

UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA

VALÉRIA DE ALBUQUERQUE SOUSA FEITOSA

TOLERANCIA AO ESTRESSE DE CONÍDIOS DE *METARHIZIUM*
ROBERTSII PRODUZIDOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM
SULFATO DE ZINCO

STRESS TOLERANCE OF CONIDIA OF *METARHIZIUM ROBERTSII*
PRODUCED ON ZINC SULFATE MEDIUM SUPPLEMENTED

São Paulo – SP

2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

VALÉRIA DE ALBUQUERQUE SOUSA FEITOSA

TOLERANCIA AO ESTRESSE DE CONÍDIOS DE *METARHIZIUM*
ROBERTSII PRODUZIDOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM
SULFATO DE ZINCO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Profº. Drº. Drauzio Eduardo Naretto Rangel
Orientador(a)

Profº. Drº. Cláudio Alberto Téllez Soto
Coorientador(a)

São Paulo – SP

2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).**

F336t FEITOSA, Valéria de Albuquerque Sousa.

Tolerância ao estresse de conídios de *Metarhizium Robertsii* produzidos em meio suplementado com Sulfato de Zinco / Valéria de Albuquerque Sousa Feitosa -- São Paulo: Universidade Brasil, 2023.

42 f.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel.

Coorientação: Prof. Dr. Cláudio Alberto Téllez Soto.

1. Sulfato de Zinco. 2. Fungos entomopatogênicos. 3. Tolerância a radiação UV-B. 4. Tolerância ao estresse por calor. 5. Tolerância ao estresse osmótico. I. Rangel, Drauzio Eduardo Naretto. II. Soto, Cláudio Alberto Téllez. III. Título.

CDD 610.28



TERMO DE APROVAÇÃO

VALÉRIA DE ALBUQUERQUE SOUSA FEITOSA

**“TOLERANCIA AO ESTRESSE DE CONÍDIOS DE METARHIZIUM ROBERTSII
PRODUZIDOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM SULFATO DE ZINCO”.**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(a). Claudio Alberto Tellez Soto (presidente-orientador)

Prof(a). Dr(a). Drauzio Eduardo Naretto Rangel (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA
FEDERAL DO PARANÁ)

Prof(a). Dr(a). Vilson Rosa de Almeida (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a). Livia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a). Eliane Mendes Rodrigues (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO)

Prof(a). Dr(a). Albery Martins e Silva (CENTRO UNIVERSITÁRIO DAS AMÉRICAS)



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

São Paulo, 21 de março de 2023.
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Claudio Alberto Tellez Soto

Houve alteração do Título: sim () não (x):

Campus Itaquera

Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030

Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070

www.ub.edu.br



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“TOLERANCIA AO ESTRESSE DE CONÍDIOS DE METARHIZIUM ROBERTSII PRODUZIDOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM SULFATO DE ZINCO”**

Autor(es):

Discente: **Valéria de Albuquerque Sousa Feitosa**

Assinatura: *Valéria de Albuquerque Sousa Feitosa*

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Claudio Alberto Tellez Soto**

Assinatura: *Claudio Tellez Soto*

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Drauzio Eduardo Naretto Rangel**

Assinatura: *Drauzio Rangel*

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Data: 21/03/2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, o maior orientador da minha vida. Ele nunca me abandonou nos momentos de necessidade.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigada por me permitir errar, aprender e crescer, por sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão especial, enfim, obrigada por tudo. Ainda não descobri o que eu fiz para merecer tanto.

À minha Família, minha amada Mãe, **Perpétuo** e meu amado Pai, **Venâncio**, muito obrigado por nunca medirem esforços para que eu concluísse esse meu sonho, que também é de vocês. Obrigada por depositarem em mim tanta confiança e amor, obrigada por todas as noites que, em suas orações antes de dormirem, intercediam a Deus por mim, pela preocupação que sempre tiveram, por vibrarem comigo a cada conquista minha e por abdicarem de tantos sonhos e projetos seus, para concluírem os meus. Foi por vocês cada virada de noite, cada gota de suor e lágrima derramada e também cada dia de aprendizado. Essa vitória é de vocês! Meu querido irmão, **Vanderson** e minha Cunhada **Ana Kalinne**, obrigada pelo companheirismo, pelos momentos de distração e por estarem sempre comigo, me apoiando e me incentivando. Onde através deles, agradeço à todos da minha família Materna e Paterna. O valor de vocês na minha vida é algo inestimável, sem vocês, nada disso seria possível, nem teria graça.

Às minhas princesas **Maria Júlia e Maria Alice**, por todo amor incondicional que vocês me proporcionam. Inúmeras foram às vezes que, na madrugada, após concluir algum trabalho, olhava para vocês e agradecia a Deus pela existência de vocês em minha vida, existência essa que é o reflexo mais perfeito da existência de Deus.

Ao meu amado esposo, **Pedro Jorge**, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada e por ter me presenteado com a minha filha de coração, **Hillary**, que se tornou motivo de luta diária. Obrigada por permanecerem ao meu lado, mesmo sem os carinhos rotineiros, sem a atenção devida. Obrigada pelo presente de cada dia, pelo sorriso e por me fazer feliz.

Aos meus sogros, **Pedro Feitosa e Elizenda**, pelo amor, apoio, presença e por acreditar em meus Sonhos. Sinto-me orgulhosa e privilegiada por ter sogros tão especiais. Gratidão!

Ao **Doutor Drauzio**, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Tantas vezes que me acompanhou e fortaleceu. Obrigada por acreditar em mim e por aceitar me acompanhar nessa caminhada. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio. Ao **Doutor Cláudio** que gentilmente aceitou trilhar essa caminhada juntamente conosco.

Aos membros da banca examinadora, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Por fim, agradeço a todos os amigos que encontrei no percurso do Doutorado, em especial à Eliane Mendes, aos professores e mestres que tive a oportunidade de conhecer. Cada um deixou sua marca registrada na minha vida e nesta formação que jamais será esquecida. A jornada não para por aqui, ainda há muito que trilhar!

Com a graça de Deus, outras vitórias ainda serão alcançadas!

Muito Obrigada!!

RESUMO

Fungos para usos industriais e agrícolas são sujeitos a uma variedade de insultos físicos e químicos, coletivamente referido a estresses. A resposta de fungos a condições de estresse pode ser devido a debilitações de crescimento e metabolismo e é importante entender a fisiologia das respostas ao estresse para aliviar as influências detrimenais ao aplicar o fungo no campo para controle de insetos. O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos fisiológicos e morfológicos do sulfato de zinco nos fungos entomopatogênicos *Metarhizium robertsii*, assim como o crescimento micelial deste fungo, e a tolerância deste aos estresses de conídios produzidos em meios suplementados com zinco sob a radiação UV, estresse osmótico (cloreto de potássio) e calor. O crescimento radial do Micélio mostrou que este sal não influencia no crescimento do fungo estudado. No que diz respeito à tolerância à radiação UV observa-se que a germinação de conídios produzidos na concentração de 1.5 g/l obteve tolerância semelhante aos conídios produzidos sob condições normais, sendo assim mais tolerantes que os produzidos nas concentrações 0.5, 1.0 e 2.0g/l. Tal achado observa-se de forma semelhante no que diz respeito à tolerância à condição de Estresse Osmótico. A germinação de conídios de *M. robertsii* suplementados com sulfato de zinco induziu uma maior tolerância ao calor ao se comparar com outros tratamentos.

Palavras - chave: Sulfato de zinco. Fungos entomopatogênicos. Tolerância a Radiação UV-B. Tolerância ao estresse por calor. Tolerância ao estresse osmótico.

ABSTRACT

Fungi for industrial and agricultural uses are subject to a variety of physical and chemical insults, collectively referred to as stresses. The fungal response to stress conditions may be due to growth and metabolism impairments and it is important to understand the physiology of stress responses to alleviate detrimental influences when applying the fungus in the field for insect control. The present study aims to evaluate the physiological and morphological effects of zinc sulfate on the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii*, as well as the mycelial growth of this fungus, and its tolerance to the stresses of conidia produced in media supplemented with zinc under UV radiation, stress osmotic (potassium chloride) and heat. Mycelium radial growth showed that this salt does not influence the growth of the studied fungus. With regard to tolerance to UV radiation, it was observed that the germination of conidia produced at a concentration of 1.5 g/l obtained similar tolerance to conidia produced under normal conditions, thus being more tolerant than those produced at concentrations 0.5, 1.0 and 2.0g /l. This finding is similarly observed with regard to tolerance to the Osmotic Stress condition. Germination of *M. robertsii* conidia supplemented with zinc sulfate induced greater heat tolerance when compared to other treatments.

