

AVALIAÇÃO DE SOLOS E SEMENTES EXPOSTOS A NANOPARTICULAS DE FERRO BIOGÊNICA SINTETIZADAS A PARTIR DE *Trichoderma harzianum*

Mariane A. Nunes^{1*}, Mariana Guilger², Ricardo N. Castro², Natalia B. Jose², Tais G. da Costa², Leonardo F. Fraceto³, Renata de Lima⁴.

1. Estudante de graduação da Universidade de Sorocaba (UNISO)
2. Estudantes de pós-graduação (a) da Universidade de Sorocaba (UNISO)
3. Professor da UNESP campus Sorocaba – Departamento de Química
4. Professora da Universidade de Sorocaba (UNISO) – Departamento de Biotecnologia/Orientadora

Resumo

A utilização de nanopartículas (NP) biogênicas para utilização agrícola é uma realidade, sendo estas utilizadas principalmente para fertilização do solo e combate a patógenos agrícolas. O objetivo deste estudo foi sintetizar NP biogênicas de ferro (Fe-NP) baseadas em *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum*), avaliar sua toxicidade e sua atividade contra patógenos agrícolas. As Fe-NP foram sintetizadas utilizando filtrado do fungo e os sais FeSO₄ (FeS-NP) e FeCl₃ (FeCl-NP). Foram realizadas a caracterização físico-química, avaliação da atividade sobre o mofo branco e toxicidade. Os resultados mostraram que as FeS-NP inibiram o crescimento do mofo branco e apresentaram menor toxicidade do que as FeCl-NP, ambas Fe-NP não apresentaram efeitos na germinação das sementes nem grandes alterações em relação a microbiota do solo. Estes resultados iniciais são promissores em relação a utilização das nanopartículas biogênicas de ferro na área agrícola.

Palavras-chave: Síntese verde; Nanotecnologia; qPCR.

Apoio financeiro: Pibic, CNPq, UNISO.

Trabalho selecionado para a JNIC: UNISO

Introdução

Os fungos possuem componentes biológicos envolvidos em processos metabólicos, são fáceis de serem obtidos em larga escala e são economicamente viáveis, além de apresentarem grande produção de proteínas (enzimas) com potencialidade de redução de sais metálicos, o que facilita a formação de nanopartículas metálicas, devido a isto são muitas vezes utilizados para a síntese de nanopartículas metálicas (SILVA et al., 2016).

A utilização destas nanopartículas biogênicas baseadas em fungos na área agrícola despontam nos últimos anos como uma possibilidade viável no combate a pragas agrícolas, porém ainda são necessários maiores estudos em relação a toxicidade, principalmente em relação ao solo e as bactérias do ciclo do nitrogênio e os impactos sobre seu metabolismo (YANG et al., 2013; GUILGER et al., 2017). Logo se faz necessário a realização de análises para a detecção de possíveis alterações desses microrganismos decorrentes da exposição as nanopartículas, prevendo consequentes alterações em suas funções (THUL, SARANGI e PANDEY, 2013). Um dos métodos utilizados com esse objetivo é a quantificação molecular, na qual o DNA de microrganismos do solo é quantificado utilizando-se genes específicos através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) que permite a quantificação de fragmentos específicos de DNA e RNA.

Dentre os diversos tipos de fungos as espécies do gênero *Trichoderma*, foram descritas como sendo fungos antagonistas (BUENO-PALLERO et al., 2016; MORANDI et al., 2009), o que possibilita atividade contra um amplo espectro de fitopatógenos, e capacidade de controlar um grande número de doenças de plantas (ZHANG et al., 1999; LOBO JR; GERALDINE; CARVALHO, 2009), sendo um fungo cotado para a síntese de nanopartículas visando atividade agrícola.

O objetivo do presente estudo foi sintetizar nanopartículas biogênicas de ferro, utilizando como agente redutor e estabilizante o fungo *Trichoderma harzianum*, realizar a caracterização físico-química, avaliar sua exposição a microbiota do solo com relação ao ciclo de nitrogênio, avaliar a germinação de semente de soja e tomate mediante exposição às nanopartículas, assim como avaliação da sua toxicidade e seu poder inibitório de patógenos agrícolas.

Metodologia

Inicialmente foi realizada a cultura de *T. harzianum* a 200mg/mL (Ecotrichem 1×10^{10} UFC/g) em ágar Batata-Dextrose, após crescimento discos de micélio foram transferidos para o meio caldo por 12 dias (ÁVILA et al., 2005). A biomassa resultante foi filtrada e transferida para a água e mantidas por 72h, a seguir o material foi novamente filtrado e o líquido utilizado para a síntese das NPs, onde foram adicionados FeCl₂ (0,2M) e FeCl₃ (0,1M), para síntese de FeCl-NP e FeSO₄ (0,1M), para a síntese de FeS-NP (DURAN et al., 2007).

Para as análises de tamanho e PDI foram realizadas pela técnica DLS e o ZP por mobilidade eletroforética. A análise de concentração e distribuição de tamanho das Fe-NP foram realizadas por meio da técnica de NTA.

