

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS *Metarhizium anisopliae* E *Beauveria bassiana* EM MEIO COMPLETO E MÍNIMO*

DESTÉFANO, Ricardo Henri Rodrigues **

JESUS, Ederlei Cássio de ***

ADÃO, Francisca Maria Rosiki Bigas ***

MARQUEZIN, Jonas Hugo ***

RESUMO

Aspectos da biologia de microorganismos, como germinação, produção de enzimas e crescimento em substâncias específicas, conduziram a um entendimento melhor de aspectos básicos do ciclo de vida destes organismos interessantes. Neste estudo duas espécies de fungos, *Metarhizium anisopliae* (linhagem E₉) e *Beauveria bassiana* (linhagem 959), dois agentes microbianos muito importantes para o controle biológico de insetos-pragas, foram cultivados sob duas condições diferentes, em Meio Completo (MC) e Meio Mínimo (MM), para a produção de micélio. Este foi quantificado através de massa seca avaliada. Os resultados mostraram uma diferença pequena de crescimento para ambos os gêneros em Meio Completo (MC) e uma diferença maior para o Meio Mínimo (MM), sugerindo que o fungo *Beauveria bassiana* apresenta menos exigência nutricional quanto ao substrato.

PALAVRAS-CHAVE: *Metarhizium*, *Beauveria*, Fungos Entomopatogênicos, Controle microbiano.

ABSTRACT

Aspects of microorganisms biology, such as germination, enzymes production and growth on specific substrates, has led to a better understanding of basic aspects of the life cycle of these interesting organisms. In this study two fungi species *Metarhizium anisopliae* (E₉ strain) and *Beauveria bassiana* (959 strain), two very important microbial agents for pests biological control, were cultured under two different conditions, on Complete medium and Minimum medium, for production of mycelial mass which was quantified by dried mass evaluated. The results showed a slight difference of growth for the two genera in Complete medium and a marked difference for Minimum medium, suggesting that *Beauveria bassiana* has less nutritional exigence for the substrate.

KEY WORDS: *Metarhizium*, *Beauveria*, Entomopathogenic Fungi, Microbial Control.

** Destéfano – Doutor em Agronomia, área de Microbiologia na ESALQ-USP, Piracicaba, SP; Engenheiro Agrônomo do Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP. Professor das disciplinas de Microbiologia, Genética e Evolução e orientador de Atividades Complementares do Curso de Ciências, Biologia, das Faculdades Padre Anchieta. Professor dos Cursos de Pós-Graduação em Biotecnologia e Ecologia e Educação Ambiental das Faculdades Padre Anchieta, Jundiá, SP.

*** Jesus, Adão, Marquezin – Graduandos na Faculdade de Ciências e Letras Padre Anchieta, Jundiá, SP.

* Pesquisa desenvolvida dentro do programa de Iniciação Científica das Faculdades Padre Anchieta

INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* pertencem à classe Deuteromycotina, são importantes patógenos de insetos-pragas da agricultura como cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*), cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *Mahanarva fimbriolata*) e broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), cupins, percevejos e de pragas de interesse em saúde pública como mosquitos e o causador da doença de Chagas, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, o “barbeiro”. Estes fungos ocorrem naturalmente como patógenos de diversas espécies de insetos das diferentes ordens. *Metarhizium anisopliae* é conhecido como “green muscardine” e *Beauveria bassiana* como “white muscardine”. A unidade infectiva desses fungos é o conídio, um esporo pigmentado o qual germina na presença de umidade e calor dando origem ao micélio formado por hifas, frutificando assim o microrganismo. Estes microrganismos podem ser manipulados em laboratório e até em escala industrial, visando a sua utilização em programas de controle biológico de pragas, minimizando ou até eliminando em alguns casos o uso de inseticidas químicos, diminuindo os efeitos negativos da utilização desses produtos.