Keywords: Zinc sulfate. Entomopathogenic fungi. Tolerance to UV-B Radiation. Heat stress tolerance. Osmotic stress tolerance.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Os fungos utilizados no meio industrial e agrícola estão sujeitos a uma variedade de estresses dos tipos físicos e/ou químicos. Nesse estudo foram avaliados os efeitos fisiológicos e morfológicos do sulfato de zinco no fungo *Metarhizium robertsii*. A produção de conídios em meio de cultura suplementado com sulfato de zinco induziu maior tolerância ao calor quando comparado aos conídios sob condições de controle. Entretanto, conídios produzidos em meio mínimo induziu maior tolerância às condições de estresse osmótico, calor e radiação UV-B. O Crescimento radial do micélio não sofreu alteração, mostrando assim que a suplementação com zinco não influencia no crescimento deste fungo.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Isolado de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575 20
- Figura 2 – Crescimento Micelial do isolado *Metarhizium robertsii* no meio de cultura Batata dextrose e agar(BDA) no período de 07 Dias. 24
- Figura 3 – Crescimento Micelial do isolado *Metarhizium robertsii* no meio de cultura Batata dextrose e agar(BDA) no período de 14 Dias. 25
- Figura 4 – Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos sob condições normais (controle), meio BDA suplementado e Meio Mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses tratamentos foi exposta à radiação UV. Percentual médio de germinação de conídios após exposição à radiação UV de conídios de *M. robertsii* produzidos nas condições acima. Para exposição ao estresse, suspensões de conídios foram expostas à radiação UV por 60, 120, 180 e 240 minutos. 26
- Figura 5 – Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos sob condições normais (controle), meio BDA suplementado e Meio Mínimo (MM). Uma suspensão de conídios foi exposta ao estresse osmótico causado por cloreto de potássio. Porcentagem média de germinação de conídios em meio BDA suplementado com cloreto de potássio de conídios de *M. robertsii* produzidos sob as condições acima. A germinação dos conídios foi realizada em BDA (controle) ou BDA suplementado com 1,3; 1,4; 1,5; 1,7; 1,9M KCl. 27
- Figura 6 - Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos sob condições normais (controle), meio BDA suplementado e Meio Mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses tratamentos foi exposta a estresse térmico. A exposição ao calor ocorreu em suspensão em banho térmico a 45°C. A germinação dos conídios foi realizada em meio de cultura BDA contendo 0,003% de benomil. As comparações estatísticas foram feitas dentro de cada tempo de exposição, não entre os diferentes tempos de exposição. 28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 SULFATO DE ZINCO	17
3.2 - QUAL A IMPORTÂNCIA DO ZINCO PARA OS FUNGOS?.....	17
3.3 - OS FUNGOS PRECISAM DE ZINCO PARA CRESCER?	18
3.4 - QUAL FUNÇÃO DO ZINCO NA FISIOLOGIA DOS FUNGOS?	18
3.5 - EXISTE TOXICIDADE DO ZINCO PARA OS FUNGOS?	19
3.6 - O SULFATO DE ZINCO AJUDA OS FUNGOS EM QUAIS TIPOS DE ESTRESSE?.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 ISOLADO DO FUNGO.....	21
4.2 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	22
4.3 CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO	22
4.4 TOLERÂNCIA DOS CONÍDIOS PRODUZIDOS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE	22
4.4.1 Tolerância à radiação uv	23
4.4.2 Tolerância ao estresse osmótico	24
4.4.3 Tolerância ao calor	24
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5 RESULTADOS	26
5.1 CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO.....	26
5.2 TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV	27
5.3 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OSMÓTICO.....	29
5.4 TOLERÂNCIA AO CALOR.....	30
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Os fungos para uso industrial e agrícola estão sujeitos a uma variedade de estresses físicos e químicos. A resposta fúngica às condições de estresse pode ser devido as deficiências de crescimento e metabolismo, e entender a fisiologia das respostas ao estresse para aliviar influências prejudiciais é importante (RANGEL, 2011; RANGEL et al., 2015a; RANGEL et al., 2015b; RANGEL et al., 2018; WALKER; BASSO, 2019).

Cátions bivalentes, como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} , são essenciais para o crescimento e metabolismo dos fungos e, conseqüentemente, devem ser obtidos do ambiente externo (JONES; GADD, 1990; WALKER; BASSO, 2019; WALKER; BIRCH, 1999). No entanto, acima de certas concentrações, todos os cátions divalentes, especialmente aqueles chamados de metais pesados, são tóxicos e podem danificar o metabolismo celular e, por fim, causar a morte celular (JONES; GADD, 1990).

O zinco desempenha um papel central na função enzimática nas células de levedura, especialmente a álcool desidrogenase, e faz parte da atividade estrutural da proteína (WALKER, 2004). A deficiência de zinco pode levar a uma fermentação lenta ou incompleta (DE NICOLA; WALKER, 2008).

O contato de um organismo ao estresse resulta no desenvolvimento de uma reação subsequente mais forte e protetora. Conceituamos como *priming* a memorização de um estresse encontrado previamente oferecendo, desta forma uma forte vantagem de sobrevivência, podendo ainda ser chamado de resistência ao estresse adquirido, resposta adaptativa ou proteção cruzada (HARISH; OSHEROV, 2022). Os fungos conseguem desenvolver *priming* através do estresse nutritivo (RANGEL, 2011; RANGEL et al., 2006; RANGEL et al., 2008), calor (RANGEL et al., 2008), iluminação (DIAS et al., 2020; DIAS et al., 2020; DIAS et al., 2022; DIAS et al., 2021), estresse químico (RANGEL et al., 2012), estresse biótico provocado por um fungo antagonista (MEDINA et al., 2020), estresse ácido ou alcalino (RANGEL et al., 2015), hipóxia (RANGEL et al., 2015). Assim sendo, a amplificação da tolerância ao calor e à radiação UV-B dos fungos isolados de solos de áreas degradadas ou de fungos de reflorestamentos recentes (FERREIRA et al., 2018), dá-se devido ao *priming* contínuo nessas circunstâncias estressantes.

O presente estudo visa compreender os efeitos fisiológicos e morfológicos do sulfato de zinco sobre fungos para uso industrial e agrícola, tendo em vista a necessidade de descobrir se estes respondem ou não ao meio suplementado com zinco, assim como entender se são essenciais para sobrevivência destes organismos quando expostos a fatores estressantes do meio ambiente como calor, radiação UV e estresses osmótico proveniente das respostas imunológicas do inseto hospedeiro.

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos fisiológicos e morfológicos do sulfato de zinco nos fungos entomopatogênicos *Metarhizium robertsii*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o crescimento micelial do fungo *Metarhizium robertsii*, produzidos em meios de cultura com zinco.
2. Estudar os fenótipos de tolerância de conídios produzidos em meios suplementados com sulfato de zinco às condições de estresse osmótico (cloreto de potássio), radiação ultravioleta e calor nos fungos *Metarhizium robertsii*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SULFATO DE ZINCO

O sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) é o mineral goslarita, conhecido como vitríolo branco, que é um composto químico cristalino incolor, e todas as formas são solúveis em água. Este elemento multifuncional é essencial para todos os processos fisiológicos; pode atuar como elemento catalisador, estrutural e regulador; e desempenha um papel importante na expressão gênica (ZHAO; BAI, 2009). O zinco (Zn) pode estar presente na forma ligada ou livre de células, dependendo do tipo e estado da célula (DE NICOLA; WALKER, 2008). Em animais, a deficiência mineral está associada a quadros patológicos graves, principalmente devido à deficiência alimentar, presença de compostos quelantes nos alimentos e distúrbios no processo de absorção gastrointestinal ou níveis urinários elevados. Em algumas situações, a deficiência desse mineral deprime o crescimento das leveduras, e as células tendem a inchar e formar grumos (OBATA et al., 1996).

3.2 - QUAL A IMPORTÂNCIA DO ZINCO PARA OS FUNGOS?

O Zn é um micronutriente essencial que desempenha um papel no metabolismo da levedura. Funciona como cofator de enzimas essenciais, como álcool e aldeído desidrogenase, que estão diretamente envolvidas na produção do etanol (TOSUN; ERGUN, 2007).

A biodisponibilidade de cátions influencia diretamente o metabolismo do açúcar da levedura em fermentações de cervejarias e destilarias. O equilíbrio é vital para o sucesso da produção de etanol. Em particular, o conhecimento das interações entre K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} , bem como sua biodisponibilidade relativa no crescimento de levedura industrial, sendo importante para manipular de maneira ideal seus níveis de fermentação (CHANDRASENA et al., 1997).

O Zn desempenha um papel importante no metabolismo fermentativo porque é essencial para a atividade de metaloenzimas, proteína que contém um ou mais íons metálicos na sua molécula. O Zn também pode ativar a síntese de riboflavina ou Vitamina B12, e aumentar o teor de proteína na fermentação da levedura. Além

disso, pode estimular o transporte dos carboidratos maltose e maltotriose para dentro das células, aumentando assim a taxa de fermentação (WALKER, 2004).