O ensaio *Allium cepa* foi realizado de acordo com Fiskejo et al. (1985), onde raízes foram expostas a nanopartículas nas concentrações $2,5 \times 10^9$ NPs/mL.

Para avaliar o potencial das NPs no controle de pragas escleródios foram colocados em crescimento em meios com e sem nanopartículas na concentração $2,5 \times 10^9$ e 5×10^9 NPs/mL por 15 dias (Quadro 1).

Quadro 1 - Montagem das placas de avaliação do potencial de controle de pragas *in vitro*.

Testes a $2,5 \times 10^9$ e 5×10^9 NPs/mL	Controles
<i>T. harzianum</i> + FeCl-NP	Mofo branco
<i>T. harzianum</i> + FeS-NP	<i>T. harzianum</i>
Mofo branco + FeCl-NP	Mofo branco + <i>T. harzianum</i>
Mofo branco + FeS-NP	

OBS* As concentrações de *T. harzianum* utilizadas foram 0,127mg/mL.

Para o ensaio de germinação (exposição $2,5 \times 10^9$ NPs/mL) as sementes de soja e feijão foram descontaminadas (hipoclorito 2%) (OLIVEIRA et al., 2018) e colocadas em espuma fenólica. Para germinação de sementes de tomate, estas foram mantidas em contato com as Fe-NP sob agitação por 1 hora e posteriormente colocadas em placas contendo meio ágar (LÓPEZ-MORENO et al., 2016).

Para a avaliação da microbiota, o solo foi seco e peneirado em 2mm. Os microcosmos foram preparados utilizando 10g de solo com 60% de umidificação. A concentração de exposição foi $2,5 \times 10^9$ NPs/mL, para o controle negativo foi utilizado água (HJELMSO et al., 2014). As amostras do solo foram coletadas nos tempos 0, 15 e 180 dias de exposição e armazenados a -80°C. A extração de DNA foi realizada com o Kit Power Soil® DNA Isolation (MoBio Laboratories). Após a extração o material foi quantificado por fluorescência (Qubit 3.0 Fluorometer) e todas as amostras foram diluídas para a concentração final de 100ug/mL. A análise de quantificação foi realizada por qPCR (reações em cadeia da polimerase em tempo real), como referência foi utilizado o gene *16SrRNA* e para quantificação os genes Nitrogenase redutase (*nirF*), Nitrito redutase (*nirK*), Nitrito redutase (*nirS*) e Nitrito redutase (*narG*), e Nitrito redutase (*cnorB*) e Óxido nítrico redutase (*nosZ*) (JUNG et al., 2011, 2012), todas as análises foram realizadas em triplicata. O volume final das reações foi 25µL contendo: 12,5µL de *Planium® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)*; 1µL de cada *primer*; 1µL da amostra de DNA.

Resultados e Discussão

As nanopartículas biogênicas de ferro sintetizadas neste estudo apresentaram boas características físico-químicas, resultados semelhantes aos obtidos por Praseetha et al. (2013) em síntese utilizando *Fusarium oxysporum* e *Actinomyces sp.* As características físico-químicas (Tabela 1), mostraram que as FeCl-NP possuem diâmetro menor e são mais dispersas em relação as FeS-NP.

Tabela 1 – Resultados obtidos com as análises de caracterização.

Material	Diâmetro (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)	Concentração
FeS-NP	262,3 ± 4,9	0,355 ± 0,040	-5,34 ± 0,180	$1,8 \times 10^{11}$ NPs/mL
FeCl-NP	232,9 ± 61,4	0,487 ± 0,095	2,38 ± 1,510	$2,5 \times 10^{10}$ NPs/mL

Em relação a atividade das nanopartículas no controle do mofo branco estas mostraram que ao final de 15 dias de exposição as FeCl-NP em ambas concentrações testadas apresentaram controle do mofo branco sem liberação de micélio e formação de novos escleródios, no entanto quando em contato com o *T. harzianum*, as mesmas inibiram o crescimento do fungo, fator negativo e provavelmente devido ao pH ácido destas NPs.

Foi observado atividade em relação ao mofo branco em ambas as concentrações testadas ($2,5 \times 10^9$ e 5×10^9 NPs/mL). Também foi observado que as FeS-NP apresentaram o crescimento de *T. harzianum*, indicando que durante a síntese alguns conídios permaneceram após filtragem, resultando seu crescimento. Ainda em relação a FeS-NP em testes para verificar sua atividade em contato com o *T. harzianum* foi possível observar as NPs não inibiram o crescimento do mesmo em ambas as concentrações testadas (Figura 1-I), indicando que esta não apresenta toxicidade para o *Trichoderma*, fato importante, pois o *Trichoderma* é utilizado como controle biológico nas lavouras, seu crescimento é um fator positivo, uma vez que o mesmo é antagonista de patógenos que pode estar presente no solo, sendo um benefício para o controle biológico, já relatado por diversos estudos (ÁVILA et al., 2005).

