

CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* ATRAVÉS DE ANÁLISE DE IMAGEM

E.H.S.OLIVEIRA^{1*}, G.R.JESUS¹, L.M.DUARTE¹ e L.M.GRAJALES^{1**}

¹ Universidade Federal do Tocantins, Departamento de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: *eduhenrique_@outlook.com e **grajales@uft.edu.br

RESUMO – Atualmente, muitos fungos são produzidos para serem aplicados na indústria, principalmente, na indústria agrícola, já que constituem uma alternativa compatível com o ambiente. Um claro exemplo é o uso do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* empregado como pesticida biológico para controlar pragas como a Mahanarva posticata, a cigarrinha-da-folha que se dá nos cultivos de cana-de-açúcar, gafanhotos, besouro do grão do trigo, carrapatos de impacto na pecuária, broca cana e outros insetos da ordem lepidópteros. O estudo do crescimento deste microrganismo aliado à análise de outras variáveis como temperatura, pH e meios de cultivo, permite ajustar modelos matemáticos visando sua produção em uma escala maior. Por este motivo, o presente trabalho teve como principal objetivo determinar o crescimento radial do fungo *Metarhizium anisopliae* através da técnica de análise de imagem. Para atingir o objetivo, o fungo foi cultivado em meio BDA e fotografado em intervalos definidos de tempo. Posteriormente, as imagens foram digitalizadas e as áreas de crescimento contabilizadas pelo *software* “Image pro plus”, onde as informações obtidas foram ajustadas a um modelo matemático que permitirá prever a taxa de crescimento do fungo.

1. INTRODUÇÃO

Com a grande expansão das atividades agrícolas, muitas pragas que destroem as plantações estão se desenvolvendo, e com o intuito de evitar a perda, os agricultores acabam optando pela utilização de agrotóxicos, o que é muito prejudicial para a saúde humana e após o processamento do alimento não é possível retirar todos os resíduos com facilidade (Moura, 2007). A fim de tornar as lavouras mais produtivas, ou seja, com pouca perda devido ao ataque de insetos e fazer com que o alimento produzido não cause danos à saúde humana, a utilização de meios de controle biológico vem crescendo a cada vez mais (Messias, 1989) e com as vantagens de ser um meio mais barato é muito mais eficaz (Pomella e Ribeiro, 2009). Tal é o caso do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* que ataca gafanhotos, cigarrinhas de cana-de-açúcar e besouros do grão de trigo (Grajales, 2010). O fungo invade os insetos penetrando as suas cutículas ou “pele”, uma vez dentro eles se multiplicam rapidamente causando a destruição da praga e ocasionalmente toxinas (Gravena, 2000). Eles emergem, frequentemente, do corpo dos insetos para produzir os esporos, que quando espalhados pelo vento, chuva ou contato com outros insetos espalham a infecção pela área (Gravena, 2000).

Devido à importância do crescimento microbiano para aplicação em lavouras como pesticidas biológicos, alguns autores tem feito seguimento desse crescimento através de modelos matemáticos que permitem prever o seu comportamento, Vieira (2000) por exemplo, utilizou um modelo matemático para bovino a pasto, onde fazia a simulação da dinâmica de nutrientes no trato gastrointestinal e com isso observava a atividade microbiana em cada animal. Outro pesquisador que utilizou modelos matemáticos para prever a taxa de crescimento microbiano foi Sarmento (2006), onde fez a modelagem do crescimento microbiano em mortadela e salsicha defumada em processos isotérmicos e não isotérmicos. Da Silva (2004) fez a análise da cinética de crescimento do fungo *Eremothecium ashbyii* onde utilizou o método *Kono* que a partir deste método se é capaz de estimar a produtividade celular.

Com o avanço da tecnologia, novas técnicas de análise vêm surgindo. O Método de Análise de imagem é um método inovador e a partir dele se é capaz de descobrir várias características do observado, como a quantidade colônias formadas por um microrganismo e a dimensão de seu tamanho de ocupação no meio de cultura, dentre outras (Gomes, 2008). Esta técnica vem se destacando muito na sociedade de pesquisadores, visto que é rápido, confiável, reduz os possíveis erros causados pela manipulação das amostras e permite analisar vários objetos simultaneamente (Balaban, 2008). Assim, o objetivo principal deste trabalho é analisar através da técnica de análise de imagem, o crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* ao longo do tempo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

