

BIOPROSPECÇÃO MICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE QUITINASE E β -1,3-GLUCANASE

MAICON SÉRGIO NASCIMENTO DOS SANTOS¹, OLÍMPIO CORREA ESCOSTEGUY², SILVANA SCHMALTZ³, MARCIO ANTONIO MAZUTTI⁴, GIOVANI LEONE ZABOT⁵, MARCUS VINÍCIUS TRES⁵

¹ Discente de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PPGEA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria – RS, (55) 3220-8000, maiconsergions@gmail.com

² Discente de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria – RS, (55) 3220-8000, olimpioescosteguy@gmail.com

³ Discente de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria – RS, (55) 3220-8000, silschmaltz@gmail.com

⁴ Professor Doutor, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PPGEA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria – RS, (55) 3220-8000, marciomazutti@gmail.com

⁵ Professor Doutor, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PPGEA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Cachoeira do Sul – RS, (51) 3724-8400, giovani.zabot@ufsm.br, marcus.tres@ufsm.br

Apresentado no
L Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2021
08 a 10 de novembro de 2021 - Congresso On-line

RESUMO: O controle biológico consiste no uso de agentes biológicos, como fungos, bactérias e/ou vírus, para reduzir a população de insetos-praga em sistemas agrícolas. Assim, muitos microrganismos de potencial inseticida podem ser selecionados para viabilizar o controle de espécies indesejadas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar a bioprospecção de microrganismos para a avaliação do potencial bioinseticida e determinar a atividade enzimática de quitinase e β -1,3-glucanase. Inicialmente, uma triagem foi realizada em áreas experimentais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, para inspecionar e coletar insetos mortos com a presença de microrganismos. Em duplicatas, os insetos foram esterilizados na superfície usando etanol 70% e uma solução de NaOCl a 0,5%, por 3 minutos, com três posteriores lavagens com água esterilizada e, em seguida, o fungo esporulado do cadáver do inseto foi rapidamente disposto em placas de Petri contendo solução de Ágar Batata Dextrose (BDA). Posteriormente, os insetos mortos com presença fúngica foram cultivados em estufa incubadora a 28 °C por uma semana. Sucessivamente, os microrganismos foram direcionados ao processo de fermentação submersa, em meio de cultivo Batata Dextrose (BD), a 28 °C e 120 rotações por minuto (rpm), por uma semana. O produto fermentado, então, foi submetido à filtração em bomba a vácuo e, finalmente, determinadas as atividades enzimáticas de quitinase e β -1,3-glucanase em espectrofotômetro a 540 nm. A quitinase e β -1,3-glucanase produzidas pelos microrganismos isolados apresentaram atividade de até $0,804 \pm 0,11$ U para MA16 e $0,3624 \pm 0,0366$ U para T1, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Agentes de controle biológico, Agricultura sustentável, Biocontrole,

MICROBIAL BIOPROSPECTING AND DETERMINATION OF THE ENZYMATIC ACTIVITY OF CHITINASE AND β -1.3-GLUCANASE

ABSTRACT: Biological control consists in using biological control agents, such as fungi, bacteria, and/or virus, to reduce the insect pest population in agricultural systems. Moreover, a large number of microorganisms with insecticidal potential can be selected to enable the

control of unwanted species. In this context, the objective of this work was to conduct the bioprospecting of microorganisms for the evaluation of the bioinsecticide potential and to determine the enzymatic activity of chitinase and β -1,3-glucanase. Initially, screening was carried out in experimental areas of the Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, to inspect and to collect dead insects with the presence of microorganisms. In duplicates, the insects were surface sterilized using 70% ethanol and a 0.5% NaOCl solution for 3 minutes, with three subsequent washes with sterile water, and then the sporulated fungus from the insect cadaver is quickly plated onto Petri dish containing Potato Dextrose Agar (PDA) solution. Afterward, dead insects with fungal presence were cultivated in an incubator at 28 °C for seven days. The microorganisms were successively directed to the submerged fermentation process, in Potato Dextrose (PD) culture medium, at 28 °C and 120 revolutions per minute (rpm), for seven days. The fermented product was then submitted to filtration in a vacuum pump and, finally, determined the enzymatic activity of chitinase and β -1,3-glucanase in a spectrophotometer at 540 nm. Chitinase and β -1,3-glucanase produced by the isolated microorganisms showed activity up to 0.804 ± 0.11 U for MA16 and 0.3624 ± 0.0366 U for T1, respectively.

