

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

APLICAÇÃO DE *Beauveria bassiana* CULTIVADA EM EXÚVIA DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* EM COMPARAÇÃO COM O CULTIVO EM ARROZ PARA APLICAÇÃO NO FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

A. B. Q. AGUIAR¹, M. P. BAGAGLI².

¹ Graduando em Engenharia de Biossistemas, IFSP, Campus Avaré, annabeatrizqueirozaguiar@gmail.com.

² Docente do curso de Engenharia de Biossistemas, IFSP, Campus Avaré, marcela.bagagli@ifsp.edu.br.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 5.01.02.04-4 Microbiologia agrícola

RESUMO: Este estudo teve como objetivo a comparação do cultivo de *Beauveria bassiana* em material quitinoso de *T. molitor* e arroz, para obtenção de bioinsumo contendo atividade quitinolítica, proteolítica e contagem satisfatória de propágulos de *B. bassiana*, além de avaliar o efeito no desenvolvimento inicial de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Os extratos das fermentações em estado sólido foram avaliados quanto à contagem de propágulos, atividades enzimáticas e aplicados no tratamento das sementes de feijão, que foram plantadas em bandejas e cultivadas em casa de vegetação por 15 dias. O estudo revelou que o fungo se desenvolveu melhor no substrato quitinoso ($3,1 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ de substrato seco) que no arroz ($7,4 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ de substrato seco) e apresentou atividade proteolítica e quitinolítica 6 e 4 vezes, respectivamente, superiores ao extrato obtido da fermentação em arroz, sendo capaz de elevar o comprimento aéreo das plantas após 15 dias de cultivo em 1,4 vezes em relação ao controle.

PALAVRAS-CHAVE: FES; Quitina; Bioinsumos; Quitinase; Protease.

APPLICATION OF *Beauveria bassiana* CULTIVATED ON *tenebrio molitor* LARVAL EXUVIA IN COMPARISON TO CULTIVATION ON RICE FOR USE IN BEANS (*phaseolus vulgaris* L.)

ABSTRACT: This study aimed to compare the cultivation of *Beauveria bassiana* on chitinous material from *Tenebrio molitor* and rice to produce a biofertilizer with chitinolytic and proteolytic activity, along with a satisfactory count of *B. bassiana* propagules. The solid-state fermentation extracts were evaluated for propagule counts, enzymatic activities, and applied to the treatment of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds, which were planted in trays and cultivated in a greenhouse for 15 days. The study revealed that the fungus developed better on the chitinous substrate, achieving a count of 3.1×10^9 CFU.g⁻¹ of dry substrate compared to 7.4×10^8 CFU.g⁻¹ on rice. Additionally, the chitinous substrate exhibited proteolytic and chitinolytic activities that were 6 and 4 times higher, respectively, than those obtained from the rice fermentation extract. This increased enzymatic activity resulted in a 1.4-fold increase in shoot length after 15 days of cultivation compared to the control.

KEYWORDS: SSF; Chitin; Bioinputs; Chitinase; Pretease.

INTRODUÇÃO

A criação massal de insetos para alimentação gera subprodutos que podem ser aplicados na obtenção de bioinsumos para a agricultura (Castro *et al.*, 2018; Heyes, 2018; Fialho *et al.*, 2021; Poveda, 2021). Entre os insetos criados de forma massal, estão as larvas de *Tenebrio molitor*, que foram as primeiras com regulamentação para o consumo humano na União Europeia (EFSA NDA Panel, 2021). Durante o desenvolvimento das larvas, há a liberação de exúvias, composta majoritariamente por proteínas, quitina e minerais, como resíduos (Finke, 2007; Kim *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2021). A quitina e seus derivados podem ser aplicados na agricultura, estimulando o desenvolvimento de plantas e

aumentando o rendimento das culturas (Chakraborty *et al.*, 2020; Poveda, 2021). Além disso, são componentes da parede celular de fungos, atuando como estrutura de proteção e estrutura (Azevedo *et al.*, 2007; Poveda, 2021).

