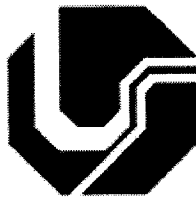


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Contribuição ao estudo do cultivo do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae*

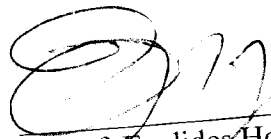
Autora: Fernanda Suzana Garcia

Uberlândia-MG  
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO CULTIVO DO FUNGO FILAMENTOSO  
*Metarhizium anisopliae*

Fernanda Suzana Garcia

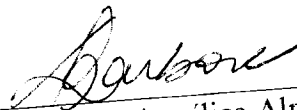


---

Prof. Euclides Honório do Araújo  
Orientador



Homologado pela coordenação do Curso  
de Ciência Biológicas em 10/07/2003



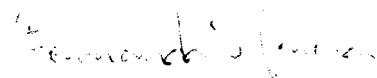
---

Prof. Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa  
Coordenadora

Uberlândia-MG  
Agosto-2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Contribuição ao estudo do cultivo do fungo filamentosso *Metarhizium  
anisopliae*

  
Autora: Fernanda Suzana Garcia

Monografia de graduação apresentada à  
Universidade Federal de Uberlândia como  
dos requisitos necessários para a  
aprovação na disciplina de Iniciação Científica II  
do curso de Ciências Biológicas

Uberlândia-MG  
2003

## RESUMO

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados no controle microbiano. Esses endopatógenos são estudados no Brasil há mais de sessenta anos, todavia, somente depois de 1964, com a ocorrência epizootica de *Metarhizium anisopliae* em cigarrinhas da cana de açúcar, que os fungos receberam mais atenção. Através de técnicas laboratoriais é possível selecionar fungos altamente virulentos, com o objetivo de utilização como bioinseticida. O fungo *Metarhizium anisopliae* é utilizado como bioinseticida especialmente contra gafanhotos, sua principal vantagem é não causar danos ao meio ambiente como os inseticidas tradicionais, bem como o custo menos elevado.

O objetivo deste trabalho foi estudar as melhores condições de cultivo do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* maximizando sua concentração celular. Foram acompanhados durante a fermentação, o pH, o crescimento da massa celular e o consumo de glicose. O pH estabilizou-se em torno de 3,0, tornando-se ácido durante a fermentação.

O Meio de Cultura utilizados para a fermentação do bolor, Meio de Cultura 1, contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 e 10,0 g/L). O fungo cresceu bem com meios numa concentração de glicose 20,0 g/L e fosfato de potássio 5,0 g/L. O crescimento do fungo durante a fermentação foi na forma de "pellets". O meio relacionado à composição apresentava uma coloração amarelada de intensidade média, o que facilitava a visualização das pequenas esferas que formavam o crescimento do fungo ao longo do tempo.

Durante todos os ensaios realizados observou-se o consumo de substrato no decorrer do tempo, com conseqüente crescimento celular. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular e a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo a média para os ensaios realizados de  $Y = 0,587$ .

Palavras-chave: Bioinseticida, *Metarhizium anisopliae*, Fermentação de bolores.

Dedico este trabalho a todos que me deram força especialmente à minha mãe, Adelair, que sempre foi uma guerreira proporcionando a mim todos estes anos de estudo, ao meu pai, Osvaldo; às minhas irmãs Simone e Juliana; às minhas amigas de república, que sempre foram minha família aqui em Uberlândia; aos meus avós, Geraldo e Maria, obrigada por tudo, nem tenho palavras pra dizer quanto sou grata.

### AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr. Euclides Honório Araújo, pela oportunidade, pela paciência, pelos conselhos durante todas as etapas deste trabalho.
- Ao meu companheiro de pesquisa em muitas etapas, Cristian Jacques Bolner de Lima.... desejo muito sucesso a você e que seus planos se concretizem em breve!
- À Faculdade de Engenharia Química, pelo espaço.
- À Renata Pimentel por toda ajuda prestada no início desta jornada .
- À Roberta Fusconi por mostrar toda a beleza destes seres tão minúsculos, e me fazer despertar para este ramo da ciência.
- À todos os funcionários que fazem com que este laboratório permaneça harmônico.
- À Berta pela descontração ao final de cada dia de trabalho.
- À Fabiana pelas intermináveis “caronas” sempre muito importantes pra mim, pela força em momentos difíceis, pela paciência em ouvir minhas lamentações e planos futuros....você foi muito importante durante minha formação acadêmica.
- À Carol pelo apoio sempre que precisei.
- À todos que estiveram de alguma forma presentes nestes momentos.

*"Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui; sê todo em cada coisa, põe quanto és no mínimo que fazes. Assim, em cada lago a lua toda brilha porque alta vive." –Fernando Pessoa*

## ÍNDICE

1-INTRODUÇÃO	01
1.1- <i>Metarhizium anisopliae</i>	01
1.2-O ciclo das relações Fungo-Hospedeiro	02
1.3-Produção do Fungo Entomopatógeno	05
2-OBJETIVO	06
3-MATERIAL E MÉTODOS	07
3.1-Microrganismo	07
3.2-Meios de Cultura	07
3.3-Preparação do Agar	08
3.4-Cultivo do <i>Metarhizium anisopliae</i>	08
3.4.1-Pré –Cultura	08
3.4.2- Testes de Cultivo em incubadora com agitação	09
3.4.3-Análises Físicas e Químicas	09
3.4.4-Construção da Curva de Calibração	10
4-Resultados e Discussão	12
4.1-Ensaio em Incubadora com Agitação	12
5-CONCLUSÕES	26
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

## 1-INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos de tamanhos e formas variadas. Podem ser unicelulares, como no caso das leveduras, ou constituídos de um conjunto de filamentos de micélio, por sua vez compostos de células denominadas hifas, com parede constituída quimicamente de quitina e/ou celulose, além de outros açúcares, como glucanas. As hifas podem ter um ou mais núcleos, contidos na mesma célula hifal, ou apresentar os núcleos em uma massa citoplasmática contínua sem os septos transversais (micélio conicítico).

Esses agentes foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano. A maioria dos gêneros de fungos endopatógenos já relatados ocorrem no Brasil, sendo que, desses 20 incidem sobre pragas que causam perdas econômicas. A ocorrência desses fungos em condições naturais tem sido em vários países um fator importante na redução das populações de pragas. Alguns fungos são patógenos de largo espectro, capazes de atacar insetos aquáticos e fitófagos que vivem na parte aérea da planta e no solo, podendo causar epizootias naturais. Podem infectar diferentes estágios dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo esta característica desejável e muito peculiar deste grupo, alguns são virulentos e a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem frente a outros grupos de patógenos que só conseguem penetrar no inseto via oral.

Estima-se que existam aproximadamente 1 milhão de espécies de insetos, de um total de mais de 2.5 milhões, que provavelmente ocorram sobre a Terra. Desse total, cerca de 10% podem ser considerados pragas agrícolas ou pragas urbanas (CADATAL et al, 1970). Mais de setecentas espécies de fungos já foram encontradas parasitando insetos ou mantendo com estes outros tipos de interações.

De acordo com ALVES (1985), fungos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* podem ser específicos ou causar doenças em um grande número de hospedeiros.

### 1.1-*Metarhizium anisopliae*

O gênero *Metarhizium* está classificado dentro da Subdivisão Deuteromycotina, Classe Hifomicetos e na Família Moniliaceae (HERREIRA & ULLOA, 1998); outros gêneros importantes representados na mesma classificação são: *Aspergillus*,



*Paecilomyces* e *Beauveria*, todos podendo ter como hospedeiros os insetos (ALVES, 1983).

Os endopatógenos vem sendo estudados no Brasil há mais de sessenta anos, contudo foi somente a partir de meados dos anos sessenta, com a ocorrência epizootica de *Metarhizium anisopliae* sobre as cigarrinhas da cana-de-açúcar, que os fungos receberam mais atenção dos pesquisadores (ALVES, 1995).

Em artigo recente de FRAZÃO et al (2000) ficou demonstrada a vantagem de *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* com relação a *Beauveria bassiana* em esporulação realizadas em cadáveres de gafanhotos.