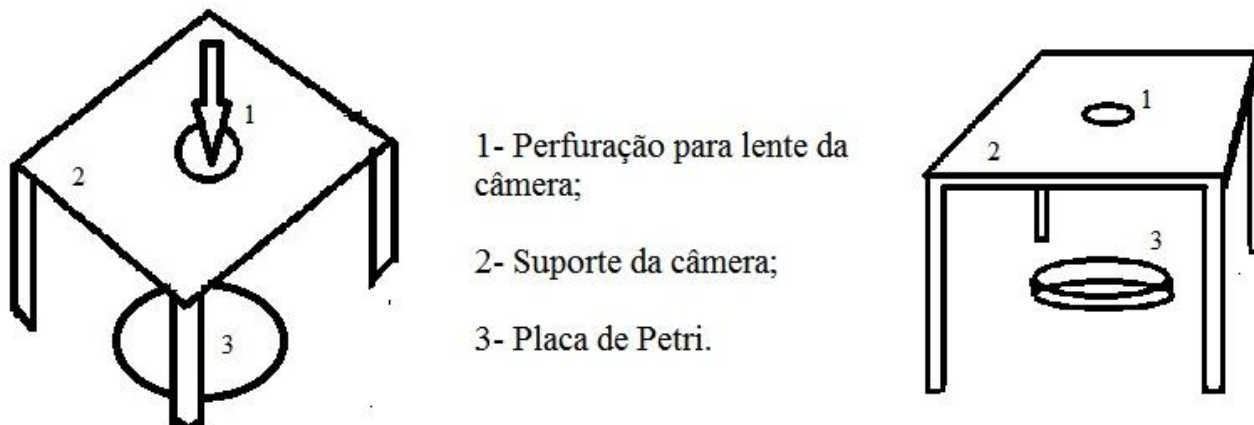
O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* cepa ICBC 425 foi utilizado sob a forma de esporos puros em pó, armazenados à temperatura de -4 °C. A cepa foi adquirida no laboratório Biocontrol, localizada na cidade de Sertãozinho-SP.

2.2 Metodologia

Quinze mililitros de meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) dispostos em placas de petri de 11cm de diâmetro foram esterilizados a 121°C por 20 minutos. Após, o meio solidificar à temperatura ambiente, o fungo foi cultivado com unicamente uma pincelada de esporos no centro geométrico das placas de petri, isto em câmara de fluxo laminar marca Marconi modelo MA1550/1. Imediatamente, o conjunto foi colocado em câmara climatizada BOD marca Adamo à temperatura de 28 °C \pm 1 °C durante 07 dias. Periodicamente, as placas de petri com o fungo foram retiradas da BOD para serem fotografadas e posteriormente analisadas mediante o software “*Image pro plus (Media Cibernetics)*” na versão gratuita.

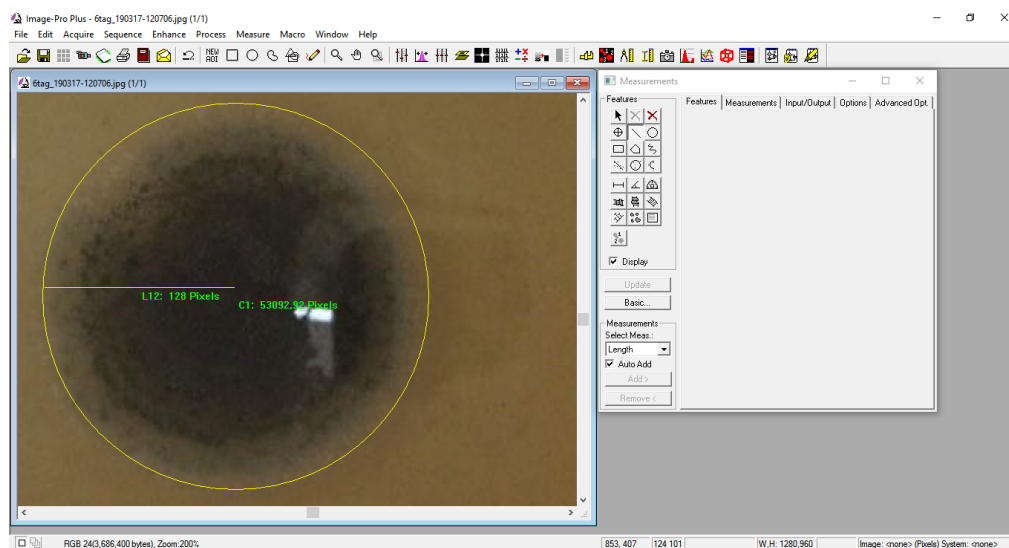
O sistema completo para as fotografias consistiu em um suporte de isopor quadrado de 17 cm de lado e 17 cm de altura. O suporte contou com uma perfuração redonda de 5 cm de diâmetro, conforme apresentado no esquema da Figura 1, para localizar a lente da câmera fotográfica Sony modelo DSC-W230 de 12.1 Mega Pixels. As condições de iluminação foram sempre controladas para garantir a padronização das fotos

Figura 1- Suporte para fotografia.



