

Determinação de Nitrato Redutase em Isolados de *Fusarium graminearum*

Determination of Nitrate Reductase in Strains of *Fusarium graminearum*

Daniel Pavanello Ferrari^{a*}; Sergio Paulo Severo de Souza Diniz^a

^aUniversidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

*E-mail: danielpavanello@ymail.com

Recebido: 7 de janeiro de 2013; Aceito: 17 de abril de 2013.

Resumo

Os fungos filamentosos como o *Fusarium graminearum* são fungos que produzem expressiva quantidade de metabólitos secundários. A pesquisa da atividade da enzima nitrato redutase, enzima diretamente associada ao processo de desnitrificação, em fungos do gênero *Fusarium* tem sido tema controverso. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da enzima nitrato redutase em cepas de *Fusarium graminearum*. As cepas de *F. graminearum* foram cultivadas na presença de nitrato e nitrito, apresentando níveis de nitrato redutase diferentes. Os resultados obtidos apontam para a utilização da via assimilatória de nitrato pelos organismos de *F. graminearum* avaliados neste estudo.

Palavras-chave: Nitrato Redutase. *Fusarium*. Nitrato Redutases.

Abstract

Fusarium graminearum are filamentous fungi that produce significant amounts of pigments. Studying the activity of the enzyme nitrate reductase, which is closely associated with the process of denitrification in *Fusarium*, has been controversial. The aim of the present study was to evaluate two strains of *F. graminearum* that have grown in the presence of nitrate and nitrite, showing different levels of nitrate reductase. The results point the use of nitrate assimilation pathway for the fungus *F. graminearum* evaluated in this study.

Keywords: Nitrate Reductase. *Fusarium*. Nitrate Reductases.

1 Introdução

Os fungos, de maneira geral, utilizam tanto amônio quanto nitrato como fonte de nitrogênio em meio de cultura. A utilização de nitrato depende da sua redução a amônio através das redutases de nitrato, o que ocorre no meio intracelular¹. Tanto a forma quanto a concentração da fonte nitrogenada interferem na produção de metabólitos secundários².

O nitrogênio se apresenta de várias formas como fonte nutricional. Entretanto, é encontrado no solo em grandes quantidades na forma de nitrato. Das demais formas de nitrogênio encontradas no solo, somente a amônia, embora tóxica, é assimilável pela microbiota, pois é encontrada na forma de seu íon NH_4^3 .

A assimilação de nitrato ou de nitrito pelos microrganismos conduz à redução de ambas fontes de N à amônia, através de vias metabólicas específicas. A redução de nitrato à amônia envolve duas enzimas: nitrato redutase e nitrito redutase^{4,5}.

Os microrganismos mostram grande diversidade na utilização de fontes de nitrogênio. Alguns são autotróficos em relação a este nutriente, sendo capazes de crescer em nitrato, amônia e, algumas vezes, em nitrogênio gasoso; outros necessitam de aminoácidos, purinas e pirimidinas⁶. A via de

assimilação do nitrato é um processo biológico essencial, sendo a principal rota de incorporação do nitrogênio inorgânico em compostos orgânicos⁷. A atuação da enzima nitrato redutase é de fundamental importância na incorporação de nitrogênio inorgânico em moléculas orgânicas complexas, podendo ser considerada a etapa limitante desse processo⁸. O nitrogênio e o potássio têm sido relacionados como participantes na ativação da enzima nitrato redutase. A fertilização potássica tem sido correlacionada positivamente com os níveis da nitrato redutase⁹, com o desenvolvimento de culturas do trigo¹⁰.

Tendo em vista a carência de referências e, portanto, de pesquisa, sobre a expressão da atividade da nitrato redutase em fungos, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade da enzima nitrato-redutase em *Fusarium graminearum*.

2 Material e Métodos

Nestes estudos foram usadas as cepas 10 e 46 do fungo *Fusarium graminearum* da coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do NEPRON - Núcleo de Estudos em Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá - UEM.

Foi utilizado o meio BDA (Batata Dextrose Agar), preparado conforme a descrição de Ruddat *et al.*¹², utilizando-

se 200 gramas de batatas cozidas em 800 ml de água destilada, seguido de filtração. Ao filtrado, adicionou-se 18 gramas de ágar e 15 gramas de dextrose, completando-se o volume para 1.000 ml. Posteriormente, o meio foi distribuído em placas de Petri, previamente autoclavadas a 120 °C, a 1 atm. Este mesmo meio de cultura foi empregado em cultura de manutenção dos fungos.

O meio ICI, conforme descrição de Payne⁴, possui a seguinte composição em gramas/litro: 80g de glucose; 0,40g NH₄NO₃; 5g KH₂PO₄; 1g MgSO₄.7H₂O e 2 ml dos seguintes elementos-traço: 0,1g FeSO₄; 0,015g CuSO₄.5H₂O; 0,161g ZnSO₄.7H₂O; 0,01g MnSO₄.7H₂O; 0,01g (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O em 100 ml de água destilada. Este meio específico foi utilizado no cultivo dos microrganismos, previamente ao ensaio enzimático.