Um programa muito conhecido no país de utilização do fungo é o controle da cigarrinha *Mahanarva posticata* em cana-de-açúcar com *M. anisopliae*. Em 1987, foram tratados 130.000 hectares de cana-de-açúcar com este patógeno. Mais recentemente a ESALQ-USP vem desenvolvendo e demonstrando a possibilidade de uso deste fungo no combate de carrapatos, pernilongos, baratas e pragas de grãos armazenados, conforme relatos de ALVES (1998).

## **1.2- O ciclo das relações fungo-hospedeiro**

O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como: temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, assim como as condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro, apresentando as seguintes fases:

A adesão representa um evento complexo, sendo o primeiro do ciclo das relações fungo-hospedeiro, que ocorre após a deposição do fungo sobre o inseto e visa a preparação do local para a fase de penetração.

Os mecanismos envolvidos na adesão ainda não são totalmente conhecidos. Para alguns fungos, a adesão parece ser um processo simples, mas, para outros, esse fenômeno só pode ser explicado através de interações moleculares entre o patógeno e a superfície do hospedeiro que lhe servirá de alimento (ALVES, 1986).

Durante a germinação, encontrando condições favoráveis de umidade, tempo, pH, oxigênio e nutrição, o fungo germina sobre o inseto, produzindo um tubo germinativo. As condições ótimas para germinação dependem da espécie e da origem dos isolados. De modo geral, em condições de laboratório, a germinação pode ocorrer no mínimo em 12 horas, a uma temperatura de 23 a 30°C e umidade relativa acima de 90%. Isolados de

*M. anisopliae* específico para escarabeídeos necessitam de elevados níveis de nutrientes nitrogenados para germinação (ST. LEGER et al.1992).

Na extremidade do tubo germinativo ocorre uma dilatação das hifas, formando uma estrutura denominada apressório. Ocorre, nesta fase, a migração do conteúdo citoplasmático para o tubo germinativo, transformando este local em um centro de elevada atividade metabólica que se caracteriza pela presença de mitocôndrias, ribossomos e outros componentes nucleares. Essa estrutura ocorre em *Beauveria*., *Metarhizium*, *Erynia*, *Neozygites*, mas pode também se formar de modo característico em determinadas condições. Para *N. rileyi* e outros fungos que normalmente não produzem apressório pode se formar uma massa mucilaginosa ao redor do tubo germinativo, a qual também teria função de adesão e de facilitar a produção de enzimas. Para alguns fungos pode ocorrer uma reunião de várias hifas, dando origem a uma estrutura apressorial que tem ação na penetração do fungo (ALVES, 1986).

A formação de grampo de penetração ocorre na parte inferior do apressório podendo ocorrer uma diferenciação da hifa, tornando-a mais fina e saliente, que teria a função de iniciar o processo de penetração da epicutícula e procutícula do tegumento do inseto. Nem todos os fungos apresentam essa estrutura muito característica.

Na penetração estão envolvidos dois processos principais, o físico, devido a pressão da hifa terminal que rompe as áreas membranosas ou esclerosas, e o químico, resultante da elaboração de enzimas (proteases, lípases e quitinases), as quais facilitam a penetração mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo. Na área da procutícula, ao redor do local de penetração, aparecem sintomas de histólise (decomposição do tecido por ação enzimática). Algumas enzimas podem estar correlacionadas com a agressividade de certos fungos para determinados hospedeiros, porém a morte do inseto é ocasionada por uma série complexa de eventos, o que dificulta o estudo dessa correlação (ALVES, 1986).

O aparelho bucal, espiráculo, ânus, sifão respiratório e tarsos são locais de penetração, porém as membranas intersegmentais do abdome são tidas como a porta de entrada mais comum para os fungos em geral.

A partir de penetração inicia-se o processo de colonização do hospedeiro pelo fungo. A hifa que penetra sofre um engrossamento e se ramifica inicialmente no tegumento do inseto e posteriormente na hemocele. Normalmente não ocorre grande crescimento hifal dentro do inseto antes de sua morte. No inseto morto, o fungo cresce

interiormente e todos os tecidos são penetrados por hifas filamentosas. Não ocorre a desintegração dos tecidos por microrganismo saprófitos que vivem dentro e sobre o inseto, porque o patógeno secreta substância antibiótica, como a oosporina, responsável pela coloração rosa dos cadáveres. A colonização dos diversos órgãos apresenta, provavelmente a seguinte seqüência: corpos gordurosos, sistema digestivo tubos de Malpighi, hipoderme e sistema nervoso, músculos e traquéias. Durante o processo de colonização, o fungo secreta substâncias tóxicas que podem afetar as células e as reações do hospedeiro. Também, durante esse estágio, os hospedeiros desencadeiam na hemocele as suas reações celulares e humorais de defesa contra a presença do fungo, tais como encapsulação, nodulação e outras (ALVES, 1986).

O tempo para colonização pode variar de 72 a 120 horas, dependendo do inseto, patógeno e das condições ambientais.

Os sintomas iniciais da doença podem aparecer como manchas escuras nas pernas, regiões intersegmentais ou distribuídas por todo tegumento. O inseto cessa a alimentação, ficando fraco, apresenta sintomas de paralisia, perde a coordenação dos movimentos e fica desorientado. Posteriormente, o tegumento torna-se róseo (no caso de *B. bassiana* e *M. anisopliae* infectando lagartas), para depois o inseto adquirir a coloração esbranquiçada, devido ao crescimento do micélio (HERLICH, et al 1975).

Após a morte do inseto que ocorre entre dois e oito dias após a inoculação (alguns inseto como cupins, baratas etc, quando submetidos a elevado potencial de inóculo podem morrer em um período de 12 a 24 horas) as hifas começam a emergir pelos espiráculos e usando pressão mecânica saem através das áreas mais fracas (região intersegmentar) depois pela cutícula mais grossa. O micélio cobre toda a superfície do corpo, iniciando pelos espiráculos e áreas intersegmentais.

A morte ocorre devido à produção de micotoxina, mudança patológica na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo devido ao crescimento do micélio e do início do processo de esporulação do fungo (LEUCONA, 1986).

Os cadáveres de cigarrinhas, lagartas e percevejos, parasitados pelo fungo *M. anisopliae* apresentam coloração verde oliva, ou verde acinzentado.

## 2-OBJETIVOS

Este trabalho apresenta como principais objetivos.

- Verificar a influência de diferentes concentrações de glicose e fosfato de potássio na produção de massa celular de *Metarhizium anisopliae*;
- Testar diferentes condições operacionais durante as fermentações, definindo as melhores para seu cultivo;
- Verificar o pH ideal para o melhor crescimento;
- Estabelecer um padrão ideal de cultivo que possibilite a posterior utilização no mercado de um bioinseticida eficiente.

### 3-MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Microrganismo

O fungo filamentososo *Metarhizium anisopliae* NRRL 3220 foi obtido da coleção de culturas Tropicais da Fundação de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, de Campinas, SP, na forma liofilizada.



Figura 1- placa com o fungo *Metarhizium anisopliae*

#### 3.2- Meios de Cultura

-Agar Sabouraud Dextrosado (g/L):

Peptona de Carne (5,0 g/L), Glucose (20,0 g/L), Agar (15,0 g/L).

- Meio de Cultura 1:

Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L).

- Meio de cultura 2:

Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (10,0 g/L).

O meio foi preparado adicionando-se 1000 mL de água destilada.

Após a homogeneização destas substâncias, foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C.

### **3.3- Preparação do Agar**

A cepa do fungo *Metarhizium anisopliae* foi aberto e suspenso em aproximadamente 3 mL de água destilada e esterilizada. Em seguida com o auxílio de uma pipeta efetuou-se a inoculação em tubos de ensaio previamente autoclavados e tampados com chumaço de algodão, contendo 10 mL de Agar Sabouraud Dextrosado, o qual foi solidificado em tubos de ensaio inclinados para aumentar a área superficial, sendo todo o procedimento realizado em câmara de fluxo laminar.