A superfície das placas de petri foram fotografadas, as imagens digitalizadas e em seguida contabilizada a área, o raio e o diâmetro de crescimento do fungo mediante o software *Image ProPlus*, conforme esquema da Figura 2. Os valores referentes ao raio, diâmetro e área foram todos disponibilizados pelo software, onde os valores se encontravam em pixels e após uma simples conversão de unidades foi transformado para centímetros ou centímetros quadrados.

Figura 2- Layout da análise de imagem



3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com as informações de área e raio obtidas foram realizados gráficos da sua variação em função do tempo para posteriormente, analisar cada estágio da curva de crescimento, ou seja, detectar o momento em que o fungo inicia e termina a fase lag, exponencial, estacionária

e de morte (Bastos, 2010). As Figuras 3 e 4 mostram a variação do raio e de área em função do tempo.

Pode-se observar que até o tempo de 24 horas após o processo de inoculação, o fungo ainda estava se adaptando ao meio, permanecendo na fase lag. Segundo Dickinson & Bottomley (1980) os fungos são capazes de manter-se até encontrar-se em condições favoráveis para retomar seu crescimento, portanto todo esse tempo que não houve crescimento micelial do fungo foi devido ao processo de adaptação. A partir das 36 horas se inicia a curva de crescimento exponencial, a qual é a de maior interesse nesse estudo já que visa analisar o seu período de maior eficiência, com o início do crescimento micelial percebe-se que com 12 horas do início desse crescimento, o fungo obteve um crescimento praticamente dobrado e a cada 12 horas percebeu-se esse comportamento. De acordo com Bastos (2010) após o final da fase de adaptação os microrganismos começam a se multiplicar rapidamente, dobrando seu número em espaços regulares de tempo, conforme foi observado.

Observe-se que no momento de 108 horas o fungo apresentou uma pequena diminuição de seu crescimento e após 12 horas desse decaimento de velocidade houve um novo aumento de velocidade, retomando o padrão de dobramento de tamanho. Essa pequena modificação na estrutura de crescimento do fungo de acordo com Nielsen (2002) e Dutta (2008) pode ter se dado pelo esgotamento de um ou mais nutrientes ou por algum pequeno acúmulo de subproduto tóxico para o seu crescimento, pois com o ambiente em acelerada mudança acontece de o microrganismo muitas vezes ter o crescimento desequilibrado.

Figura 3 – Crescimento radial do fungo em função do tempo.

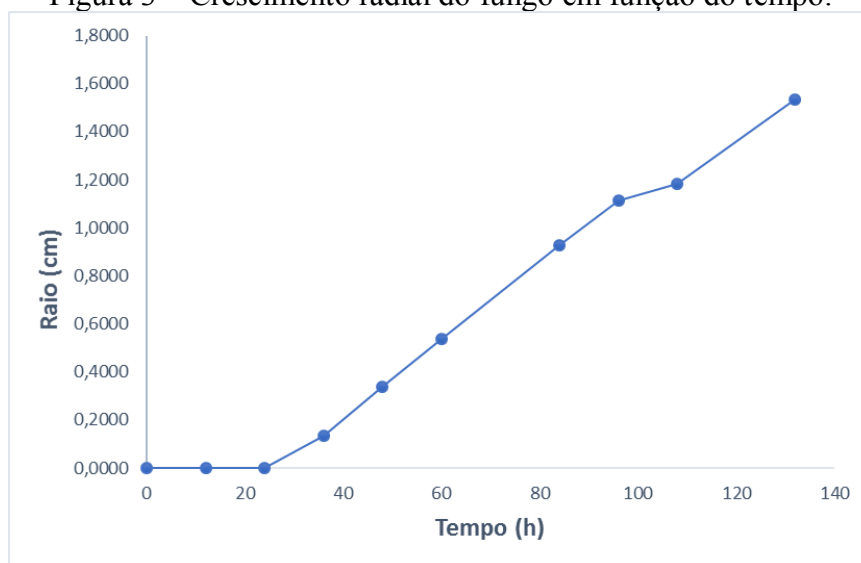
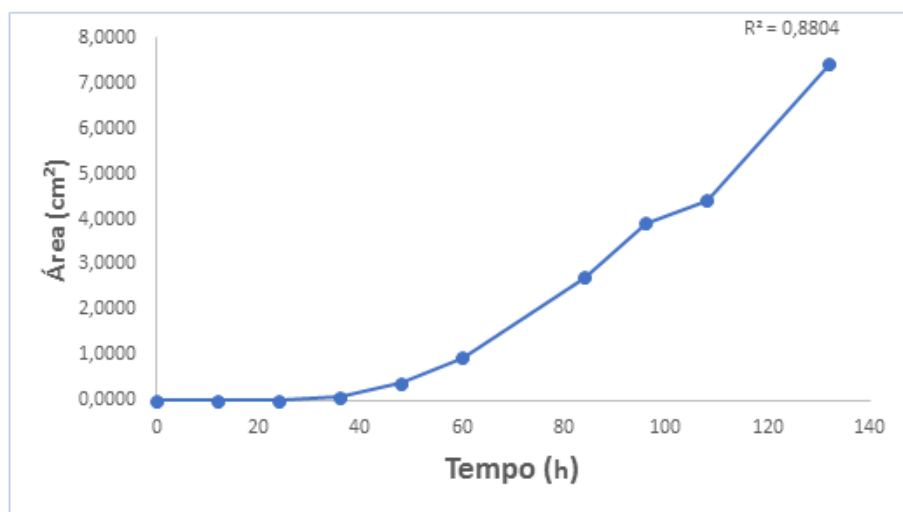