A padronização dos inóculos foi realizada em frascos tipo Erlenmeyer contendo 1/5 de meio BD ou ICI do volume nominal do frasco (125 ml). Discos homogêneos de cultura de fungos, previamente preparadas nos meios sólidos, foram transferidos para o meio de cultivo em condições assépticas. O respectivo inóculo foi incubado sob agitação rotatória a 100 rpm a 28 °C, durante 6 dias.

Os ensaios microbiológicos foram iniciados com a transferência asséptica do inóculo (40 ml) para 400 ml de meio ICI e crescido em frascos Erlenmeyer de 2 litros, sob agitação rotatória a 100 rpm a 28 °C, durante, no mínimo, 7 dias. Os meios de cultivo e a vidraria usada nos experimentos foram devidamente autoclavados.

O acompanhamento do crescimento micelial foi realizado pela remoção de aliquotas do meio de cultivo, em condições assépticas, determinando-se a massa micelial úmida (grama %), o teor de amido residual (absorbância a 620 nm), carboidratos totais (grama %), glucose (grama %) e proteínas solúveis totais (grama %)¹¹.

2.1 Determinação da atividade da enzima nitrato redutase

O sistema reacional para a determinação da atividade da enzima nitrato redutase consistiu de 1 mL da amostra (filtrado da cultura) adicionado 0,3 mL de sulfanilamida e 0,3 mL de 1-naftil-etilenodiamino-dicloreto 0,02%. A leitura, em absorbância, foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

3 Resultados e Discussão

As Tabelas 1 e 2 apresentam os parâmetros de acompanhamento do desenvolvimento das culturas de *F. graminearum*, cepas 10 e 46. Durante todo o crescimento dos microrganismos, foram determinados os níveis de consumo de carboidratos totais (CHT), glucose, amido, massa micelial úmida (MMU) e proteína solúveis no meio.

Tabela 1: Determinação de carboidratos totais, glucose, amido, massa micelial úmida e proteína solúvel durante o crescimento de *F. graminearum* (cepa 10).

Tempo (H)	CHT (g%)	Glucose (g%)	Amido (abs) [†]	MMU ^{**}	Proteína (g%)
0	2,3	2,4	2,5	0,02	0,001
24	2,3	2,2	2,4	0,10	0,05
48	2,1	1,8	2,2	0,22	0,09
72	1,6	1,6	1,7	0,55	0,19
96	0,8	0,7	0,7	0,76	0,26
120	0,4	0,4	0,5	0,80	0,27
144	0,1	0,1	0,3	0,83	0,30
168	0,1	0,0	0,1	0,83	0,31

[†]Absorbância a 620 nm

^{**}MMU = massa micelial úmida

Tabela 2: Determinação de carboidratos totais, glucose, amido, massa micelial úmida e proteína solúvel durante o crescimento de *F. graminearum* (cepa 46).

Tempo (H)	CHT (g%)	Glucose (g%)	Amido (abs) [†]	MMU ^{**}	Proteína (g%)
0	2,3	2,4	2,5	0,02	0,001
24	2,2	2,3	2,4	0,10	0,05
48	2,0	1,9	2,3	0,22	0,08
72	1,7	1,6	1,8	0,50	0,15
96	0,9	0,8	0,7	0,72	0,23
120	0,4	0,5	0,5	0,78	0,25
144	0,2	0,1	0,2	0,81	0,27
168	0,1	0,0	0,1	0,81	0,27

[†]Absorbância a 620 nm

^{**}MMU = massa micelial úmida

A Figura 1 apresenta os diferentes níveis de nitrato redutase, medida pela formação de nitrito, para as duas cepas de *F. graminearum* estudadas. Os níveis dessa atividade enzimática variou entre 1,34 e 1,38 mM de nitrito, tendo sido realizadas 5 repetições.

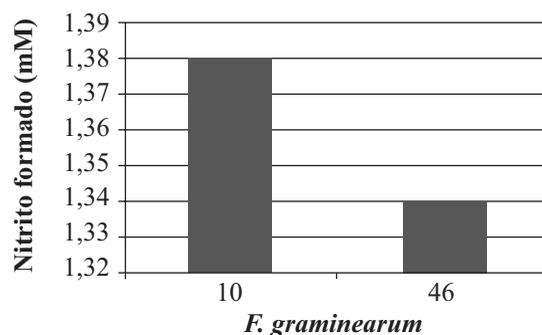


Figura 1: Níveis de nitrato redutase em *F. graminearum*

Objetivando acompanhar a relação de consumo de nitrato com a atividade da nitrato redutase através da formação de nitrito, mensuramos a quantidade residual de nitrato no meio de cultivo. O meio ICI foi usado, uma vez que se tratava de

um meio sintético que nos permitiu alterar as concentrações de nitrato sem afetar outros elementos. Podemos observar na Tabela 1 que houve uma relação estequiométrica entre nitrato absorvido e nitrito formado em decorrência da atividade da nitrato redutase. Ou seja, há uma efetiva conversão de nitrato em nitrito, o que pressupõe a utilização da seguinte via:



Tabela 3: Relação entre nitrito excretado e nitrato residual

Cepas	Nitrito Formado	Nitrato Residual
10	1,38	0,62
46	1,34	0,66

*Concentração inicial de KNO₃= 2,0mM

As bactérias e fungos coexistem, em todos os ecossistemas conhecidos. No solo, as bactérias se constituem em um alimento abundante para uma vasta gama de organismos, dentre os quais alguns fungos¹. Uma série de interações mutualísticas entre fungos e bactérias tem sido relatada. A associação de fungos e bactérias fixadoras de nitrogênio é de vital importância para a aceleração da decomposição de material vegetal morto. A bactéria fixa o nitrogênio atmosférico, aumentando os níveis desse elemento na forma de compostos orgânicos¹³.

Esses compostos são, por sua vez, utilizados pelo fungo que cresce com mais vigor, o que permite uma decomposição mais eficiente e rápida da matéria vegetal, e um fornecimento maior de nutrientes para a bactéria¹⁴. As espécies que fazem a simbiose com o rizóbio são as mais indicadas para aumentar o conteúdo de matéria orgânica de solos degradados de sistemas produtivos em condições de baixa fertilidade, acelerando o processo de sucessão vegetal³. Outra simbiose envolve bactérias que estão localizadas dentro das células de alguns fungos e são chamadas *endossimbiontes*². Fungos de vários grupos como Ascomycetos e Basidiomycetos parecem apresentar essas bactérias vivendo no citoplasma ou em organelas, por exemplo, nos vacúolos¹⁵. A discussão sobre o melhor entendimento sobre o metabolismo do nitrogênio em fungos, particularmente sobre a presença da atividade da nitrato redutase, é um tema ainda em aberto. Ao considerarmos o solo como um universo competitivo de organismos e nutrientes, torna-se claro a importância das relações simbióticas na manutenção do equilíbrio.

Tendo em vista essas afirmativas, é possível que a ocorrência de atividades enzimáticas como a nitrato redutase e nitrito redutase em fungos se justifique por essas possíveis interações fungo-bactéria¹⁶.

4 Conclusão

Os dados aqui apresentados demonstram a utilização da via assimilatória de nitrato por algumas cepas de *F. graminearum*. Há necessidade de mais estudos buscando melhor entendimento do processo e mecanismos dessas enzimas no gênero *Fusarium* e em outros fungos.

Referências

1. Bruckner B, Blechschmidt D. Nitrogen regulation of gibberellins biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Appl Microbiol Biotechnol 1991;35:646-50.
2. Maccheroni JR, Araújo WL, Lima AOS. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: Esposito E, Azevedo JL. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, EDUCS; 2004. p.580.
3. Putzke J, Putzke TL. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul: UNISC; 2002.
4. Payne WJ. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol Rev 1973;37:409-52.
5. Hewitt EJ. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. Ann Rev Plant Physiol 1975;26:73-100.
6. Solomonson LP, Lorimer GH, Hall RL, Borchers R, Backley JL. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-nitrate reductase of *Chlorella vulgaris*. J Biol Chem 1975;250:4120-7.
7. Falcão VR. Aspectos moleculares de nitrato redutase da macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA): seqüenciamento do gene e estudo da expressão do RNA mensageiro. 132f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo; 2006.
8. Silva SM, Oliveira LJ, Faria FP, Reis EF, Carneiro MAC, Silva, SM. Atividade da enzima nitrato redutase em milho cultivado sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e potássica. Cienc Rural 2011;41:11-7.
9. Venkatesan S, Ganapthy MNK. Nitrate reductase activity in tea as influenced by various levels of nitrogen and potassium fertilizers. Commun Soil Sci Plant Anal 2004;35:1283-91.
10. Viana EM, Kiehl JC. Doses de nitrogênio e potássio no crescimento de trigo. Bragantia 2010;69:975-82.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
12. Ruddat M, Helftmann E, Lang A. Conversion of steviol to a gibberelin-like compound by *Fusarium moniliforme*. Arch Biochem Biophys 1963;111:187-90.
13. Baldani VLD, Oliveira E, Balota E, Baldani JI, Kirchoff G, Dobereiner J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. An Acad Bras Cienc 1997;69:116-7.
14. Franco AA, Campello EFC. Manejo nutricional integrado na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade dos sistemas produtivos utilizando a fixação biológica de nitrogênio como fonte de nitrogênio. In: Aquino AM, Assis RL. Processos biológicos no sistema solo-planta. Ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; 2005. p.201-20.
15. Moreira FMS, Siqueira JO. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA; 2006.
16. Griffin DH. Fungal physiology. New York: John Wiley & Sons; 1994.