Em relação ao ensaio de *Allium cepa* as nanopartículas induziram alterações no índice mitótico e no índice de alteração, quando comparadas ao controle, provavelmente devido a diferentes fenômenos e interações ocorrendo com o uso das nanopartículas, embora as alterações ocorridas nas FeS-NP foram aparentemente melhores que as ocorridas nas FeCl-NP (Figura 1-II) provavelmente estes resultados são devido ao pH diferente entre as nanopartículas alguns estudos semelhantes utilizando diferentes metais para a síntese relataram diferenças nos índices mitóticos e de danos de acordo com a concentração de nanopartículas, pH e o tempo de exposição (GUILGER et al., 2017; GADANO et al., 2002).

Os ensaios de germinação de sementes mostraram que na presença de NP não foram observadas diferenças significativas em relação a germinação, no entanto, o mesmo não foi observado para as sementes de feijão e soja, sendo os resultados da exposição as FeCl-NP os que apresentaram o menor índice para o feijão (Figura 1- III).

Na avaliação da microbiota do solo os resultados revelaram um aumento nos números de bactérias nos solos tratados com ambas as NPs no início do tratamento (15 dias após exposição), sendo estes estabilizados ou diminuídos após 180 dias, outra observação é quem relação ao tipo de bactéria, onde foi possível observar que inicialmente havia grande quantidade de bactérias fixadoras (representada pela *nitrogenase reductase*), sendo que estas apresentaram uma queda na quantidade aos 180 dias, principalmente em solos expostos a FeS-NP (Figura 1-IV). Para a quantificação molecular foi realizado o método relativo, logo a comparação sempre é realizada em relação ao controle, embora seja observado uma diminuição na quantidade de bactérias após 180 dias em solos tratados, o mesmo pode ser observado em relação ao controle. A alternância na quantidade de bactérias do ciclo do nitrogênio também foi observada em outros estudos (MARUYAMA et al., 2016, GUILGER et al., 2017).

Conclusões

A síntese de Fe-NPs a partir do *T. harzianum* como agente redutor foi possível, sendo que as diferentes NP produzidas apresentaram diferentes características físico-químicas, assim como diferenças em relação a sua atividade. Ambas as Fe-NP apresentaram atividade em relação ao controle do mofo branco e embora as FeCl-NP tenham demonstrado maior inibição, as FeS-NP mostraram ser a melhor opção devido ao fato destas não inibirem o crescimento de *T. harzianum*. Em relação a toxicidade as Fe-NP apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos que variaram de acordo com o tipo de exposição (FeS-NP e FeCl-NP), sendo as FeS-NP as menos tóxicas, não sendo observada toxicidade também em relação a germinação de sementes. As Fe-NP apresentaram alterações na microbiota do solo, sendo as FeCl-NP as que mostraram resultados mais próximos ao controle. A utilização de Fe-NP biogênicas podem ser uma opção na tentativa de controle de patógenos agrícolas, porém existe a necessidade de maiores estudos para garantir a segurança da sua utilização.

Referências bibliográficas

SILVA, P. L. et al. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. Em: RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada a Agro&Industria**. Edição. 1, Blucher, v.4, p. 968-1013, 2016.

YANG, Y.; WANG, J.; XIU, Z.; ALVAREZ, P. J. J. Impacts of Silver Nanoparticles on Cellular and Transcriptional Activity of Nitrogen-Cycling Bacteria. **Environ. Toxicol. and Chem.**, v. 32, n. 7, p. 1488-1494, 2013.

GUILGER, M. et al. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. **Scientific Reports**, 7: 44421, 2017.

THUL, S. T.; SARANGI, B. K.; PANDEY, R. A. Nanotechnology in Agroecosystem: Implications on Plant Productivity and its Soil Environment. **Expert Opin Environ Biol.**, v.2, n. 1 p. 1-7, 2013.

ÁVILA, Z. R. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma spp.* antagonistas a *Sclerotinia rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, n.117, p. 117-130, 2005.

DURAN, N. et al. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process on Textile Fabrics and Their Effluent Treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 203–208, 2007.

OLIVEIRA, J. L. et al. Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable

Agriculture. **J. Agric. Food Chem**, v. 66, p. 1330-1340, 2018.

LÓPEZ-MORENO, M. L. et al. Effect of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles on the growth and development of *Lycopersicon lycopersicum* (tomato plants). **Science of the Total Environment** **550**, p. 45-52, 2016.

HJELMSO, M. J. et al. High-Resolution Melt Analysis for Rapid Comparison of Bacterial Community Compositions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 12, p. 3568-3575, 2014.

JUNG, J. et al. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. **Res. Microbiol.**, England, v. 162, p. 1018-1026, 2011.

JUNG, J. Seasonal changes in nitrogen-cycle gene abundances and in bacterial communities in acidic forest soils. **J. Microb.**, Switzerland, v. 50, n. 3, p. 365-373, 2012.

Figura 1 – I) Teste de atividade: A, B, C – controle; D, E, F, G – tratamentos e (FeCl-NP, FeS-NP respectivamente) mofo branco; H, I, J, K, G – tratamentos e (FeCl-NP, FeS-NP respectivamente) *Trichoderma harzianum*. II) Germinação de sementes. III) Cito e genotoxicidade por *Allium cepa*. IV) Análise molecular da microbiota do solo.

