

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE FUNGOS
ENCAPSULADOS E ARMAZENADOS EM
DIFERENTES TEMPERATURAS**

VIRGÍNIA GUERRA ELIZEI

2009

VIRGÍNIA GUERRA ELIZEI

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE FUNGOS ENCAPSULADOS E
ARMAZENADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Dra. Sara Maria Chalfoun

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Elizei, Virgínia Guerra.

Avaliação da viabilidade de fungos encapsulados e armazenados em diferentes temperaturas / Virgínia Guerra Elizei. – Lavras : UFLA, 2009.

50 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Sara Maria Chalfoun.

Bibliografia.

1. Imobilização celular. 2. Encapsulamento de fungos. 3. Alginato de sódio. 4. Formulação granulada. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.2

VIRGÍNIA GUERRA ELIZEI

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE FUNGOS ENCAPSULADOS E
ARMAZENADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 04 de março de 2009

Prof. Dr. Luis Roberto Batista

UFLA

Prof. Dr. Carlos José Pimenta

UFLA

Dra. Sara Maria Chalfoun
EPAMIG
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2009

Dedico

A Deus,

Aos meus pais, que junto com minha vó Neia, apoiaram-me e fizeram com que esse trabalho fosse realizado. Essa conquista também é de vocês!

Aos meus irmãos Rafaela e Giovani, pelo carinho e incentivo.

E a todos que eu amo e que de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao departamento de Biologia pela oportunidade da realização do curso.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pela bolsa de estudo. A EPAMIG/EcoCentro onde foram realizados os testes.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura onde foram tiradas as fotografias.

À pesquisadora Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza pela orientação e confiança.

Aos Pesquisadores da EPAMIG, Dr. Paulo Rebelles Reis e Dr. Rodrigo Luz da Cunha pelas sugestões e auxílio.

Ao Dr. Marcelo Claudio Pereira.

À Dra. Deila Magna dos Santos Botelho e Ms. Alex de Oliveira Ribeiro (Unilavras) pelo apoio estatístico.

A todos os funcionários do laboratório de microbiologia do departamento de Biologia.

Aos professores Dra. Rosane Freitas Schwan, Dra. Cristina F. Silva e Dr. Luis Roberto Batista pelo apoio nos trabalhos durante o curso.

Ao professor Dr. Eduardo Alves e Elô do Laboratório MEV.

A todos os funcionários e estagiários da EPAMIG, principalmente Pedro Paulo, Ana Paula e Cintia pela ajuda nas análises com *Aspergillus niger*.

Ao Pedro Paulo pelo carinho e paciência.

A meus pais, avó e irmãos pelo incentivo.

Aos colegas de curso Maria Gabriela, Silvia e Márcia pelo companheirismo.

OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Pagina
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Métodos de imobilização celular.....	03
2.2 Suportes utilizados para imobilização de células microbianas.....	06
2.3 Utilização de microrganismos encapsulados.....	09
2.4 Utilização agroindustrial de espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	12
2.5 Utilização agroindustrial de espécies do gênero <i>Cladosporium</i>	14
2.6 Utilização agroindustrial de espécies do gênero <i>Penicillium</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Encapsulamento de fungos.....	18
3.2 Avaliação da viabilidade dos fungos encapsulados e conservados em diferentes temperaturas.....	19
3.3 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura – MEV.....	19
3.4 Análises estatística.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Testes ‘in vitro’ da viabilidade de <i>Aspergillus niger</i> imobilizados em grânulos de alginato de sódio.....	21
4.2 Testes ‘in vitro’ da viabilidade de <i>Cladosporium cladosporioides</i> imobilizados em grânulos de alginato de sódio.....	26
4.3 Testes ‘in vitro’ da viabilidade de <i>Penicillium solitum</i> imobilizados em grânulos de alginato de sódio.....	30
4.4 Utilização de grânulos de alginato de sódio contendo fungos pela microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	34
5 CONCLUSÕES.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	40
ANEXOS.....	47

RESUMO

ELIZEI, Virgínia Guerra. **Avaliação da viabilidade de fungos encapsulados e armazenados em diferentes temperaturas.** 2009. 50p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A imobilização celular representa uma alternativa para a condução de bioprocessos, quando células ficam retidas em matrizes e podem ser utilizadas por longos períodos. Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de testar uma nova metodologia de imobilização de fungos com custo reduzido, avaliar a viabilidade destes fungos quando submetidos ao novo método de encapsulamento, e determinar a temperatura ideal para armazenar os fungos imobilizados. Os micélios dos fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium solitum* foram usados para a imobilização com 15gr de arroz triturado e 3gr de alginato de sódio que gotejava numa solução de cloreto de cálcio a 0,25M para formação dos grânulos. Após a secagem em estufa a 26°C, os grânulos foram armazenados em três temperaturas, ambiente (18 – 27 °C), geladeira (4 a 7 °C) e freezer (-3 a -6 °C). Os plaqueamentos foram realizados a cada 15 dias em meio de cultura BDA. As avaliações do tamanho das colônias e esporulação foram realizadas após 7, 14 e 21 dias do plaqueamento, durante 195 dias para o *A.niger*, 225 dias para o *C. cladosporioides*, e 210 dias para *P.solitum*. Realizou-se também análise de microscopia eletrônica de varredura visando verificar a segurança do micélio encapsulado. A temperatura de armazenamento não afetou o desenvolvimento micelial de *A.niger* e *P.solitum*. No entanto a esporulação foi reduzida para os grânulos armazenados no freezer. O desenvolvimento micelial de *Cladosporium cladosporioides* foi influenciado pela temperatura. Os grânulos conservados em temperatura ambiente tiveram a viabilidade menor que os armazenados em geladeira e freezer. Na análise de microscopia eletrônica de varredura observou-se que a imobilização é um método seguro onde o micélio fúngico permanece no interior do grânulo, facilitando o transporte, armazenamento e aplicação de microrganismos.

Palavras-chave: imobilização celular, encapsulamento de fungos, alginato de sódio, formulação granulada

Orientadora: Dra. Sara Maria Chalfoun - EPAMIG Sul de Minas

ABSTRACT

ELIZEI, Virgínia Guerra. **Evaluation of the viability of fungi encapsulated and stored at different temperatures.** 2009. 50p. Dissertation (Master in Agro Microbiology) - Federal University Lavras, Lavras, MG.

Cellular immobilization represents an alternative for the bioprocess conduction, where the cells are kept in a matrix and can be used over long periods. This work was conducted with the objective to test a fungi immobilization methodology with reduced cost, to evaluate the viability of these fungi when submitted to the new encapsulation method, and to determine the ideal temperature to store the immobilized fungi. The mycelium of the fungi *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* and *Penicillium solitum* were mixed with 15gr of titrated rice and 3gr of sodium alginate, which was dripped in a 0.25M calcium chloride solution for formation of the pellets. After drying in an oven at 26°C, the granules were stored at three temperatures: room (18 – 27 °C) refrigerator (4 a 7 °C) and freezer (-3 a -6 °C). The platings were carried out every 15 days in BDA culture medium (potato-dextrose-agar). The evaluations of the colony size and sporulation were carried out after 7, 14 and 12 days of plating, during 195 days for *A.niger*, 225 days for *C. cladosporioides*, and 210 days for *P.Solitum*. Scanning Electronic Microscopy (SEM) analysis also took place seeking to verify the security of the encapsulated mycelium. The storage temperature did not affect the mycelial development of *A.niger* and *P.solitum*. However the sporulation was reduced for the granules stored in the freezer. The mycelial development of *Cladosporium cladosporioides* was influenced by the temperature. The granules conserved at room temperature had lower viability than those refrigerator and freezer stored. In the SEM analysis it was observed that the immobilization is a safe method where the fungus mycelium remains inside the granule, facilitating transport, storage and application of microorganisms.

Key words: cellular immobilization, encapsulation of fungi, sodium alginate, granulated formulation

Adviser Dra. Sara Maria Chalfoun - EPAMIG Sul de Minas

1 INTRODUÇÃO

A imobilização é um termo que descreve as muitas formas em que células podem ser aprisionadas em matrizes ou suportes. Pesquisas na área de imobilização de células microbianas têm aumentado consideravelmente no setor de biotecnologia e muitos trabalhos estão sendo realizados. Nessa perspectiva a utilização de microrganismos imobilizados em suportes inertes e de baixo custo é hoje um dos enfoques para a aplicação em processo agro-industriais no país (Bofo et al., 2005).

A imobilização de células microbianas ou enzimas representa uma alternativa para a condução de bioprocessos, uma vez que os biocatalizadores ficam retidos em uma matriz e podem ser utilizadas inúmeras vezes (Canilha et al., 2006).

A imobilização pode ser definida como o movimento não independente de células microbianas e enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojados dentro ou na superfície de um agente imobilizador (Tapion & Tapion, 1988). A imobilização também pode ser definida como a fixação de células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (Cantarelli, 1989).

Existem dois tipos de leitos para a imobilização de células microbianas, sendo os que as aprisionam fisicamente e os que aderem à superfície. No primeiro caso, são encapsulados em glóbulos ou fibras de polissacarídeos, proteínas ou polímeros sintéticos. No segundo caso, as células são fixadas ao suporte de imobilização diretamente por ligações químicas (iônicas ou covalentes) (Meersman, 1992).

Diversos estudos mostram que o encapsulamento de fungos, bactérias, leveduras e enzimas, promovem a formação de um excelente inoculante sólido,

de fácil aplicação, manuseio e transporte. As células microbianas imobilizadas podem ser armazenadas por longos períodos permanecendo viáveis à utilização. O encapsulamento ou imobilização apresentam vantagens em relação ao cultivo tradicional de microrganismos em meios de cultura, como, por exemplo, não há gastos com reagentes, e não é necessário tempo nem espaço para a manutenção das colônias (Fenice et al., 2000).

Em particular, os fungos filamentosos são utilizados na produção de enzimas de interesse comercial, nos processos de biorremediação e biocontrole, na fertilização do solo, em produção de alimentos e diversos outros processos. Considerando os fatos expostos, neste trabalho, objetivou-se testar uma nova metodologia de imobilização de fungos filamentosos de menor custo, avaliar a viabilidade dos fungos quando submetidos ao novo método de encapsulamento, e determinar a temperatura ideal para armazenar os fungos imobilizados e comprovar a segurança dos grânulos contendo os fungos pela microscopia eletrônica de varredura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Métodos de imobilização celular

O método e o tipo de suporte a serem empregados em um determinado processo de imobilização devem ser estabelecidos, recaindo a escolha sobre aquele que apresente maior retenção da atividade celular. A escolha dependerá basicamente de dois fatores: 1) as características peculiares do material biológico a ser imobilizado; 2) condições de uso do sistema imobilizador. Frente à variabilidade desses fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e um suporte que seja de uso universal, adequados para qualquer processo de imobilização (Corcoran, 1985).