Após esta primeira etapa o microrganismo era mantido em estoque e ativo, para tanto foram feitos repiques a cada 2 meses. Para a realização do repique, um tubo de ensaio contendo o fungo em cultura pura era aberto e suspenso em água destilada e esterilizada. Com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada raspava-se levemente a superfície, posteriormente com o uso de uma pipeta graduada, transferia-se cerca de 0,5 mL desta suspensão para outros tubos de ensaio contendo também 10 mL de Agar Sabouraud Dextrosado, solidificado na posição inclinada, e autoclavados, sendo os mesmos tampados com chumaço de algodão. Tal procedimento era realizado em câmara de fluxo laminar.

Os tubos inoculados eram colocados em temperatura ambiente por 48 horas para verificar o sucesso da inoculação e observar se houve contaminação do meio de cultura por outro microrganismo. Após esta etapa, os tubos de ensaio contendo a cultura pura eram mantidos em uma câmara fria (5°C) para diminuir o metabolismo do fungo, e mantidos até futura necessidade de uso (FERREIRA, 2000).

### **3.4- Cultivo de *Metarhizium anisopliae***

#### **3.4.1- Pré Cultura**

Na pré-cultura, o meio de glicose era distribuído em erlenmeyers, contendo 100 mL em cada.

- o inóculo consistia na raspagem dos esporos com o auxílio de uma alça de platina, obtidos dos tubos de ensaio contendo cultura pura. Posteriormente este meio era levado para incubadora com agitação durante 120 horas.

- já para a inoculação em meio líquido é necessário conhecer-se a quantidade de esporos, expressa em esporos/mL. Isto foi realizado com o auxílio de uma câmara de Neubauer, da Optik Labor, com profundidade de 0,1 mm e área do menor quadrado de  $0,0025 \text{ mm}^2$

Possuindo, portanto um volume de  $0,0025 \text{ mm}^3$  que é uma lâmina para microscópio onde há divisões quadriculares com volume conhecido, onde é possível contar os esporos presentes.

A partir da solução filtrada, retira-se uma amostra com o auxílio de uma pipeta Pasteur colocando-a na câmara de Neubauer. Em seguida, com o auxílio de um microscópio com objetiva 40X conta-se a quantidade de esporos presentes em 5 quadros aleatórios com volume conhecido de cada quadro de  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mL}$  e em seguida fez o cálculo da média do número de células contadas.

#### **3.4.2- Testes de Cultivo em Incubadora com Agitação:**

Os ensaios realizados na incubadora com agitação foram mantidos em elernmeyers com um volume total de 100 mL de inóculo, durante 120 horas a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e agitação constante 150rpm. Para estes experimentos, utilizou-se meios de glicose, efetuando as análises para massa seca e açúcares redutores a cada 24 horas.

#### **3.4.3- Análises Físicas e Químicas**

##### **A) Massa Seca**

1- Filtração- massa seca foi determinada filtrando-se o material retirado com o auxílio de uma bomba a vácuo, com papel filtro de faixa branca de 9cm de diâmetro, previamente pesado.

A massa filtrada juntamente com o papel foi colocada na estufa na temperatura de  $105^\circ\text{C}$  por um período de 24 horas para eliminar a umidade presente. A seguir era feita uma nova pesagem dos papéis de filtro, agora contendo a massa filtrada e a massa seca

foi obtida por diferença de massa líquida do papel. A pesagem foi feita em balança analítica com precisão de 4 casas decimais.

2 – Centrifugação: utiliza-se a centrifugação por um intervalo de 5 minutos, numa temperatura de 15°C a uma velocidade de 15000 rpm em centrífuga automática, ao final da centrifugação, retirava-se a massa e colocava em papel de filtro na estufa na temperatura de 105°C por 24 horas.

### **B) Açúcares redutores**

A determinação da concentração dos açúcares no meio foi feito pelo método do DNS (MILLER, 1959). Este método dosa a concentração de açúcares redutores.

### **C) Fator de rendimento**

O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular e a variação do açúcar consumido foi feito de acordo com a função  $Y^{x/s} = -\Delta x / \Delta s$ , partindo da concentração inicial de glicose (20,0 g/L).

#### **3.4.4 – Construção da curva de calibração.**

Para obtenção das concentrações de Glicose foi construída uma curva de calibração para a glicose, com valores de concentração em função da transmitância obtida pela leitura no espectrofotômetro.

Para a construção da curva foram preparadas soluções de concentrações conhecidas de glicose em 10 balões volumétricos de 100 mL cada, com concentrações na faixa de 0,1 a 1,0 g/L. O método utilizado para a construção da curva foi o DNS.

A Tabela 1 apresenta os valores de concentração e transmitância usados na construção da curva de calibração, a Figura 1 mostra a curva obtida juntamente com a equação empírica ajustada a sua correlação.



Tabela 1 – Dados para a construção da curva de calibração da glicose

Concentração	Log T
0,1	1,98
0,2	1,96
0,3	1,93
0,4	1,88
0,5	1,87
0,6	1,85
0,7	1,81
0,8	1,78
0,9	1,76
1	1,72

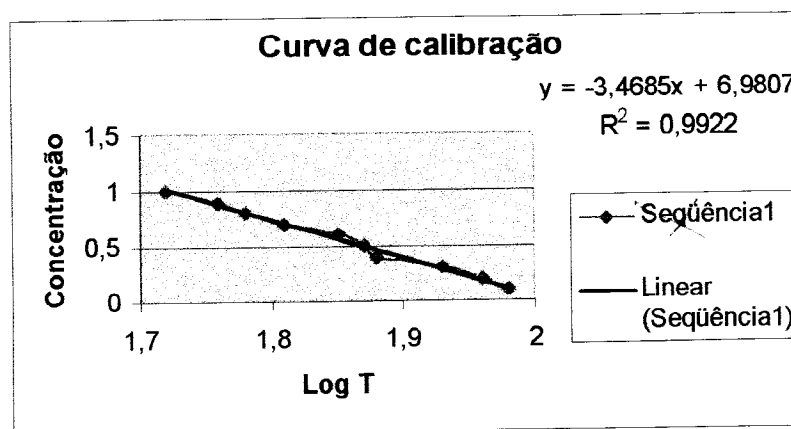


Figura 2 –Curva de Calibração da Glicose

Pela curva de calibração com  $R^2 = 0,9922$  obteve-se a Equação 1 que relaciona a concentração de Glicose em função da transmitância:

$$C \text{ (g/L)} = - 3,4685 \cdot T \text{ (\%)} + 6,9807$$

## 4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1-Ensaio em Incubadora com agitação

A Tabela 2 apresenta as condições do Meio de Cultura 1, contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L) referente aos Ensaio de 1 a 7; Meio de Cultura 2, contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (10,0 g/L), referente aos Ensaio de 8 a 10.

Ensaio	pH inicial	pH Final	Temperatura °C	Concentrações (g/L)				
				Glicose	Fosfato de potássio	Extrato de malte	Extrato de levedura	Sulfato de amônio
1	5,29	2,77	37	20,0	5,0	1,2	2,5	3,0
2	5,26	2,74	37	20,0	5,0	1,2	2,5	3,0
3	5,02	2,43	37	20,0	5,0	1,2	2,5	3,0
4	5,22	3,09	37	20,0	5,0	1,2	2,5	3,0
5	5,45	2,65	37	20,0	5,0	1,2	2,5	3,0
6	5,32	2,86	37	20,0	5,0	1,2	2,5	3,0
7	5,08	2,92	37	20,0	5,0	1,2	2,5	3,0
8	5,02	2,65	37	20,0	10,0	1,2	2,5	3,0
9	4,85	2,9	37	20,0	10,0	1,2	2,5	3,0
10	4,95	2,8	37	20,0	10,0	1,2	2,5	3,0

Apresentação individual dos Ensaio de 1 a 10 estão representados nas Tabelas de 3 a 12. Os valores da concentração de glicose e massa seca são expressos de acordo com as médias calculadas através dos valores observados nos respectivos Ensaio.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos na incubadora, utilizando-se como Meio de Cultura glicose, numa temperatura de 37 ° C.

Tabela 3 -Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L), referente ao Ensaio 1.