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico e endofítico amplamente utilizado no controle biológico de insetos-praga e/ou no desenvolvimento de plantas, sendo um produtor de quitinases e proteases por fermentação em estado sólido (Suresh; Chandrasekaran, 1999; Liu; Yang; Wang, 2022; Sala *et al.*, 2022). Atualmente, a produção deste fungo utiliza principalmente arroz cozido ou outros cereais como substrato. No entanto, como o arroz é um cereal amplamente utilizado na alimentação humana, surge o interesse em encontrar outros meios de cultivo para a fermentação em estado sólido (FES) a base de resíduos ou subprodutos (Mattedi *et al.*, 2023), sendo os resíduos da criação de insetos uma alternativa (Maciel, 2023).

Considerando a importância do fungo *B. bassiana* na agricultura e a necessidade de aproveitamento de resíduos como substratos alternativos em FES, este trabalho visou utilizar o material quitinoso proveniente de exúvias de larvas de *Tenebrio molitor* como substrato para a fermentação em estado sólido de *Beauveria bassiana*, a fim de se obter bioinsumo com atividade de quitinases e proteases bem como quantidade significativa do microrganismo. Ainda, foi avaliado o efeito dos bioinsumos obtidos na fase germinação de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) comum e no seu desenvolvimento inicial.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do material sólido

O material quitinoso proveniente do cultivo de larvas de *T. molitor* foi doado pela empresa AGRIN - Criação e Comércio de Insetos. Esse material foi seco em estufa de circulação forçada de ar, a 70 °C até peso constante. Em seguida, o material foi triturado em moinho multiuso e passado por peneira com abertura de 600 µm, sendo armazenado em embalagens plásticas a -18 °C até o momento de uso.

A capacidade de retenção de água do material quitinoso foi avaliada pesando 1g do material em Tubo falcon de 15 ml de fundo cônico com pequenos furos, sendo estes acoplados à uma proveta de 10 mL. Em seguida foram adicionados 7,5 mL de água destilada ao material e foi coletado o líquido nas provetas por 24 h (adaptado de Müller, 1964). Após o período, foi quantificada a capacidade de retenção de água pelo material (CR). O ensaio foi realizado em triplicata.

Preparo dos inóculos para as fermentações

A linhagem de *Beauveria bassiana* (Bb) foi isolada do produto comercializado pela empresa de bioinsumos AGRINOR fertilizantes e mantido no laboratório de microbiologia do Instituto Federal de São Paulo, Campus Avaré, em *slants* de ágar batata dextrose (PDA) recobertos por vaselina líquida sob refrigeração (5°C) até o momento de uso.

Para a produção dos inóculo de Bb, placas de Petri contendo ágar batata dextrose (PDA) foram recobertas com o microrganismo, utilizando técnica de recobrimento para obtenção de crescimento confluyente, utilizando *swab* estéril para o estriamento. As placas foram incubadas a 28 °C por 96 h.

Cultivo dos microrganismos nos materiais por fermentação em estado sólido.

O material quitinoso foi umedecido com água destilada na quantidade indicada pela CR, homogeneizado e transferido para frascos Erlenmeyer de 250mL (18 g cada).

Para o cultivo em arroz foram utilizados a proporção 1:1, colocando em frascos Erlenmeyer de 250mL 30g de arroz tipo 1, umedecido com 30 mL de água destilada.

Ambos os substratos foram feitos em triplicata, autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento, foram inoculados com 3 cilindros de ágar, de 0,6 cm de diâmetro, com a superfície completamente recoberta pelo microrganismo de interesse, e incubados por 240 h para o material quitinoso e por 168 h para o arroz, a 28 °C.

Extração de enzimas extracelulares e microrganismos

Após o período de incubação, foram adicionados 50 mL de água destilada a os meios de cultivo, seguidos de homogeneização com bastão de vidro e agitação a 200 rpm por 40 minutos a 28°C. Em seguida, os extratos foram filtrados utilizando funil e gaze estéril para remover os sólidos. Os filtrados

resultantes foram denominados de extrato fermentado bruto de quitina (EFB Q), extrato fermentado bruto de Arroz (EFB A), ambos foram armazenados a -18°C até a análise.