O mecanismo patogênico ocorre por uma série de etapas, se iniciando pelo contato (adesão) do fungo com o inseto hospedeiro, em seguida ocorre a germinação do conídio sobre o tegumento, formação de apressórios (grampos de penetração), penetração e colonização, onde ocorre força mecânica e a ação de enzimas como proteases, quitinases, lipases e amilases que auxiliam na invasão e colonização do hospedeiro, que uma vez invadido, uma ação tóxica pela secreção de diversas toxinas produzidas pelo fungo completa o ciclo infeccioso-patogênico. A velocidade e o grau de patogenicidade desta ação infecciosa temporal é que determina a virulência do entomopatógeno (Alves, 1998).

Em entomopatógenos muitas vezes o produto que se deseja obter é o próprio micélio fúngico para ser usado em formulações comerciais (Li & Holdon, 1995). O uso racional de fungos para este propósito é dependente do entendimento básico do fenômeno de seu crescimento e da cinética através da qual ele ocorre. O crescimento é um processo complexo com diversos componentes diferentes, acompanhado em maior ou menor extensão pelo desenvolvimento e diferenciação, que pode envolver aumento no número de células ou da quantidade de substâncias estruturais não vivas (Griffin, 1994).

A hifa é a forma característica de crescimento das células fúngicas que permite ao organismo explorar e aproveitar novos ambientes e substratos. Normalmente, o crescimento ocorre de maneira balanceada, através do aumento ordenado de todos os componentes do organismo, de maneira que sua constituição química permaneça aproximadamente constante.

Diversos parâmetros têm sido utilizados para avaliação do crescimento. O crescimento pode ser medido em termos de mudanças no número de células, do crescimento linear, do volume, da massa fresca, da massa seca, da atividade total de qualquer processo metabólico ou em termos da quantidade de algum constituinte celular (Mandels, 1965). A medida da massa seca tem sido o método mais utilizado para o estudo do crescimento de fungos, é a maneira mais direta de se representar a quantidade do organismo produzido. Qualquer outro método deve se referir à massa seca para a interpretação do significado fisiológico do parâmetro que está sendo utilizado (Mandels, 1965).

Existem algumas limitações e desvantagens na utilização da massa seca, pois é um método destrutivo, conseqüentemente, exige um grande número de culturas para a obtenção de valores significativos no curso do crescimento, muitas vezes podem surgir problemas na separação da massa micelial quando substratos insolúveis são utilizados, como quitina, elastina, ou cutícula de insetos, o que certamente não ocorre quando da utilização de meios de cultura como o meio completo e meio mínimo.

As colônias de fungos, em culturas líquidas, sob agitação, crescem exponencialmente, de maneira que o logaritmo da quantidade do fungo aumenta linearmente com o tempo. Quando um meio de cultura é inoculado e o crescimento é medido durante um certo período de tempo, tem-se como resultado uma típica curva sigmoideal que pode ser dividida em diversas fases, com diferentes características fisiológicas. As fases são: 1ª.- fase lag, onde a célula aumenta de tamanho, mas não em número, é uma fase de adaptação às condições da cultura; 2ª.- fase exponencial com crescimento autocatalítico, as células se multiplicam com grande velocidade; 3ª.- fase de declínio de crescimento específico, em alguns casos vista como uma fase de crescimento linear; 4ª.- fase estacionária de duração variada, às vezes tão curta que nem é observada, e 5ª.- fase de morte da cultura, usualmente acompanhada por autólise (Braga, 1997 e Braga *et al*, 1999).

A duração dessas fases de crescimento depende de diversos fatores, especialmente do inóculo e da natureza dos nutrientes presentes no meio, os fatores nutricionais podem afetar toda a dinâmica da cultura, sendo a taxa de crescimento influenciada pelos nutrientes fornecidos.

Nesse estudo, foram avaliadas as condições para a realização de métodos comparativos de medição de comportamento de crescimento e desenvolvimento de culturas fúngicas na presença de substratos de constituição nutricional basal e enriquecidos nutricionalmente.

OBJETIVO

Observar a diferença de crescimento dos fungos entomopatogênicos entre os diferentes meios de cultura, Meio Mínimo e Meio Completo e comparar os valores de massa seca obtidos.