KEYWORDS: Biological control agents, Sustainable agriculture, Biocontrol.

INTRODUÇÃO: O clássico controle de pragas por meio da aplicação de pesticidas sintéticos é extremamente prejudicial em função dos graves efeitos na saúde humana, meio ambiente e resistência de pragas-alvo, ocasionando em surtos severos em agro ecossistemas (AKUTSE et al., 2020). Neste contexto, a aplicação de biopesticidas oferece uma alternativa viável à redução do consumo de produtos convencionais, além da minimização da toxicidade ao ambiente e à saúde humana e redução significativa da resistência de pragas-alvo (MAYANGLAMBAM; SINGH; RAJASHEKAR, 2021). Ainda, o cenário global de produtos de base biológica é extremamente promissor e têm reportado resultados encorajadores. A prospecção de microrganismos para o desenvolvimento de formulações biológicas é fundamental e a etapa inicial nas pesquisas voltadas à exploração da atividade microbiana para o uso potencial frente à produtos convencionais. Com isso, o uso de microrganismos (fungos, bactérias, leveduras, etc) produtores de enzimas micolíticas (quitinase, glucanase, proteases e mananases) têm despertado o interesse nos últimos anos, sobretudo na busca de espécies de alto potencial bioinseticida (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019). Considerando-se que a parede celular de fungos entomopatogênicos e insetos é composta, predominantemente, por polissacarídeos como quitina ou glucana, a produção destas enzimas podem ocasionar na ruptura da parede celular de espécies-alvo e garantir o sucesso do manejo de pragas (VELIZ; MARTÍNEZ-HIDALGO; HIRSCH, 2017). Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar a bioprospecção de microrganismos para a avaliação do potencial bioinseticida e determinar a atividade enzimática de quitinase e β -1,3-glucanase.

MATERIAL E MÉTODOS: Para uma melhor compreensão das etapas metodológicas realizadas no desenvolvimento deste estudo, um fluxograma é apresentado na Figura 1.

