

INFLUÊNCIA DA CARGA DE SUBSTRATO NA ESPORULAÇÃO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* EM EMBALAGENS PLÁSTICAS

V. K. HOMMA¹, L. P. CUNHA² e J. C. THOMÉO²

¹ Universidade Estadual Paulista, Departamento de Química Ambiental

² Universidade Estadual Paulista, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos
E-mail para contato: lucasportilhodacunha@gmail.com

RESUMO – Este trabalho teve como objetivo analisar a influência da carga de substrato, sendo arroz tipo 1, na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* em embalagens plásticas. Com objetivo de otimizar e gerar economia no processo de produção de esporos do fungo realizou – se teste em embalagens plásticas de polipropileno com diferentes cargas e com tamanhos diferentes das embalagens. Observou – se com os resultados obtidos que é possível produzir esporos em embalagens plásticas com altos níveis de cargas, porém com embalagens apropriadas e de tamanho ideal para fornecer aeração e evitar constipação das embalagens.

1. INTRODUÇÃO

A substituição ou diminuição no uso de agrotóxicos na agricultura por uso de fungos entomopatogênicos vêm se tornando cada vez mais comum. A substituição ou troca vem ocorrendo pois a sociedade tem buscado cada vez mais alimentos saudáveis sem a adição de agrotóxicos e pela ótima eficiência de mortandade das pragas (Almeida e Batista Filho, 2001; Frazzon et al., 2000; Lacey et al. 2015). Existem muitos fungos que são utilizados como bioinseticidas como: *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* e *Beauveria bassiana* que tem apresentado êxito no combate de cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*, dos gafanhotos *Schistocerca pallens*, *Stiphra robusta* e *Rhammatocerus schistocercoides*, da broca-do-café *Hypothenemus hampei* e os cupins-de-montículo e da cana-de-açúcar, os cupins do gênero *Cornitermes* (Valicente, 2009).

No Brasil o uso do fungo *Metarhizium anisopliae* teve início há mais de 50 anos para combater a cigarrinha da folha da cana-de-açúcar, praga comum neste tipo de cultura e com a proibição das queimadas ocorrendo o aumento no corte mecanizado da cana-de-açúcar, favorecendo o seu aumento (Almeida e Batista Filho, 2001; Loureiro et al., 2012; Ottati-de-Lima, 2007).

Define – se o fungo *Metarhizium anisopliae* como filamentosos entomopatogênicos e acaricidas (Hu et. al., 2002; Wang et al., 2016; Driver et. al., 2000, Liu et. al., 2001; Baratto, 2005). A temperatura ótima de cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* é de 28°C (Dortas e Arcas, 1998; Pollar, 2005). Vários autores realizaram diversos testes para verificar a interferência da temperatura na esporulação, no qual pode – se observar que quando o fungo é

exposto a temperaturas acima e abaixo de suas condições ótimas tem sua esporulação reduzida (Keyser et al. 2014, Lanza et al., 2009).

Para que se obtenha sucesso na aplicação do fungo é necessário realizar a aplicação inundativa, para isso se faz necessário à produção em larga escala, porém os processos industriais deste fungo ainda são artesanais e desprovidos de tecnologia e controles sofisticados de processo. Muitas informações que podem afetar diretamente o crescimento micelial do fungo e sua esporulação são pouco conhecidas e controladas como: temperatura, aeração, pH, umidade, dentre outros, que podem afetar diretamente o crescimento micelial do fungo e sua esporulação (Schmidt et al. 2007).

Na indústria o processo de produção de esporos em geral ocorre com uso da técnica de fermentação em estado sólido (FES) e, em geral, o arroz é pesado e adicionado em embalagens plásticas com capacidade para 500 gramas de arroz cru, em seguida são umidificados, autoclavados, após o processo de resfriamento o substrato estéril recebe o inóculo em câmara de fluxo laminar e em seguida as embalagens são homogeneizadas. A incubação é realizada em salas climatizadas e as embalagens ficam dispostas em prateleiras por 15 dias. Após o período de cultivo o arroz é retirado das embalagens para empacotamento em embalagens maiores ou para extração dos esporos dos grãos de arroz (Cunha, 2016).

