

BIOHERBICIDA FÚNGICO PRODUZIDO A PARTIR DE BIOMASSA MICROALGAL

JÚLIA PIEPER NERLING^{1,2*}, ALINE FRUMI CAMARGO³, HELEN TREICHEL⁴,
ALTEMIR JOSE MOSSI^{2,5}

1. Introdução

O desenvolvimento contínuo de novos métodos de controle de plantas daninhas é essencial para a produtividade agrícola. Os fungos ocupam um lugar importante para a produção de bioherbicidas, pois apresentam vantagens em relação aos compostos sintéticos. As enzimas fúngicas secretadas são responsáveis por degradar a parede celular das plantas a fim de facilitar o acesso dos fungos. (BORDIN et al., 2020).

Os fungos ocupam um lugar importante para a produção de bioherbicidas, pois apresentam vantagens em relação aos compostos sintéticos. As enzimas fúngicas secretadas são responsáveis por degradar a parede celular das plantas a fim de facilitar o acesso dos fungos. (BORDIN et al., 2020).

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 (RADHAKRISHNAN, et al., 2018; MEHDIZADEH, et al., 2020; VERMA et al., 2020).

As microalgas podem oferecer um substrato rico em carboidratos e proteínas, o que possibilitaria sua utilização como matéria-prima. Esta seria também uma alternativa a um meio de fermentação mais barato, agregando valor ao produto final. (MICHELON et al., 2016; COSTA et al., 2019) Nesse sentido, a bioprospecção de cepas microbianas é fundamental para a descoberta de novas espécies. Em processos fermentativos, essa biomassa têm potencial para atuar como substratos, visando o desenvolvimento de enzimas com menor custo. (COSTA et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2020).

¹Discente de Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS, *campus Erechim*, contato: julaianerling@gmail.com

²Grupo de Pesquisa: Agroenergia

³Doutoranda em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina

⁴Doutora em Engenharia de Alimentos, UFFS, *campus Erechim*,

⁵Doutor em Ecologia, UFFS, *campus Erechim*, **Orientador**.

2. Objetivos

Esta pesquisa teve por objetivo principal investigar a formulação de um bioherbicida por meio de processos fermentativos utilizando isolados fúngicos e biomassa de microalgas cultivadas em digestato da produção de biogás como substrato. Para isso, de forma secundária buscou-se avaliar o aumento de escala de produção de diferentes fungos com potencial bioherbicida em processo de fermentação em biorreator submerso tipo *airlift*, usando microalgas como substrato, e quantificar enzimas envolvidas na atividade bioherbicida (amilase, celulase, lacase, lipase, peroxidase e protease) nos extratos obtidos por fermentação.

3. Metodologia

A biomassa microalgal foi obtida em cooperação com os pesquisadores da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), e é resultante do processo de tratamento que visa a remoção de amônia e fósforo da porção residual sólida (digestato) da produção de biogás, proveniente de dejetos da suinocultura e realizada por meio de um reator biológico com manta de lodo de fluxo ascendente. A linhagem de microalga que será utilizada como substrato para as fermentações corresponde a espécie *Chlorella* spp. (MICHELON et al., 2016).

Para a produção dos bioherbicidas foram testados três isolados fúngicos, sendo que estes foram definidos com base nos resultados de pesquisas. O primeiro deles, da espécie *Trichoderma koningiopsis* foi isolado da planta daninha *Digitaria ciliares* e apresentou resultados promissores de produção enzimática e no controle de plantas daninhas em outros estudos (BORDIN et al., 2018; CAMARGO et al., 2019b; REICHERT JÚNIOR et al., 2019).

Os testes de ampliação de escala para a obtenção de biocompostos com potencial bioherbicida, tem como base condições de fermentação previamente estudadas em pequena escala por Bordin et al. (2018).