Tempo(h)	Transmitância(%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular(g/L)
0	71.7	5.29	12,95	0
0	74.3	5.33		
24	71.8	5.20	12,935	1
24	72.2	5.21		
48	78.3	3.40	2,46	7
48	78.2	3.49		
72	81.8	3.43	2	8
72	81.8	3.27		
96	89.4	2.86	1,19	10
96	88.0	2.85		
120	90.3	2.76	1,06	11
120	90.7	2.77		

Os resultados da Tabela 3 são apresentados na Figura 3

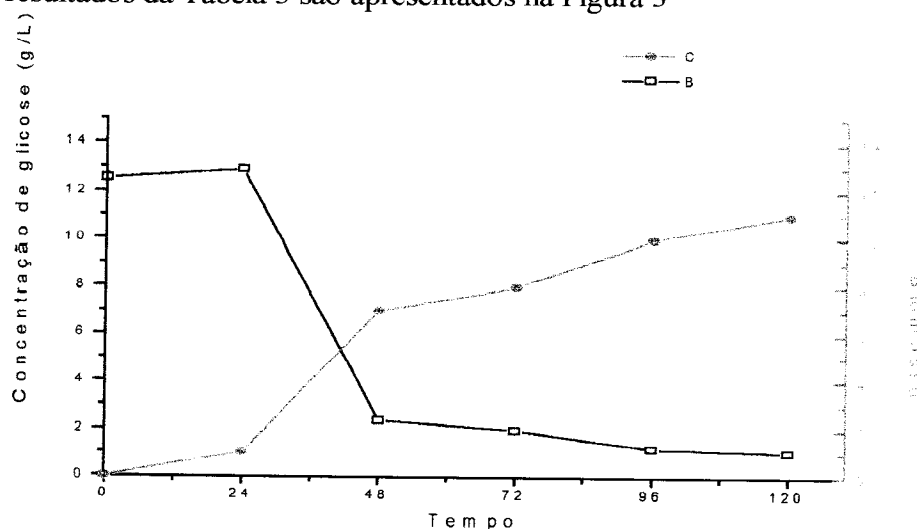


Figura 3– Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 1 demonstrado na Tabela 3 observou-se que houve o consumo do substrato no decorrer do tempo, a massa celular também aumentou proporcionalmente ao consumo. Notou-se ainda que o crescimento máximo do fungo ocorreu até 72 horas. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y = 0,56$ .

Tabela 4- Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L), referente ao Ensaio 2.

Tempo (h)	Transmitância (%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular (g/L)
0	85.9	5.26	12,75	0
0	86.2	5.31		
24	86.0	5.21	13,1	0,545
24	84.8	5.22		
48	84.5	4.16	7	8,5
48	84.4	4.18		
72	84.1	3.10	7	11,5
72	83.5	3.06		
96	88.7	2.94	5,7	12,5
96	86.7	2.90		
120	94.1	2.77	3	12
120	93.2	2.74		

Os resultados da Tabela 4 são apresentados na Figura 4

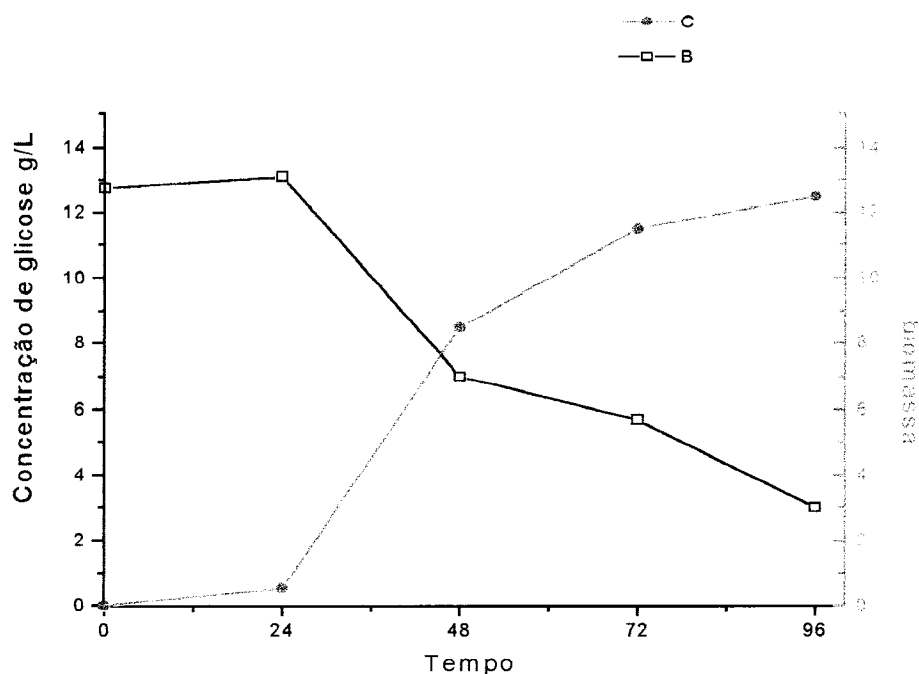


Figura 4 –Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 2 demonstrado na Tabela 4, o consumo do substrato teve uma diminuição por volta de 48 horas com posterior retomada do consumo e observou-se que a massa celular teve um crescimento contínuo. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y = 0,70$ .

Tabela 5- Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L), referente ao Ensaio 3.

Tempo (h)	Transmitância (%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular (g/L)
0	84,2	5,02	13,6	0
0	85,7	4,83		
24	84,5	4,82	13,2	0,895
24	86,3	4,65		
48	70,4	3,68	12,775	2,313
48	72,5	3,62		
72	78,3	3,3	10,025	9,252
72	76,4	3,16		
96	77,9	2,84	9,175	9,106
96	80,6	2,73		
120	79,3	2,47	9,125	9,144
120	79,6	2,43		

Os resultados da Tabela 5 são apresentados na Figura 5

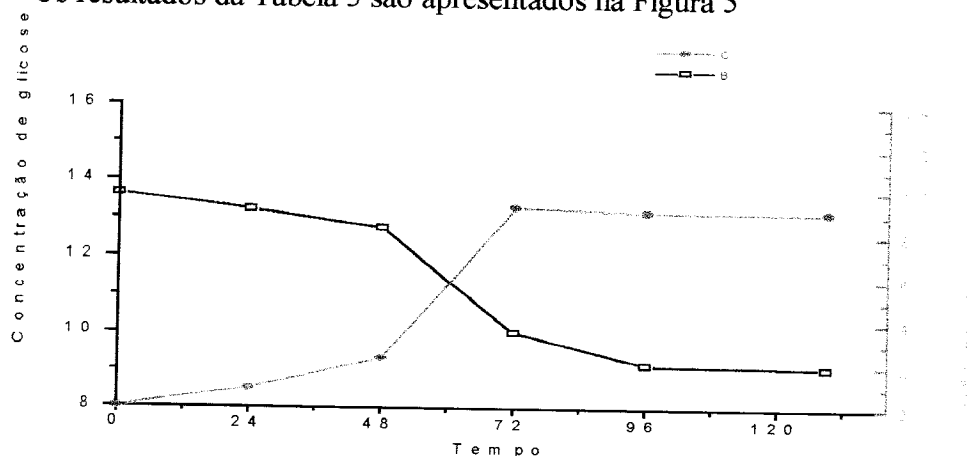


Figura 5 –Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 3 demonstrado na Tabela 5, o consumo do substrato teve uma diminuição por volta de 48 horas, observou-se também que a massa celular teve um crescimento contínuo com maior expressão por volta de 48 horas e estabilidade em torno de 72 horas. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y = 0,84$ .

Tabela 6- Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L), referente ao Ensaio 4.