Como demonstrado neste trabalho na indústria utiliza - se uma carga de 500g para produção de esporos visando à economia e otimização do processo industrial. Este trabalho teve como objetivo observar a interferência das cargas de substrato na produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* em embalagens plásticas. Para isso realizou - se o cultivo do fungo com diferentes tipos de cargas e tamanho de embalagens.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os testes foram realizados em triplicata e será demonstrado o desvio padrão de cada teste realizado. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, com suporte do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, ambos do IBILCE/UNESP

2.1. Microrganismo

Foi utilizado o fungo *M. anisopliae* da linhagem 425, concedido pelo Instituto Biológico de São Paulo. Inicialmente, fez-se o armazenamento do fungo em tubos de ensaio com meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Após o desenvolvimento do fungo, foi adicionado óleo mineral para a formação de uma camada protetora de colônia, em seguida os tubos foram mantidos em câmara fria com temperatura controlada a 4°C sendo posteriormente utilizados nas repicagens para outros ensaios realizados.

A repicagem do fungo foi realizada em Erlenmeyers inclinados contendo 50 mL de meio de cultivo BDA utilizando uma alça de platina, em seguida foram dispostos em câmara DBO a 28°C durante 15 dias.

Para o preparo do inóculo, adicionou-se solução Tween 80 a 0,1% na superfície da colônia e com o auxílio da alça de platina, raspou - se a superfície para facilitar o

desprendimento dos esporos. Foi fixada a concentração de 10^7 esporos/grama de substrato de sólido seco em todos os ensaios.

2.2. Fermentação em embalagens de polipropileno

Os ensaios de cultivo do fungo foram realizados em embalagens plásticas contendo 10g, 50g, 100g, 250g, 500g, 750g e 1000g de substrato. Utilizou - se embalagens plásticas com duas dimensões sendo 10x20 cm e 30x40cm. Nas embalagens com 10x20 cm realizou – se ensaios com cargas de 10g e 50g de substrato, para as embalagens de 30x40 cm utilizou – se testes com 10g, 50g, 100g, 250g, 500g, 750g e 1000g, sendo o substrato utilizado o arroz tipo 1 de adquirido em mercado local. As embalagens com dimensões de 30x40 cm são equivalentes às utilizadas em biofábricas, como é o caso da empresa Oligos Biotecnologia de São José do Rio Preto-SP.

Em todas as embalagens foram acoplados bocais de PVC, nos quais foram acoplados tampões de algodão envolto por gaze para garantir as trocas de gases e assegurar que não haja contaminação. Para facilitar a aeração e que não ocorra a aglomeração do substrato, foi colocado no interior das embalagens arames em forma espiral.

Geralmente as biofábricas trabalham com embalagens contendo massas variadas. A empresa citada anteriormente opera em embalagens com uma massa de 500g de substrato, portanto, a massa de 10g objetiva minimizar possíveis gradientes de temperatura e umidade no meio de cultivo, demonstrando uma condição ideal de cultivo, já a massa de 1000g sugere uma situação diferente, onde os gradientes seriam significantes e acabariam afetando o metabolismo microbiano e consecutivo à produção de esporos.

2.3. Extração de esporos

Para a extração dos esporos utilizou – se solução Tween 80 à 0,1%, para cada 1 g de substrato seco foi utilizado 200 mL da solução e após adicioná-la nas embalagens, as mesmas foram dispostas em um banho metabólico com agitação recíprocante (*Marconi, Dubnoff, BRA*) e permaneceu em agitação de 120 b.p.m por 50 minutos.

Após o término do tempo de extração, pipetou-se 1,5 mL e adicionou-se em eppendorf identificados, em seguida fez-se a contagem dos esporos em câmara de Neubauer.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os testes foram realizados em triplicata e nas Tabelas 3.1 e 3.2 são demonstrados os resultados de concentração de esporos (C_e) do fungo *Metarhizium anisopliae* e seus respectivos desvio padrão (DP), cultivado em embalagens plásticas de polipropileno.

Tabela 3.1: Concentrações de esporos após 10 dias de cultivo em embalagens plásticas.com dimensões de 10x20 cm.

Carga de substrato	$C_e (10^8/\text{mL})$	DP
10g	8,42	0,44
50g	6,08	0,56

Tabela 3.2: Concentrações de esporos após 10 dias de cultivo em embalagens plásticas.com dimensões de 30x40 cm.

Carga de substrato	$C_e (10^8/\text{mL})$	DP
10g	6,00	0,55
50g	6,84	0,49
100g	7,46	0,34
250g	6,40	0,14
500g	7,20	0,45
750g	3,01	0,30
1000g	1,35	0,17

Na Tabela 3.1 demonstra os resultados de uma comparação de fermentação em estado sólido do fungo *Metarhizium anisopliae*, no qual realizou – se fermentações com duas cargas distintas, sendo 10g e 50g em embalagens plásticas de 10x20 cm. Pode – se observar que os testes com 10g obteve-se maior resultado de esporulação, isso pode ter ocorrido em virtude de maior aeração e também pela disposição do substrato na embalagem que formava uma fina camada do meio de cultivo na embalagem. Já os testes realizados com 50g a embalagem teve seu preenchimento quase que 85% de sua capacidade, levando a uma diminuição na aeração e também aglomeração do substrato diminuindo a porosidade do meio de cultivo.

