

## AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DO *Trichoderma koningiopsis* NA PRESENÇA DE HERBICIDAS SINTÉTICOS

LARISSA CAPELETTI ROMANI<sup>1,2\*</sup>, ALINE FRUMI CAMARGO<sup>3</sup>, HELEN TREICHEL<sup>4</sup>, ALTEMIR JOSÉ MOSSI<sup>5</sup>

### 1 Introdução

A adoção de novos modelos de manejo e a integração de métodos culturais para o controle de plantas invasoras, incluindo abordagens biológicas, mecânicas e físicas, são cruciais para reduzir ou substituir o uso excessivo de produtos químicos (CAMARGO et al., 2019).

Fungos como o *Trichoderma* sp. são amplamente utilizados como agentes de controle biológico. O potencial fitotóxico dos bioherbicidas pode estar relacionado à presença de enzimas que causam alterações fisiológicas nas plantas-alvo, pois elas têm a capacidade de atuar em diferentes vias metabólicas, podendo alterar a absorção de nutrientes, a fotossíntese e a permeabilidade da membrana (BORDIN et al., 2020).

### 2 Objetivos

Avaliar as enzimas produzidas pelo fungo *Trichoderma koningiopsis* isolado, e associado a herbicidas comerciais, bem como seu potencial bioherbicida.

### 3 Metodologia

O fungo *Trichoderma koningiopsis* (código de identificação no GenBank MK860714), foi isolado da planta daninha *Digitaria ciliares*, e foi escolhido neste estudo pois exibiu bons resultados anteriores de produção enzimática e no controle de plantas daninhas conforme demonstrado por Bordin et al. (2018) e Camargo et al. (2019). Para analisar o crescimento do fungo e a produção de enzimas, foram realizadas, no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos (LAMIBI), fermentações em estado submerso, em que o meio foi constituído por:

<sup>1</sup> Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim, contato: [larissaromani139@gmail.com](mailto:larissaromani139@gmail.com).

<sup>2</sup> Grupo de Pesquisa: Agroenergia. Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos (LAMIBI).

<sup>3</sup> Doutoranda em Biotecnologia e Biociências, UFSC, campus Florianópolis.

<sup>4</sup> Doutora em Engenharia de Alimentos, UFFS, campus Erechim.

<sup>5</sup> Doutor em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal Fronteira Sul, campus Erechim, **Orientador**.

glicose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), peptona ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ). Os esporos do *T. koningiopsis* ( $6,2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) foram transferidos para os Erlenmeyers e após colocados em agitador orbital a 120 rpm e  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante cinco dias ininterruptos, quando foram feitas as avaliações enzimáticas. Para avaliação do crescimento, os esporos foram cultivados em meio líquido e acondicionados em agitador orbital a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , em triplicata e o crescimento fúngico ocorreu em meio de cultivo na presença e ausência (controle) de herbicidas. A avaliação foi realizada diariamente a partir das 24 horas de incubação.

A escolha dos herbicidas sintéticos foi feita em consonância à grande utilização na agricultura, os quais foram escolhidos três principais: Roundup Original, Roundup WG e Zapp QI 620. Todos possuindo como mecanismo de ação a inibição da enzima Enol Piruvil Shiquimato Fosfato Sintase (EPSPs), e como ingrediente ativo o glifosato. Os herbicidas foram analisados nas concentrações de 50% e 100% da dose recomendada (doses encontradas na bula do produto) e tratamento controle (fungo sem os herbicidas). Após a fermentação, o líquido foi filtrado, resultando na retenção da biomassa, a qual foi então quantificada e expressa em gramas por litro. Foram feitas as seguintes atividades enzimáticas: Peroxidase: Devaiah e Shetty (2009), Khan e Robinson (1994). Lacase: Hou et al. (2004). Amilase: Fuwa (1954), Pongsawadi e Yagisawa (1987). Lipase: Treichel et al. (2016). Celulase: Ghose (1987).

Os dados foram tratados estatisticamente através do uso de análise de variância seguida de teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), sendo adotado o software Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE *T. koningiopsis*

Observou-se que a biomassa fúngica teve um crescimento até os dias 10 e 11, quando atingiu os maiores valores, sendo os mesmos reduzidos após esse período, até os 20 dias (Quadro 1). Os resultados demonstraram a paralisação das atividades de amilase, celulase e lipase ao quinto dia, e por isso, avaliou-se a biomassa neste dia, a qual era de  $3,67 \text{ g L}^{-1}$ . A atividade da peroxidase apresentou maior valor aos 20 dias. As atividades de amilase e celulase iniciaram altas nos primeiros dias, reduzindo até sua ausência a partir dos 14 e 7 dias, respectivamente. A atividade da lipase oscilou durante o período experimental, com maiores valores a cada 5 dias, nos primeiros dez dias do experimento e picos de atividade a cada três dias durante o restante do tempo. Este comportamento não foi o esperado, já que pode ter

ocorrido uma mudança na conformação das enzimas. Geralmente a diminuição na produção enzimática pode estar relacionada à formação de metabólitos inibidores, os quais são produzidos em resposta às condições ambientais durante o crescimento fúngico, inibindo a produção enzimática (LOPEZ-BUCIO et al., 2015).