Existem vários meios de imobilização de células vivas. Esses métodos podem ser divididos em basicamente quatro grandes grupos: auto-agregação, ligação a superfície, contenção por barreiras e aprisionamento em matrizes porosas.

A imobilização por meio da auto-agregação envolve a agregação ou a floculação das células de maneira natural ou artificialmente induzidas. Dessa forma as células se ligam entre si sem a necessidade do uso de um suporte imobilizador. A floculação natural é uma propriedade de relativamente poucas células. Além disso, os agregados celulares naturais são geralmente instáveis e sensíveis à tensão de cisalhamento, sendo necessária a adição de agentes químicos que formem ligações cruzadas entre as células, como, por exemplo, o glutaraldeído, durante o processo de imobilização (Canilha et al., 2006).

A imobilização, por meio de ligação à superfície pode ser realizada por meio de interações iônicas ou adsorptivas, ou por meio de ligações covalentes entre grupos reativos do suporte e do biocatalizador. A ligação por meio de adsorção e/ou interações iônicas é um método simples, barato e permite a

regeneração da matriz, porém apresenta desvantagens como a perda de células microbianas imobilizadas para o meio reacional, impedindo, assim, o trabalho em condições muito severas. Para o aumento da massa celular imobilizada, suportes porosos têm sido geralmente utilizados, permitindo também a ligação das células à estrutura superficial interna. Por outro lado, a imobilização por meio de ligações covalentes resulta em uma interação de células-suporte mais forte e estável, tendo como principal desvantagem o risco de danos à membrana celular.

Células microbianas imobilizadas por meio de aprisionamento em matriz porosas como alginatos e carragena, conhecidas também por encapsulamento, normalmente envolve a síntese *in situ* da matriz porosa em torno das células a serem imobilizadas. Os poros da matriz são menores que as células contidas no interior (Pradella, 2001). Esse é um método que tem sido extensivamente estudado para a imobilização de células viáveis, em razão da possibilidade do uso de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como os suportes de imobilização (Canilha et al., 2006). Além disso, as células imobilizadas em matriz hidrofílicas podem ser protegidas de condições inadequadas de pH, temperatura, solventes ou qualquer composto que iniba o desenvolvimento celular presente no meio. Como principais desvantagens pode-se citar: o pequeno volume disponível para a contenção das células imobilizadas, a perda de células para o meio durante o processo de utilização e a instabilidade dos suportes normalmente utilizados, que limita a utilização dos agregados por longos períodos (Pradella, 2001).

O método de encapsulamento consiste em misturar uma suspensão micelial em uma solução de alginato de sódio, seguido de um gotejamento numa solução de cloreto de cálcio. A troca iônica do sódio pelo cálcio resulta em esferas solidificadas de alginato. O tamanho das esferas pode ser facilmente controlado pelo dispositivo de gotejamento. O sistema oferece grande flexibilidade, como adição de cargas para melhorar a estabilidade e conservação

dos grânulos. A distribuição da biomassa de forma homogênea nas cápsulas é garantida por meio da constante agitação da suspensão micelial (Mauperin et al., 1987).

A imobilização por meio de contenção por barreiras envolve a utilização de membranas pré-formadas ou formação *in situ* da membrana em torno das células imobilizadas. Esse método também é conhecido como encapsulamento, e tem sido utilizado como uma tecnologia alternativa ao aprisionamento em matrizes porosas, uma vez que, oferece vantagens como a capacidade de concentração de células e prevenção da perda de células para o meio durante a utilização (Park & Chang, 2000).

Todos os métodos de imobilização apresentam vantagens e desvantagens. Embora a estabilidade das células não possa ser garantida, em todos os casos, as seguintes vantagens são citadas: o inóculo permanece retido no suporte, possibilita um melhor controle das propriedades reais do meio, maior pureza e o aumento do rendimento, no caso de imobilização de enzimas não há necessidade de extração e podem ser esperados resultados econômicos e favoráveis (Pradella, 2001).

Quanto ao tipo de suporte, na literatura são citados vários materiais inertes que podem ser usados como suporte para imobilização de células e enzimas. A natureza física desses suportes varia desde materiais geliformes (alginato, álcool polivinílico, carragena, etc.) até superfícies sólidas (vidro poroso, alumina etc.). Os suportes podem ser classificados em cinco tipos fundamentais: 1. microporoso ou não poroso (vidro, sílica, nylon); 2. microencapsulamento (nitrocelulose, triacetato de celulose); 3. polímeros com moderado grau de ligações cruzadas (poliacrilamidas); 4. polímeros com baixo grau de ligações cruzadas (sephadex) e 5. microporosos (sílica e alumina) (Canilha et al., 2006).

Para um material-suporte ser utilizado para imobilização celular ele deve ser encontrado com facilidade e abundância, ter baixo custo, facilidade de operar em grande escala, não apresentar toxicidade às células, ter alta capacidade de retenção e apresentar resistência mecânica para uma longa vida operacional (Pradella, 2001). Os suportes inorgânicos são mais vantajosos que os orgânicos em razão da sua durabilidade, densidade, estabilidade e controle de porosidade. Os materiais orgânicos também apresentam a grande vantagem de facilidade de esterilização e limpeza.

Estudos recentes confirmaram a capacidade de imobilização de diversos materiais orgânicos, tais como fibras de coco, fibras de mamão, concha de caranguejo, bucha vegetal, palha de palmeiras, fibras de madeira etc. Porém, em todos esses materiais tem sido notada uma baixa capacidade de adesão das células em razão da deterioração desses materiais tornando-os um veículo imobilizador não aplicável (Lai et al., 2008).

2.2 Suportes utilizados para imobilização de células microbianas

Para a imobilização de células, diversos materiais podem ser utilizados como suporte. Géis de alginato, carragena e poliacrilamida, alumina, terra de Kanuma, caule de cana e sílica são alguns exemplos de suportes encontrados na literatura, quando se diz respeito à imobilização de células viáveis (Corcoran, 1985; Pradella, 2001; Canilha et al., 2006).

Polímeros de carboidrato como alginato, poliacrilamida e carragenas têm sido utilizados para imobilizar fungos e enzimas, representando uma forma flexível de imobilização. A matriz ou suporte de imobilização é o fator chave para aplicação ambiental da biomassa imobilizada. Os polímeros da matriz determinam a resistência final das partículas imobilizadas (Tam et al., 1998).

Estudos recentes confirmaram a capacidade de imobilização de diversos materiais orgânicos, tais como fibras de coco, fibras de mamão, concha de caranguejo, bucha vegetal, palha de palmeiras, fibras de madeira etc. Porém, em todos esses materiais tem sido notada uma baixa capacidade de uso em razão da rápida deterioração, sendo assim um veículo imobilizador não aplicável (Lai et al., 2008).

A matriz de imobilização mais utilizada atualmente tem sido:

Gel de alginato

Os géis de alginato têm sido os mais extensivamente utilizados para a formulação dos grânulos. Os alginatos são sais monovalentes de ácidos algínicos extraídos de diferentes tipos de algas marrons. São disponíveis em sais solúveis em água, tais como: alginato de amônia, alginato de cálcio, e alginato de sódio (Melo & Costa, 2005).

Alginato de sódio é um composto químico, é o sal de sódio do ácido algínico. Sua fórmula química empírica é $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$. Ele forma uma goma, quando extraído das paredes celulares de algas marrons, e é usado pela indústria de alimentos para aumentar a viscosidade de alguns alimentos e como emulsificante. Também é usado em tabletes contra a indigestão e na preparação de moldes odontológicos. O alginato de sódio não tem sabor distinguível e sua coloração vai do branco ao amarelado.

O método de aprisionamento em gel de alginato é uma técnica extensivamente utilizada para a imobilização de microrganismos viáveis. Como a formação do gel ocorre rapidamente na presença de íons de cálcio, sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, a atividade e a viabilidade dos microrganismos imobilizados são conservadas (Corcoran, 2005). As vantagens como baixo custo, grande disponibilidade no mercado, possibilidade de ampliação em escala de produção e a aceitação das substâncias utilizadas para a imobilização (alginato e cloreto de cálcio) como aditivos na

produção de alimentos têm sido citados na literatura (Corcoran, 2005), além da característica de serem os grânulos de alginato degradados naturalmente após 120 dias, quando utilizados para inocular microrganismos no solo (Pethkar & Paknikar, 2002). Entre as desvantagens o uso desse polímero como suporte destaca-se a instabilidade química na presença de agentes quelantes dos íons de cálcio (fosfato, lactato e citrato), a tendência das esferas em sofrer dilatação na presença de cátions monovalentes e as limitações impostas à transferência de substratos e produtos.

São encontrados diversos trabalhos que citam a utilização de alginato para a imobilização de *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*, para a produção de etanol (Jamai et al., 2001); *Kluyveromyces lactis*, na produção de lactose (Bofo et al., 2005); *Candida guilliermondii*, na produção de xilitol (Carvalho et al., 2005).

Carragena

A carragena é um polímero natural presente na estrutura celular de algas da família Rodophyceae. Esse polissacarídeo tem a capacidade de formar colóides e géis em meio aquoso com concentrações muito baixas. O sistema de imobilização de células em carragena é promissor para a produção industrial do etanol, onde a utilização do gel de alginato não apresentou boa estabilidade operacional quando comparada com a carragena. As citações encontradas para a imobilização usando este tipo de suporte foi para *S. cerevisiae* também para a produção de etanol (Nigam, 2000), *Pseudomonas dacunhae* para produção de L-alanina (Çhak et al., 1999) e *Escherichia coli*, visando a produção de L-fenilalanina (Leng et al., 2006).

Poliacrilamida

A poliacrilamida é um suporte comumente utilizado em fermentação alcoólica. É um polímero originado pela mistura de dois monômeros, a acrilamida e a bisacrilamida, formando uma espécie de rede. Células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em gel de poliacrilamida tem sua viabilidade afetada quando se encontram dentro do grânulo de poliacrilamida. Por outro lado, as células que se alojam na superfície do gel mantêm a capacidade de formar colônias com boa atividade fermentativa. A estabilidade das células é maior que as imobilizadas em alginato (Canilha et al., 2006).

Alumina

Desde 1982, a alumina vem sendo utilizada como suporte de imobilização para células e enzimas. A alumina é um material inorgânico, que apresenta diversas vantagens para ser utilizado como suporte de imobilização. Sua vida útil é mais longa que as de suporte orgânicos, o baixo custo torna-a mais atrativa para imobilização enzimática e é de fácil esterilização e limpeza. Encontram-se citações de uso de alumina na imobilização de *S.cerevisiae* na produção de etanol (Santos et al., 1998), *Zymomonas mobilis*, para produção de lêvanio e etanol (Bekers et al., 2001), *Lactobacillus rhamnosus*, para a produção de ácido láctico (Moueddeb et al., 1996).