Atua como um cofator de muitas proteínas e é indispensável para sua atividade catalítica e/ou estabilidade estrutural. Zn também é um componente onipresente de enzimas envolvidas na transcrição e das proteínas de dedo Zn que regulam a expressão gênica. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o Zn provavelmente é necessário para a função de quase 3% do proteoma (BÖHM et al., 1997). Além de seu envolvimento na estrutura e função das proteínas, a interação do Zn com os lipídios contribui para a fluidez da membrana, e sua interação com os ácidos nucleicos ajuda a prevenir reações radicais deletérias (VALLEE; AULD, 1990). A deficiência deste oligoelemento essencial pode ter consequências graves. Por exemplo, na fermentação da cerveja, a deficiência de Zn no mosto leva a uma fermentação lenta e, portanto, à deterioração da qualidade da cerveja. Embora seja importante o monitoramento preciso da concentração de Zn em tais fermentações industriais, a formação de complexos com polifenóis, proteínas e outros compostos implica que a concentração de Zn nem sempre prediz com precisão sua biodisponibilidade para leveduras (KREDER, 1999).

3.3 - OS FUNGOS PRECISAM DE ZINCO PARA CRESCER?

Os íons metálicos, incluindo o Zn, definitivamente desempenham um papel na regulação do metabolismo da levedura, onde as células requerem esses metais para manter a integridade estrutural da célula e das organelas. Atuam nas interações célula-célula, fenômeno de floculação, expressão gênica, divisão e crescimento celular, mecanismos de captação de nutrientes, ação enzimática do metabolismo, osmorregulação, manutenção de energia e sobrevivência celular. Além disso, as células de levedura precisam de metais para atuar como protetores de estresse diante de estressores ambientais (WALKER, 2004).

3.4 - QUAL FUNÇÃO DO ZINCO NA FISIOLOGIA DOS FUNGOS?

A limitação de Zn causa uma forte regulação negativa da transcrição gênica envolvida no acúmulo de carboidratos de reserva. A relevância fisiológica dessa resposta foi verificada pela análise dos teores de glicogênio intracelular e trealose,

que foram fortemente reduzidos em culturas limitadas em Zn, sendo válido ressaltar que a trealose é a principal molécula de carboidrato que é utilizada no armazenamento de energia pelos insetos para o voo. Estudos comparativos com culturas limitadas em nitrogênio mostraram que o acúmulo acentuado de carboidratos de reserva era específico para limitação de Zn e não apenas uma consequência de condições de excesso de glicose (DE NICOLA et al., 2007).

3.5 - EXISTE TOXICIDADE DO ZINCO PARA OS FUNGOS?

O excesso de Zn é tóxico, pois pode competir com outros íons metálicos pelos sítios ativos de enzimas ou proteínas de transporte intracelular. Por esta razão, os organismos desenvolveram mecanismos que controlam rigidamente os níveis intracelulares de Zn. A homeostase do Zn na levedura pode ser mediada pelo controle da absorção de Zn, armazenamento de Zn em vacúolos, ligação intracelular de Zn por metalotioneínas, família de proteínas de baixo peso molecular, e efluxo de Zn das células. Em *S. cerevisiae*, várias proteínas envolvidas na absorção e armazenamento de Zn foram identificadas (ZHAO; EIDE, 1996).

Embora os cátions bivalentes, incluindo Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} , sejam essenciais para o crescimento e o metabolismo, acima de certas concentrações, todos os cátions bivalentes, particularmente os dos chamados metais pesados, são tóxicos. Eles podem prejudicar o metabolismo celular, incluindo a nutrição iônica e, finalmente, a morte celular. Sua toxicidade está relacionada à força das habilidades de coordenação e à coordenação química do íon específico. Os efeitos tóxicos incluem o bloqueio de grupos funcionais de biomoléculas importantes, por exemplo, enzimas, inibindo o sistema de transporte de íons e nutrientes essenciais, deslocando e substituindo íons metálicos essenciais de localizações celulares e biomoléculas, desnaturando enzimas e interrompendo estruturas de membrana (JONES; GADD, 1990).

Zhao e Bai (2012) citam que o excesso de Zn é tóxico para a célula e que o nível celular deve ser finamente controlado dentro de uma faixa adequada, que normalmente está entre 0,1 e 0,5 mM

A concentração ótima de Zn no meio de crescimento está entre 4 e 8 μM (WALKER, 2004). No entanto, a concentração desse elemento pode variar em diferentes ambientes industriais, como mosto de uva, melação de cana ou mosto

cervejeiro. Na indústria vinícola, por exemplo, a concentração de Zn no mosto de uva está entre 0,04 e 7,8 ppm, sendo a média de 0,90 ppm. Normalmente, na produção de vinho, tais teores de Zn são satisfatórios para o andamento da fermentação. A concentração média de Zn no melaço de beterraba é de 40 ppm, enquanto no melaço de cana-de-açúcar é de 13 ppm, com concentração ideal para produção de etanol entre 1 e 5 ppm (DE NICOLA; WALKER, 2008).

3.6 - O SULFATO DE ZINCO AJUDA OS FUNGOS EM QUAIS TIPOS DE ESTRESSE?

O Zn pode ser um protetor no momento da toxicidade, além de aumentar a tolerância ao estresse térmico. Além disso, pode aumentar o conteúdo em leveduras floculantes cultivadas na presença de Zn, impactando significativamente a taxa de crescimento, o rendimento de etanol e a fluidez da membrana da levedura (ZHAO; BAI, 2009).

Este elemento induz respostas de estresse em um esforço para garantir a sobrevivência quando exposto a insultos ambientais, que incluem: 1) Aumento da síntese de trealose e glicerol, 2) Indução da biossíntese de proteínas de choque térmico/frio, 3) Indução enzimática de estresse, alterações estruturais na membrana celular, produção de glutathione e modulação da homeostase iônica (WALKER, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLADO DO FUNGO

O isolado de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575 foi obtido da *USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, NY, USA*. As culturas estoque foram mantidas a 4 °C em tubos de ensaio em batata dextrose ágar (BDA) (*Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA*) ajustado para pH 6,9.

Isolado de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575



USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Robert W. Holley
(*Center for Agriculture and Health, NY, USA*).

Figura 1. Isolado de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575



Fonte: Autoria Própria

Este fungo tem sido amplamente estudados em relação à tolerância a muitos tipos de estresses (ARAÚJO et al., 2018; AZEVEDO et al., 2014; DIAS et al., 2018; RANGEL et al., 2010a; RANGEL et al., 2010b; SOUZA et al., 2014). As culturas estoque foram mantidas a 4 °C em tubos de ensaio em batata dextrose ágar (BDA) (*Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA*).

4.2 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os conídios de *M. robertsii* foram produzidos em 23 ml de meio BDA ou meio BDA suplementado com sulfato de zinco (concentrações: 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9 e 2,0 μM), ou meio basal para crescimento sob estresse nutritivo, também chamado de meio mínimo (MM), que é um meio composto por Czapek Dox Agar sem sacarose, [(NaNO₃, 0,2%), (K₂HPO₄, 0,1%), (MgSO₄, 0,05%), (FeSO₄, 0,001%) e Bacto Agar 1,5% (Becton, Dickinson e CO, Sparks, MD, EUA) em poliestireno de 95mm. O pH de ambos os meios foi ajustado para 6,9.

4.3 CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO

Conídios do fungo *Metarhizium robertsii* foram transferidos de culturas de 14 dias de crescimento por inoculação em ponto com uma agulha no centro do meio de cultura batata dextrose e agar (BDA) em placas de Petri de poliestireno (95 x 15 mm). As placas inoculadas em meio BDA (controle), ou meio BDA suplementado com diferentes concentrações de Zinco foram mantidos a 26 °C no escuro. Os tamanhos de colônia foram medidos semanalmente durante 14 dias. O crescimento radial (mm) foi medido semanalmente a partir do centro do ponto de inoculação para a periferia da colônia em cada placa. Duas medições radiais foram feitas em ângulos retos para cada. Os locais de medição foram feitos nos mesmos eixos a cada dia. Este estudo foi realizado em triplicata utilizando três lotes diferentes de culturas (RANGEL et al., 2010b).

4.4 TOLERÂNCIA DOS CONÍDIOS PRODUZIDOS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Conídios do fungo *Metarhizium robertsii* foram produzido em meio BDA (controle), ou meio BDA suplementado com diferentes concentrações de zinco e mantido no escuro a 26 °C. Após a produção de conídios, foi avaliada a porcentagem de germinação destes conídios nas seguintes condições de estresse: 1) radiação UV (DIAS et al., 2018), 2) estresse osmótico causado pelo cloreto de potássio (RANGEL et al., 2008b), 3) exposição ao calor (RANGEL et al., 2008b; RANGEL et al., 2005; SANTOS et al., 2011).