Figura 4 – Aumento de área do fungo em função do tempo.



Pretende-se continuar avaliando o crescimento do *M. anisopliae* após 130 horas de experimentos, com o objetivo de determinar a fase estacionária e fase de morte do microrganismo, podendo assim gerar modelos matemáticos completos que permitam determinar a cinética de crescimento do mesmo.

4. CONCLUSÃO

De acordo os objetivos esperados, pode-se perceber que os mesmos foram alcançados com extremo êxito, verificando que em um período de sete dias é o período no qual o fungo melhor se desenvolve e a partir destes resultados conclui-se que sua velocidade de crescimento a cada 12 horas nesse período de sete dias de crescimento manteve um padrão de praticamente dobrar sua velocidade de crescimento radial.

5. REFERÊNCIAS

BALABAN, M. O. Quantifying Nonhomogeneous Colors in Agricultural Materials Part I: Method Development. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 9, p. 431 – 437, 2008.

BARBOSA, B. C. Controle biológico. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/ecologia/controle-biologico/>> Acesso em 20 de Março de 2017

BASTOS, G. R. Tecnologia das fermentações: Fundamentos de bioprocessos. Coleção UAB-UFSCar, p. 92-93, 2010.

BUENO, V. H. P.; V. L. , J. C.. Controle biologico de pragas em cultivos protegidos. *Ciência & Ambiente*, v. 43, p. 211-230, 2011

DA SILVA, R. S. F. Cinética de crescimento de fungos: I. Modelo matemático para o *Eremothecium Ashbyik*. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 2, n. 8, p. 199-201, 2004.

DE MOURA, R. M. Agrotóxicos: Heróis ou vilões? A face da questão que todos devem saber. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 4, p. 23-49, 2014.

DUTTA, R. Fundamentals of biochemical engineering. v.1, p. 106-140, 2008.

GOMES, M. I. S. **Monitorização do crescimento de um biofilme fotossintético por análise de imagem**. 2008. Tese de Doutorado. FCT-UNL.

GRAJALES, L. M. Avaliação de um biorreator rotativo para fermentação em estado sólido. 2010.

GRAVENA, S. Os fungos no controle de insetos, 2000. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/os-fungos-no-controle-de-insetos/>> Acesso em 19 de Março de 2017.

GRAVENA, S. Controle biológico no manejo integrado de pragas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 13, p. 281-299, 1992.

MESSIAS, C. L. Fungos, sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 57-59, 1989.

NIELSEN, J. H.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. Bioreaction Engineering Principles. V.2, p.10, 2002.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas—uma visão empresarial. **Biocontrole de Doenças de Plantas**, p. 239, 2009.

REGINA, M. Cinética do crescimento miceliano de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto. 2001.

SARMENTO, C. M. P. Modelagem do crescimento microbiano e avaliação sensorial no estudo da vida de prateleira da mortadela e da linguiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico. 2006.

VIEIRA, R. A. M.; PEREIRA, J. C.; MALAFAIA, P. A. M.; QUEIROZ, A. C.; JORDÃO, C. P.; GONÇALVES, A. L. Simulação da dinâmica de nutrientes no trato gastrointestinal: aplicação e validação de um modelo matemático para bovinos a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 898-909, 2000.