2.3 Utilização de microrganismos encapsulados

Diversos estudos demonstraram que o encapsulamento de fungos promove a formação de um excelente inoculante sólido. O micélio encapsulado pode ser armazenado a 4°C durante muitos meses, com a conservação de 95 a 100% de sua viabilidade, sendo um método fácil e seguro de transportar e armazenar (Kuek et al., 1992). Técnicas de imobilização microbiana, incluindo o

encapsulamento em gel, têm várias vantagens que são melhores que o cultivo tradicional de microrganismos em meio de cultura, como, por exemplo, não há gastos com reagentes para formulação dos meios de cultura, e não é necessário tempo nem espaço para a manutenção das colônias de microrganismo (Fenice et al., 2000).

Em muitos trabalhos de biorremediação, utilizando biopolímeros, citam o alginato de sódio como uma excelente matriz por não afetar o estado fisiológico dos fungos (Tam et al., 1998). Hu & Reeves (1997) relataram o uso de poliuretano como suporte na imobilização de *Pseudomonas aeruginosa* sendo superior ao alginato e gel de poliacrilamida. Ting & Sun (2000) investigaram o uso de álcool de polivinil (PVA), como matriz na imobilização de leveduras e relataram um alto grau de resistência química dos grânulos.

Salgado (1993) utilizou o fungo *Arthrobotrys conoides* imobilizado em alginato de sódio para o controle biológico de nematóides no solo, tendo em vista que os nematóides causam grande prejuízo na produção agrícola e o uso de defensivos aumenta a resistência e polui o ambiente; a imobilização seria uma forma útil de utilizar esse microrganismo no controle de nematóides. O autor observou que o fungo permaneceu viável dentro dos grânulos de alginato por oito semanas, armazenados a 4°C. O crescimento micelial do fungo, a temperatura de 19 - 20°C foi melhor a partir dos grânulos armazenados por uma semana.

Visando também ao controle biológico, Mafia et al. (2003), imobilizou *Trichoderma inhamatum* em grânulos de alginato de sódio para o controle de *Rhizoctonia solani* agente etiológico da mela de estacas do Eucalipto. Observou-se que a atividade do patógeno foi reduzida de acordo com o aumento da quantidade de *Trichoderma inhamatum* imobilizado adicionado ao solo, sendo que a maior concentração testada de 60g pellets semeado em 1000g de solo foi capaz de eliminar 100% do patógeno.

As cápsulas, conservadas sob refrigeração, podem manter a viabilidade dos microrganismos durante vários meses de armazenamento. Rossi (2006) observou viabilidade de *Rhizopogon nigrescens* em 100% de sobrevivência sob condições de refrigeração após 250 dias, mostrando-se um inoculante com grande potencial industrial, com infectividade confirmada nas mudas testes, desempenhando a simbiose micorrízica de forma eficiente.

Tam et al. (1998) utilizaram a alga *Chlorella vulgaris* imobilizada em gel de alginato para a recuperação de cobre em ambientes aquáticos. Eles observaram que a alga imobilizada foi capaz de adsorver o cobre da solução e ainda resistir a quatro ciclos subsequentes de forma estável, ou seja, sem desmanchar. A matriz de alginato contribui significativamente para a ligação do cobre às células quando comparada à eficiência de células livres que tiveram valores bem inferiores aos grânulos de alginato e alga.

A imobilização de microrganismos também é utilizada na indústria de alimentos, o consumo de suplementos probióticos contendo bactérias viáveis e benéficas à saúde humana tem aumentado muito nas duas últimas décadas. Iogurtes e leite fermentado acrescidos de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium*, *B. longum* e *Saccharomyces boulardii*, são frequentemente consumidos como probióticos. Grosso & Trindade (2004), testaram a estabilidade de microrganismos imobilizados em alginato de cálcio para a utilização em leite acidificado e iogurte, comparando com as formas livres. Os resultados obtidos mostraram que tanto células livres como as imobilizadas apresentaram uma taxa de sobrevivência adequada no leite acidificado e iogurte após 21 dias de estocagem.

A imobilização de biocatalizadores é uma estratégia que pode ser usada para a condução de bioprocessos em situações variadas. Busca-se com a imobilização propiciar o uso de enzimas ou células por períodos prolongados através de processos contínuos ou semi-contínuos (Carvalho et al., 2005).

O xarope de açúcar invertido tem inúmeras aplicações nas indústrias de refrigerantes, alimentos e farmacêutica em razão da alta resistência a contaminações microbiológicas, poder anti-cristalizante e umectante. A inversão da sacarose em açúcar invertido por via enzimática utiliza enzimas purificadas (invertase) ou células de leveduras com elevada atividade de invertase. Urioste et al. (2003), testaram a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*, levedura com elevada atividade de invertase, em suportes orgânicos de baixo custo, como bucha vegetal e bagaço de cana. A levedura se mostrou mais eficiente no suporte de bucha vegetal, apresentando 17% mais eficiência que o suporte de bagaço de cana. No entanto, os dois suportes tiveram o tempo de utilização reduzido em razão da rápida deterioração.

A utilização de microrganismos imobilizados para a solubilização de fosfato no solo tem ganhado destaque nesses últimos anos. A capacidade de solubilização de fosfato por *Penicillium variable* imobilizado em alginato de cálcio foi comprovada por Fenice et al. (2000), mostrando grande eficiência no processo solubilizando até 36% do fosfato total presente no meio.

2.4 Utilização agroindustrial de espécies do gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* apresenta mais de 185 espécies, encontrado nos mais diversos habitats. O grupo é caracterizado por possuir cabeças conidiais escuras, geralmente negras e conidióforos hialinos a acinzentados, com cabeças globosas. O conidióforo apresenta cabeça conidial radiada, com métulas e fiálides ou somente fiálides, os conídios são escuros unicelulares e globosos. São fungos saprófitas, cosmopolitas e têm como hospedeiros uma variedade de espécies vegetais tais como arroz, trigo, milho, algodão, sorgo, soja, café etc.

Os microrganismos são peças fundamentais na manutenção de fosfato no solo, sendo que a utilização desses microrganismos encapsulados facilitaria a

distribuição dos microrganismos e agregação ao solo. Vassileva et al. (1998) utilizaram *Aspergillus niger* para a solubilização de fosfato no solo, imobilizado em diferentes suportes tais como ágar, alginato de cálcio e carragena. Resultados indicaram uma alta taxa de solubilização em um curto período (48hs), enquanto as taxa de solubilização por células microbianas livres podem chegar a nove dias. Quanto aos suportes utilizados para imobilização, os grânulos de alginato de cálcio tiveram sua estabilidade afetada negativamente pela presença do fosfato, que após alguns ciclos em contato com solução de fosfato foram destruídos, liberando quantidades de micélio para o meio. Os grânulos mais estáveis foram os de carragena, seguidos pelos de ágar.

Espécies do gênero *Aspergillus* também são amplamente utilizadas em processo de biorremediação de metais pesados. Huang & Huang (1991) demonstraram que *Aspergillus oryzae* imobilizado, pode remover íons de cobre e cádmio de ambientes aquosos. *Aspergillus niger* é um biosorvente de espécies de mercúrio como mercúrio inorgânico e metil mercúrio de ambientes aquosos (Karunasagar et al., 2003).

A capacidade de biosorção de metais por *Aspergillus niger* também é conhecida e muito estudada, para a biorremediação de chumbo, cádmio, cobre e níquel. Kapoor et al. (1998) avaliaram a capacidade de biosorção de chumbo, cádmio, cobre e níquel por *Aspergillus niger* imobilizado, comparando com a biosorção dos mesmos metais por *A. niger* de forma livre. Os resultados para chumbo, cádmio e cobre foram 320, 260 e 350 vezes respectivamente superior aos resultados de biosorção obtidos pela biomassa livre. A biosorção de níquel não foi eficiente pelo fungo imobilizado, apresentando taxas mais altas de biosorção pelas células livres.

Tinturas sintéticas incluem uma gama de corantes orgânicos, solventes em água, muito utilizados em indústria têxtil, de papel, cosmética e alimentícia. Essas tintas são descartadas em efluentes sem nenhum tratamento, causando não

somente uma poluição visual, mas também trás prejuízos ecológicos e danos a saúde (Yesiladali et al., 2006). Desde 1980, o uso de biomassa fúngica vem sendo estudado para a remediação de efluentes contaminados por tinturas sintéticas, e *Aspergillus fumigatus* encontra-se entre os isolados com grande capacidade de biosorver tais substâncias (Xiao & Hu, 2005). Deve-se observar, no entanto, a necessidade de consideração de adoção de medidas de segurança para a manipulação de alguns microrganismos, a exemplo do *A. fumigatus*.

2.5 Utilização agroindustrial de espécies do gênero *Cladosporium*

O gênero *Cladosporium* apresenta aproximadamente 500 espécies descritas, sendo 15 de importância de ocorrência comum. O fungo apresenta colônias de coloração verde oliva, podendo ser cinza, amarelo, marrom ou negro, de textura aveludada ou flocosa. Vários relatos comprovam que *Cladosporium* sp está associado à bebida de boa qualidade do café. Um provável mecanismo de ação do *Cladosporium* seria o consumo muito rápido da mucilagem presente no fruto impedindo ou amenizando o estabelecimento de outros fungos (Pereira et al., 2005).

Os microrganismos são capazes de produzir substâncias de seu metabolismo, que podem ser de interesse do homem. Eles desenvolvem essa capacidade como respostas ao crescimento em um habitat desfavorável. De acordo com Gallo et al. (2004), uma espécie marinha de *Cladosporium* sp. é capaz de produzir um antibiótico potente na inibição de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, apresentando ainda alguns componentes que diminuem o desenvolvimento de *Candida albicans*.

Espécies do gênero *Cladosporium* são usadas no biocontrole de insetos hospedeiros de plantas como pulgão; já que os insetos vêm desenvolvendo resistência aos inseticidas químicos. *Cladosporium herbarum* é uma espécie

efetiva no controle de moscas brancas que atacam as lavouras segundo Abdel-Baky & Abdel-Salam (2001).

Vários microrganismos têm a capacidade de promover a biorremediação de metais pesados do meio ambiente por dois mecanismos. O primeiro é a absorção, onde os microrganismos são capazes de absorver o metal e utilizá-lo em seu metabolismo, transformando-o em um componente que possa ser integrado aos ciclos biogeoquímicos naturais. E o segundo é a adsorção, que promove a ligação desses metais à superfície do fungo. Isso graças aos polímeros presentes na parede celular fúngica como quinina, mananas e glucanas. Nesse caso, pode-se utilizar a biomassa viva ou morta. Pethkar et al. (2001), em seus trabalhos utilizaram *Cladosporium cladosporioides* para adsorver cádmio, cobre, cromo, ouro, níquel, prata e zinco de ambientes aquáticos, e notou que a adsorção de ouro foi de 81,1mg por grama de micélio, seguido pela prata 42,6 mg por grama de micélio de *C. cladosporioides* (Pethkar & Paknikar, 2002).

Em 1998, foi descoberta uma nova enzima sintetizada por *Cladosporium* sp. a N-alquilglicina oxidase. Essa enzima é utilizada na produção de fármacos indicados para tratamento de doenças degenerativas do sistema nervoso como o Mal de Parkinson, pois a N-alquilglicina protege os neurônios (Gomi & Horiuchi, 1998).