Quadro 1. Biomassa e atividade das enzimas peroxidase, lacase, amilase, celulase e lipase em *T. koningiopsis* cultivado em meio líquido ao longo de 20 dias. Erechim/RS, 2024.

Dias de Avaliação	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Peroxidase (U mL <sup>-1</sup> )	Lacase (U mL <sup>-1</sup> )	Amilase (U mL <sup>-1</sup> )	Celulase (U mL <sup>-1</sup> )	Lipase (U mL <sup>-1</sup> )
1	1,45 <sup>a</sup>	1,13 <sup>cde</sup>	0,00	2,55 <sup>ab</sup>	0,45 <sup>a</sup>	1,95 <sup>bcd</sup>
2	3,54 <sup>a</sup>	0,70 <sup>ef</sup>	0,00	2,82 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	1,00 <sup>bcd</sup>
3	2,96 <sup>b</sup>	0,63 <sup>ef</sup>	0,00	2,18 <sup>b</sup>	0,36 <sup>b</sup>	0,00
4	2,70 <sup>c</sup>	0,65 <sup>def</sup>	0,00	1,98 <sup>b</sup>	0,34 <sup>b</sup>	0,00
5	3,67 <sup>b</sup>	0,75 <sup>def</sup>	0,00	1,10 <sup>cd</sup>	0,12 <sup>c</sup>	1,75 <sup>bcd</sup>
6	3,70 <sup>c</sup>	0,73 <sup>c</sup>	0,00	0,99 <sup>ef</sup>	0,12 <sup>c</sup>	0,50 <sup>bcd</sup>
7	5,05 <sup>b</sup>	1,53 <sup>cd</sup>	0,00	0,22 <sup>cd</sup>	0,00	0,00
8	5,95 <sup>b</sup>	1,25 <sup>ef</sup>	0,00	1,08 <sup>f</sup>	0,00	1,30 <sup>a</sup>
9	9,11 <sup>b</sup>	0,66 <sup>cde</sup>	0,00	0,01 <sup>de</sup>	0,00	0,00
10	10,63 <sup>a</sup>	1,11 <sup>f</sup>	0,00	0,65 <sup>c</sup>	0,00	1,20 <sup>bc</sup>
11	10,55 <sup>a</sup>	0,28 <sup>cde</sup>	0,00	1,31 <sup>ef</sup>	0,00	5,05 <sup>d</sup>
12	9,95 <sup>b</sup>	1,05 <sup>c</sup>	0,00	0,27 <sup>cde</sup>	0,00	0,70 <sup>bcd</sup>
13	8,68 <sup>b</sup>	1,51 <sup>b</sup>	0,00	0,74 <sup>f</sup>	0,00	1,45 <sup>a</sup>
14	8,03 <sup>c</sup>	2,21 <sup>b</sup>	0,00	0,00	0,00	5,70 <sup>bcd</sup>
15	6,98 <sup>a</sup>	2,68 <sup>b</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00
16	6,59 <sup>c</sup>	2,23 <sup>b</sup>	0,00	0,00	0,00	1,35 <sup>b</sup>
17	4,92 <sup>b</sup>	2,28 <sup>b</sup>	0,00	0,00	0,00	5,25 <sup>bcd</sup>
18	4,73 <sup>c</sup>	2,16 <sup>b</sup>	0,00	0,00	0,00	0,30 <sup>bcd</sup>
19	3,39 <sup>b</sup>	2,43 <sup>b</sup>	0,00	0,00	0,00	7,02 <sup>bc</sup>
20	2,35 <sup>b</sup>	9,51 <sup>a</sup>	0,00	0,00	0,00	7,20 <sup>bc</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE *T. koningiopsis* COMBINADO COM HERBICIDAS

Foi observado que *T. koningiopsis* em meio combinado com herbicidas manteve seu crescimento de uma maneira geral. Houve aumento na biomassa fúngica em comparação com a testemunha, na presença do herbicida Roundup Original (5,09 g L<sup>-1</sup>), conforme Quadro 2. Isso demonstra que o herbicida não afetou o desenvolvimento fúngico (CAMARGO et al., 2019).

Não foi identificada a atividade da enzima lacase em nenhum dos testes realizados. Na maioria das vezes, as lacases fúngicas são difíceis de serem obtidas, pois necessitam de substratos que contenham indutores químicos como compostos fenólicos, aromáticos ou íons

de cobre (RODRÍGUEZ et al., 2019). As enzimas amilase e celulase, apresentaram menor atividade em comparação às outras enzimas. Já a peroxidase houve aumento na presença do herbicida Zapp Qi 620 (7,71 g L<sup>-1</sup>), conforme Quadro 2. Estudos realizados por Bordin et al. (2018) reforçam que, por mais que ocorram picos baixos na produção de algumas enzimas, sob o ponto de vista econômico, a produção do biocomposto fúngico de *Trichoderma koningiopsis* é vantajoso em decorrência dos teores encontrados nas enzimas que potencializam o efeito bioherbicida.

