Brazilian Journal of Development

Influência da carga de substrato na esporulação do fungo *metarhizium anisopliae* em embalagens plásticas

Influence of substrate loading on sporulation of fungus metarhizium anisopliae in plastic packaging

DOI:10.34117/bjdv5n6-167

Recebimento dos originais: 05/04/2019
Aceitação para publicação: 10/05/2019

Lucas Portilho da Cunha
Mestre em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/IBILCE
Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos
Endereço: Cristóvão Colombo 2265, Jardim Nazareth, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil
E-mail: lucasportilhodacunha@gmail.com

Veronika Kaori Homma
Graduada em Química Ambiental pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/IBILCE
Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Química Ambiental
Endereço: Cristóvão Colombo 2265, Jardim Nazareth, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil
E-mail: veronikahomma@hotmail.com

João Cláudio Thoméo
Livre Docente pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/IBILCE
Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos
Endereço: Cristóvão Colombo 2265, Jardim Nazareth, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil
E-mail: thomeo@ibilce.unesp.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar a influência da carga do 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 tamanhos comportando diferentes cargas de arroz. 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.

Brazilian Journal of Development

Palavras chaves: Metarhizium anisopliae, Cultivo em Estado Sólido, Esporo, Embalagem Plástica.

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the influence of the type 1 rice load on sporulation of the fungus Metarhizium anisopliae in plastic packaging. With the objective of optimizing and generating savings in the fungus spore production process, polypropylene plastic packages with different sizes with different loads of rice were tested. It was observed with the results that it is possible to produce spores in plastic packages with high levels of loads, however with appropriate packages and of ideal size to provide aeration and to avoid constipation of the packages.

Key words: Metarhizium anisopliae, Solid State Crop, Spore, Plastic Packaging.

1 INTRODUÇÃO

A substituição ou diminuição do uso de agrotóxicos na agricultura por fungos entomopatogênicos vem se tornando comum, uma vez que a sociedade tem buscado alimentos saudáveis e pela alta eficiência destes fungos no combate a pragas agrícolas (Almeida, J. E. M., Batista Filho, 2001; Lacey et al., 2015; Paula et al., 2000).

Existem muitos fungos que são utilizados como bioinseticidas, tais como *Metarhizium anisopliae, M. flavoride* e *Beauveria bassiana*, que têm apresentado êxito no combate de pragas diversas, como as cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*), de gafanhotos (*Schistocerca pallens*, *Stiphra robusta* e *Rhammatocerus schistocercoides*), da broca-do-café *Hypothenemus hampe*i e de cupins do gênero *Cornitermes* (Cunha, 2018). Atualmente os fungos entomopatogênicos representam cerca de 10% dos agentes biológicos para controle de pragas no mundo e mais de 60% na América Latina, dos quais 33% são *M. anisopliae* e 32% *B. bassiana* (Nishi e Sato, 2017).

Atualmente, a maior utilização de *M. anisoliae* é no combate às cigarrinhas da cana-de-açúcar, pois com a proibição da queima da cana nos canaviais no Estado de São Paulo, e consequente acúmulo de palha nos campos, ocorre aumento expressivo da praga. Segundo (Castro et al., 2016), no Brasil mais de 2 milhões de hectares de cana – de – açúcar são tratados com *M. anisplaie*, de modo que desde 2015, o país se tornou portador do maior programa de controle de pragas utilizando bioinseticidas (Alonso-Díaz et al., 2007; Castro et al., 2016; Galindo-Velasco et al., 2015; Loureiro et al., 2012; Paula et al., 2000; Santos et al., 2017; Shin et al., 2016). Define-se *M. anisopliae* como um fungo filamentoso, entomopatogênico e acaricida (Driver et al., 2000; Hu e Leger, 2002; Wang et al., 2016). A temperatura ótima de cultivo é de 28°C (Dorta e Arcas, 1998; Polar et al., 2005) e vários

autores realizaram diversos testes para verificar a influência da temperatura na esporulação, relatando 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 sua 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, tais como aeração, pH e umidade 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), tendo arroz tipo 1 como substrato (Jenkins et al., 1998), que é pesado e adicionado em embalagens plásticas com capacidade para até 500 gramas de arroz cru. A seguir, o arroz é umidificado, autoclavado e, após resfriamento, inoculado em câmera de fluxo laminar. 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 (CUNHA, 2016).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da carga de arroz tipo 1 na produção de esporos do fungo *M. anisopliae* em embalagens plásticas. Para isso realizou – se o cultivo do fungo com diferentes cargas e tamanhos de embalagens. Os resultados aqui apresentados serão úteis a industriais que produzem comercialmente o microrganismo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO

Foi utilizado o fungo *M. anisopliae* da linhagem 425, fornecido 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 sobre a colônia. Em seguida, os tubos foram mantidos a 4ºC, sendo posteriormente utilizados nas repicagens para os ensaios posteriores. A repicagem do fungo foi realizada em frascos Erlenmeyers inclinados, contendo 50 mL de meio de cultivo BDA, sendo cultivado em câmera DBO a 28°C durante 15 dias.

Brazilian Journal of Development

Para o preparo do inóculo, adicionou-se solução Tween 80 a 0,1% aos frascos Erlenmeyer e, com o auxílio de uma alça de platina, raspou – se a superfície da colônia para facilitar o desprendimento dos esporos. Foi retirada uma alíquota da suspensão resultante e determinada a concentração de esporos em microscópio ótico de 40x de magnificação, co auxílio de uma câmara de Neubauer, ajustando-se posteriormente a concentração de 10^7 esporos/grama de substrato de sólido seco para 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, de 10x20 cm e de 30x40cm. Nas embalagens com 10x20 cm, realizaram – se ensaios com cargas de 10g e 50g de substrato e nas embalagens de 30x40 cm com as cargas de 10g, 50g, 100g, 250g, 500g, 750g e 1000g, sendo arroz tipo 1 utilizado como substrato, adquirido no comércio 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 colocados 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. Os cultivos foram realizados por 10 dias.

Geralmente as biofábricas trabalham com embalagens contendo massas variadas. A empresa citada anteriormente opera com embalagens contendo 500g de substrato, portanto. Assim, neste trabalho, a massa de 10g objetiva minimizar possíveis gradientes de temperatura e umidade no meio de cultivo, representando uma condição ideal de cultivo, enquanto que a massa de 1000g sugere uma situação limite, para a qual os gradientes seriam consideráveis e acabariam afetando o metabolismo microbiano e a produção de esporos.

2.3. EXTRAÇÃO DE ESPOROS

Para a extração dos esporos utilizou – se solução Tween 80 à 0,1% e para cada 1 g de substrato seco foi utilizado 5 mL da solução. Após a adição da solução, as embalagens foram dispostas em um banho metabólico com agitação reciprocante (*Marconi, Piracicaba, Brasil*), permanecendo em agitação de 120 ciclos por minuto por 50 minutos.

Após o término do tempo de extração, coletou-se 1,5 mL da suspensão para posterior contagem dos esporos em câmara de Neubauer.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo empregadas estatísticas descritivas para interpretar os resultados. Aos dados foi aplicada uma análise de variância e as médias foram comparadas através do teste de Tukey a 95% de nível de confiança, empregando-se o *software* Minitab 18.1 (*Minitab Inc., State College, EUA*)

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas Tabelas 3.1 e 3.2 são apresentados os resultados de concentração de esporos (C_e) de *M. anisopliae*, seus respectivos desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV), para as embalagens de 10x20 cm e 30x40 cm, respectivamente.