2.6 Utilização agroindustrial de espécies do gênero *Penicillium*

O *Penicillium* é um gênero amplamente distribuído na natureza, encontrados em todas as partes do planeta, principalmente em regiões de clima temperado. Podem colonizar matéria orgânica morta, solos, queijos, pães, cereais e frutas, causando deterioração, alterações bioquímicas e produção de

metabólitos secundários. São fundamentais na decomposição da matéria orgânica e reciclagem de nutrientes (Chalfoun & Batista, 2003).

A utilização de enzimas obtidas por microrganismos tem diversas aplicações nos processos industriais. As pectinases de origem fúngica são usadas na indústria alimentícia para a produção de sucos de frutas, azeite de oliva e vinho inibindo o seu escurecimento. Enzimas também podem ser utilizadas nas indústrias têxteis para converter a pectina em celulose. Muitas espécies de *Penicillium* são produtores dessas enzimas, sendo a espécie *Penicillium griseoroseum* um grande produtor de pectinases quando um indutor natural está presente no meio (Piccoli-Valle et al., 2001).

Xilanases também são enzimas de interesse comercial produzidas por espécies do gênero *Penicillium*, como *P. herquei*, *P. purpurogenum*, *P. oxalicum*, *P. chrysogenum* e *P. janthinellum*. As xilanases são utilizadas em indústrias de papel, para o clareamento do papel, na indústria de alimentação animal como um suplemento de rações, gerando um aumento de peso e rápido crescimento de aves em especial (Li et al., 2007).

A produção de ácido micofenólico por *Penicillium brevicompactum* imobilizado foi comparado com a produção por células livres, por Xu & Yang (2006) em seus trabalhos. Os autores notaram que houve uma grande produção de mais de 20% de ácido micofenólico pela biomassa imobilizada quando comparada com as células livres num período de 3 horas.

Controle biológico é uma alternativa ambientalmente amigável de baixo custo e tem tornado alvo de grandes estudos. O biocontrole de uma doença causada por *Fusarium oxysporum* que ataca tomates, morangos, melões e melancias, tem sido controlado pelo uso de uma espécie de fungo do gênero *Penicillium*. O *Penicillium oxalicum* tem largo espectro de atividade contra vários patógenos de plantas, reduzindo os níveis da doença quando é aplicado nas lavouras (Cal et al., 2008).

A contaminação de efluentes por tinturas usadas nos processos industriais resulta em sérios problemas ambientais. Alguns métodos físico-químicos de tratamento são em geral caros (Vaidya & Datye, 1982). A aplicação de fungos filamentosos no tratamento desses efluentes é um processo promissor apresentando um baixo custo. Algumas espécies de *Penicillium* são conhecidas pelo seu potencial biorremediador e pelos mecanismos de biosorção de substâncias danosas ao ambiente. Porém a utilização de biomassa nos tratamentos tem limitações impostas pela recuperação e separação da biomassa após o tratamento. A utilização de biomassa imobilizada facilita sua remoção sem trazer maiores danos ao meio ambiente. (Zhang et al. 2003), utilizaram o micélio de *Penicillium oxalicum* imobilizados para recuperar tinturas industriais de ambientes aquáticos. A biomassa imobilizada foi capaz de adsorver rapidamente os corantes da água, e foram facilmente removidos do ambiente.

Penicillium solitum, aparece comumente como contaminante de alimentos. Desde 1979, metabólitos produzidos por *P. solitum*, vêm sendo utilizados como fármaco. A espécie é uma grande produtora de lipase utilizada na digestão de gorduras ingeridas pelo homem (Bogdanova et al., 1979). No entanto, só recentemente foi comprovado que esta espécie é capaz de produzir a solistatina, que é uma substância análoga da compactina. A compactina é um agente utilizado pelas indústrias farmacêuticas na síntese de drogas indicadas para reduzir os níveis de colesterol do sangue (Larsen et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Encapsulamento dos fungos

O presente trabalho foi realizado no laboratório de fitopatologia e microbiologia do EcoCentro/EPAMIG, em Lavras 2007 – 2009

Foram selecionados três gêneros diferentes de fungos filamentosos, para serem encapsulados e analisados o comportamento e a viabilidade desses fungos imobilizados em grãos de alginato. As espécies selecionadas foram *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium solitum*, em razão da capacidade de utilização em processos agroindustriais.

Os fungos foram mantidos sob condições controladas em placas de Petri de 9 cm de diâmetros, contendo o meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) por 7 dias a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h.

Para produção massal dos micélios fungicos, três discos de cultivos em BDA foram repicados para Erlenmeyers de 500mL de capacidade, contendo 100 mL de meio líquido BD (batata-dextrose), seguindo de incubação a 25 °C sob agitação rotativa, a 120 rpm, por 15 dias (Mafia et al., 2003). A massa de micélio foi então coletada e, após remover o excesso de meio de cultura por filtragem, a massa de micélio foi seca em estufa de ventilação com filtro a 26 °C por três dias. O micélio seco foi triturado utilizando um moinho elétrico.

Para produzir a formulação do tipo granulada, foi utilizada a metodologia adaptada de Lewis & Papavizas (1985), onde 15g de arroz triturado e peneirado foi misturado com 200mL de água destilada e autoclavados. Após o resfriamento, foram adicionadas 0,50g do micélio triturado e 3g de alginato de sódio. A mistura foi transferida para um aparato de quatro saídas onde foi gotejada a mistura em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) a 0,25 M, o que permite a formação de grânulos esféricos de diâmetro regular. Os grânulos

formados foram mantidos por 10 min nesta solução de CaCl_2 , e depois foram lavados em água destilada, para remover o excesso de cloreto de cálcio. Os grânulos foram colocados em bandejas cobertas por telas previamente esterelizadas e submetidos à secagem em estufa com filtro, sob ventilação forçada, durante dois dias a 26 °C.

Para avaliar a viabilidade do agente biológico e a inexistência de contaminação, os grânulos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA para posterior observação das colônias puras.

3.2 Avaliação da viabilidade dos fungos encapsulados e conservados em diferentes temperaturas

Para avaliar a viabilidade das três espécies de fungos encapsulados e a melhor condição de armazenamento, foram realizados testes com os grânulos armazenados nas temperaturas ambiente (entre 18 e 27 °C), geladeira (entre 4 e 7 °C) e freezer (entre -3 e -6 °C), e foram plaqueamentos em intervalos de 15 dias. As cápsulas dos fungos imobilizados conservados nas temperaturas citadas foram plaqueados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), para posterior avaliação do desenvolvimento das colônias puras, após 7, 14 e 21 dias do plaqueamento, mantidos em BOD a 25 °C. Fez-se a medição do diâmetro das colônias e contagem de esporos, utilizando a câmara de Neubauer.

3.3 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura - MEV

As amostras foram preparadas e fotografadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural – LME da UFLA, Lavras MG, de acordo com o protocolo para preparação de amostras para microscopia eletrônica de varredura, proposto por Alves, 2004.

3.4 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em parcelas subdivididas no tempo, com três repetições para o crescimento micelial e duas repetições para avaliar a esporulação. Os tratamentos das parcelas foram constituídos por três temperaturas de armazenamento (ambiente, geladeira e freezer). As subparcelas constituíram-se do tempo de armazenamento, sendo 13 avaliações para o fungo *Aspergillus niger*, 15 avaliações para o fungo *Cladosporium cladosporioides* e 14 avaliações para o fungo *Penicillium solitum*.

O índice de crescimento micelial foi verificado a partir da fórmula proposta por Oliveira (1991):

$$\text{ICM} = \frac{C_1 + C_2 + \dots C_n}{N_1 + N_2 + \dots N_n}$$

onde:

ICM= crescimento micelial;

C₁, C₂, .C_n = crescimento das colônias na primeira, segunda e última avaliação;

N₁, N₂ e N_n = número de dias de avaliação.

Os diâmetros das colônias foram medidos em milímetros aos 7, 14 e 21 dias após o plaqueamento. As avaliações da contagem de esporos foram feitas nas mesmas datas da avaliação micelial, usando a formula do índice de esporulação diária (IED).

$$\text{IED} = \frac{E_1 + E_2 + \dots E_n}{N_1 + N_2 + \dots N_n}$$

onde:

IED= Índice de esporulação diária;

E₁, E₂, .E_n = número de esporos na primeira, segunda e última avaliação;

N₁, N₂ e N_n = número de dias de avaliação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes “in vitro” da viabilidade de *Aspergillus niger* imobilizados em grânulos de alginato de sódio

A tecnologia utilizada para imobilização ofereceu condições de se produzir uma formulação biológica constituída de pequenos grânulos de tamanhos uniformes (1 a 2 mm) e moderadamente resistentes. Esta formulação apresentou-se mais leve do que muitas preparações líquidas e menos volumosas que as preparações utilizando matéria orgânica.

O isolamento do fungo *Aspergillus niger* proveniente do grânulo de alginato de sódio, provou a eficácia do encapsulamento, utilizando a matriz de alginato de sódio para a conservação do micélio fúngico. A avaliação do índice de crescimento micelial demonstrou que a temperatura de armazenamento dos grânulos não influenciou no desenvolvimento do micélio, que apresentou uma ótima viabilidade durante todo o período de 195 dias de avaliação, mantendo e conservando todas as suas características (Figura 1 e 2).

Resultados semelhantes foram obtidos por Diogo et al. (2005), que recuperou *A. niger* a partir de esporos conservados em água destilada após um período de 12 meses.

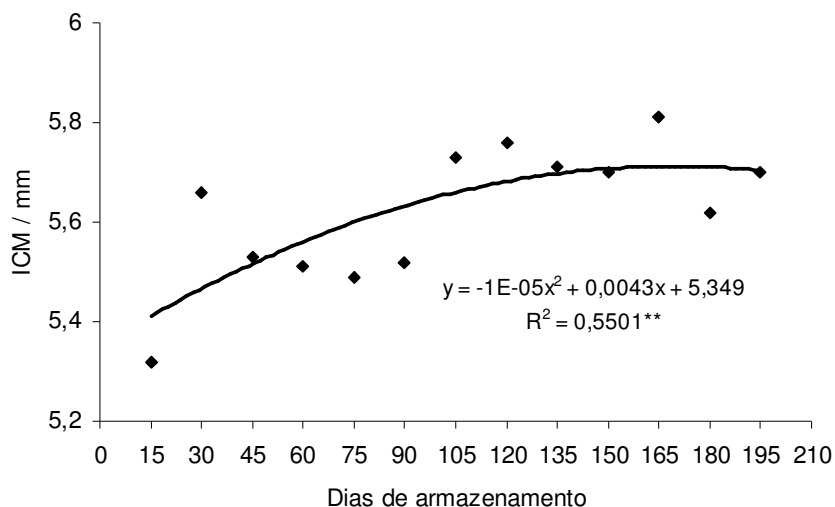


FIGURA 1 Crescimento micelial de *Aspergillus niger* imobilizados em alginato de sódio e armazenados em diferentes temperaturas. Lavras, MG, 2009.