METODOLOGIA

Os fungos foram cultivados em meio completo sólido e meio mínimo por 10 dias a 28°C para obtenção dos conídios, ou seja, o inóculo; em seguida foi feita uma padronização por meio de diluições seriadas e contagem do número de conídios utilizando-se o hematímetro (Câmara Neubauer).

Em seguida, a viabilidade dos conídios foi avaliada pela inoculação de uma alíquota de suspensão dos mesmos em meio completo sólido, e após 14-16 horas, verificando-se sob microscópio a porcentagem de conídios apresentando hifas ou tubos germinativos e conídios sem germinar.

A viabilidade encontrada foi de 95,7% para o *Metarhizium anisopliae* e 94,5% para o *Beauveria bassiana*, valores estes utilizados como fatores de correção da dose real.

A concentração de conídios por mL de suspensão foi estabelecida em $1,1 \times 10^9$ como concentração final por mL de meio de cultura completo e mínimo, tendo cada Erlenmeyer 200 mL de meio inoculado com cada fungo respectivamente para os dois gêneros em estudo.

As culturas foram colocadas em "shaker" e deixadas a 28°C, 150 rpm, por 72 horas para crescerem produzindo micélio suficiente para se medir a massa seca de cada tratamento.

Após o crescimento, as culturas foram filtradas em papel de filtro previamente tarado, coletando-se a massa micelial, em seguida levada para estufa a 80°C para secagem e posterior pesagem da massa seca em intervalos de 24h por 4 vezes até obtenção de uma média consistente.

Meio Mínimo: 6,00g de NaNO_3 , 0,52g de KCL, 0,52g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,52g de KH_2PO_4 , 10,00g de Glicose, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , água destilada (q.s.p.).

Meio Completo: 6,00g de NaNO_3 , 0,52g de KCL, 0,52g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,52g de KH_2PO_4 , 10,00g de Glicose, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , água destilada, 2,00g de Peptona, 0,50g de extrato de levedura, 1,50g de caseína hidrolisada, 1,00mL de solução de vitaminas.

Ajustar o pH para 6,8 com NaOH 2N.

Autoclavar a 121°C/1atm/20min.

Solução de vitaminas: 100,00mg de Ácido nicotínico, 10,00mg de Ácido p-aminobenzóico, 50,00mg de Tiamina, 20,00mg de Biotina, 50,00 de Piridoxina, 100,00mg de Riboflavina e 100,00mL de água destilada.

Autoclavar por 10 minutos a 0,5 atm

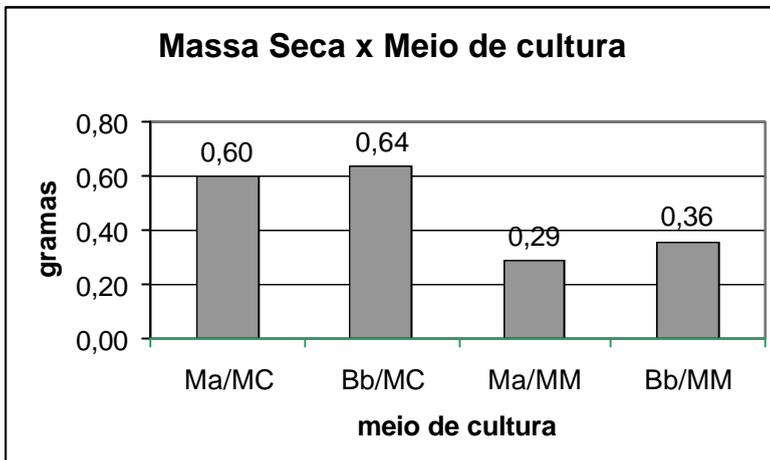
RESULTADOS

Tabela I: Medidas de massa seca dos fungos em Meio Completo (MC) e Meio Mínimo (MM)