Tempo (h)	Transmitância (%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular(g/L)
0	84,2	5,22	14,075	0
0	84,5	5,19		
24	83,4	4,92	14,65	1,451
24	83,8	5,03		
48	74,4	3,89	10,88	8,33
48	76,6	3,78		
72	78,3	3,58	9,6	9,152
72	78,3	3,57		
96	83,7	3,08	7	8,522
96	81,7	3,14		
120	78,9	3,12	9,32	9,102
120	79,1	3,09		

Os resultados da Tabela 6 são apresentados na Figura 6

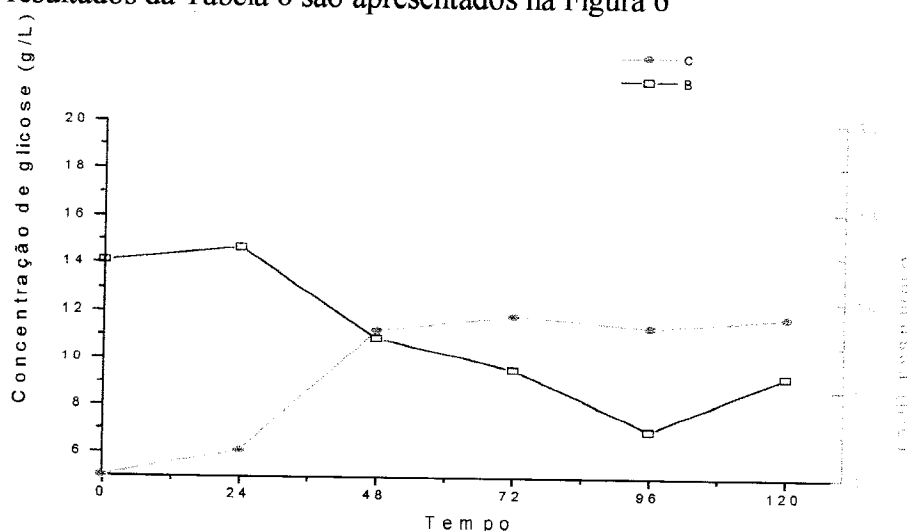


Figura 6 –Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 4 demonstrado na Tabela 6, o consumo do substrato acentuou-se por volta de 24 horas sendo contínuo até 96 horas e observou-se que a massa celular teve um crescimento contínuo a partir de 24 horas mantendo-se estável por volta de 48 horas. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y = 0,64$ .

Tabela 7- Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L), referente ao Ensaio 5.

Tempo	Transmitância (%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular(g/L)
0	82,8	5,45	16,25	0
0	83,1	5,2		
24	82,9	4,7	16,75	1,113
24	82,5	4,36		
48	71,7	3,78	14	2,471
48	71	3,65		
72	74,2	5,88	12,625	2,877
72	73,7	5,77		
96	77	5,53	11	4,1
96	77,1	2,84		
120	74,5	2,88	12,5	6,92
120	73,8	2,65		

Os resultados da Tabela 7 são apresentados na Figura 7

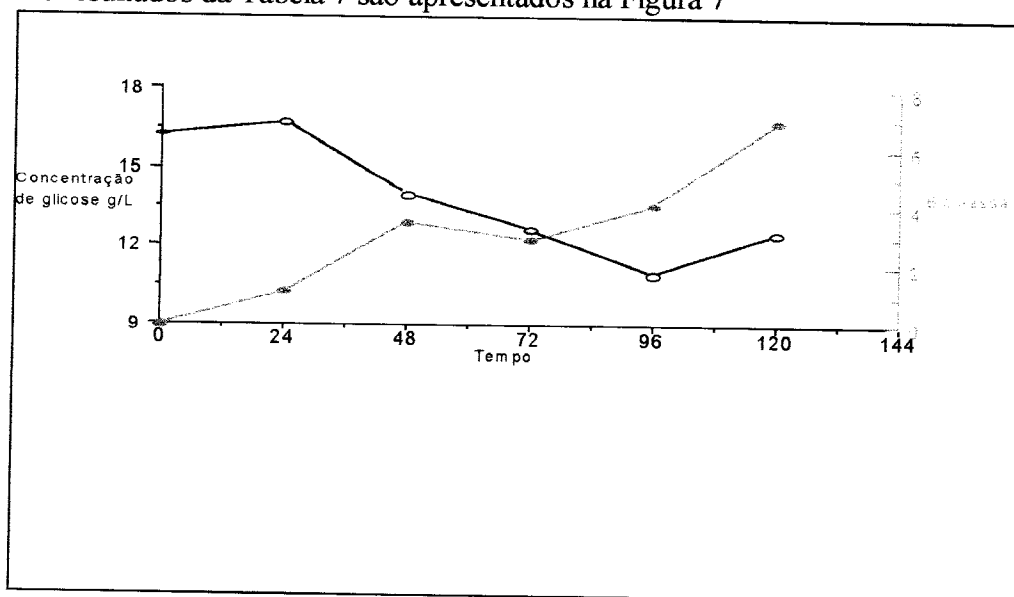


Figura 7 –Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 5 demonstrado na Tabela 7, o consumo do substrato teve uma diminuição por volta de 24 horas, observou-se também que a massa celular teve um crescimento descontínuo por volta de 48 horas. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y= 0,77$ .

Tabela 8- Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L), referente ao Ensaio 6.

Tempo	Transmitância (%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular(g/L)
0	70	5,32	14,25	0
0	70,8	5,33		
24	73,4	4,5	12,25	4,3
24	75,6	4,98		
48	78,9	3,45	10,125	4,35
48	79,8	3,26		
72	81,1	3,3	8,75	5,412
72	80,6	3,15		
96	84,9	3,12	7,375	5,5
96	83,6	3,1		
120	82,5	2,9	8	5,7
120	83,1	2,86		

Os resultados da Tabela 8 são apresentados na Figura 8

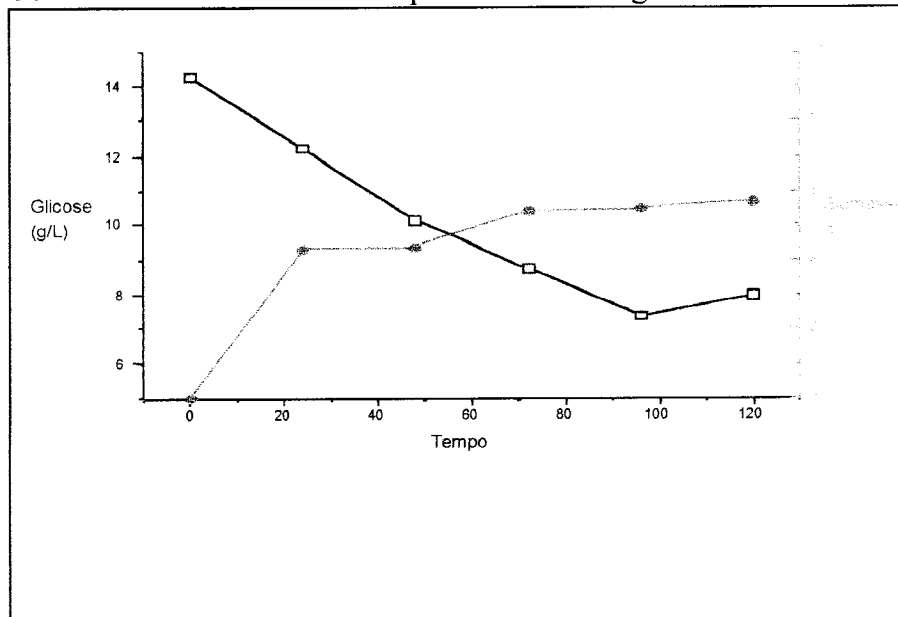


Figura 8 –Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 6 demonstrado na Tabela 8, o consumo do substrato teve uma diminuição contínua a partir de 24 horas, observou-se também que a massa celular teve um crescimento irregular por volta de 24 horas mantendo-se estável. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y=0,40$ .



Tabela 9- Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L), referente ao Ensaio 7.