** Significância a 1%

O fungo *Aspergillus niger* não perdeu a viabilidade durante o período de teste, indicando que o fungo presente no grânulo pode ainda ser capaz de crescer a partir dos grãos por um período maior que o avaliado. De acordo com Kuek et al. (1992), dependendo da espécie fúngica, o método de imobilização utilizando matriz de alginato pode permitir o armazenamento do inoculante por períodos maiores que 7 meses.

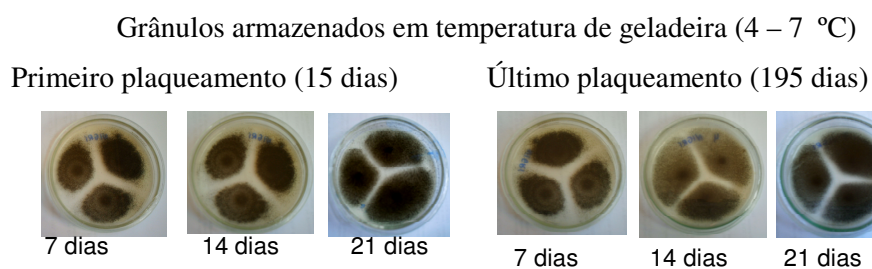
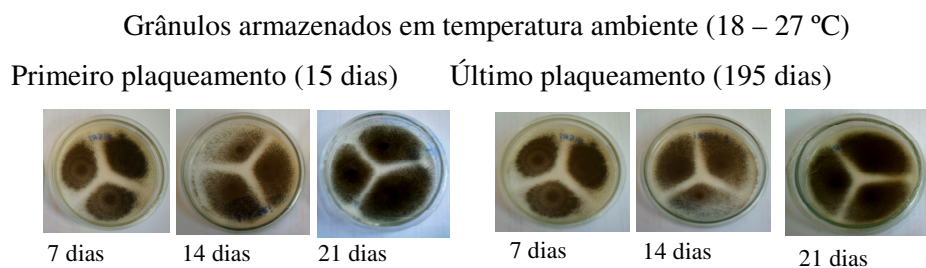


FIGURA 2 Desenvolvimento micelial e esporulação dos primeiros (15 dias) e os últimos plaqueamentos (195 dias) dos grânulos contendo o fungo *Aspergillus niger* armazenados nas diferentes temperaturas.

A avaliação da esporulação por *Aspergillus niger* crescidos a partir dos grânulos armazenados no freezer (-3 a -6 °C) tiveram uma redução na quantidade de esporos quando comparados com os armazenados na temperatura

ambiente (18 – 27 °C) e geladeira (4 – 7 °C) ao longo do período estudado. Os grânulos armazenados em temperatura ambiente apresentaram uma maior quantidade de esporos, demonstrando ser a temperatura ideal para melhor esporulação (Figura 3 e Tabela 1). De acordo com Medeiros et al. (1992) a esporulação de *Aspergillus niger* é favorecida por temperaturas mais elevadas, comprovando a redução de esporos quando armazenados no freezer.

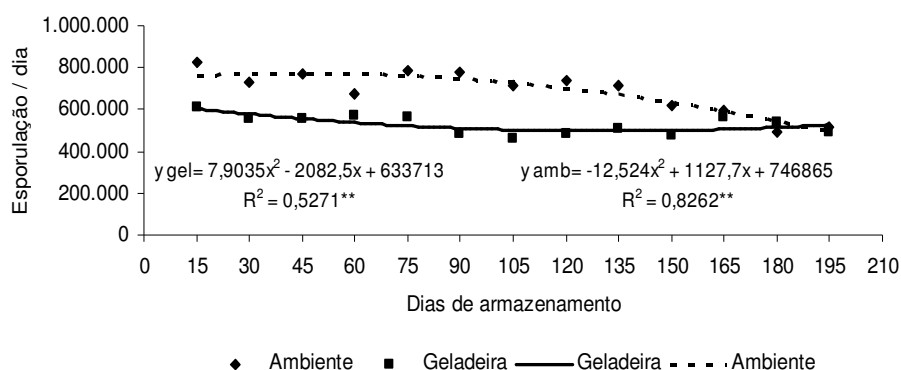


FIGURA 3 Esporulação do fungo *Aspergillus niger* imobilizado em alginato de sódio e submetidos a diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2009

** Significância 1%

Os resultados obtidos nas condições de armazenamento em baixas temperaturas devem-se ao fato de que o armazenamento sob essas condições, por longos períodos de tempo, pode acarretar danos à parede celular pela formação de cristais de gelo que crescem e rompem a estrutura celular e molecular dos microrganismos (Tortora et al., 2006).

Os fungos mesófilos apresentam uma faixa ótima de crescimento entre 4 e 40 °C, quando são armazenados em condições de temperatura abaixo de 4 °C, o seu metabolismo torna-se lento. Se as condições favoráveis ao seu

desenvolvimento forem oferecidas, leva-se um tempo para que o fungo se adapte e seu metabolismo normalize. De acordo com o presente estudo, os fungos provenientes dos grânulos armazenados no freezer (-3 a -6 °C), tiveram uma menor esporulação por não estarem adaptados a temperaturas baixas exigindo um tempo maior para sua recuperação (Tortora et al., 2006).

Os resultados observados na presente pesquisa assemelham-se com os obtidos por Kitamoto et al. (2002), que avaliaram a viabilidade de *A. niger* conservado em freezer com 10% de glicerol cobrindo a colônia. Os autores conseguiram conservar o fungo viável por 120 meses. Esses dados, confirmam a viabilidade do *A. niger* imobilizado em alginato de sódio, podendo ser armazenado por um período superior, ao ser analisado no presente estudo.

TABELA 1 Esporulação in vitro do fungo *Aspergillus niger* imobilizado e submetido a diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2009.

Dias Amazen.	Temperaturas de armazenamento		
	Ambiente	Geladeira	Freezer
15	821.578 a	608.053 b	400.000 c
30	731.365 a	556.486 b	319.941 c
45	768.086 a	552.100 b	400.000 c
60	674.282 a	574.192 b	435.889 c
75	784.212 a	561.230 b	380.277 c
90	778.378 a	484.740 b	323.945 c
105	716.198 a	457.736 b	364.269 c
120	734.563 a	484.740 b	400.000 c
135	716.948 a	504.756 b	417.255 c
150	619.841 a	474.312 b	409.406 c
165	591.607 a	560.805 a	380.732 b
180	489.471 a	543.119 a	424.100 b
195	514.207 a	489.791 b	412.132 c
CV% 1			3,60
CV% 2			5,92

* Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott a 5%.

4.2 Testes “in vitro” da viabilidade de *Cladosporium cladosporioides* imobilizados em grânulos de alginato de sódio

A recuperação do fungo *Cladosporium cladosporioides* a partir dos grânulos confirmam a excelente capacidade do alginato de sódio como matriz de imobilização celular. As porosidades nos grânulos, próprias da matriz, inibem a formação de umidade dentro dos mesmos, promovendo assim uma forma segura de inibir o desenvolvimento precoce do fungo imobilizado (Melo & Costa, 2005).

O micélio de *Cladosporium cladosporioides* imobilizado em alginato de sódio apresentou boa viabilidade de desenvolvimento micelial em todas as temperaturas que foram armazenadas até 180 dias após o processo de imobilização. A partir de 195 dias os grânulos armazenados em temperatura ambiente tiveram uma queda em seu desenvolvimento micelial, apresentando a perda total da viabilidade a partir de 225 dias após a imobilização, quando o fungo não foi mais capaz de crescer a partir do grânulo. Isso demonstrou que a temperatura de armazenamento é um fator significativo para manter a viabilidade do imobilizado de *Cladosporium cladosporioides* (Figura 4 e 5).

O ponto máximo de crescimento micelial para os grânulos armazenados na temperatura ambiente foi aos 103 dias, após esse período ocorre o declínio do desenvolvimento.

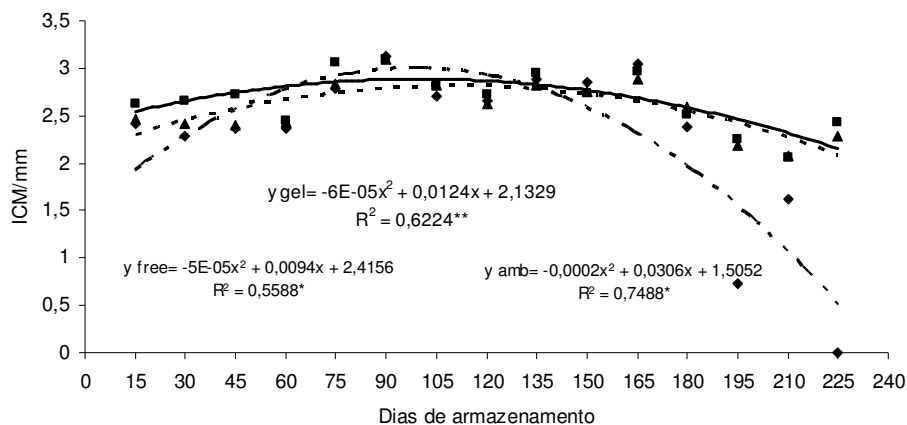


FIGURA 4 Desenvolvimento micelial de *Cladosporium cladosporioides* imobilizados e armazenados em diferentes temperaturas. Lavras, MG, 2009.

** Significância a 1% de probabilidade * Significância a 5% de probabilidade

Todos os microrganismos possuem um tempo de viabilidade quando preservados por meio de diferentes métodos e, após esse período, ocorre a degeneração natural do microrganismo, perdendo a capacidade de formar novos descendentes (Kitamoto et al., 2002). *Cladosporium cladosporioides* tem como temperatura mínima de crescimento -4 °C e temperatura ótima 22 °C de acordo com Sautour et al. (2002), as faixas de temperatura até 22 °C são as ideais para o bom funcionamento metabólico de *C. cladosporioides* atingindo assim seus níveis ótimos de desenvolvimento micelial, mantendo sua capacidade de propagarem descendentes.