Para fins de avaliação do bioherbicida gerado, a amostra do extrato fermentado é coletada com 72 horas para determinar a atividade enzimática. Para avaliar o substrato, é desenvolvida a contagem de esporos (os quais somaram $1,44 \times 10^7$ esporos) e a medição de presença de enzimas de interesse ambiental e que atuem de forma sinérgica na ação bioherbicida, foi implementado procedimentos para quantificar as enzimas: amilase (FUWA, et al., 1987; MILLER, 1959), celulase (GHOSE, 1987; MULLER, 1959), lacase (HOU et al., 2004), lipase (TREICHEL et al., 2015), protease (KHAN et al., 1994; DEVAIAH et al., 2009) e peroxidase (BORDIN et al., 2018; CAMARGO et al., 2019; REICHERT JÚNIOR et al.,

2019).

4. Resultados e Discussão

Em uma primeira análise, a fermentação foi desenvolvida através de agitação mecânica, em agitador orbital, a qual teve os parâmetros controlados para o melhor desenvolvimento do processo, contribuindo para o estudo das condições ideais quando aplicado no biorreator *Airlift*. Nesta etapa já ficou determinado que apenas o microrganismo *T. Koningiopsis* apresenta potencial para o processo em estudo, logo o mesmo foi continuado apenas com esta cepa microbiana.

Na fermentação por agitação mecânica, as atividades enzimáticas se apresentaram conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Atividades enzimática da fermentação

Amostras analisadas com 72 horas de fermentação		ABS			MÉDIA	ART (g/L)	BRANCO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/G)
		1	2	3					
AMILASE		0,0560	0,0240	0,0290		0,9431		1,0469	15,9310
CELULASE		0,0030	0,0020	0,0040		0,0786		0,0218	0,3319
LACASE		0,0530	0,0450	0,0440	0,0473			0,0053	0,0800
LIPASE		21,0900	21,6000	21,8800	21,5230		19,9000	2,4350	37,0540
PEROXIDASE		0,1470	0,1450	0,1430	0,1450			7,2500	110,3260
PROTEASE		0,1920	0,1960	0,1900	0,1927			4,8170	73,2970

Posterior aos procedimentos de fermentação em pequena escala, iniciou-se o estudo para a produção em Biorreator *Airlift*. Dessa forma, foi efetuada uma fermentação teste apenas com a biomassa algal. Para tanto, foram medidas as atividades de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, conforme apresentado na Tabela 2. Observa-se potencial na produção de algumas enzimas, corroborando com estudos anteriores realizados pelo grupo, e ainda, mostrando que os testes de aplicação (em andamento), devem resultar em atividade bioherbicida do composto produzido (BORDIN et al., 2018; CAMARGO et al., 2019; REICHERT JÚNIOR et al., 2019).

Sabe-se que o fato de ampliar o volume útil em escala de biorreator será capaz de produzir alteração na maioria das quantificações enzimáticas evidenciando que se deve atentar para outras variáveis que estão presentes e influenciam o processo de fermentação. Apesar do microrganismo *T. koningiopsis* ter demonstrado, em estudos anteriores, características promissoras durante o processo de ampliação de escala supõe-se também que o mesmo produzirá metabólitos inibidores que influenciarão na redução de algumas enzimas e na

produção de biomassa (STEFANSKI et al.,2020).

