROS, M., ROSELL, C.M., SAN, Y. **Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties.** Appl Microbiol. 98:229-237. 2005.
- PAPAVIZAS, G. C. ***Trichoderma* and *Gliocadium*: biology, ecology and potential for biocontrol.** Ann. Rev. Phytopathol 23: 23-54, 1985.
- RIBEIRO, M.S. **Estudo da produção de fosfatase ácida por *Trichoderma harzianum*.** Dissertação, UFG, 2010.
- SAMUELS, G.J. ***Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology.** Phytopathology v.96 p.195-206, 2006.
- TASAKI, Y., AZWAN, A., YAZAKI, J., HARA, T., JOH, T. **Structure and expression of two genes encoding secreted acid phosphatases under phosphate – deficient conditions in *Pholiota nameko* strain N2.** Current Genetics, v.49, p.323-332, 2006.
- ULHOA, C. J. & PEBERDY, J. F. **Effect of carbon sources on chitinase production by *Trichoderma harzianum*.** Mycol. Res. 97: 45-48, 1992.
- YADAV, S.R., TARAFDAR, C.J. **Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds.** Soil Biol. Bioch. 35:1-7. 2003.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.