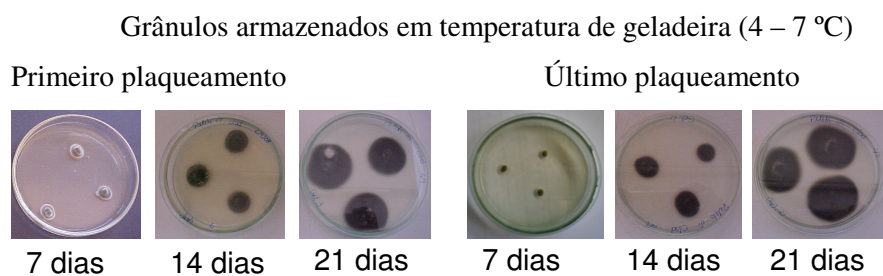
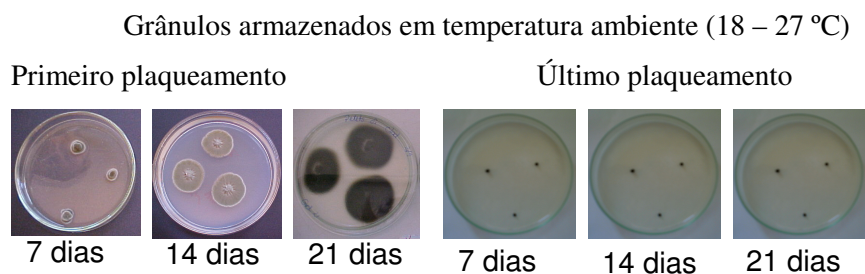


FIGURA 5 Os primeiros e os últimos plaqueamentos dos grânulos contendo o fungo *Cladosporium cladosporioides* armazenados nas diferentes temperaturas.

A esporulação de *Cladosporium cladosporioides* imobilizado em alginato de sódio e armazenado em diferentes temperaturas mostrou que os grânulos armazenados nas menores temperaturas (freezer e geladeira) tiveram uma menor esporulação que os fungos armazenados em temperatura ambiente

até os 210 dias. A partir de 210 dias a esporulação dos fungos presentes nos grânulos armazenados em temperatura ambiente chegou a zero em razão da inviabilidade de crescimento dos mesmos. A esporulação atingiu seu ponto máximo aos 86 dias de crescimento a partir dos grânulos armazenados em temperatura ambiente. Houve um declínio da esporulação após os 86 dias, mostrando que *C. cladoporioides* tem uma viabilidade maior quando armazenado nas temperaturas de geladeira (4 – 7 °C) e freezer (-3 a -6) (Figura 6 e Tabela 2).

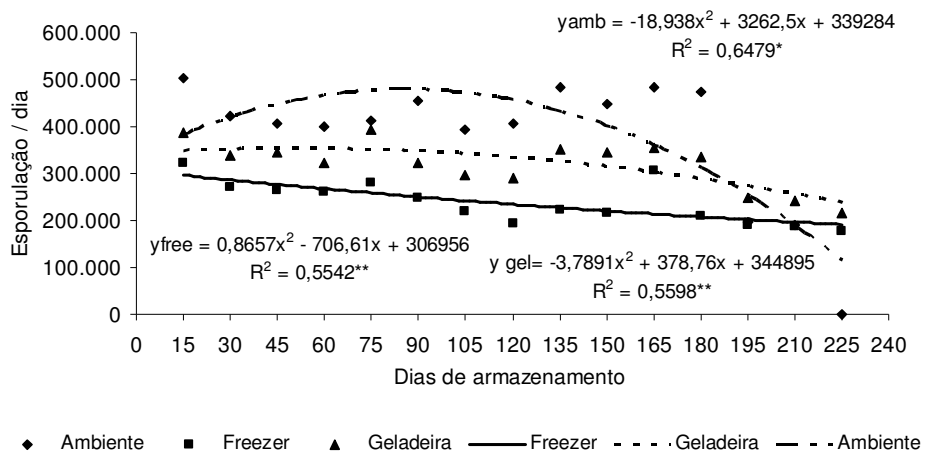


FIGURA 6 Esporulação do fungo *Cladosporium cladoporioides* crescidos a partir dos grânulos de alginato e armazenados em diferentes temperaturas. Lavras, MG, 2009.

* Significância a 1% de probabilidade ** Significância a 5% de probabilidade

A redução da quantidade de água é uma característica que reduz o metabolismo das células quando armazenadas. A redução da quantidade de água associada a temperaturas baixas torna o metabolismo ainda mais lento, possibilitando a viabilidade das células microbianas por longos períodos, quando

retirados esses elementos que são fatores chaves para redução do metabolismo celular (Giroto et al., 2008).

TABELA 2 Esporulação *in vitro* do fungo *Cladosporium cladosporioides* imobilizado e submetido a diferentes temperaturas de armazenamento.

Dias Armaz.	Temperaturas de armazenamento		
	Ambiente	Geladeira	Freezer
15	504.050 a	387.082 b	323.205 b
30	424.100 a	339.036 b	271.930 b
45	405.781 a	346.410 a	264.406 b
60	400.000 a	323.945 b	261.331 b
75	411.595 a	393.649 a	280.980 b
90	456.155 a	323.945 b	248.965 b
105	392.409 a	297.345 b	219.077 b
120	406.155 a	289.745 b	193.610 b
135	484.740 a	352.914 b	223.506 c
150	447.073 a	346.410 b	217.320 c
165	484.480 a	353.482 b	305.750 b
180	475.002 a	334.561 b	208.816 c
195	197.076 a	249.757 a	191.004 a
210	189.442 a	242.330 a	188.034 a
225	00.000 b	217.431 a	176.045 a
CV% 1			9.52
CV% 2			17.65

* Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott a 5%.

4.3 Testes “in vitro” da viabilidade de *Penicillium solitum* imobilizados em grânulos de alginato de sódio

O fungo *Penicillium solitum* apresentou uma excelente viabilidade frente ao método de imobilização utilizado. De acordo com os resultados do ICM (índice de crescimento micelial) o fungo teve um ótimo desenvolvimento micelial até 165 dias após a imobilização independente da temperatura de

armazenamento submetido, sendo que a variação do crescimento durante esse período foi de 3,50 a 2,69mm/dia. (Figura 7 e 8).

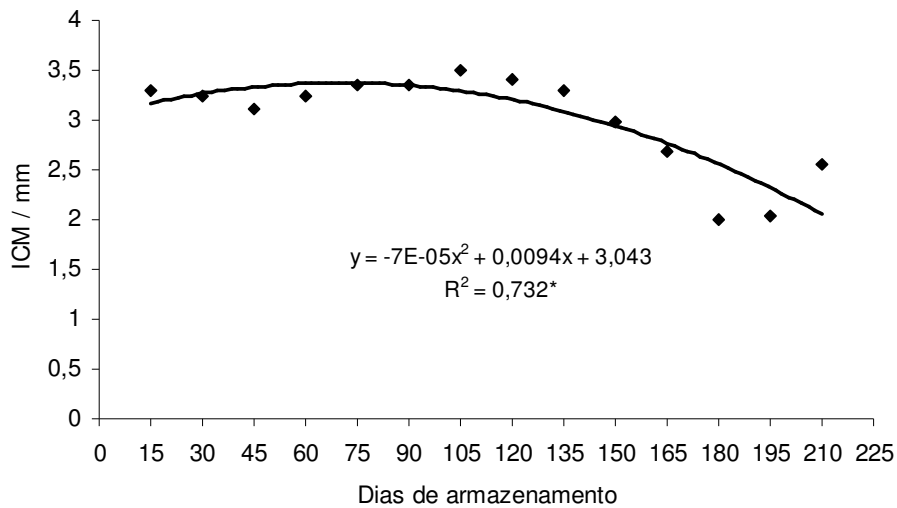


FIGURA 7 Crescimento micelial de *Penicillium solitum* imobilizados em grânulos de alginato de sódio e submetidos ao armazenamento em diferentes temperaturas.

* Significância a 5%

É essencial a presença de propágulos vivos na formulação, ou seja, utilizar agentes e reagentes que não sejam nocivos ao fungo, o que pode ser comprovado pelo crescimento da colônia fúngica a partir do grânulo de alginato, assim como foi obtida por Fravel et al. (1985) com os fungos *Penicillium oxalicum*, até 12 semanas de armazenamento em temperatura ambiente. De acordo com Medeiros et al. (1992) fungos conservados em temperatura ambiente apresentam alta velocidade, crescimento e esporulação, por estarem adaptados às condições.

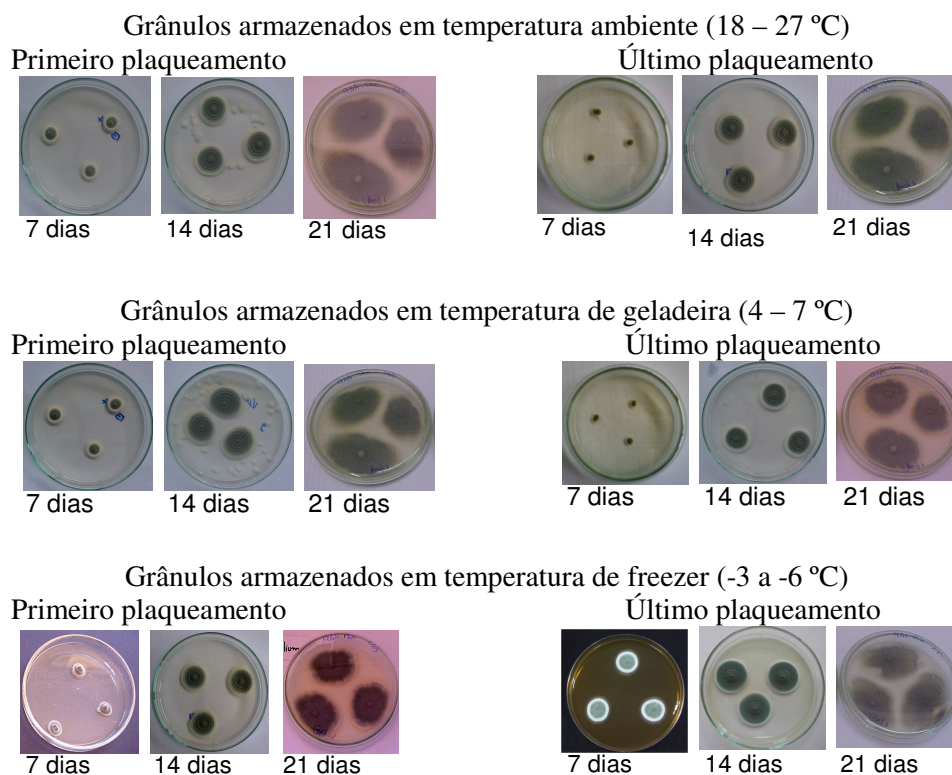


FIGURA 8 Desenvolvimento micelial de *Penicillium solitum*, primeiros e últimos plaqueamentos, demonstram que não houve diferenças no crescimento micelial durante o período avaliado.

A avaliação da esporulação do fungo crescido a partir do grânulo de alginato demonstrou que os grânulos armazenados na temperatura ambiente (18 – 27 °C) tiveram maior índice de esporulação, seguido por temperatura de geladeira (4 – 7 °C) e freezer (-3 a -6 °C) (Figura 9).