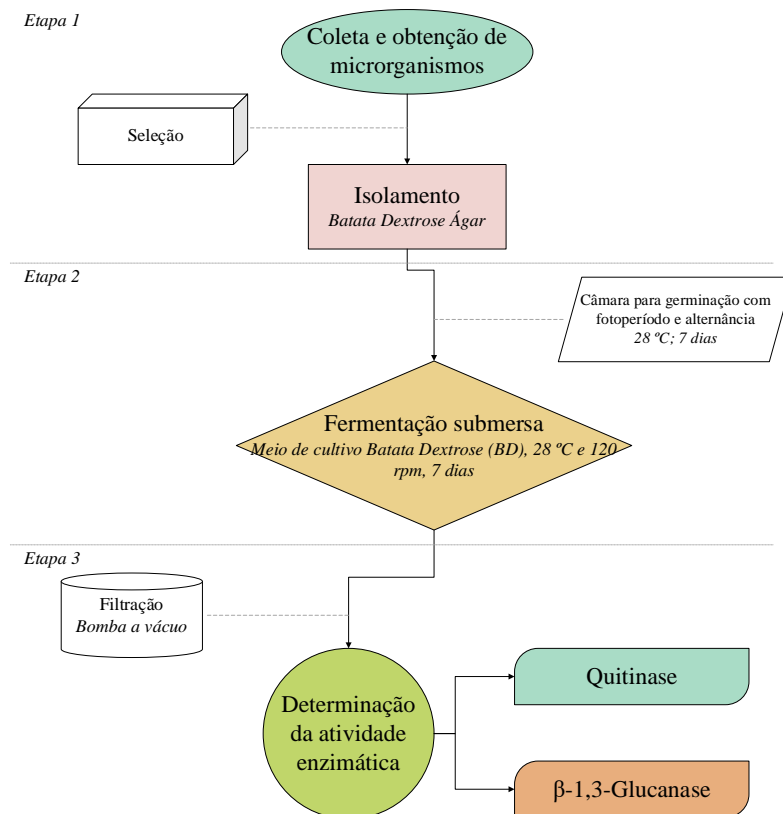


FIGURA 1. Etapas metodológicas executadas no estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O pH da solução durante o período de fermentação submersa se tornou progressivamente básico (Figura 2). Vinte e quatro horas após o início do processo fermentativo, o pH de todas as soluções foi similar e próximo ao valor do meio de cultivo (6.0). Após 168 horas, os C4 ($9,0550 \pm 0,1202$), MA16 ($8,9650 \pm 0,2192$) e D1 ($8,7 \pm 0,1556$) evidenciaram os maiores resultados. Em relação à performance da atividade enzimática, os isolados MA16 e C1 apresentaram atividade enzimática de quitinase de até $0,804 \pm 0,11$ U e $0,139 \pm 0,017$ U, respectivamente. Considerando-se a atividade de β -1,3-glucanase, os isolados T1, A7 e C4 mostraram atividade de $0,3624 \pm 0,0366$, $0,3107 \pm 0,2090$ e $0,2718 \pm 0,4553$, respectivamente (Tabela 1).

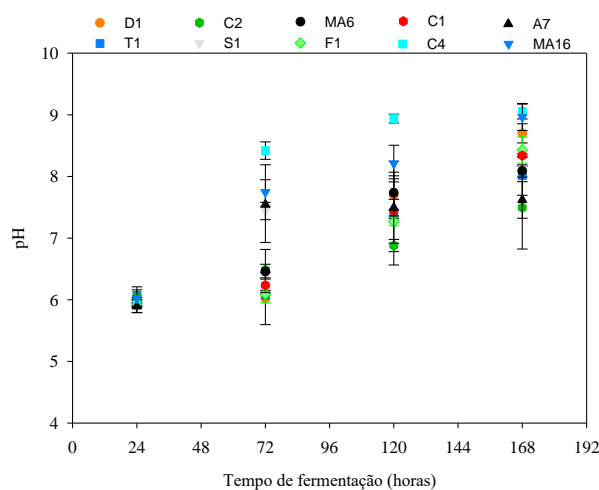


FIGURA 2. Perfil cinético do pH das soluções em 24, 72, 120 e 168 horas de processo fermentativo.

TABELA 1. Condições de processo e maiores rendimentos de açúcares (Y_{RS} ; g/ 100g biomassa) para as biomassas de arroz, soja e noqueira-pecã.

Identificação	Atividade enzimática (U/mL)	
	Quitinase	β -1,3-Glucanase
D1	0,0 \pm 0,0	0,0213 \pm 0,1470
T1	0,1312 \pm 0,09	0,3624 \pm 0,0366
C2	0,1026 \pm 0,05	0,2581 \pm 0,0602
S1	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
MA6	0,0 \pm 0,0	0,0463 \pm 0,0372
F1	0,0 \pm 0,0	0,0175 \pm 0,1417
C1	0,139 \pm 0,017	0,2493 \pm 0,0974
C4	0,0 \pm 0,0	0,2718 \pm 0,4553
A7	0,0 \pm 0,0	0,3107 \pm 0,2090
MA16	0,804 \pm 0,11	0,1491 \pm 0,0372

CONCLUSÕES: A quitinase produzida pelos microrganismos isolados apresentou atividade de até 0,804 \pm 0,11 U para MA16 e 0,139 \pm 0,017 U para C1. Em relação à atividade de β -1,3-glucanase, os isolados T1, A7 e C4 evidenciaram atividade de 0,3624 \pm 0,0366, 0,3107 \pm 0,2090 e 0,2718 \pm 0,4553, respectivamente, consideradas as condições de crescimento microbiano. Os resultados apontam para o potencial de aplicação das enzimas produzidas nos microrganismos isolados. Finalmente, este estudo encoraja a bioprospecção de microrganismos produtores de quitinase e β -1,3-glucanase como potenciais agentes de biocontrole.

AGRADECIMENTOS: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS:

- AKUTSE, K. S. et al. Biopesticide research and product development in Africa for sustainable agriculture and food security – Experiences From the International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE). **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 1–14, 2020.
- KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–19, 2019.
- MAYANGLAMBAM, S.; SINGH, K. D.; RAJASHEKAR, Y. Current biological approaches for management of crucifer pests. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021.
- VELIZ, E. A.; MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; HIRSCH, A. M. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. **AIMS Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 689–705, 2017.