

PRODUÇÃO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* VIA FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

Guilherme Debiazi Beloni; Wagner Arruda de Jesus; Wallace do Nascimento Gabriel;
Daniela Tiago da Silva Campos.

Universidade Federal de MatoGrosso, Av. Fernando Corrêa da Costa, nº 2367, Bairro Boa Esperança - Cuiabá – MT, CEP: 78060-900.

Resumo

Bioinseticidas a base do fungo *Metarhizium anisopliae* são utilizados no Brasil em larga escala para o controle de pragas em pastagens e no cultivo de cana-de-açúcar. O trabalho objetiva encontrar a composição do meio de cultura em conjunto com os parâmetros de cultivo que proporcione a maior produção de propágulos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425. Para isso foram avaliados meios de cultura compostos de sacarose, farinha de soja, extrato de malte, peptona de caseína e sais minerais. Os resultados demonstram que os meios de cultura compostos por farinha de soja com relação C/N 10:1 apresentaram maior produção de blastosporos/mL após 3 dias de cultivo, já os meios de cultura compostos por peptona de caseína não apresentaram produção de blastosporos. Após 4 dias de cultivo, houve redução na quantidade de blastosporos, o que evidencia pico de produção após 3 dias de cultivo. O estudo demonstrou o potencial do uso da farinha de soja como fonte de nitrogênio na produção de blastosporos de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425, bem como a relação carbono e nitrogênio 10:1 que se apresentou como a mais compatível para a estirpe utilizada e por fim o tempo de cultivo de 3 dias que se mostrou mais adequado.

Palavras-chave: controle biológico, hypocreales, microrganismo.

Introdução

O controle biológico consiste em um método de manejo de pragas no qual são utilizados macroorganismos ou microrganismos como agente de controle para pragas, de modo que os agentes microbiológicos podem ser fungos, bactérias e vírus. Dentro deste grupo os fungos entomopatogênicos são os mais estudados, visto a alta eficiência no controle de insetos, alta especificidade, a fim de evitar que insetos benéficos sejam afetados pelo produto, tal como ocorre com inseticidas químicos, bem como a compatibilidade do controle biológico com o método de manejo integrado de pragas (MIP).

Bioinseticidas a base do fungo *Metarhizium anisopliae* são utilizados no Brasil em larga escala em pastagens para o controle da cigarrinha da pastagem (*Notozulia entriana*), cigarrinha-dos-capinzais (*Deois flavopicta*), e principalmente no cultivo de cana-de-açúcar para o controle da cigarrinha-da-cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata*).

Para o desenvolvimento de um bioinseticida primeiramente é necessário produzir em massa propágulos do microrganismo de interesse, o que pode ser realizado por meio do cultivo em substrato líquido ou substrato sólido. Apesar de o método mais popular de produção de *Metarhizium anisopliae* ser realizado em substrato sólido (arroz parboilizado), o método de produção em substrato líquido, foco deste trabalho, oferece algumas vantagens interessantes para indústria como menor demanda de mão de obra, espaço físico, e menor tempo requerido para produção de propágulos.

O meio de cultura, no qual o microrganismo é cultivado deve suprir toda demanda nutricional da espécie fúngica, sendo composto por fontes de carbono, nitrogênio e minerais equilibrados para proporcionar a maior quantidade de propágulos com menor tempo e custo possível. Visto isso, o trabalho

objetiva encontrar a composição do meio de cultura em conjunto com os parâmetros de cultivo que proporcione a maior produção de propágulos (blastosporos) do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425.

Metodologia

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá. No qual foi utilizado o fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 cedido pelo Instituto biológico de São Paulo.

Os meios de cultura utilizados no presente trabalho foram baseados nos trabalhos desenvolvidos por Vega et al. (2003), Jackson; Jaronski (2009) e Santos (2017), e foram compostos de sacarose como fonte de carbono e farinha de soja, extrato de malte e peptona de caseína como fontes de nitrogênio com as quantidades descritas detalhadamente na Tabela 1. Adicionalmente aos meios de cultura foram adicionados como fontes de minerais 1 g/L de KCl; 0,36 g/L de KH_2PO_4 e 0,6 g/L de MgSO_4 e o pH ajustado para 5,5.