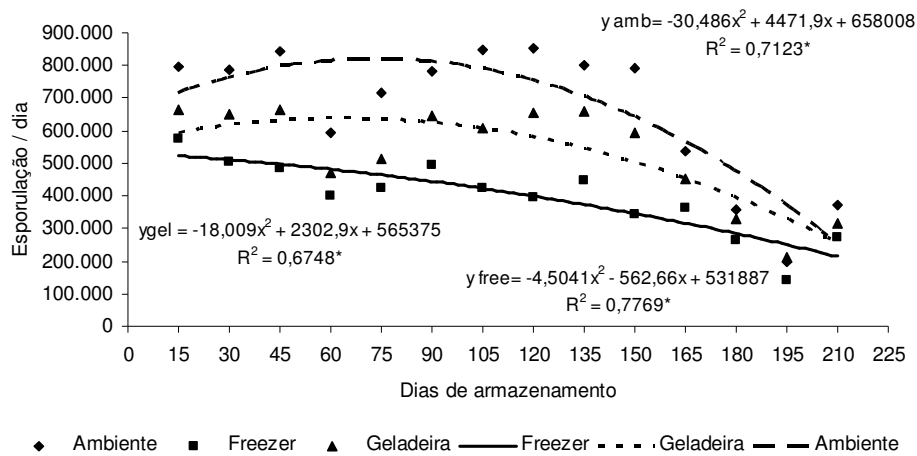


FIGURA 9 Esporulação de *Penicillium solitum* imobilizado em alginato de sódio e armazenado sob diferentes temperaturas. Lavras, MG, 2009. *Significância 5%

As faixas de temperatura entre 25 e 35 °C proporcionam a algumas espécies de fungos filamentosos uma esporulação mais rápida e abundante de acordo com Casa et al. (2007), o que confirma os resultados obtidos neste experimento, tornando evidente que a temperatura ideal de armazenamento para a esporulação de *Penicillium solitum* é em temperatura ambiente, variando de 18 a 27 °C durante todo o período de avaliação.

Após os 195 dias, houve uma recuperação do desenvolvimento fúngico, aumentando também a esporulação (Tabela 3). Microrganismos tendem a adaptarem-se às situações adversas de seu habitat normal, e algumas mudanças químicas e fisiológicas são essenciais para que ocorra a adaptação às novas situações. O stress causado por mudanças de temperatura induz a um desenvolvimento rápido do micélio, e um alto índice de esporos, que são estruturas de resistência na tentativa de produzir novos descendentes para propagar a espécie (Feofilova, 2003). *Penicillium solitum* é uma espécie

resistente a temperaturas baixas de acordo com Sonjak et al. (2003), que isolaram a espécie de geleira do Ártico.

TABELA 3 Esporulação in vitro do fungo *Penicillium solitum* imobilizado e submetido a diferentes temperaturas de armazenamento

Dias Armaz.	Temperaturas de armazenamento		
	Ambiente	Geladeira	Freezer
15	796.862 a	663.282 b	574.390 c
30	787.375 a	648.028 b	504.950 c
45	845.571 a	662.637 b	484.520 c
60	595.803 a	468.920 b	400.000 c
75	717.220 a	514.758 b	424.264 c
90	780.788 a	644.193 b	494.948 c
105	484.446 a	608.220 b	424.264 c
120	854.380 a	655.699 b	393.649 c
135	803.112 a	659.010 b	447.073 c
150	793.099 a	595.448 b	346.108 c
165	538.195 a	452.735 b	360.555 c
180	358.113 a	329.729 a	263.421 b
195	199.630 a	210.545 a	139.630 b
210	374.165 a	316.227 b	273.836 c
CV% 1			5.83
CV% 2			7.39

* Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott a 5%.

4.4 Visualização dos grânulos de alginato de sódio contendo fungos pela microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura facilitou a visualização do grânulo como um todo, permitindo observar a disposição das hifas e esporos após o preparo da formulação, dentro do grânulo de alginato de sódio. Foi possível a observação da superfície e do interior dos grânulos.

É possível observar a superfície do grânulo, onde não foi possível visualizar hifas nem esporos dos fungos imobilizados, mostrando assim que a

imobilização de células microbianas é uma forma segura para transporte de microrganismos, protegendo o micélio e as pessoas que manipulam esses grânulos, livrando-as de contaminação (Figura 10).

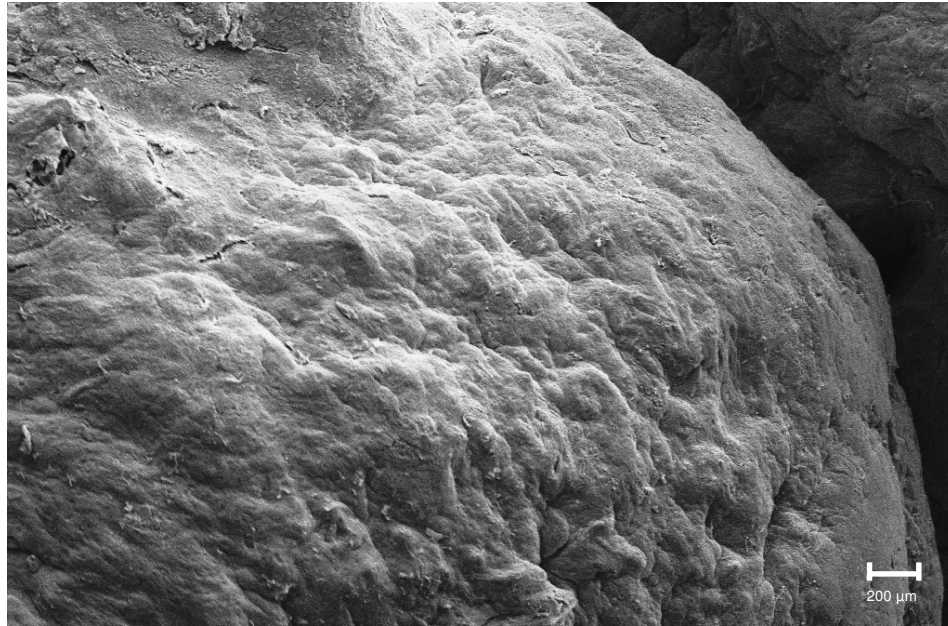


FIGURA 10 Eletromicrografia da superfície do grânulo de alginato de sódio

O fungo encapsulado em alginato de sódio torna mais fácil a aplicação e distribuição em solos. A resistência do grânulo trazida pelo alginato de sódio permite a sua utilização em ambientes aquáticos sem que os grânulos sejam destruídos (Pethkar & Paknikar, 2002).

O encapsulamento produz uma formulação segura, já que as hifas e esporos só aparecem no interior dos grânulos, isso também confirma que a imobilização protege o micélio fúngico por estar envolto em uma massa de alginato de sódio e farelo de arroz (Figuras 11, 12, 13 e 14). De acordo com

Melo & Costa (2005), o farelo nutritivo deixou o grânulo com maior eficiência em preservação do fungo.

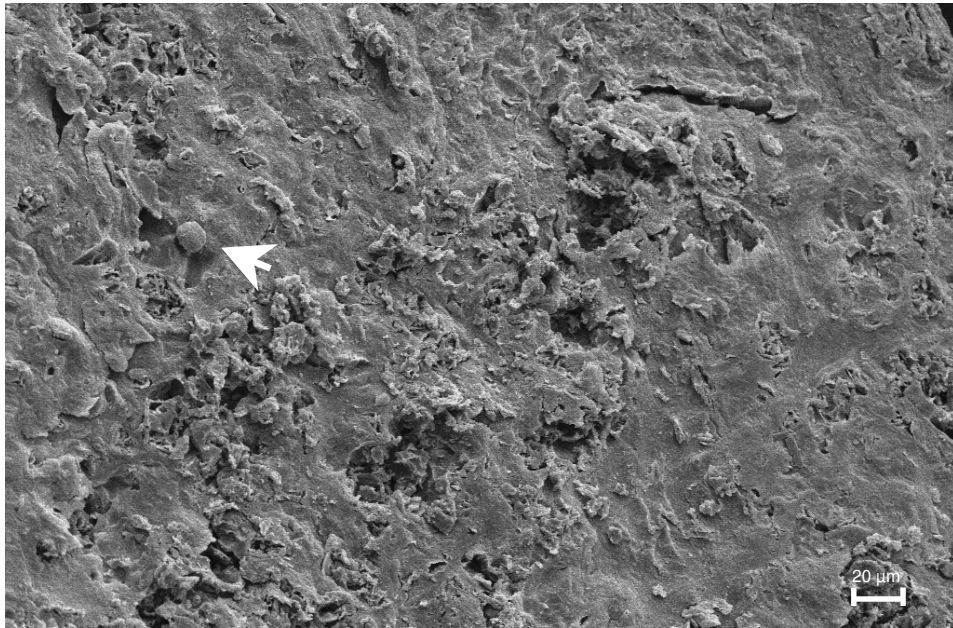


FIGURA 11 Eletromicrografia do corte em nitrogênio líquido no grânulo de alginato de sódio, a seta indica um esporo de *Penicillium solitum*

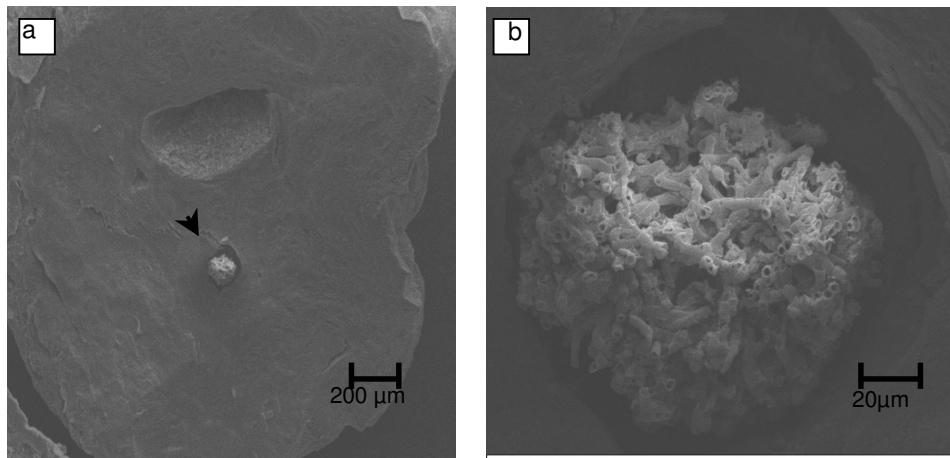


FIGURA 12 Eletromicrografia dos grânulos cortados, foto (a) a seta indica um emaranhado de hifas no centro do grânulo que pode ser confirmado pela foto (b) aproximação das hifas da foto (a).