Quadro 2. Biomassa de *Trichoderma koningiopsis* isolado e combinado com os herbicidas, e atividade das enzimas peroxidase, lacase, amilase, celulase e lipase. Erechim/RS, 2024.

Tratamentos	Biomassa (U mL <sup>-1</sup> )		Peroxidase (U mL <sup>-1</sup> )		Lacase (U mL <sup>-1</sup> )	
	50%	100%	50%	100%	50%	100%
<i>T.koningiopsis</i>	1,89±2,9 <sup>a</sup>		14,02±0,01 <sup>a</sup>		0	
Zapp Qi 620	2,48±0,1 <sup>a</sup>	3,05±6,9 <sup>a</sup>	10,38±0,01 <sup>a</sup>	7,72±0,01 <sup>a</sup>	0	0
Roundup Original	1,98±5,4 <sup>a</sup>	5,09±2,8 <sup>a</sup>	5,85±0,06 <sup>a</sup>	3,35±0,02 <sup>a</sup>	0	0
Roundup WG	2,03±1,9 <sup>a</sup>	3,05±2,8 <sup>a</sup>	1,75±0,01 <sup>b</sup>	1,46±0,01 <sup>a</sup>	0	0
	Amilase (U mL <sup>-1</sup> )		Celulase (U mL <sup>-1</sup> )		Lipase (U mL <sup>-1</sup> )	
	50%	100%	50%	100%	50%	100%
<i>T.koningiopsis</i>	1,00±0,01 <sup>a</sup>		0,13±0,0 <sup>a</sup>		0,00±0,11	
Zapp Qi 620	0,37±0,01 <sup>a</sup>	0,93±0,01 <sup>b</sup>	0	0,07±0,01 <sup>c</sup>	1,20±1,36 <sup>a</sup>	0,60±0,20 <sup>a</sup>
Roundup Original	0	0	0,05±0,01 <sup>ab</sup>	0,02±0,01 <sup>bc</sup>	0	0
Roundup WG	0	0	0	0	0	0

a,b,c Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% (p <0,05). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

#### 4.3 TESTE PRELIMINAR PARA AMPLIAÇÃO DE ESCALA

A fim de expandir as perspectivas para a produção de bioherbicidas, avaliou-se em biorreator as atividades enzimáticas e condições operacionais do biorreator Airlift Bio-Tec-Pro-II (Tecnal, Brasil). Primeiramente foi testada uma condição somente com a microalga do gênero *Chlorella* spp, provenientes do tratamento de fitorremediação de efluentes da produção de biogás. A fermentação continuou por 168 h até a constância das enzimas. As maiores produções enzimáticas se concentraram entre 120 e 168 h. Há a intenção de se testar uma próxima condição, na qual será adicionado o *T. koningiopsis*.

#### 5 Conclusão

O fungo filamentosso *Trichoderma koningiopsis* demonstrou potencial de crescimento e



produção de enzimas mesmo na presença de herbicidas, isso é positivo pensando na redução do uso de compostos comerciais. Após os testes preliminares, há a intenção de continuidade do estudo, através da ampliação da escala de produção do biocomposto.

### Referências Bibliográficas

- BORDIN, E. R. et al. Current production of bioherbicides: mechanisms of action and technical and scientific challenges to improve food and environmental security. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1–14, 14 out. 2020.
- CAMARGO, A. F. et al. Resistant weeds were controlled by the combined use of herbicides and bioherbicides. **Environmental Quality Management**, v. 29, p. 37–42, 2019.
- DEVAIAH, S.P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.94, p.119-126, 2009.
- FUWA, H. A. New method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v.41, p.583-603, 1954.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.
- HOU H. et al. Enhancement of laccase production by pleurotus ostreatus and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochem** 39:1415–1419.
- KHAN, A.A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v.49, p.407-410, 1994.
- LOPÉZ-BUCIO, J. et al. Trichoderma as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, v.196, p.109-123, 2015.
- PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomalto-dextrin gluco-transferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v.65, p.463-467, 1987.
- RODRÍGUEZ, R. D. et al. Enhancing laccase production by white-rot fungus *Funalia floccosa* LPSC 232 in co-culture with *Penicillium commune* GHAIE86. **Folia Microbiologica**, v. 64, p. 91–99, 2019.
- TREICHEL, H. et al. Lipase production from a newly isolated *Aspergillus niger* by solid state fermentation. **Current Biotechnology**, v.5, p.1-7, 2016.

**Palavras-chave:** Bioherbicida; plantas daninhas; enzimas; biorreator; agroecologia.

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES- 2023-0270

**Financiamento:** CNPQ