Os conídios provenientes dos fungos e tratamentos acima foram removidos após 14 dias através de um leve toque com alça microbiológica sem tocar no substrato e foram suspensos em 10 ml de solução estéril de Tween 80 (0,01% v/v *Sigma -Aldrich Corporation, EUA*) em tubos de Pyrex (20 × 125 mm) (*Corning, Corning, NY, EUA*). As suspensões foram ajustadas para 1×10^5 conídios ml^{-1} com um hemocitômetro, posteriormente, foram agitadas vigorosamente e usadas para os experimentos a seguir:

4.4.1 Tolerância à radiação UV

Após preparo, as suspensões foram utilizadas imediatamente nos experimentos de exposição à radiação UV-B (RANGEL et al., 2006; RANGEL et al., 2008b). A suspensão (40 μl) de conídios produzidos em meio BDA suplementado com Zn e o controle produzido em meio BDA foram inoculados no centro do meio BDA (placas de poliestireno 35 x 15 mm) com 0,002% Benomyl com 25% de ingrediente ativo (*Hi-Yield Chemical Company, Bonham, TX*) (MILNER et al., 1991). O fungicida benomyl tem sido utilizado em inúmeros estudos para reduzir a velocidade da germinação e facilitando a contagem da germinação após 24 h (controle) e 48 h (exposto a radiação UV) (BRAGA et al., 2001a; BRAGA et al., 2001b; RANGEL et al., 2006; RANGEL et al., 2008b). As placas permaneceram abertas no fluxo laminar por 30 min para secar as suspensões de conídios. Após a secagem, as suspensões foram expostas em uma Câmara de Teste de Xenônio QSUN XE-3-HC 340S (QLAB® *Corporation, Westlake, OH, EUA*), que é um equipamento que realiza testes realísticos de radiação UV utilizando o filtro Daylight-Q. Para evitar a dessecação do meio, as placas foram cobertas com filme de diacetato. Placas de Petri com a suspensão seca de todos os isolados foram expostas por 60, 120, 180, 240 min.

A irradiância ponderada de Quaito no interior da câmara foi de 1335 mW m^{-2} . A irradiância espectral foi medida conforme descrito em outro lugar (Dias et al., 2018; Rangel et al., 2004). O espectro de ação do dano ao DNA (formação do dímero de pirimidina de ciclobutano) desenvolvido por Quaito et al. (1992) e normalizado para unidade em 300 nm foi empregado para calcular irradiâncias UV ponderadas em mW m^{-2} . Filtros de diacetato de celulose (*JCS Industries, Le*

Miranda, CA, EUA) foram usados para excluir radiação UV-C e UV-B de comprimento de onda curto. A irradiância e a temperatura do equipamento foram ajustadas conforme DIAS et al. (2018).

As placas de Petri controle (uma para cada isolado) com a suspensão de conídios não expostas à radiação UV foram cobertas com papel alumínio e colocadas na câmara por 210 min.

A germinação de conídios foi observada em 24 h (placas de controle) ou 48 h (placas irradiadas com UV) após as suspensões de conídios serem inoculadas no meio conforme descrito acima. A avaliação foi realizada em triplicata utilizando-se três lotes de diferentes culturas.

4.4.2 Tolerância ao estresse osmótico

A germinação dos conídios produzidos sob condições normais (controle) ou em meio suplementado com Zn foi ensaiada em meio BDA (controle) ou meio BDA em placas de Petri de poliestireno (35 x 15 mm) suplementado com cloreto de potássio a 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 e 1.9 M (concentração final) (RANGEL et al., 2008a). Pelo menos 300 conídios por placa foi avaliado após 24 horas e a porcentagem de germinação foi calculada (BRAGA et al., 2001b). Cada tratamento foi repetido três vezes com um lote fresco de conídios produzidos por cada repetição.

4.4.3 Tolerância ao calor

A suspensão de conídios do fungo *Metarhizium robertsii* produzidos em condições normais BDA ou produzidos em meio BDA suplementado com Zn foram agitadas vigorosamente em tubos de ensaio e foram colocados em banho térmico por 0 (controle), 1, 2, 3, 4 h a 45 °C (SOUZA et al., 2014). Após a exposição ao calor, 40 µl da suspensão foi inoculada no centro das placas de Petri (35 x 15 mm) com meio BDA suplementado com 0.003% benomyl, e a germinação de conídios foram avaliados após intervalos de 24 horas (controle) ou 48 horas (conídios expostos ao calor). A porcentagem de germinação foi calculada de acordo com os itens anteriores.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos do crescimento micelial, e dos diferentes estresses osmótico, térmico e a radiação uv-b foram avaliados a partir de um delineamento inteiramente casualizado (dic) com diferentes repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância por meio do programa agroestat (BARBOSA; MALDONADO JÚNIOR, 2015), seguido da comparação das médias pelo teste *tukey* ($p < 0,05$).

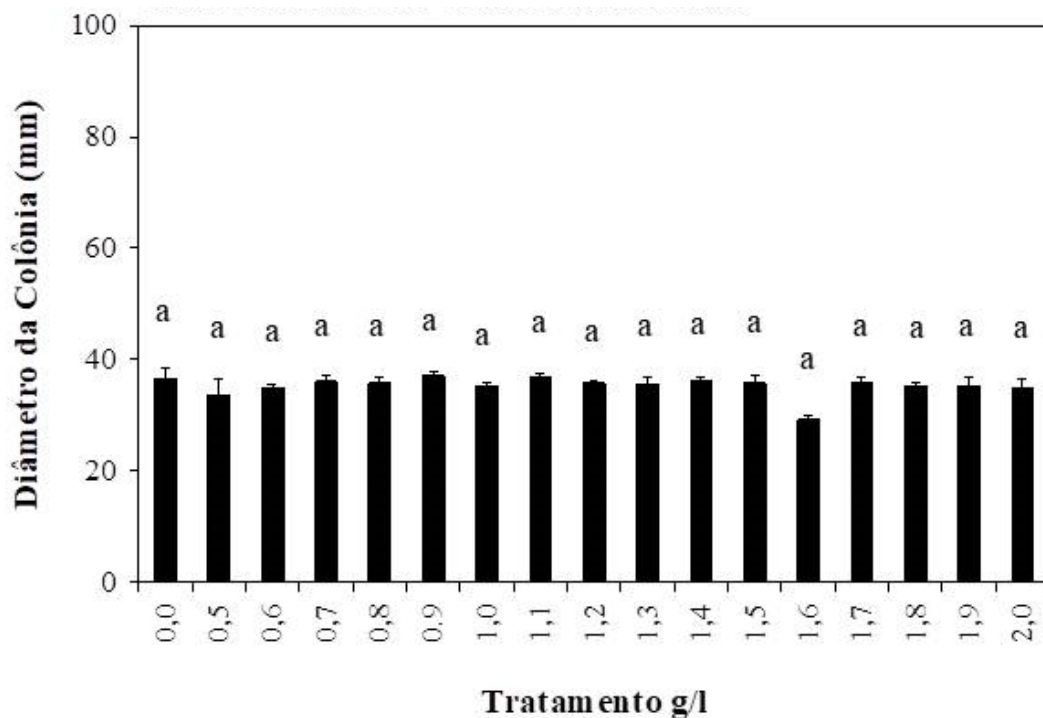
5 RESULTADOS

5.1 CRESCIMENTO RADIAL DO MICÉLIO

No que diz respeito ao crescimento radial do micélio dos fungos em estudo, analisou-se os mesmos após 07 e 14 dias de inoculação, estes crescidos no meio de cultura Batata dextrose e agar (BDA).

Ao analisar o gráfico do crescimento radial do micélio suplementado com sulfato de zinco no intervalo de tempo de sete dias, nas diversas concentrações utilizadas mostrou-se que este sal não influencia no crescimento deste fungo, tal fato pode ser verificado ao observar o diâmetro das colônias com sete dias (Figura 2). No que concerne à estatística, observou-se que não houve diferença significativa entre as diversas concentrações utilizadas, considerando $p < 0,05$.