Os extratos foram avaliados quanto à produção de proteases, quitinases, contagem indireta de propágulo de *B. bassiana* e aplicados no ensaio de germinação de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

Quantificação de bolores nos EFB

Foi realizado a diluição decimal seriada da amostra em tubos com solução salina (0,85% m:v) estéril com 0,05% (m:v) de polisorbato 80. Foram semeados 100 µL da diluição desejada em 2 placas de Petri contendo ágar PDA. Após espalhamento com alça de Drigalsky, as placas foram incubadas em estufa a 28°C por 96 h e, então, foram contadas as unidades formadoras de colônias. O cálculo da quantidade de unidades formadoras de colônia por mL de amostra foi calculado pela equação 1.

$$E_{\text{sporos}} \left(\frac{UFC}{mL} \right) = \frac{\text{número médio de colônias nas placas} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume de amostra semeado (mL)}} \quad (\text{eq1})$$

Quantificação da atividade proteolítica nos EFB

A atividade de proteases foi medida utilizando azocaseína como substrato para a reação enzimática, conforme o método de Charney e Tomarelli (1947), com algumas modificações. A mistura composta por 0,5 mL de azocaseína a 0,5% (m:v), pH 7,0, e 0,5 mL da solução enzimática previamente diluída. Esta mistura foi incubada por 40 minutos a 50°C. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de TCA a 10% (m:v), e a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 20°C. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi então neutralizada com 1,0 mL de KOH a 5 M. A atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância a 428 nm em 0,01 nas condições experimentais.

Quantificação da atividade quitinolítica nos EFB.

A quantificação de quitinases foi realizada de acordo com Schmaltz (2020). A reação enzimática foi conduzida em tubos plásticos de 5 mL contendo 500 µL de solução 1% de quitina de crustáceo coloidal em tampão acetato 50 mM em pH 7,0 e 500 µL de solução enzimática (previamente diluída), sendo incubados a 40°C por 1 hora, e após a reação paralisada em banho de gelo. Na sequência, foi realizada a quantificação dos açúcares redutores pelo método de DNS (Miller, 1959), utilizando N-acetilglucosamina como padrão. Um controle foi preparado paralisando a reação com o DNS logo no início da reação enzimática. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de N-acetilglucosamina por mL por minuto de reação.

Análise do efeito dos EFB no tratamento das sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

Os EFB foram utilizados para o tratamento das sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), compradas em comércio local. As sementes foram colocadas em sacos plásticos com capacidade para 1 kg e foram adicionados 2,0 mL de EFB para cada 300g de sementes. Os sacos foram fechados e agitados por 2 minutos para garantir a homogeneização. Em seguida, as sementes foram colocadas em bandejas plásticas e secas em temperatura ambiente por 2 horas. Água destilada estéril foi utilizada como controle.

As sementes tratadas foram cultivadas em bandejas para mudas, com substratos úmido, sendo plantadas 25 sementes a 3 cm de profundidade para cada ensaio, realizados em duplicata. As bandejas foram colocadas na estufa e irrigadas três vezes ao dia durante 15 dias. Durante esse período, foi quantificado o índice de germinação (plântulas com pelo menos 2 mm acima do substrato). Ao final do experimento, foram medidos o comprimento da parte aérea e das raízes, além do volume das raízes, utilizando o método de deslocamento de coluna d'água.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA de um fator, com auxílio do software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) versão 4.1.0, sendo realizadas comparação de médias pelo teste Tukey com 95% de confiança. No caso da germinação, os dados foram analisados pelo teste Chi-quadrado com 95% de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capacidade de retenção de água do material quitinoso

A capacidade de retenção de água pelo material quitinoso foi, em média, de $2,9 \pm 1,2 \text{ mL.g}^{-1}$. Desta forma, para cada 1 g de material quitinoso, foram adicionados 2,9 mL de água.

Avaliação das fermentações e atividades enzimáticas

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para a contagem de esporos de *B. bassiana* bem como as atividades proteolítica e quitinolítica do EFB A e EFB Q.

TABELA 1. Atividade proteolítica e quitinolítica dos EFB A e EFB Q de *Beauveria bassiana*. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras pelo teste Tukey com 95% de confiança, sendo a análise realizada para cada resposta.

Ensaio	Contagem de <i>B. bassiana</i> (UFC.g ⁻¹ de substrato seco)	Atividade Proteolítica (U.g ⁻¹ de substrato seco)	Atividade Quitinolítica (U.Kg ⁻¹ de substrato seco)
EFB A	$7,4 \times 10^8$ ^b	$5,7 \pm 0,6$ ^b	$4,15 \pm 0,21$ ^b
EFB Q	$3,1 \times 10^9$ ^a	$34,8 \pm 2,8$ ^a	$11,6 \pm 0,9$ ^a

A contagem de propágulos de *B. bassiana* por grama de material quitinoso de *T. molitor* foi 42 vezes superior à encontrada por grama de arroz, nas condições experimentais, com 95% de confiança. Os valores obtidos foram razoáveis, atingindo contagens próximas à de especificações de referência para bioinsumos para agricultura orgânica (Brasil, 2019).