Tabela 1. Meios de Cultura para o fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425.

Meio de Cultura	Relação C/N	Quant. C	Quant. N	Sacarose	Farinha de Soja	Extrato de Malte	Peptona de Caseína
		-----g/L-----					
1	5:1	20	4	32	42	—	—
2	10:1	20	2	40	21	—	—
3	5:1	20	4	25	40	12,6	—
4	10:1	20	2	36	21	6,3	—
5	5:1	20	4	48	—	—	34,7
6	10:1	20	2	48	—	—	17,35

Os cálculos se basearam em sacarose contendo 42% de carbono, extrato de malte contendo 24% de carbono e 0,8% de nitrogênio, farinha de soja contendo 16% de carbono e 9,6% de nitrogênio, peptona de caseína contendo 11,5% de nitrogênio.

O isolado *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 armazenado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia e Zootecnia da UFMT, em geladeira, foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), e incubado em incubadora com demanda biológica de oxigênio durante 10 dias a 26 °C com fotoperíodo de 12:12 horas de luz e escuro.

Os conídios foram coletados mediante a raspagem das placas com solução salina e espalhante adesivo Tween 80 (0,04%), para obter a suspensão conidial, a qual foi quantificada em microscópio óptico com aumento de 40x com auxílio de hemocitômetro de Neubauer.

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de cada meio de cultura nos quais foram inoculados de forma padronizada a concentração de 10^8 conídios para todas as amostras, em seguida incubados a 26°C em mesa agitadora orbital (Shaker) a 150 rotações por minuto (rpm).

Resultados e Discussão

Os resultados demonstram (Tabela 2) que os meios de cultura 2 ($1,20 \times 10^8$) e 4 ($9,75 \times 10^7$) apresentaram maior produção de blastosporos/mL após 3 dias de cultivo não diferindo

significativamente, em seguida o meio de cultura 1 ($1,25 \times 10^7$). O meio de cultura 3 apresentou baixa produção de blastosporos, já os meios de cultura 5 e 6 não apresentaram produção de blastosporos, no entanto foi observado durante as avaliações que o meio de cultura 3 apresentou alta produção de biomassa fúngica e os meios de cultura compostos por peptona de caseína (5 e 6) como fonte de nitrogênio não apresentaram crescimento de blastosporos e ainda baixa produção de biomassa, o que evidencia que esta fonte não é adequada para o cultivo de *M. anisopliae*.

Dentre os meios de cultura mais produtivos, observa-se que ambos possuem semelhanças quanto a relação de carbono e nitrogênio 10:1, bem como a farinha de soja na composição do meio de cultura, como fonte carbono e nitrogênio, o que indica que, a relação C/N 10:1 é a mais adequada para a estirpe IBCB 425 de *M. anisopliae* avaliada, assim como a farinha de soja se apresenta como um ingrediente promissor para produção em massa de propágulos de *M. anisopliae*.

Já após 4 dias de cultivo, o meio de cultura que apresentou maior produção de blastosporos foi o meio de cultura 2 ($1,01 \times 10^8$), diferindo significativamente do meio de cultura 4 ($6,76 \times 10^7$), e ao final o meio de cultura 1 ($1,25 \times 10^7$). Os meios 3, 5 e 6 apresentaram os mesmos resultados obtidos após 3 dias de agitação.

Visto que a produção de blastosporos atingiu o pico de produção após 3 dias de cultivo, e em seguida houve queda na quantidade de blastosporos/mL, o ensaio indica que a fermentação de *M. anisopliae* IBCB 425 deve ser conduzida até o 3º dia, a fim de obter maior produção de blastosporos, otimizar o tempo para produção de lotes subsequentes, e reduzir custos com energia.

Tabela 2. Número de blastosporos nos diferentes meios de cultura avaliados para *Metarhizium anisopliae* IBCB 425.

Meios de cultura	Blastosporos/mL	
	3 Dias	4 Dias
1	$1,25 \times 10^7$ b	$1,25 \times 10^7$ c
2	$1,20 \times 10^8$ a	$1,01 \times 10^8$ a
3	—	—
4	$9,75 \times 10^7$ a	$6,76 \times 10^7$ b
5	—	—
6	—	—
CV %	28,75	26,53

* Tratamentos simbolizados por — não apresentaram produção de blastosporos, ou baixa produção $< 10^5$.