Na Tabela 3.2 realizou – se fermentações em embalagens plásticas com dimensões maiores e pode – se observar que o mesmo que ocorre nas fermentações em embalagens plásticas de dimensões 10x20 cm com carga de 50 g ocorreu nas embalagens maiores quando foi utilizado maiores cargas de 750g e 1000g. As outras fermentações com maiores quantidades de substratos até a marca de 500g que resultava em um preenchimento da embalagem por cerca de 45% do seu total houve bons índices de esporulação do fungo.

4. CONCLUSÃO

O estudo demonstra que os melhores resultados foram obtidos quando preencheu – se cerca de 45% das embalagens com substrato. Concluindo - se que é possível produzir esporos com qualquer carga de substrato desde que atenda as necessidades de crescimento do fungo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, J.E.M; Filho, A.B. Banco de Microrganismos entomopatogênicos pesquisa. Biotecnologia ciência & desenvolvimento. Nº 20, 2001.
- BARATTO, C. M. Caracterização de genes de quitinases do entomopatógeno e acarida *Metarhizium anisopliae*. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.
- CUNHA, L.P.” Aspectos de engenharia da produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em biorreator de bandeja. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, 2016
- DORTAS, B; ARCAS, J. “Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration”. *Enz. and Micro. Tech.* Vol. 23, Pag. 501–505, 1998.
- DRIVER, F; MILNER, RJ; TRUEMAN, WH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, Vol. 104, p. 134-150, 2000.
- FRAZZON, A. P.G; VAZ JUNIOR, I.S; MASUDA, A; SCHRANK, A. “In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*”. *Veterinary Parasitology* Vol. 94, pag 117–125, 2000.
- HU, G; LEGER, R. J.” Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent”. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6383–6387 Vol. 68, No. 12, 2002.
- KEYSER, C.A; FERNANDES, E.K.K; RANGEL, D.E.N; ROBERTS, D.W. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol. 120, pag. 67-73. 2014
- LACEY, L. A; GRZYWACZ, D; SHAPIRO-LLAN, D. I; FRUTOS, R; BROWNBRIDGE, M; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 132, pag. 1–41, 2015
- LANZA, L. M; MONTEIRO, A, C; MALHEIROS, E. B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. *Cienc. Rural*. Vol.39. 2009.
- LIU, Z.Y; LIANG, Z. Q; WHALLEY, A. J. S; YAO, Y. J. & LIU, A. Y. *Cardyrops brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its Anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *J. Invertebr. Pathol.* Vol. 78: 178-182, 2001.
- LOUREIRO, E.S; FILHO, A.B; ALMEIDA, J.E.M; MENDES, J.M; PESSOA, L.G.A. Eficiência de isolados de *metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorok. No controle da cigarrinhada-raiz da cana-de-açúcar, *mahanarva fimbriolata* (stal, 1854) (hemiptera: cercopidae), em condições de campo”. *Arq. Inst. Biol.* Vol.79, p.47-53, 2012.

- OTTATI-DE-LIMA, E.L. Produção de *metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok. e *beauveria bassiana* (bals.) vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, 2007.
- POLLAR, P; MURO, M.A; KAIRO, M.T.K; MOORE, D; PEGRAM, R; JOHN, S-A; ROACH-BENN, C. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Veterinary Parasitology*. Vol. 134, Pag. 159–167, 2005.
- SCHMIDT, F. G. V; SILVA, J. B. T; FARIA, M. R; MAGALHÃES, B. P; ALVES, R.T; LECOQ, M. “Metodologia de aplicação do fungo *metarhizium anisopliae* var. *acridum* para o controle do gafanhoto *rhymmatocerus schistocercoides* em campo. Embrapa. ISSN 1676 – 340, Vol. 208. 2007.
- VALICENTE, F. H. “Controle biológico de pragas com entomopatógenos”. *Controle Biológico De pragas, Doenças E Plantas Invasoras*. Vol. 39, nº 251, pag. 48-55, 2009.
- WANG, J.B; LEGER, R. S, WANG, C. “Advances in genomics of entomopathogenic fungi”. *Advances in Genetics*, Vol. 94. 2016.