<i>Metarhizium anisopliae</i>				
MC	Massa do papel(g)	Massa papel+fungo(g)	Massa seca(g)	Média(g)
1	0,91	1,46	0,55	0,60
2	1,35	1,93	0,58	
3	1,35	1,98	0,63	
4	1,36	1,98	0,62	
MM				
1	1,32	1,60	0,28	0,29
2	1,35	1,71	0,36	
3	1,36	1,61	0,25	
4	1,36	1,63	0,27	

<i>Beauveria bassiana</i>				
MC	Massa do papel(g)	Massa papel+fungo(g)	Massa seca(g)	Média(g)
1	1,36	1,98	0,62	0,64
2	1,34	1,95	0,61	
3	1,31	1,96	0,65	
4	1,32	2,01	0,69	
MM				
1	1,32	1,66	0,34	0,36
2	1,4	1,76	0,36	
3	1,33	1,67	0,34	
4	1,34	1,75	0,41	

Gráfico I: Massa Seca x Meio de Cultura.



MC - Meio Completo
MM - Meio Mínimo

Ma - *Metarhizium anisopliae*
Bb - *Beauveria bassiana*

DISCUSSÃO

Baseado nos resultados obtidos, observou-se uma nítida diferença no perfil de crescimento entre os diferentes meios de cultura, não sendo observada diferença entre os dois gêneros de fungos estudados. Apesar de se tratar de dois gêneros distintos de fungos, obteve-se valores de massa seca próximos tanto para Meio Completo como para Meio Mínimo. Observou-se diferença notória entre os dois meios de cultivo, apesar da técnica de quantificar a massa seca representar um método destrutivo, mas de muita aplicação, pois, se trata de um método simples, de baixo custo e eficiente para avaliação de padrões de crescimento de microrganismos.

De certa forma, observou-se uma certa exigência nutricional por parte do fungo *Metarhizium anisopliae*, dado o seu perfil de crescimento diferenciado em relação ao fungo *Beauveria bassiana*, quando na presença de uma mesma fonte nutricional produziu massa seca levemente menor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos, 2^a. Edição. Piracicaba, FEALQ, 1998, 1163p.
- BRAGA, G.U.L. Caracterização molecular e fisiológica de linhagens de *Metarhizium anisopliae*.(Tese de doutorado-UNICAMP), Campinas-SP,1997, 127p.
- BRAGA, G.L.U.; Destéfano, R.H.R. & Messias, C.L. Journal of Invertebrate Pathology 78: 11-17, 1999.
- GRIFFIN, D.H. Spore dormancy and germination. In: Griffin ,D.H. *Fungal physiology*. Second edition. New York, Wiley-Liss, 1994. p.375-398.
- MANDELS, G.R. Kinetics of fungal growth. In: Ainsworth, G.C. & Sussman,A.S. *The fungi. An advanced treatise*. Vol.I. New York, Academic Press, 1965. p.599-612.
- LI, D.P. & HOLDON, D.G. Effects of nutrients on colonyformation,growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Journal of Invertebrate Pathology, 65: 253-260, 1995.

AGRADECIMENTOS

Parte do trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, nas dependências da Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental do Instituto Biológico - Campinas, cedido pela Dra. Suzete Ap. Lanza Destéfano.

Os alunos envolvidos no trabalho de iniciação científica mostraram dedicação e empenho para a realização do mesmo, inclusive em final de semana, demonstrando interesse e participação acima da média, o que proporcionou um ótimo convívio tanto acadêmico como pessoal, possibilitando um grande aprendizado técnico - científico, na área de estudo em microbiologia.

Ao professor Rodolfo Antônio de Figueiredo; Coordenador de Graduação do Curso de Biologia e Coordenador da Pós-Graduação das Faculdades Padre Anchieta, pelo apoio e estímulo.

Ao professor José Vergílio Betioli; Diretor dos Cursos de Biologia e Letras das Faculdades Padre Anchieta, pelo apoio.

Ao professor Cláudio L. Messias (Unicamp), pela cessão das linhagens do fungo.