**Tratamentos seguidos pelas mesmas letras não diferem significativamente com base no Teste Tuckey a 5% de significância.

Em trabalho de Vega et al. (2003), no qual foram testados meios de cultura líquido com relações C/N (10:1, 30:1, 50:1) e concentrações de C (8 e 36 g/L), para o isolado de *M. anisopliae* ARSEF 4901, os autores não verificaram diferença significativa na produção de blastosporos entre os tratamentos avaliados, as produções obtidas neste trabalho foram entre $1,4 \times 10^7$ a $3,7 \times 10^7$ após 4 dias de fermentação, o que indica a necessidade da avaliação da relação C/N para cada isolado.

Jackson e Jaronski (2009) testaram meios de cultura com relações C/N e concentrações diferentes estirpes de *M. anisopliae*, no qual obtiveram ($1,61 \times 10^8$ blastosporos/mL) para a estirpe MA1200 em meio de cultura composto por 36 g/L de C, e relação C/N 10:1; ($2,68 \times 10^6$ blastosporos/mL) para a estirpe F52 em meio de cultura com 36 g/L de C, e relação C/N 50:1, e para estirpe TM109 não houve diferença significativa entre as relações C/N para os meios de cultura com 36 g/L de C ambos

todos após 4 dias de cultivo. Embora o trabalho citado seja com estirpes distintas, reforça a particularidade de cada estirpe quanto a produção em meios de cultura.

Os estudos de Jackson e Jaronski (2014) com produção de *M. brunneum* estirpe F52 demonstraram a viabilidade da produção de propágulos em massa, por meio de fermentação líquida em biorreatores sem a perda na qualidade do bioinseticida. No entanto, é necessário otimizar o meio de cultivo, bem como os parâmetros de cultivo para a estirpe de interesse.

Ottati-de-Lima et al. (2014), avaliaram meios de cultura líquido para *M. anisopliae* IBCB 42, no qual obtiveram maior produção de blastosporos em meios de cultura com menores concentrações de carbono 16 e 14,4 g/L e extrato de levedura como fonte de N, atingindo produções de $1,45 \times 10^8$ e $1,54 \times 10^8$ blastosporos/mL respectivamente. Ainda que tenha sido utilizada a mesma estirpe, a composição dos meios de cultura interfere drasticamente na produção de blastosporos, visto que ao utilizar peptona de caseína não houve produção de blastosporos.

No trabalho de Santos (2017), no qual foram testados meios de cultura líquido para o fungo *M. anisopliae* estirpe ESALQ1037, a maior produção de blastosporos ($1,2 \times 10^8$ blastosporos/mL) foi verificada em meio de cultura composto de 36 g L^{-1} de C com relação C/N 10:1, de modo semelhante ao trabalho realizado com IBCB 425 no presente trabalho.

Conclusões

O estudo demonstrou o potencial do uso da farinha de soja como fonte de nitrogênio na produção de blastosporos de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425, bem como a relação carbono e nitrogênio 10:1 que se apresentou como a mais compatível para a estirpe utilizada e por fim o tempo de cultivo de 3 dias que se mostrou mais adequado.

Referências

JACKSON, M.A; JARONSKI, S.T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological research**, v. 113, p. 842-50, 2009. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756209000744> >. doi: 10.1016/j.mycres.2009.03.004.

JACKSON, M.A; JARONSKI, S.T. Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52, **Biocontrol Science and Technology**, v. 22 n. 8, p. 915-930, 2012. Disponível em: < <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/56479> >. doi: 10.1080/09583157.2012.696578.

OTTATI-DE-LIMA, E.L. et al. Liquid production of entomopathogenic fungi and ultraviolet radiation and temperature effects on produced propagules. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 4, p. 342-350, 2014. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572014000400342&lng=en&tlng=en >. doi: 10.1590/1808-1657001352012.

SANTOS, P. S. Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales). Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2017. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-09082017-145110/pt-br.php> >. doi: 10.11606/T.11.2017.tde-09082017-145110.

VEGA et al. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 363–368, 2003. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1023924304456> >. doi: 10.1023/A:1023924304456.