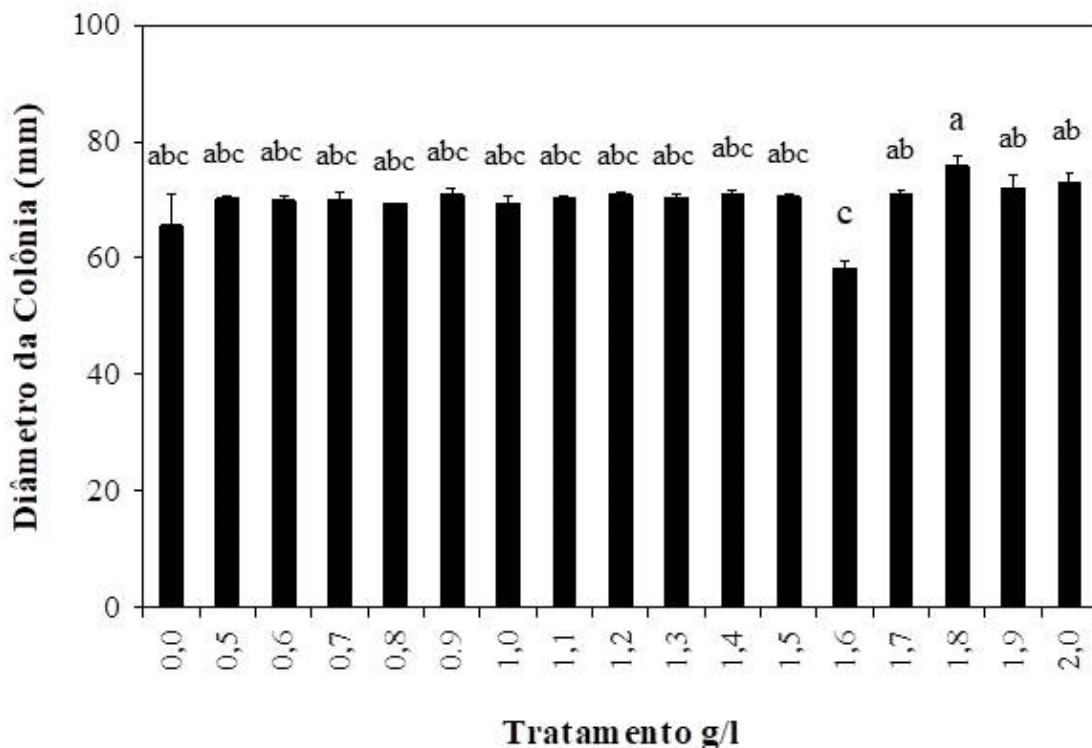
Figura 2 - Crescimento micelial do fungo *Metarhizium robertsii* no meio de cultura batata dextrose e agar (BDA) suplementado com sulfato de zinco no período de sete dias. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)



Fonte: Autoria própria

No que diz respeito ao crescimento radial do micélio, em meio de cultura suplementado com sulfato de zinco no período de 14 dias, nas diversas concentrações utilizadas revelou que este sal não influencia no crescimento deste fungo. No que concerne à estatística, observou-se que não houve diferença significativa entre as diversas concentrações utilizadas, considerando $p < 0,05$. A única diferença foi observada entre as concentrações 1.6 e 1.8 (Figura 3).

Figura 3 - Crescimento micelial do fungo *Metarhizium robertsii* no meio de cultura batata dextrose e agar (BDA) suplementado com sulfato de zinco no período de 14 dias. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)



Fonte: Autoria própria

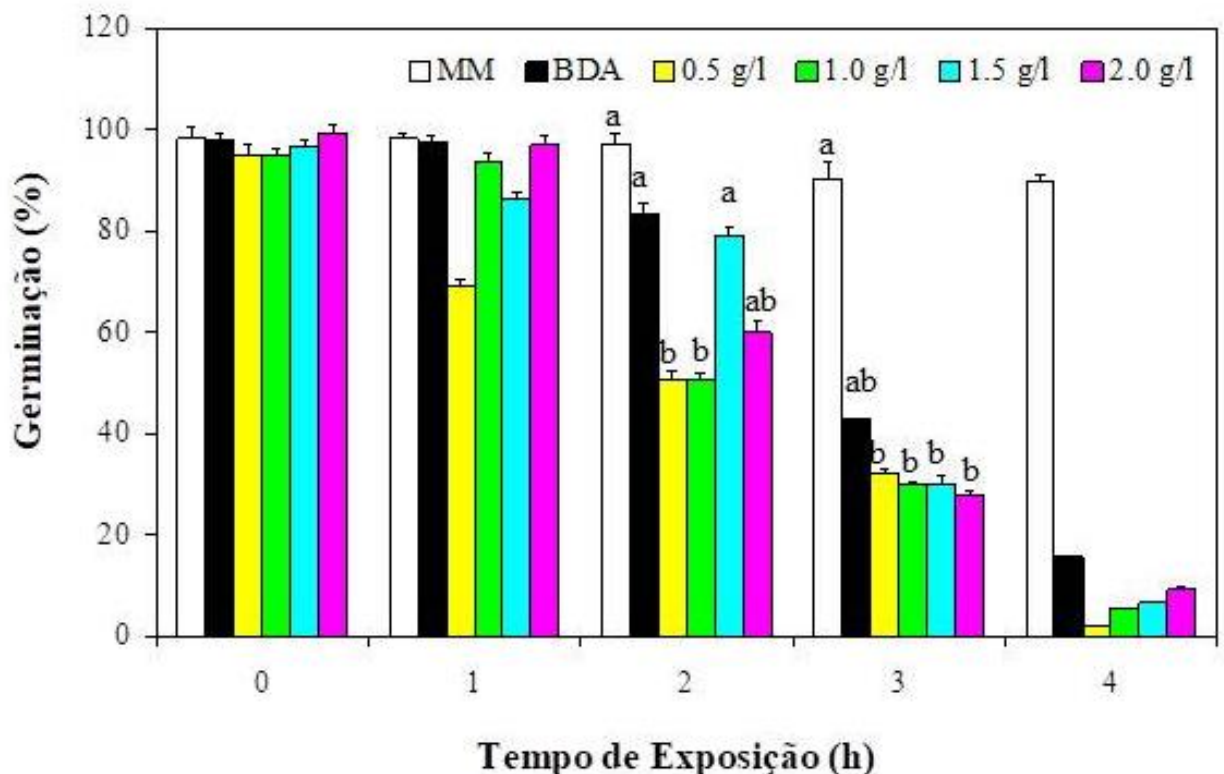
5.2 TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV

Foi observado para 2 h de radiação UV-B, a germinação dos conídios produzido nos tratamentos controle e meio mínimo (MM), bem como conídios produzidos em meio BDA suplementado com 1,5 e 2,0 g/l de sulfato de zinco produziram conídios com maior tolerância à radiação UV-B. Entretanto conídios

produzidos com BDA suplementado com 0,5 e 1,0 g/l de sulfato de zinco tiveram uma menor tolerância. Entretanto após 3 h de radiação UV-B a tolerância de conídios produzidos em BDA suplementadas com sulfato de zinco foram similares ao controle. Sendo que o MM o que produziu conídios com maior tolerância (Figura 3).

Observa-se que, o meio suplementado com sulfato de zinco na concentração de 1.5 g/l obteve tolerância semelhante aos conídios produzidos sob condições normais (Controle), sendo assim mais tolerantes que os produzidos nas concentrações 0.5, 1.0 e 2.0 g/l. (Figura 4).

Figura 4- Conídios de *Metarhizium robertsii* produzidos sob condições normais (controle), meio BDA suplementado com sulfato de zinco e meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses tratamentos foi exposta à radiação UV-B. Percentual médio de germinação de conídios após exposição à radiação UV-B de conídios de *M. robertsii* produzidos nas condições acima. Para exposição ao estresse, suspensões de conídios foram expostas à radiação UV-B por 1, 2, 3 e 4 horas. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)



Fonte: Autoria própria

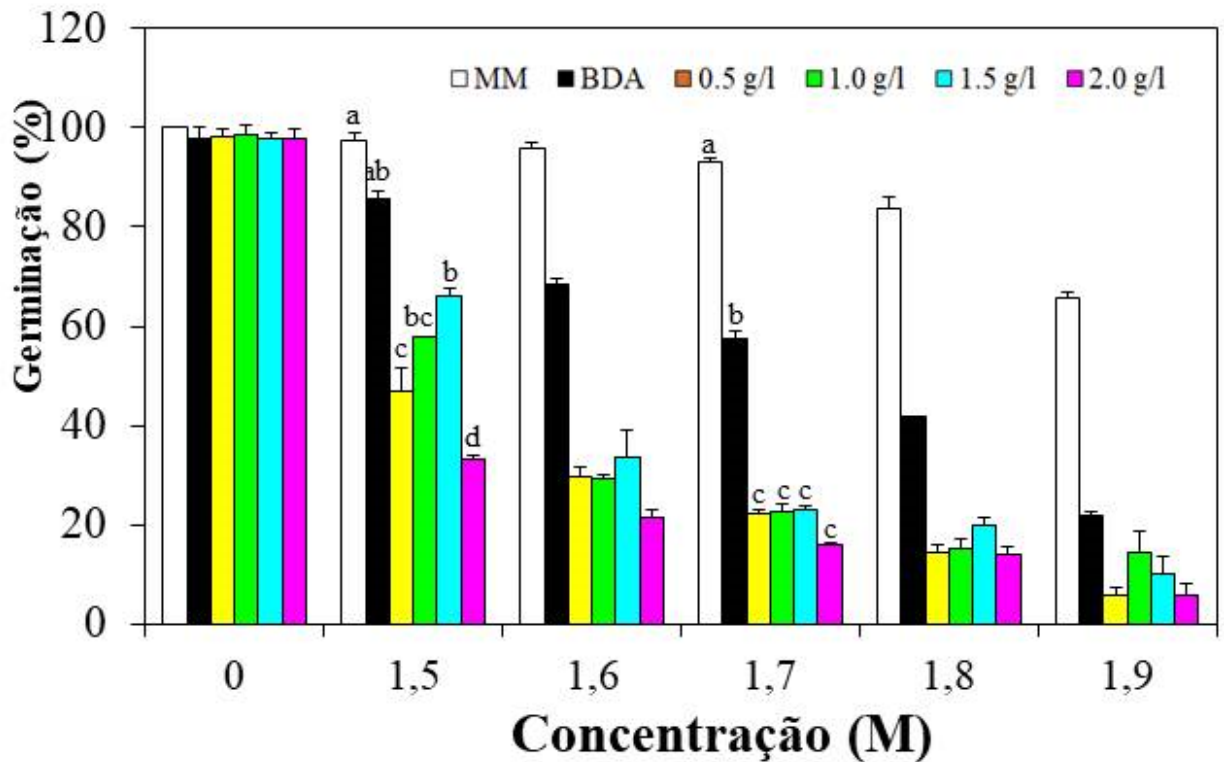
5.3 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OSMÓTICO