Na Tabela 3.1 observa-se que os testes realizados nas embalagens de 10x20 cm contendo 10g de arroz seco forneceram concentração de esporos superior aos realizados com 50 g de substrato, o que foi confirmado pelo teste de Tukey de comparação entre médias. Esta diferença a favor da menor carga de arroz pode ter ocorrido em virtude da maior aeração e também pela disposição do substrato na embalagem, que formava uma fina camada do meio de cultivo na embalagem, expondo uma maior área superficial do arroz ao ataque fúngico. Já os ensaios realizados com 50g nesta embalagem representaram um preenchimento de quase 85% de sua capacidade, levando a uma diminuição na aeração e também aglomeração do substrato, diminuindo a porosidade do meio de cultivo. Quanto aos coeficientes de variação, nota-se que há aumento da variabilidade dos ensaios com o aumento da carga, indicando a dificuldade de adaptação do microrganismo ao meio de cultivo quando pouco espaço livre é deixado acima do leito de partículas (*headspace*) para aeração do cultivo.

Na Tabela 3.2 apresentam-se os resultados dos cultivos realizados nas embalagens plásticas de 30x40 cm, podendo-se observar que há uma faixa de ocupação ótima de arroz na embalagem, de acordo com o teste de Tukey, indo de 100g a 500g, decaindo para cargas menores e decaindo ainda mais para cargas maiores.

Brazilian Journal of Development

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/mL)	DP (10^8/mL)	CV (%)
10g	$8,42^A$	0,44	5,2
50g	$6,08^B$	0,56	9,2

(*) C_e: concentração de esporos; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação (CV = DP/C_e). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre médias, de acordo com o teste de Tukey a 95% de índice de confiança.

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/mL)	DP (10^8/mL)	CV (%)
10g	$6,00^B$	0,55	9,2
50g	$6,84^{AB}$	0,49	7,2
100g	$7,46^A$	0,34	4,6
250g	$6,40^{AB}$	0,14	2,2
500g	$7,20^A$	0,45	6,3
750g	$3,01^C$	0,30	10,0
1000g	$1,35^D$	0,17	12,6

(*) C_e: concentração de esporos; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação (CV = DP/C_e). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre médias, de acordo com o teste de Tukey a 95% de índice de confiança.

Nesta embalagem de maior tamanho, a carga de 500 g corresponde a 45% do volume da embalagem e cargas maiores resultam em pequenos *headspaces*, o que impacta negativamente o cultivo, como discutido anteriormente. Outro aspecto que pode ter influenciado a formação de biomassa fúngica e produção de esporos são os prováveis gradientes de temperatura no interior das embalagens. A concentração de esporos para a 500g de arroz foi mais do que cinco vezes maior do que para 1000g. No entanto, há que se considerar a produtividade do processo, pois com a massa de 1000g seria possível dobrar a quantidade total de esporos no mesmo período de 10 dias de cultivo. Ainda assim, o cultivo com embalagens contendo 500g de substrato seria vantajoso. Quanto à baixa produção de esporos com cargas inferiores a 250g, acredita-se que o grande *headspace* favoreceu o

ressecamento do substrato. Note-se que os coeficientes de variação refletem a tendência de melhor adaptação do microrganismo para a faixa entre 100g e 500g de carga.

4 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que deve haver a formação de um sobre espaço (*headspace*) de cerca de 50% do volume total da embalagem para que haja boa adaptação do fungo *Metarhizium anisopliae* ao meio de cultivo. Volumes excessivos comprometem a troca de gases de respiração, comprometendo a produção de esporos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos imensamente ao apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (Faperp - Processo n° 005/2019) por toda ajuda, também agradecemos por toda infraestrutura e ajuda técnica que o IBILCE/UNESP nos proporcionou para que essa pesquisa fosse realizada.

REFERÊNCIAS

Almeida, J. E. M., Batista Filho, a., 2001. Banco de Microrganismos Entomopatogênicos. Biotecnol. Ciência e Desenvolv. 30–33.