Tempo	Transmitância (%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular(g/L)
0	74,4	5,08	16,875	0
0	73,3	5,07		
24	73	4,05	12,3	1,2
24	73,1	4,1		
48	72,7	3,94	12,5	2,238
48	72,9	3		
72	84,6	2,94	6,375	7,51
72	85,3	2,9		
96	85,1	2,91	5	9,145
96	84,7	2,92		

Os resultados da Tabela 9 são apresentados na Figura 9

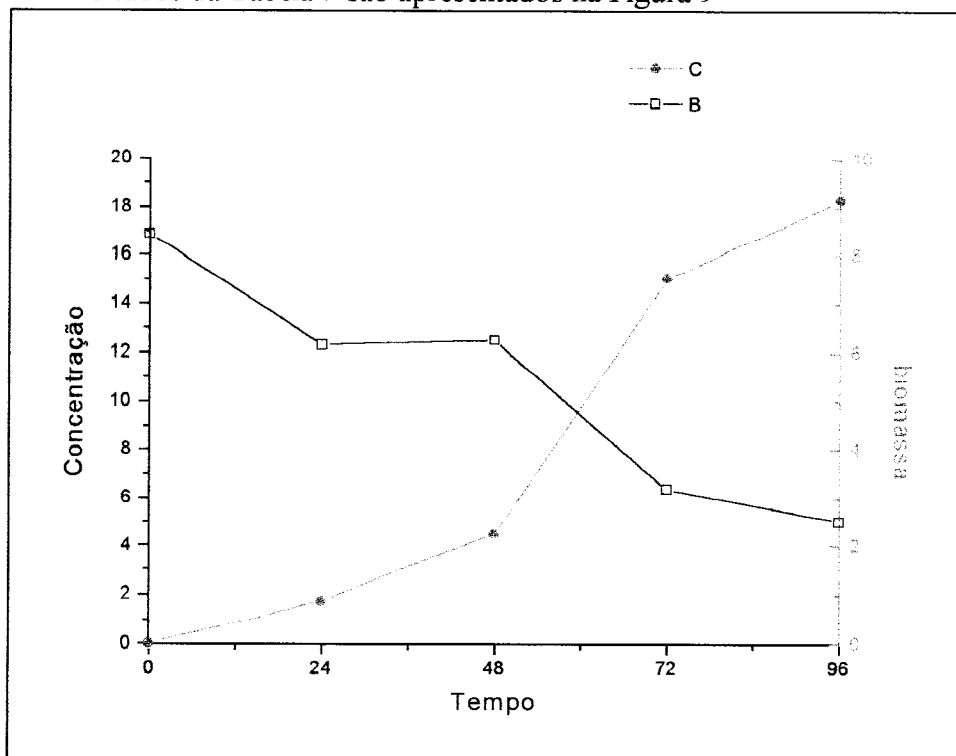


Figura 9 –Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 7 demonstrado na Tabela 9, o consumo do substrato teve uma diminuição entre 24 e 48 horas com posterior retomada, observou-se também que a massa celular teve um crescimento contínuo. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y = 0,61$ .

Tabela 10- Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (10,0 g/L), referente ao Ensaio 8.

Tempo	Transmitância (%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular (g/L)
0	66,1	5,02	16,125	0
0	66,5	5		
24	72,9	4,84	11,5	2,35
24	76,4	4,88		
48	78,1	3,61	9,625	3,555
48	78,4	3,72		
72	79,1	2,65	9,25	3,805
72	79,2	2,71		
96	85,1	2,67	6,5	5,4935
96	84,3	2,65		

Os resultados da Tabela 10 são apresentados na Figura 10

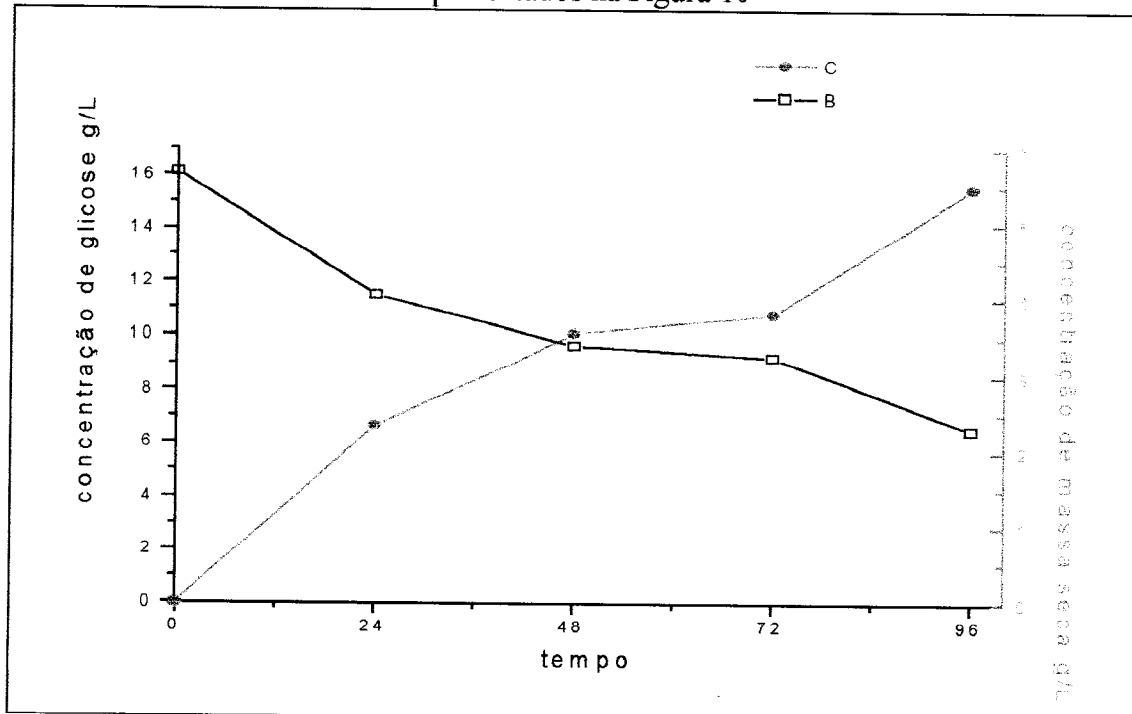


Figura 10-Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 8 demonstrado na Tabela 10, o consumo do substrato foi contínuo, observou-se também que a massa celular teve um crescimento proporcional ao consumo de glicose. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y = 0,42$ .

Tabela 11- Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (10,0 g/L), referente ao Ensaio 9.

Tempo	Transmitância (%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular(g/L)
0	60,9	4,85	17,75	0
0	66	4,86		
24	62,6	4,51	18,5	2,85
24	62,2	4,68		
48	63	3,52	16,25	3,382
48	68,9	3,49		
72	72,3	3,15	12,75	3,562
72	72,4	3,17		
96	74,2	2,89	11,5	4,9375
96	75	2,9		

Os resultados da Tabela 11 são apresentados na Figura 11

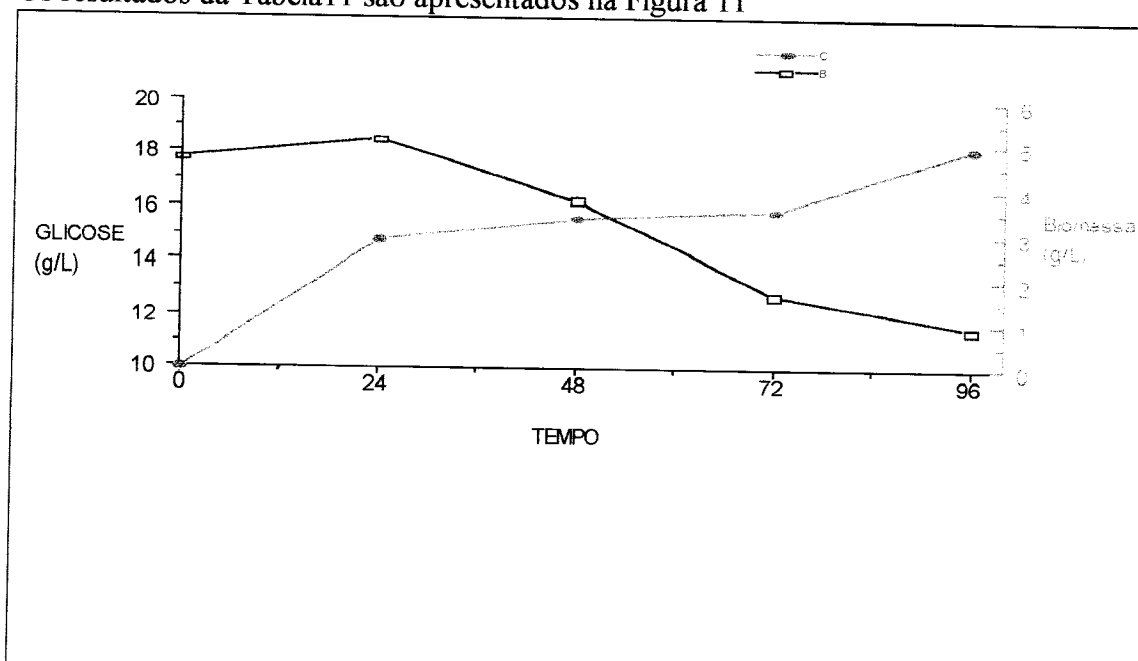


Figura 11 –Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 9 demonstrado na Tabela 11, o consumo do substrato acentuou-se por volta de 48 horas, observou-se também que a massa celular teve um crescimento contínuo com maior expressão a partir de 24 horas. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y = 0,58$ .