A germinação de conídios produzidos em meio de cultura suplementado com sulfato de zinco foi menor que os conídios produzidos em BDA especialmente a partir de 1,7 M. O meio mínimo produziu conídios com maior tolerância ao estresse osmótico (Figura 4).

O sulfato de zinco tornou os conídios menos tolerantes quando comparado ao controle, podendo observar também que não houve diferença das tolerâncias entre as diversas concentrações de KCl utilizadas (Figura 5).

Figura 5 - Conídios de *Metarhizium robertsii* produzidos sob condições normais (controle), meio BDA suplementado com sulfato de zinco e meio mínimo (MM).

Porcentagem média de germinação de conídios em meio BDA suplementado com cloreto de potássio de conídios de *M. robertsii* produzidos sob as condições acima. A germinação dos conídios foi realizada em BDA (controle) ou BDA suplementado com 1,3; 1,4; 1,5; 1,7; 1,9 M KCl. As comparações estatísticas foram feitas dentro de cada concentração de KCl, não entre as diferentes concentrações. As barras de erro são erros padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em momentos diferentes. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)



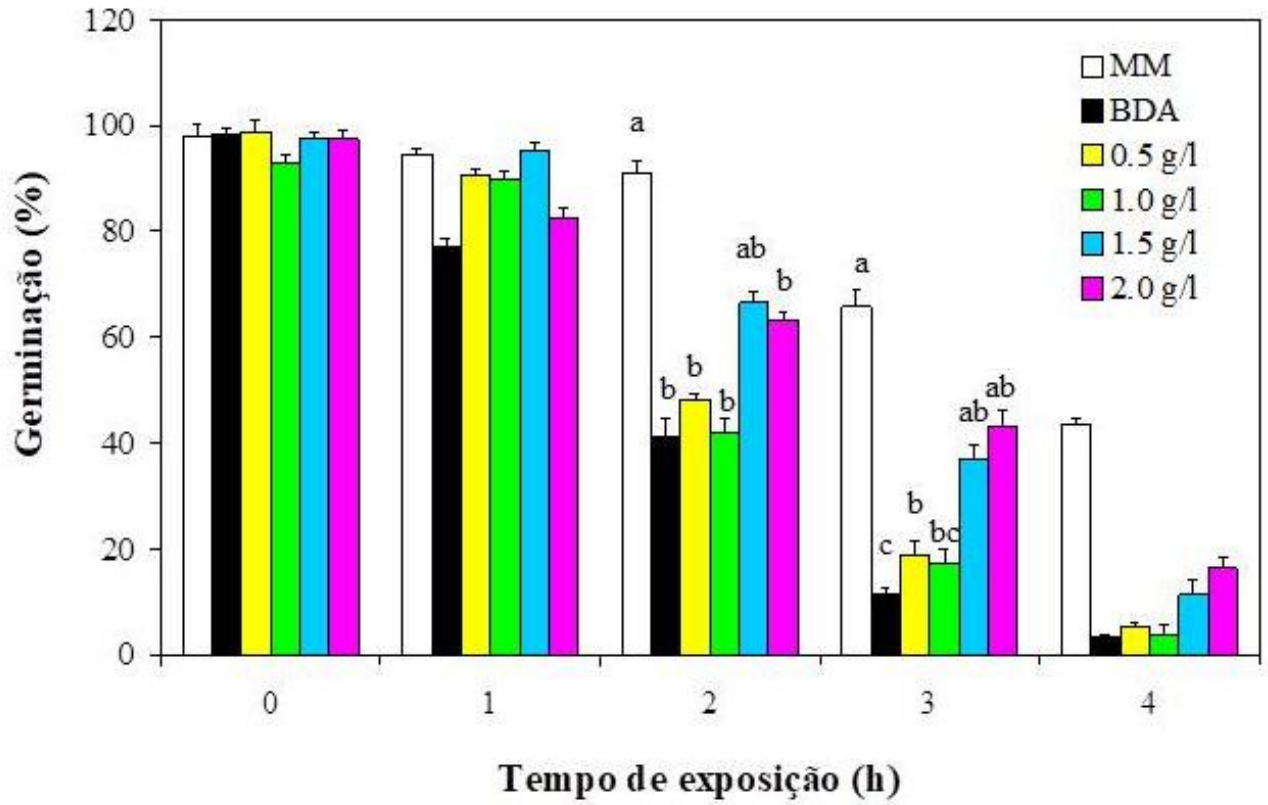
Fonte: Autoria própria

5.4 TOLERÂNCIA AO CALOR

A germinação de conídios de *M. robertsii* produzidos em meio suplementado com sulfato de zinco foi similar ao controle após 2 h de exposição ao calor. Entretanto após 3 h de exposição ao calor foi verificado que conídios produzidos em meio suplementado com sulfato de zinco nas concentrações 0,5, 1,5 e 2,0 g/l foram mais tolerantes que os conídios produzidos no controle. Observa-se que os conídios produzidos em meio mínimo foram mais tolerantes ao se comparar com os outros tratamentos (Figura 6).

Figura 6 - Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos sob condições normais (controle), meio BDA suplementado com sulfato de zinco e meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses tratamentos foi exposta a estresse térmico. A exposição ao calor ocorreu em suspensão em banho térmico a 45°C. A germinação dos conídios foi realizada em meio de cultura BDA contendo 0,003% de benomil. As comparações estatísticas foram feitas dentro de cada tempo

de exposição, não entre os diferentes tempos de exposição. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)



Fonte: Autoria Própria

6 DISCUSSÃO

Os efeitos fisiológicos e morfológicos de íons de Zn nos fungos entomopatogênicos *Metarhizium robertsii* foram analisados através da avaliação do crescimento radial do micélio, onde se analisou os mesmos após sete e 14 dias de inoculação, em meio de cultura batata dextrose e agar (BDA).

Buscou-se estudar a tolerância de conídios produzidos em meios de cultura com Zn expostos às condições de estresse osmótico (cloreto de potássio), radiação ultravioleta e calor nos fungos *Metarhizium robertsii*.

Tal contexto assemelha-se ao estudo de De Nicola e Walker (2008) onde se observou que concentrações de Zn na faixa de 0,25 - 0,50 ppm foram relatados como ideais para o crescimento celular e no que diz respeito à glicólise encontrou-se um intervalo de 1 - 2 ppm. Vale ressaltar que a concentração do Zn é variável em diferentes meios industriais, como mosto de vinho, melação de cana ou cerveja mosto.

Torna-se válido ressaltar que as deficiências de Zn podem influenciar no processo de fermentação, causando redução do crescimento das células de levedura, assim como diminuição da produção de etanol. Logo, quando os níveis de Zn caem abaixo de cerca de 0,1 ppm, pode-se verificar alterações no processo de fermentação, levando a fermentações lentas e/ou incompletas (DE NICOLA; WALKER, 2008).

De Nicola e Walker (2008) nos mostra ainda que as propriedades físico-químicas do meio ambiente influenciam diretamente na fisiologia das células de levedura, podendo alterar tanto a viabilidade quanto a vitalidade. Nas fases do processo de fermentação industrial do álcool, pode-se observar que uma variação nas concentrações pode impactar significativamente no crescimento e fermentação celular, sendo assim importante compreender as interações entre estresses ambientais e leveduras, principalmente para a indústria cervejeira, produtores de vinho e destiladores visando otimizar o crescimento celular, a viabilidade e o desempenho da fermentação. Dentre os stress nos quais são submetidos nos processos industriais podemos encontrar os químicos (alterações de pH, limitação / privação de nutrientes, toxicidade / limitação de íons metálicos), físicos (estresse osmótico, mudanças nas temperaturas, desidratação, reidratação) e biológicos

(envelhecimento celular, alterações genotípicas ou competição de outros organismos).