Tabela 2 – Atividades enzimática da fermentação no biorreator airlift

Tempo	Fermentação Biorreator Airlift												Lipase				Peroxidase				
	Amilase				Celulase				Lacase				Amostra (mL)			Branco (mL)	Ativ (U/mL)	ABS			Ativ (U/mL)
	1	2	3	ART (g/L)	1	2	3	ART (g/L)	1	2	3	Ativ (U/mL)	1	2	3			1	2	3	
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	19,700	18,500	18,900	21,100	0,0000	0,054	0,059	0,057	2,8333
24	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	15,500	15,700	15,550	18,900	0,0000	0,056	0,058	0,059	2,8833
48	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	19,000	18,900	18,700	18,800	0,0000	0,103	0,104	0,106	5,2167
72	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	18,000	18,300	18,000	18,800	0,0000	0,087	0,083	0,087	4,2833
96	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0330	0,0340	0,0390	0,6354	0,1176	0,0000	0,0000	0,0000	15,500	15,700	15,550	15,900	0,0000	0,054	0,059	0,057	2,8333
120	0,0450	0,0360	0,0400	0,7253	0,8052	0,0120	0,0000	0,0100	0,1319	0,0244	0,0000	0,0000	25,600	25,900	26,000	24,000	2,0052	0,056	0,058	0,059	2,8833
144	0,0390	0,0310	0,0300	0,5994	0,6654	0,0100	0,0100	0,0100	0,1798	0,0333	0,0000	0,0000	27,130	26,900	26,960	25,500	1,6370	0,222	0,200	0,219	10,6833
168	0,1790	0,1780	0,1787	3,2112	3,5648	0,1220	0,1200	0,0900	1,9901	0,3682	0,0000	0,0000	27,800	27,400	27,600	25,400	2,4063	0,201	0,197	0,190	9,8000

O fato de ampliar a escala também modifica a forma com que o meio é agitado. Em pequena escala o processo foi realizado em Erlenmeyers e a agitação foi essencialmente mecânica. No caso de biorreator do tipo *Airlift*, o sistema de mistura foi promovido com o uso de vazão de ar, que por consequência facilita a dispersão completa dos componentes no meio de cultivo (STEFANSKI et al.,2020).

5. Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que o uso do biorreator tipo *Airlift* apresenta potencial para aumento de escala na produção de Bioherbicidas.

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.
- BORDIN, E. R. et al. Non-Toxic Bioherbicides Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Can Be Applied to the Control of Weeds in Agriculture Crops. *Industrial Biotechnology*, v. 14, n. 3, p. 157–163, 2018.
- CAMARGO, A. F. et al. Resistant weeds were controlled by the combined use of herbicides and bioherbicides. *Environmental Quality Management*, v. 29, n. 1, p. 37–42, 2019b.
- COSTA, J. A. V. et al. Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 54, n. 5, p. 366–375, 2019.
- DE OLIVEIRA, C. T. et al. Production of cutinase by solid-state fermentation and its use as

adjuvant in bioherbicide formulation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 42, n. 5, p. 829–838, 2020.

FUWA, H. A New Method For Microdetermination modified method of thatdescribed by Mc Cready. *The Journal of Biochemistry*, v. 41, n. 5, p. 583–603, 1954.

GHOSE, T. K. Measurements 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 Biochemistry*, v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 2004.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. *Food Chemistry*, v. 49, p. 407–410, 1994.

MICHELON, W. et al. Effects of Nitrogen and Phosphorus on Biochemical Composition of Microalgae Polyculture Harvested from Phycoremediation of Piggery Wastewater Digestate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 178, n. 7, p. 1407–1419, 2016.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and Identification of a Cyclomaltodextrin Glucanotransferase-Producing Bacteria. *Journal of Fermentation Technology*, v. 65, n. 4, p. 463–467, 1987.

RADHAKRISHNAN, R., et al.. Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 158, p. 131–138, 2018.

REICHERT JÚNIOR, F. W. et al. New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential. *Heliyon*, v. 5, n. 5, p. 0–6, 2019.

STEFANSKI, F. S. et al. Potential Use of Biological Herbicides in a Circular Economy Context: A Sustainable Approach. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 4, p.1-14, 2020.

TREICHEL, H. et al. Lipase Production from a Newly Isolated *Aspergillus niger* by Solid State Fermentation Using Canola Cake as Substrate. *Current Biotechnology*, v. 6, n. 4, 2015.

VERMA, D. et al. Microbial Control of Pests and Weeds. In: *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. Elsevier Inc., 2020. p. 119–126

Palavras-chave: Controle biológico. Processos biotecnológicos. Segurança alimentar.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2022-0132

Financiamento CNPq