Tabela 12 Resultados obtidos na incubadora, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte(1,2 g/L), Extrato de Levedura(2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (10,0 g/L), referente ao Ensaio 10.

Tempo	Transmitância (%)	pH	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de massa celular(g/L)
0	63,1	4,95	17,625	0
0	64,5	4,86		
24	71,8	4,51	12	2,955
24	75,4	4,68		
48	77,1	3,52	9,875	3347
48	78,5	3,49		
72	82,1	3,1	8,25	3,546
72	80,2	3,7		
96	85,1	2,9	6,625	4,64
96	84,3	2,8		

Os resultados da Tabela12 são apresentados na Figura 12

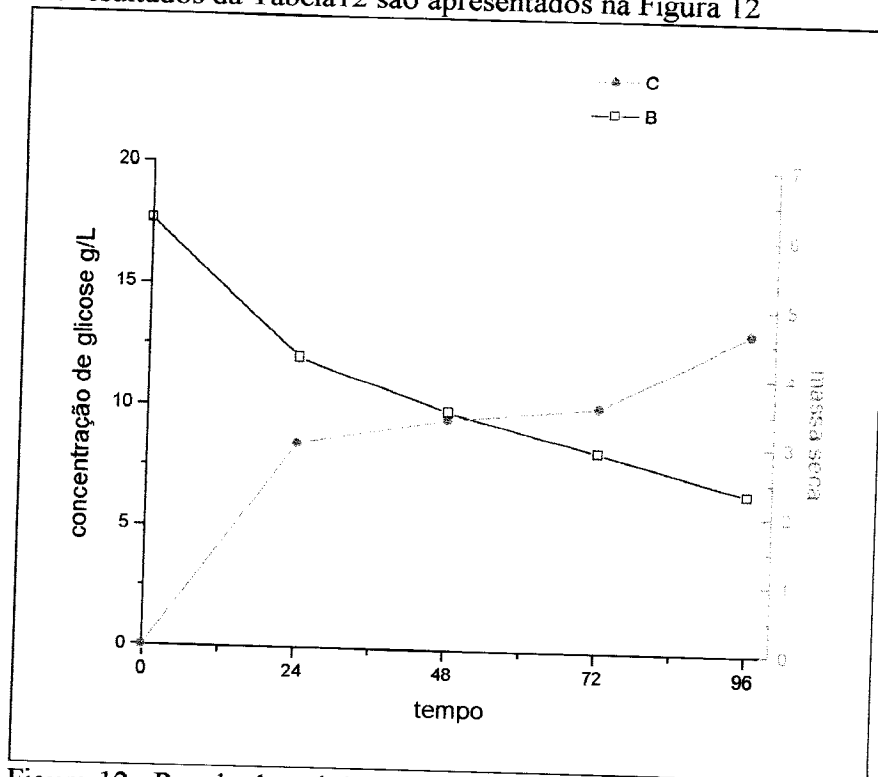


Figura 12 –Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

No Ensaio 10 demonstrado na Tabela 12, o consumo do substrato foi contínuo a partir de 24 horas, observou-se também que a massa celular cresceu com maior expressão por volta de 24 horas. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular com a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que este Ensaio apresentou  $Y = 0,42$ .

Tabela 13- Resultados obtidos na incubadora, referentes aos Ensaio de 1 a 10 de acordo com o Meio de Cultura 1, contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L) referente aos Ensaio de 1 a 7, e Meio de Cultura 2, contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (10,0 g/L), referente aos Ensaio de 8 a 10, apresentando o pH inicial e final, concentrações de glicose e biomassa iniciais e finais, e fator de rendimento.

Ensaio	pH	pH	Concentração inicial de glicose	Concentração final de glicose	Concentração inicial de biomassa	Concentração final de biomassa	Fator de rendimento *
1	5,29	2,77	13,09	1	0	10,729	0,56
2	5,26	2,74	12,75	3	0	12	0,7
3	5,02	2,43	13,6	9,125	0	9,144	0,84
4	5,22	3,09	14,075	9,32	0	9,029	0,64
5	5,45	2,65	16,25	12,5	0	9,44	0,77
6	5,32	2,86	14,25	8	0	4,8	0,4
7	5,08	2,92	16,875	5	0	9,145	0,61
8	5,02	2,65	16,125	6,5	0	5,4935	0,42
9	4,85	2,9	17,75	11,5	0	4,9375	0,58
10	4,95	2,8	17,625	6,625	0	4,64	0,42

\*Fator de rendimento  $Y_{x/s} = \Delta x / \Delta s$  calculado sobre Glicose inicial (20,0)g/L.

Os resultados da Tabela13 são apresentados na Figura 13, 14, 15, 16.

Figura 13- Apresenta a relação entre as diferentes concentrações de glicose presentes nos Ensaio de 1 a 10, descritos na Tabela 13.

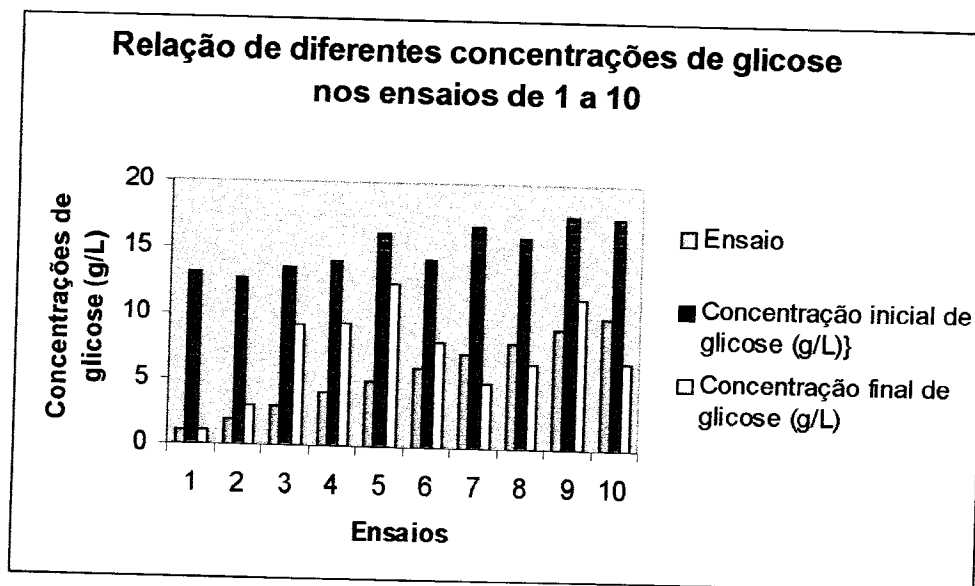


Figura 13 – Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C

Figura 14- Apresenta as alterações de pH ocorridas nos Ensaio de 1 a 10, descritas na Tabela 13.

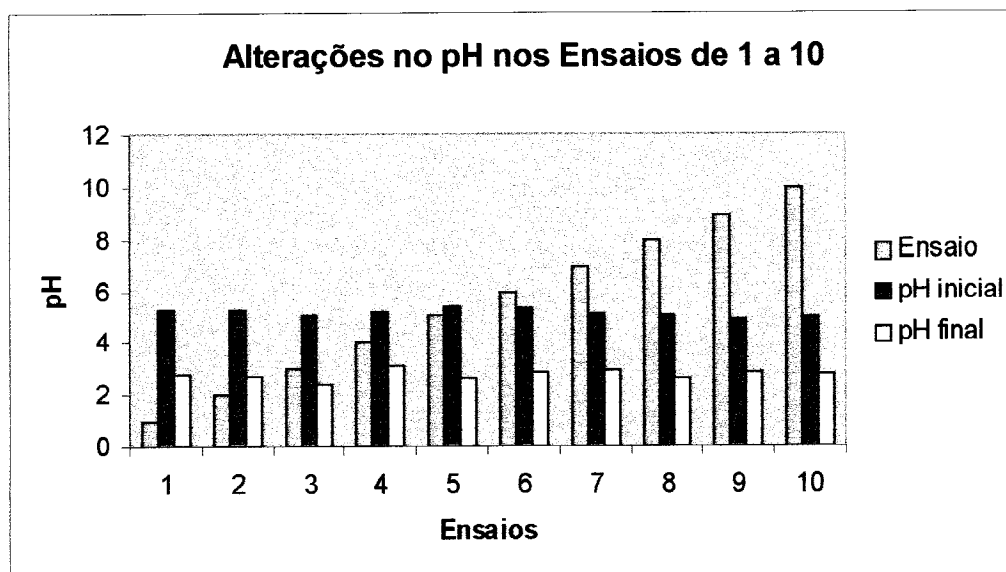


Figura 14 – Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C.