De Nicola et al. (2005) e Walker et al. (2006) estudaram a implicação da variação do nível de Zn na fluidez da membrana da levedura de cerveja, assim como a ação dos metais no controle das respostas da levedura ao estresse ambiental. Uma cepa de levedura de cerveja de *S. cerevisiae* foi extensivamente cultivada em meio com baixo teor de Zn para esgotar os níveis celulares de Zn e, em seguida, lançado em mosto contendo concentrações variáveis de Zn. Além de crescimento e fermentação, a fluidez da membrana foi avaliada por uma modificação do método de Learmonth e Gratton (2002) medindo a polarização generalizada (GP) de Laurdan. Verificou-se que o Zn impactou significativamente sobre a taxa de crescimento, rendimento de etanol e fluidez da membrana de levedura. Além disso, foi descoberto que os valores de GP da célula (e, portanto, a fluidez da membrana) mudaram com o envelhecimento da célula e com disponibilidade de Zn. Células com baixo teor de Zn (aprox. 0,5 fg / célula) exibiram baixos níveis de GP indicando alta fluidez da membrana, o que pode resultar do estresse de etanol quando os níveis de Zn estão baixos.

Ainda sobre o etanol, sabe-se que a temperatura influencia a membrana plasmática por estar relacionada ao aumento da sua fluidez. Sugere-se que a membrana plasmática é o compartimento celular primário que controla a tolerância ao calor, existindo evidências de que o etanol e o estresse de temperatura influenciam a fluidez da membrana plasmática encapsulada permitindo uma liberação geral de íons metálicos. Sabe-se que um nível adequado de Zn pode estabilizar a membrana plasmática e auxiliar as células de levedura a controlar os efeitos de alguns estresses ambientais (DE NICOLA; WALKER, 2008). Experimentos realizados com uma cepa de levedura de cerveja de *S. cerevisiae* sob temperatura, etanol e tensões combinadas de temperatura / etanol, mostraram uma liberação significativa de íons zinco acompanhada pela perda da viabilidade da cultura. Após 1 e 5 h de exposição, as células retiveram o zinco e a viabilidade após estresse por calor ou etanol, embora a combinação desses insultos teve um efeito dramático sinérgico sobre a viabilidade das células que estavam todos mortos após apenas uma hora do início do estresse. Após 24 h exposição, todas as células morreram, embora algum Zn residual tenha sido associado à célula morta provavelmente devido a absorção apertada da parede celular (DE NICOLA, 2007).

No estudo realizado, ao avaliar o crescimento radial do micélio suplementado com sulfato de zinco nos intervalos de tempo de sete dias e 14 dias, nas diversas concentrações utilizadas observou-se que este sal não influencia no crescimento deste fungo, não havendo, portanto, diferença significativa entre as diversas concentrações utilizadas, considerando $p < 0,05$.

No que diz respeito à tolerância à radiação UV, observou-se que para 2 h de radiação UV-B, a germinação dos conídios produzidos nos tratamentos controle e meio mínimos (MM), bem como conídios produzidos em meio BDA suplementado com 1,5 e 2,0 g/l de sulfato de zinco produziram conídios com maior tolerância à radiação UV-B. Entretanto conídios produzidos com BDA suplementado com 0,5 e 1,0 g/l de sulfato de zinco tiveram uma menor tolerância. Diante disso, observou-se que, o meio suplementado com sulfato de zinco na concentração de 1.5 g/l obteve tolerância semelhante aos conídios produzidos sob condições normais (controle), sendo assim mais tolerantes que os produzidos nas concentrações 0.5, 1.0 e 2.0 g/l.

Tal fato assemelha-se com o estudo de Dias et al. (2021) onde foram estudadas sete espécies de fungos , sendo elas *A. aleyrodis*, *B. bassiana*, *C. fumosorosea*, *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. robertsii* e *T. cylindrosporium*, onde foram cultivadas sob iluminação e produziram conídios com maior tolerância a certas condições de estresse quando comparadas às que eram produzidos no escuro, com isso, o estudo mostrou que o crescimento micelial sob luz branca constante aumentou significativamente a tolerância à radiação UV em conídios de isolados *M. robertsii* (ARSEF 2575) e *C. fumosorosea* (ARSEF 3889). Mostrando assim que, os conídios produzidos sob estresse nutricional se demonstram mais tolerantes à radiação UV quando comparados com os produzidos sob luz branca (DIAS et al., 2021).

Em relação ao estresse osmótico, pode se observar que a germinação de conídios produzidos em meio de cultura suplementado com sulfato de zinco foi menor quando comparado aos conídios produzidos em BDA, principalmente a partir de 1,7 M, sendo que o meio mínimo produziu conídios com maior tolerância a esse tipo de estresse. Observou-se também que o sulfato de zinco tornou os conídios menos tolerantes quando comparado ao controle, não havendo assim não havendo assim diferença nas tolerâncias entre as diversas concentrações de KCl utilizadas.

Dias et al. (2021) nos mostra que o crescimento micelial sob luz branca constante resultou em conídios com maior tolerância ao estresse osmótico em cinco

espécies de fungos, dentre elas o *M. robertsii* (ARSEF 2575). Podendo observar que para outras espécies como *B. bassiana*, o crescimento sob luz branca provocou um aumento da sensibilidade em concentrações mais altas de KCl. Em contrapartida, conídios de *T. inflatum* (ARSEF 4877) produzidos sob luz se mostraram menos tolerantes aos serem comparados com os conídios produzidos ao escuro. Conídios de *M. robertsii* (ARSEF 2575), produzidos sob estresse nutritivo se mostraram mais tolerantes ao estresse osmótico do que os conídios produzidos no escuro.

No tocante à tolerância ao calor, os resultados nos mostram que a germinação de conídios de *M. robertsii* produzidos em meio suplementado com sulfato de zinco após 3 h de exposição ao calor verificou-se que conídios suplementados nas concentrações 0,5, 1,5 e 2,0 g/l foram mais tolerantes que os conídios produzidos no controle, assim como os produzidos em meio mínimo quando comparados com os outros tratamentos.

No estudo de Dias et al. (2021), observa-se que das sete espécies de fungos estudadas o crescimento micelial sob luz branca contribuiu positivamente para o aumento da tolerância ao calor dos conídios de apenas duas delas, sendo *M. robertsii* (ARSEF 2575) e *Metarhizium anisopliae* (ARSEF 5749). No que concerne ao estresse nutritivo causado pelo MM verificou-se que este contribuiu para o aumento da tolerância ao calor dos conídios em vários fungos, como as seguintes espécies *Metarhizium brunneum* (ARSEF 1187), *M. robertsii* (ARSEF 2575), *Tolyocladium inflatum* (ARSEF 4877) e *M. anisopliae* (ARSEF 5749).

Em contrapartida, outros estudos mostram que a luz azul contribuiu consideravelmente para a produção de conídios, porém o crescimento sob luz branca e vermelha produziu uma quantidade estatisticamente similar de conídios ao crescimento no escuro. Além de que, os conídios produzidos na luz azul exibiram coloração mais escura do que os conídios produzidos no escuro (OLIVEIRA et al., 2018).

Com isso, percebemos que conídios de *M. robertsii* produzidos sob estresse nutricional acumulam quantidade superior de eritritol, manitol e trealose, tal fato pode esclarecer a alta tolerância desses conídios em combate ao estresse térmico estresse oxidativo, estresse osmótico e radiação UV (RANGEL et al., 2006a, 2008, 2015b; RANGEL, 2011).

É válido ressaltar a importância da utilização da microbiologia para compreender a relação entre saúde e meio ambiente, buscando alternativas que

visem minimizar os danos causados através da exposição à estresses, principalmente, no decorrer dos processos industriais, e portanto trabalhar esta área dentro da Engenharia Biomédica permite o desenvolvimento e a aplicação de tecnologias voltadas tanto para a área da saúde quanto para a área industrial de forma que ocorra uma produção de conhecimento que leve ao fortalecimento das inovações tecnológicas.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos fisiológicos e morfológicos do sulfato de zinco nos fungos entomopatogênicos *Metarhizium robertsii*, assim como o crescimento micelial deste fungo, e a tolerância deste aos estresses de conídios produzidos em meios suplementados com zinco sob a radiação UV, estresse osmótico (cloreto de potássio) e calor. Conforme observado nos resultados verificamos que o crescimento radial do micélio do fungo *M. robertsii* não sofreu alteração, quando o meio de cultura foi suplementado com sulfato de zinco, tal fato nos mostra que a suplementação com zinco não influencia no crescimento deste fungo.

No que diz respeito à tolerância ao calor, observou-se que o sulfato de zinco induziu maior tolerância ao calor dos conídios do fungo *M. robertsii*, quando comparado aos conídios sob condições de controle e MM. Os conídios do fungo *M. robertsii* produzidos em meio de cultura suplementada com sulfato de zinco, expostos a condições de estresse osmótico e radiação UV-B, não induziram maiores tolerâncias quando comparados aos meios de controle e mínimo.