As duas atividades enzimáticas avaliadas foram significativamente superior para o EFB Q, com 95% de confiança, sugerindo que a produção de enzimas extracelulares sofreu indução do material quitinoso composto majoritariamente de proteínas e quitina (Smith; Grula, 1983; Fleuri; Sato, 2008; Baldoni *et al.*, 2020).

Avaliação dos EFB no tratamento das sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

O índice de germinação bem como o volume da raiz e comprimentos da raiz e parte aérea, médios, medidos após 15 dias de cultivo das sementes tratadas com água (controle), com o EFB A e EFB Q, estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Índice de germinação (%), volume da raiz (mL), comprimento da raiz (cm) e comprimento da parte aérea (cm) de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) tratadas com água (controle), com o EFB A e EFB B. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras pelo teste Chi-quadrado para índice de germinação e Tukey para as demais, com 95% de confiança. As análises foram realizadas por variável resposta.

Ensaio	Índice de germinação (%)	Volume da raiz (mL)	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento parte aérea (cm)
EFB A	$50 \pm 8,5$ ^a	$1,72 \pm 0,01$ ^b	$14,51 \pm 0,34$ ^a	$7,68 \pm 0,45$ ^{a,b}
EFB Q	$70 \pm 8,5$ ^a	$2,07 \pm 0,05$ ^a	$14,58 \pm 0,11$ ^a	$9,48 \pm 0,81$ ^a
Controle	$68 \pm 5,7$ ^a	$1,69 \pm 0,12$ ^{a,b}	$14,31 \pm 2,74$ ^a	$8,51 \pm 0,12$ ^b

O índice de germinação das sementes não apresentaram diferenças significativas pelo teste Chi-quadrado com 95% de confiança. O comprimento das raízes também não diferiram significativamente, no entanto, observa-se que a amostra controle apresentou maior variação que as demais. Em relação ao volume das raízes, as plantas que tiveram as sementes tratadas com EFB Q apresentaram volume significativamente superior às tratadas com o EFB A, no entanto não diferiram do controle com 95% de confiança. Novamente, nota-se que a variação dos volumes no controle foi superior às demais. Por fim, as partes aéreas nas plantas de sementes tratadas com EFB A e EFB Q não diferiram, no entanto, as tratadas com EFB Q foram significativamente maiores que as controle, com 95% de confiança.

Canassa *et al.* (2019) avaliaram o desenvolvimento de plantas de feijão após 7, 14 e 21 dias de plantio em comparação com um controle (sementes não inoculadas), sendo observado que o fungo entomopatogênico e endofítico foi capaz de aprimorar a altura das plantas, diferindo significativamente do controle.

CONCLUSÕES

O fungo entomopatogênico e endofítico *B. bassiana* foi capaz de se desenvolver em material quitinoso proveniente de exúvias de *T. molitor*, atingindo quantidade significativa de propágulos por grama de substrato seco. Além disso, o extrato retirado do material fermentado apresentou atividade proteolítica e quitinolítica superiores que o evidenciado para o extrato do cultivo do fungo em arroz, um substrato tradicional para sua propagação, sugerindo que o substrato mais complexo composto majoritariamente por quitina e proteína pode estimular a produção de exoenzimas nas condições avaliadas.

O extrato fermentado de quitina por *B. bassiana*, quando aplicado no tratamento de sementes de feijão, elevaram a altura das plantas quando comparado ao controle, não diferindo do extrato fermentado de arroz. Uma grande variação nos resultados do controle foram observadas, para todas as medidas de crescimento das plantas. Não foi observado efeito dos EFB na germinação das sementes, nas condições experimentais.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

A.B.Q.A. procedeu com a metodologia e experimentos. Todos os autores contribuíram com a redação e revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFSP pela estrutura e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, V. V. C; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA-FOOK, M.V.L.; COSTA, A.C.F.M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de e Processos**, v.2, n.3, p.27-34, 2007

BALDONI, D.B., ANTONIOLLI, Z.I., MAZUTTI, M.A. *et al.* Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1897–1908, 2020.