Alonso-Díaz, M.A., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutierrez, R., Angel-Sahagún, C.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Fragoso-Sánchez, H., 2007. Evaluation of Metarhizium anisopliae (Hyphomycetes) for the control of Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. Vet. Parasitol. 147, 336–340. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.030

Castro, T., Mayerhofer, J., Enkerli, J., Eilenberg, J., Meyling, N. V., Moral, R. de A., Demétrio, C.G.B., Delalibera, I., 2016. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and M. robertsii in strawberry crop soil after soil drench application. Agric. Ecosyst. Environ. 233, 361–369. https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.09.031

Dorta, B., Arcas, J., 1998. Sporulation of Metarhizium anisopliae in solid-state fermentation with forced aeration. Enzyme Microb. Technol. 23, 501–505. https://doi.org/10.1016/S0141-

0229(98)00079-9

Driver, F., Milner, R.J., Trueman, J.W.H., 2000. A taxonomic revision of Metarhizium based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol. Res. 104, 134–150. https://doi.org/10.1017/S0953756299001756

Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Cruz-Vázquez, C., Pescador-Rubio, A., Angel-Sahagún, C.A., Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Contreras-Lara, D., 2015. Efficacy of entomopathogenic fungi (Ascomycetes: Hypocreales) against adult Haematobia irritans (Diptera: Muscidae) under stable conditions in the Mexican dry tropics. Vet. Parasitol. 209, 173–178. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.025

Hu, G., Leger, R., 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Appl. Environ. Microbiol. 68, 6383–6387. https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6383

Jenkins, N.E., Heviefo, G., Langewald, J., J, A., Lomer, C.J., Park, S., Sl, B., 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. BioControl 19, 21–32.

Keyser, C.A., Fernandes, É.K.K., Rangel, D.E.N., Roberts, D.W., 2014. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many Metarhizium isolates reducing biocontrol efficacy? J. Invertebr. Pathol. 120, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.05.008

Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. J. Invertebr. Pathol. 132, 1–41. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009

Lanza, L.M., Monteiro, A.C., Malheiros, E.B., 2009. Sensibilidade de Metarhizium anisopliae à temperatura e umidade em três tipos de solos. Ciência Rural 39, 6–12. https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000100002

Loureiro, E.S., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Mendes, J.M., Pessoa, L.G.A., 2012. Efficiency of Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok isolates in the control of the sugarcane spittlebug Mahanarva fimbriolata (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) in field conditions. Arq. Inst. Biol 79, 47–53. https://doi.org/10.1590/S1808-16572012000100007

Nishi, O., Sato, H., 2017. Species diversity of the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and M. flavoviride species complexes isolated from insects in Japan. Mycoscience 58, 472–479. https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.06.008

Paula, A., Frazzon, G., Da, I., Vaz Junior, S., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2000. In vitro assessment of Metarhizium anisopliae isolates to control the cattle tick Boophilus microplus. Vet. Parasitol. 94, 117–125. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00368-X

Polar, P., De Muro, M.A., Kairo, M.T.K., Moore, D., Pegram, R., John, S.A., Roach-Benn, C., 2005. Thermal characteristics of Metarhizium anisopliae isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. Vet. Parasitol. 134, 159–167. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.010

Santos, V., Mascarin, G.M., da Silva Lopes, M., Alves, M.C.D.F., Rezende, J.M., Gatti, M.S.V., Dunlap, C.A., Delalibera Júnior, Í., 2017. Identification of double-stranded RNA viruses in Brazilian strains of Metarhizium anisopliae and their effects on fungal biology and virulence. Plant Gene 11, 49–58. https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.01.001

Schmidt, F.. G.V., Silva, J.B.T., Faria, M.R., Magalhães, B.P., Alves, R.T., Lecoq, M., 2007. Methodology of application of the fungus Metarhizium anisopliae var. acridum for the control of the grasshopper Rhammatocerus schistocercoides in the field. In: Bol [WWW Document]. Bol. Pesqui. e Desenvolv. 208. URL https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-/publicacao/189419/metodologia-de-aplicacao-do-fungo-metarhizium-anisopliae-var-acridum-para-o-controle-do-gafanhoto-rhammatocerus-schistocercoides-em-campo

Shin, T.Y., Bae, S.M., Woo, S.D., 2016. Screening and characterization of antimicrobial substances originated from entomopathogenic fungi. J. Asia. Pac. Entomol. 19, 1053–1059. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.09.008

Wang, J.B., St. Leger, R.J., Wang, C., 2016. Advances in Genomics of Entomopathogenic Fungi. Adv. Genet. 94, 67–105. https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.002