Como próximo passo dessa pesquisa, e levando em consideração as observações expostas, vislumbra-se a realização de novas pesquisas com a utilização do fungo entomopatogênicos *Metarhizium robertsii* suplementado com outros sais e/ou expostos a outras condições de estresses como a iluminação.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. A. S.; DIAS, L. P.; FERREIRA, P. C.; MITTMANN, J.; PUPIN, B.; BRANCINI, G. T. P.; BRAGA, G. Ú. L.; RANGEL, D. E. N. Responses of entomopathogenic fungi to the mutagen 4-nitroquinoline 1-oxide. **Fungal Biology**, v. 122, p. 621-628, 2018.
- AZEVEDO, R. F. F.; SOUZA, R. K. F.; BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N. Responsiveness of entomopathogenic fungi to menadione-induced oxidative stress. **Fungal Biology**, v. 118, n. 12, p. 990-995, 2014.
- BARBOSA, J. C.; MALDONADO JUNIOR, W. **AgroEstat - sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 2015.
- BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 678-687, 2000.
- BÖHM, S.; FRISHMAN, D.; MEWES, H. W. Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 2464-2469, 1997.
- BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 105, p. 874-882, 2001a.
- BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium anisopliae* isolates from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 98-108, 2001b.
- CABANIS, J.C. ; FLANZY, C. **Oenologie, fondements scientifiques technologiques**. Paris: Lavoiser Publ, 1998.
- CHANDRASENA, G.; WALKER, G.M.; STAINES, H.J. Use of response surfaces to investigate metal ion interactions in yeast fermentations. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 55, p. 24-29, 1997.
- DE NICOLA, R.; ANTHONY, S.; WALKER, G. M.; LEARMONTH, R. Impact of zinc on yeast membranes and cell physiology during brewing fermentations. *In*: Proceedings of the XXIVth International Specialised Symposium on Yeasts, Oropessa del Mar, Spain. **Anais**. Spain: University of Southern Queensland, 2005.
- DE NICOLA, R.; HAZELWOOD, L. A.; DE HULSTER, E. A. F.; WALSH, M.C.; KNIJNENBURG, T. A.; REINDERS, M. J. T.; WALKER, G. M.; PRONK, J. T.; DARAN, J. M.; DARAN-LAPUJADE, P. Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to zinc limitation in chemostat cultures. **Appl Environ Microb**, v. 73, p. 7680-7692, 2007.

DE NICOLA, R.; WALKER, G. M. Interaction between yeasts and zinc. *In*: SATYANARAYANA, T.; KUNTZE, G. (Eds.). **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Dordrecht: Springer Science e Business Media BV, 2008.

DIAS, L. P.; ARAÚJO, C. A. S.; PUPIN, B.; FERREIRA, P. C., BRAGA, G. Ú. L., RANGEL, D. E. N. The Xenon Test Chamber Q-SUN[®] for testing realistic tolerances of fungi exposed to simulated full spectrum solar radiation. **Fungal Biology**, v. 122, p. 592-601, 2018.

DIAS, L. P.; SOUZA, R. K. F.; PUPIN, B.; RANGEL, D. E. N. Conidiation under illumination enhances conidial tolerance of insect-pathogenic fungi to environmental stresses, **Fungal Biology**, v. 125, n. 11, p. 891-904, 2021.

FERREIRA, P. C.; PUPIN, B.; RANGEL, D. E. N. Stress tolerance of soil fungal communities from native Atlantic forests, reforestations, and a sand mining degraded area. **Fungal Biology**, v. 122, p. 400-409, 2018.

HARISH, E.; OSHEROV, N. Fungal Priming: Prepare or Perish. **J Fungi (Basel)**, v. 8, n. 5, p. 448, 2022.

JONES, R. P., GADD, G. M. Ionic nutrition of yeast—physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 402-418, 1990.

KREDER, G. C. Yeast assimilation of trub-bound zinc. **J. Am. Soc. Brew. Chem**, v. 57, n. 4, p. 129-132, 1999.

MEDINA, E. Q. A.; OLIVEIRA, A. S.; MEDINA, H. R.; RANGEL, D. E. N. Serendipity in the wrestle between *Trichoderma* and *Metarhizium*. **Fungal Biology**, v. 124, p. 418-426, 2020.

MILNER, R. J.; HUPPATZ, R. J.; SWARIS, S. C. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. **J. Invertebr. Pathol**, v. 57, p. 121-123, 1991.

OBATA, H.; HAYASHI, A.; TODA, T.; UMEBAYASHI, M. Effects of zinc deficiency on the growth, proteins, and other constituents of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, cells. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 42, p. 147-154, 1996.

OLIVEIRA, A. S.; BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N. *Metarhizium robertsii* illuminated during mycelial growth produces conidia with increased germination speed and virulence. **Fungal Biology**, v. 122, n. 6, p. 555-562, 2018.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycol. Res**, v. 112, p. 1362-1372, 2008.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; HALLSWORTH, J. E.; ROBERTS, D. W. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. **Curr. Genet**, v. 61, 383-404, 2015.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 116-125, 2005.

RANGEL, D. E. N., ANDERSON, A. J., ROBERTS, D. W. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 127-134, 2006.

RANGEL, D. E. N.; ALSTON, D. G.; ROBERTS, D. W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research**, v. 112, p. 1355-1361, 2008a.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, v. 112, p. 1362-1372, 2008b.

RANGEL, D. E. N.; DETTENMAIER, S. J.; FERNANDES, E. K. K.; ROBERTS, D. W. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, p. 375-389, 2010a.

RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, E. K. K.; DETTENMAIER, S. J.; ROBERTS, D. W. Thermotolerance of germlings and mycelium of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium* spp. and mycelial recovery after heat stress. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, p. 344–350, 2010b.

RANGEL, D. E. N.; ALDER-RANGEL, A.; DADACHOVA, E.; FINLAY, R. D.; KUPIEC, M.; DIJKSTERHUIS, J.; BRAGA, G. U. L.; CORROCHANO, L. M.; HALLSWORTH, J. E. Fungal stress biology: a preface to the Fungal Stress Responses special edition. **Curr. Genet**, v. 61, p. 231-238, 2015a.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; HALLSWORTH, J. E.; ROBERTS, D. W. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. **Curr. Genet**, v. 61, p. 383-404, 2015b.

RANGEL, D. E. N.; FINLAY, R. D.; HALLSWORTH, J. E.; DADACHOVA, E.; GADD, G. M. Fungal strategies for dealing with environmental and agricultural stress. **Fungal Biology**, v. 122, p. 602-612, 2018.

RANGEL, D. E. N. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 27, p. 1281-1296, 2011.

RANGEL, D.E.N.; FERNANDES, E.K.K.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Culture of *Metarhizium robertsii* on salicylic-acid supplemented medium induces increased conidial thermotolerance. **Fungal Biology**, v. 116, p. 438-442, 2012.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; HALLSWORTH, J. E.; ROBERTS, D. W. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. **Curr. Genet**, v. 61, p. 383-404, 2015.

SANTOS, M. P.; DIAS, L. P.; FERREIRA, P. C.; PASIN, L. A.; RANGEL, D. E. N. Cold activity and tolerance of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium* spp. to UV-B irradiation and heat. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 209-13, 2011.

SOUZA, R. K. F.; AZEVEDO, R. F. F.; LOBO, A. O.; RANGEL, D. E. N. Conidial water affinity is an important characteristic for thermotolerance in entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, p. 448–461, 2014.

TOSUN, A.; ERGUN, M. Uso do método de design experimental para investigar os efeitos dos íons metálicos em fermentações de levedura. **J. Chem. Biotechnol**, v. 82, p. 11-15, 2007.

VALLEE, B.L.; AULD, D.S. Coordenação, função e estrutura do zinco de enzimas de zinco e outras proteínas. **Biochemistry**, v. 29, p. 5647–5659, 1990.

WALKER, G. M. Metals in yeast fermentation processes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 54, p. 197- 229, 2004.

WALKER, G. M.; WALKER, R. S. K. Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 105, p. 87-129, 2018.

WALKER, G. M.; BASSO, T. O. Mitigating stress in industrial yeasts. **Fungal Biology**, v. 124, n. 5, p. 387-397, 2019.

WALKER, G. M.; BIRCH, R. M. Environmental stress responses in industrial yeasts. *In: 5th Aviemore Conference on Malting, Brewing e Distilling, London.* **Anais**. London: Campbell Institute of Brewing, 1999.

ZHAO, Y.; LIN, Y. H. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a chemostat under high glucose conditions. **Biotechnol Lett**, v. 25, p. 1151-4, 2003.

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 2454-2458, 1996.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Zinc and yeast stress tolerance: Micronutrient plays a big role. **J Biotechnol**, v. 158, p. 176-183, 2012.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **J Biotechnol**, v. 144, p. 23-30, 2009.