Brasil. Instrução Normativa SDA nº 36, de 13 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a especificação de referência para produtos fitossanitários com uso aprovado na agricultura orgânica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 de dezembro de 2019.

CANASSA, F.; TALL, S.; MORAL, R.A.; DE LARA, I.A.R.; DELALIBERA, I.; MEYLING, N.V. Effects of bean seed treatment by the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* on plant growth, spider mite populations and behavior of predatory mites. **Biological Control**, v.132, p. 199-208, 2019.

CASTRO, R. J. S. de; OHARA, A.; AGUILAR, J. G. S.; DOMINGUES, M. A. F. Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for consumption and future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76 p. 82-89, 2018.

CHAKRABORTY, M.; HASANUZZAMAN, M.; RAHMAN, M.; KHAN, A.R.; BHOWMIK, P.; MAHMUD, N.U.; TANVEER, M.; ISLAM, T. Mechanism of promotion and disease suppression by chitosan biopolymer. **Agriculture**, v. 10, n.624, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/ag>

CHARNEY J.; TOMARELLI R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological Chemistry**, v. 1 505, 1947.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens). Scientific Opinion on the safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **EFSA Journal**, v. 19 n. 1 p. 6343- 6372, 2021.

FIALHO, A.T.S.; SILVA, A.S.; BRITO, C.O.; VALE, P.A.C.B.; OLIVEIRA, C.J.P.; RIBEIRO JUNIOR, V. Nutricional composition of larvae of mealworm (*Tenebrio* and crickets (*Gryllus assimilis*) with potential usage in feed. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.73, n.2, p.539-542, 2021.

FINKE, M. D. Estimate of chitin in raw whole insects. **Zoo Biol.**, v. 26, n.2, p. 105-15. 2017.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 28, n.2; p. 299-310, 2008.

HEYES, M. Food proteins and bioactive peptides: New and Novel sources, characterisation strategies and applications. **Foods**, v. 7 n. 38, 2018.

KIM, S.G.; KIM, J.E.; OH H.K.; KANG, S.J.; KOO, H.Y.; KIM, H.J.; CHOI, H.C.; SUN, S.S. Feed supplementation of yellow mealworms (*Tenebrio molitor* L.) imp characteristics and meat quality in broiler. **J. Agric. Sci. Technol.**, v.49, n. 9, p. 18, 2014. Doi: <https://doi.org/10.29335/tals.2014.49.9>.

LIN Y-S, LIANG S-H, LAI W-L, LEE J-X, WANG Y-P, LIU Y-T, WANG S-H, LEE M-H. Sustainable Extraction of Chitin from Spent Pupal Shell of Black Soldier Fly. 9(6):976, 2021. <https://doi.org/10.3390/pr9060976>

LIU, Y.; YANG, Y.; WANG; B. Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter. **Scientific reports**, v.12, p.5706, 2022.

MACIEL, Gleidson Luquezi. **Fermentação de material quitinoso residual da criação de larvas de BSF (*Hermetia illucens*) para obtenção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Biosistemas) – Instituto Federal de São Paulo, Avaré, São Paulo, 2023.

MATTEDI, Alessandro; *et al.*; **Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production**. *Microorganisms*, v.11, 1408, 2023.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

POVEDA, J. Insect frass in the development of sustainable agriculture. A review. **Agronomy for sustainable development**, v.41, n.5, <https://doi.org/10.1007/s13593-020-00656-x>.

SALA, A.; ECHEGARAY, T.; PALOMAS, G.; BOGGIONE, M.J.; TUBIO, G.; BARRENA, R. Insights on fungal solid-state fermentation for waste valorization: C chitinase production in different reactor configurations. **Sustainable chemistry and pharmacy**, 26, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100624>

SCHMALTZ, S. **Produção de enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana* em fermentação submersa assistida por ultrassom**. Dissertação de (Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2020.

SMITH, J.R.; GRULA, E.A. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. **Journal of invertebrate pathology**, v.42; n.3, p. 319-326, 1983.

SURESH, P.V.; CHANDRASEKARAN, M. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. **Process biochemistry**, 34:257-267, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(98\)00092-2](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(98)00092-2).