Figura 15- Apresenta a relação entre as diferentes concentrações de biomassa observadas nos Ensaio de 1 a 10, descritas na Tabela 13.

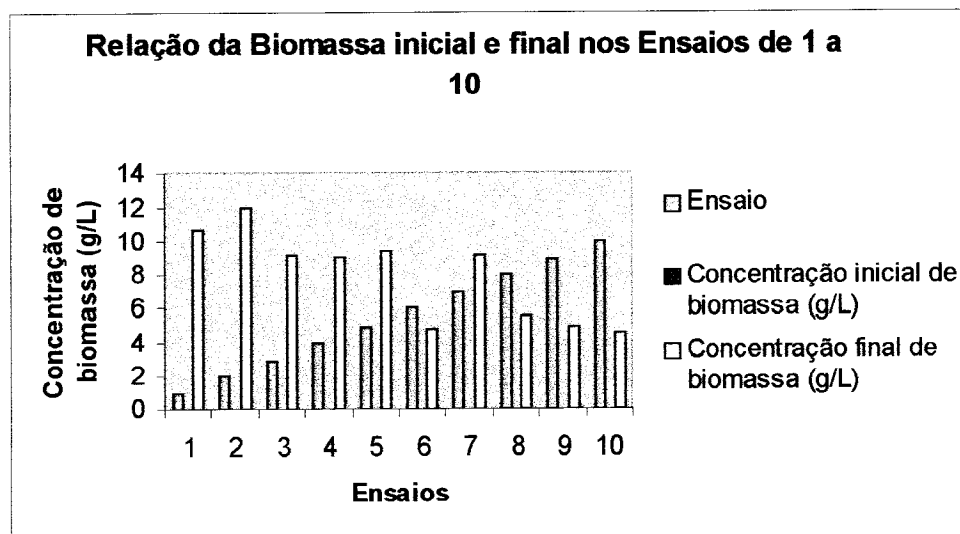


Figura 15 – Resultados obtidos em incubadora com agitação a 150 rpm e 37°C, secas em Estufa retilínea. Concentração inicial de biomassa igual a 0.

Figura 16- Apresenta o resultado do fator de rendimento nos Ensaio de 1 a 10 descritos na Tabela 13.

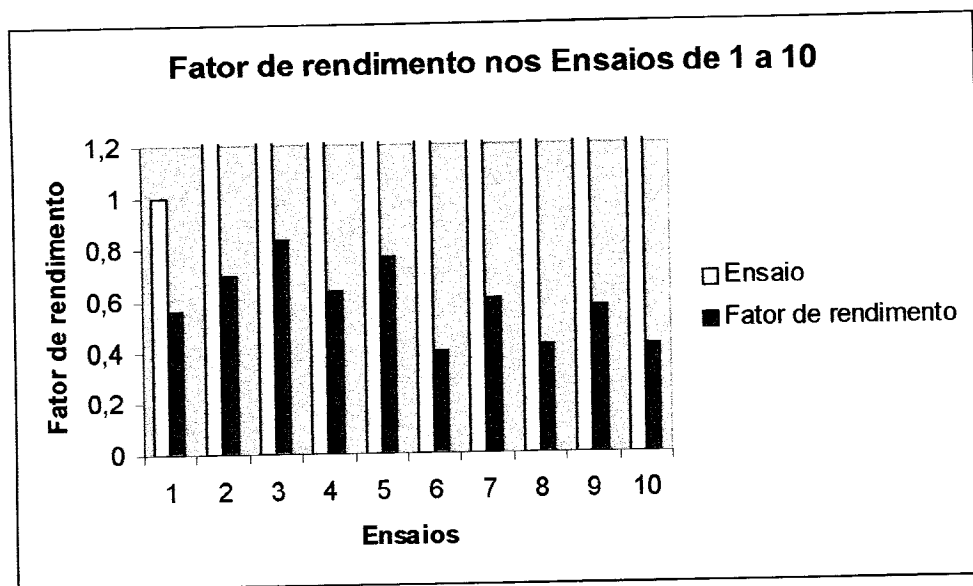


Figura 16 – Resultados obtidos estatisticamente, sendo  $Y^x/s = \Delta x / \Delta s$  calculado com glicose (20,0 g/L)

Com base nos resultados obtidos, observou-se o consumo de substrato no decorrer do tempo, com conseqüente crescimento celular. O fator de rendimento que relaciona a variação da massa celular e a variação do açúcar consumido demonstrou que houve crescimento, sendo que a média do fator de rendimento nos Ensaio de 1 a 10 esteve em torno de  $Y = 0,587$ .

O Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L), relacionado à composição apresentava uma coloração amarelada de intensidade média, o que facilitava a visualização de pequenas esferas que formavam o crescimento do fungo ao longo do tempo.

ALVES (1998) ressaltava que durante o processo de fermentação, é comum na produção de fungo em meios líquidos, a formação de pequenas esferas de micélio, de aproximadamente 5 mm de diâmetro.

## 5- CONCLUSÕES

Com base nos testes realizados:

- o fungo *Metarhizium anisopliae* desenvolveu-se melhor com pH entre 5.45 e 2.43 e este se tornou decrescente ao longo do tempo;

- quando houve grande alteração acima ou abaixo do pH citado, observou-se a ocorrência de contaminação, devido ao fato deste fungo ser muito sensível, o aspecto do Meio de Cultura também se modificou ficando com coloração mais opaca;

- seu cultivo requer cuidados em todas as etapas, especialmente no momento da inoculação.

- de acordo com o fator de rendimento, o fungo apresentou em média fator de rendimento em torno de  $Y = 0,587$ .

-o tempo de fermentação foi de 120 horas em seis Ensaios e de 96 horas em quatro Ensaios.

- nos Ensaios de 1 a 6 o tempo de fermentação foi de 120 horas, o Ensaio 7 foi de 96 horas, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (5,0 g/L).

- nos Ensaios 8, 9 e 10 o tempo de fermentação foi de 96 horas, Meio de Cultura contendo Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,2 g/L), Extrato de Levedura (2,5 g/L), Sulfato de Amônio (3,0 g/L), Fosfato de Potássio (10,0 g/L).



## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-ALVES, S.B., **Fungos entomopatogênicos** IN: Controle Microbiano de Insetos, ALVES, S.B., FEALQ, 1986.

2--ALVES, S.B. & PEREIRA, R.M., **Produção de fungos Entomopatogênicos** IN: Controle Microbiano de Insetos, ALVES, S.B., FEALQ, 1986.

3-HERLICH, P.R. & HERLICH, A.H. (1975), **População Recursos Ambiente**, Trad.J.G. Tundisi, EDUSP, São Paulo.

4-HERRERA T. & ULLOA, M. **El Reino de los Hongos**. 2.ed. México City: UNAMA,1998. 552p.

5-LEUCONA, R.E.1986.Controle Microbiano de *diatraea saccharalis*(Fabr.,1794) (Lep.:Pyralidae) com *Beauveri bassiana* (bals) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch e vírus da granulose, simulação dos efeitos de sua aplicação.Dissertação de mestrado, ESLQ/USP, Piracicaba, 170 p.

6- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31:426-428, 1959.

7- PATRICK, M. S., ADLARD, M. W. & KESHAVARZ, T. Production of an Indolizidine Alkaloid, Swainsonine by the Filamentous fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Biothecnology Letters** 15:997-1000, 1993.

8- SIGMA, **Biochemicals and Reagents for Life Science Research**. St . Louis: Sigma-Aldrich Co., 1999.2880p.