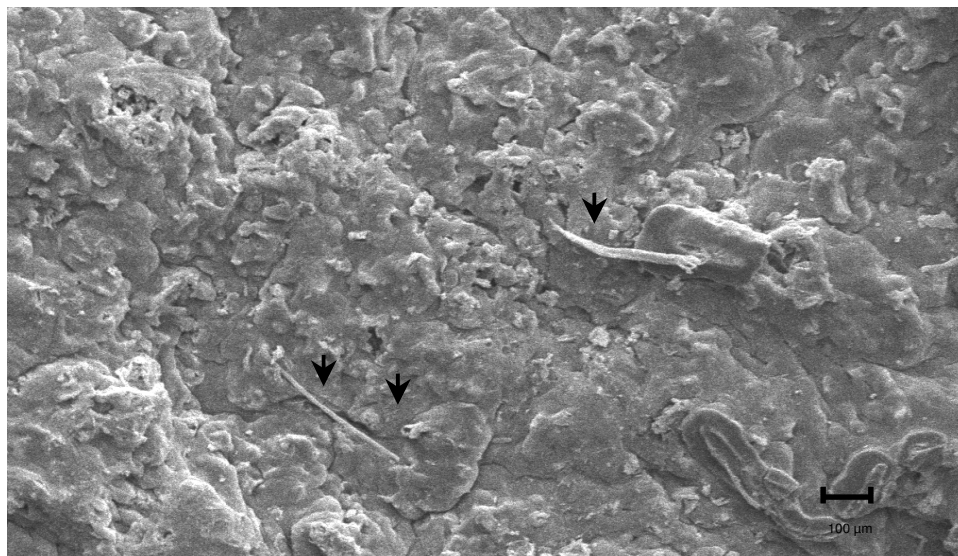


FIGURA 13 Eletromicrografia do corte no granulo de alginato de sódio, as setas apontam as hifas do fungo *P. solitum* distribuídas pela parte interna do grânulo.

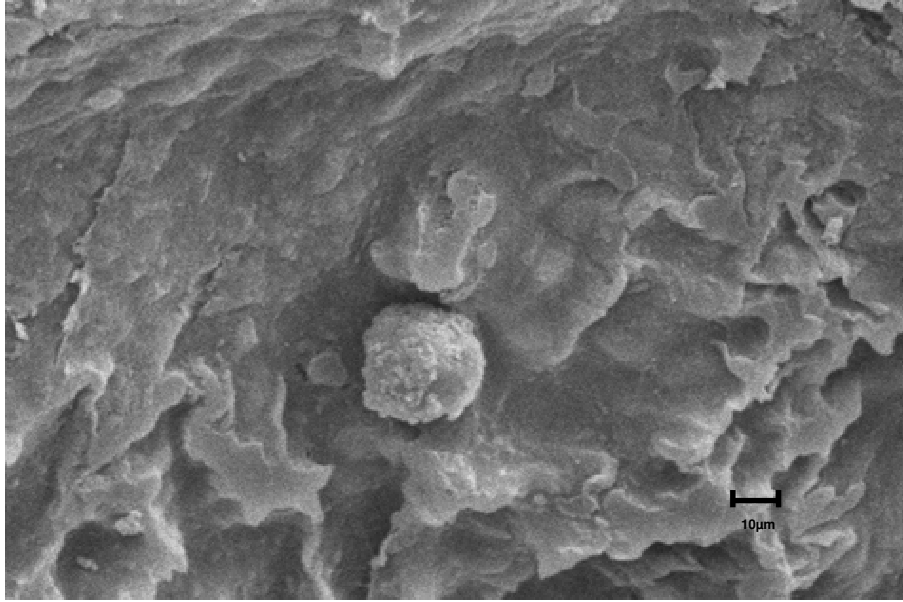


FIGURA 14 Eletrimicrografias de um esporo do fungo *p. solitum* no interior do grânulo numa secção feita com nitrogênio líquido.

5 CONCLUSÕES

A técnica empregada para imobilização com alginato de sódio foi adequada para os fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium solitum*, que apresentaram um crescimento satisfatório durante o período estudado. Produziu uma formulação leve e fácil de ser aplicada. O longo período de viabilidade dos fungos indica que a técnica pode também ser aplicada como método de preservação de fungos.

A temperatura de armazenamento dos grânulos não afetou o desenvolvimento micelial de *Aspergillus niger*, no entanto a esporulação foi reduzida para os fungos provenientes dos grânulos armazenados em geladeira (4 – 7 °) e freezer (-3 a -6 °C).

A viabilidade de *Cladosporium cladosporioides* foi reduzida até 195 dias quando armazenado em temperatura ambiente (18 – 27 °C). A esporulação e o desenvolvimento micelial foram afetados pela temperatura de armazenamento.

O desenvolvimento micelial de *Penicillium solitum* foi excelente nas três temperaturas em que os grânulos foram conservados. Houve uma redução na esporulação dos fungos crescidos a partir do grânulo do freezer.

A temperatura mais adequada para preservação dos grânulos contendo os fungos é a temperatura de geladeira que permite a viabilidade das três espécies de fungos avaliados por um período mais longo e a conservação em temperaturas mais baixas reduz o aparecimento de contaminantes.

Foi possível provar pelas eletromicrografias que a imobilização em grânulos de alginato de sódio é uma formulação segura, em que o micélio fúngico permanece apenas no interior do grânulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BAKY, N.F.; ABDEL-SALAM, A.H. Natural incidence of *Cladosporium* spp. as a bio-control agent against whiteflies and aphids in Egypt. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v.127, n.11, p.228-235, Nov. 2001.

BOFO, M.; BAROLI, B.; FADDA, A.M.; BLANCO MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ, M.I.S. Lactose bioconservation by calcium alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Microbial Technology**, New York, v.29, n.12, p.506-512, Dec. 2005.

BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSACHEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSJA, E.; UPITE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**, London, v.36, n.5, p.979-986, May 2001.

BOGDANOVA, T.Y.; PRINBERG, G.E.; MIKHAILOTS, G.A. **Enzyme-compensating action of lipase from *Penicillium solitum* in experimental insufficiency of fat digestion**. Plenum: Springer, 1979. 138p.

CAL, A.D.; REDONDO, C.; SZTEJNBERG, A.; MALGAREJO, P. Biocontrol of powdery mildew by *Penicillium oxalicum* in open-field nurseries of strawberries. **Biological Control**, Orlando, v.47, n.7, p.103-107, July 2008.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n.36, n.6, p.48-57, jun. 2006.

CANTARELLI, C. The use of immobilized yeast in wine fermentation. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.3, p.3-20, July 1989.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHAS, L.; CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. Metabolic behavior of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochemical Engineering Journal**, New York, v.25, n.7, p.25-31, July 2005.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; AMBOLIM, L.; MOREIRA, E.N. Effect of temperature and light regimes on mycelial growth, conidial germination and sporulation of *Stenocarpella macrospora* and *Stenocarpella maydis*. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, DF, v.32, n.2, p.137-142, dez. 2007.

ÇHAK, G.; SAVASÇI, H.; ÇHAK, P.; OZDAMAR, T.H. Growth and k-carrageenan immobilization of *Pseudomonas dacunhae* cells for L-alanine production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.24, n.11, p.67-74, Nov. 1999.

CHALFOUN, S.M.; BATISTA, B. **Fungos associados a frutos de café *Aspergillus* e *Penicillium***. Brasília, DF: Embrapa informações Tecnológicas, 2003. 69p.

CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, Amsterdam, v.10, n.7, p.815-819, July 1985.

CORCORAN, E. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cell. **Microbial Technology**, New York, v.29, n.11, p.681-688, Nov. 2005.

DIOGO, H.C.; SARPIERI, A.; PIRES, M.C. Fungi preservation in distilled water. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, São Paulo, v.80, n.6, p.591-594, fev. 2005.

FENICE, M.; SELBMAN, L.; FEDERICI, F.; VASSILEV, N. Application of encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. **Bioresource Technology**, Essex, v.73, n.10, p.157-162, Oct. 2000.

FEOFILOVA, E.P. Deceleration of vital activity as a universal biochemical mechanism ensuring adaptation of microorganisms to stress factors: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.39, n.1, p.1-18, June 2003.

FRAVEL, D.R.; MAROIS, J.J.; LUMSDEN, R.D.; CONNICK JUNIOR, W.J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. **Phytopatology**, Madison, v.75, n.7, p.774-777, Aug. 1985.

GALLO, M.L.; SELDS, A.M.; CABRERA, G.M. Antibiotic long-chain and α,β -unsaturated aldehydes from culture of the marine fungus *Cladosporium* sp. **Biochemical Systematics and Ecology**, Palo Alto, v.32, n.8, p.545-551, Aug. 2004.

GIROTTO, M.J.; AQUINO, L.F.B.; PEREZ, R.B.; NAVES, M.F.; SACCO, S.R. O Uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides

parasitas: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Curitiba, n.10, n.6, p.1-7, jun. 2008.

GOMI, K.; HORIUCHI, T. Purification and characterization of a new enzyme, N-alkylglycine oxidase from *Cladosporium* sp. G-10. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1429, n.11, p.439-445, Nov. 1998.

GROSSO, C.R.F.; TRINDADE, C.S.F. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacterium lactis* in acidified milk and on immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.14, n.4, p.151-156, Mar. 2004.

HU, M.Z.C.; REEVES, M. Biosorption of Uranium by *Pseudomonas aeruginosa* strain CSU immobilized in a novel matrix. **Biotechnology**, Amsterdam, v.28, n.13, p.60-70, Nov. 1997.

HUANG, J.P.; HUANG, C.P.; MOREHART, A.L. **Removal of heavy metals by fungal (*Aspergillus oryzae*) adsorption**. London: Elsevier, 1991. 349p.

JAMAI, L.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; HAMDOUNI-ALAMI, O.; TAHRI-JOUTI, M.A.; MCDERMOTT, T.; ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v.204, n.11, p.375-379, Nov. 2001.

KAPOOR, A.; VARARAGHAVAN, T.; CULIMORE, D.R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v.70, n.11, p.95-104, Nov. 1998.

KARUNASAGAR, D.; ARUNACHALAM, J.; RASHMI, K.; NAVEENA, J.L.L.; MOHAN, P.M. Biosorption of inorganic methyl Mercury by a biosorbent from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.19, n.11, p.291-295, Nov. 2003.

KITAMOTO, Y.; SUZUKI, A.; SHIMADA, S.; YAMANAKA, K. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. **Mycoscience**, New York, v.43, n.12, p.143-149, Dec. 2002.

KUEK, C.; TOMMERUP, I.C.; MALAJCZUC, N. Hidrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n.4, p.273-277, Oct. 1992.

- LAI, Y.L.; ANNADURAI, G.; HUANG, F.C.; LEE, J.F. Biosorption of Zn (II) on the different Ca-alginate beads from aqueous solution. **Bioresource Technology**, Essex, v.10, n.14, p.1-8, Nov. 2008.
- LARSEN, T.O.; LANGE, L.; SCHNORR, K.; STENDER, S.; FRISVAD, J.C. Solistatin, a novel phenolic compactin analogue from *Penicillium solitum*. **Tetrahedron Letters**, New York, v.48, n.10, p.1261-1264, Oct. 2007.
- LENG, Y.; ZHENG, P.; SUN, Z.H. Continuous productions of L-phenylalanine from phenylpyruvic acid and L-aspartic acid by immobilized recombinant *Escherichia coli* SW0209-52. **Process Biochemistry**, London, v.41, n.5, p.1669-1672, May 2006.
- LEWIS, J.A.; PAPAVIDAS, G.C. Characteristics of alginate formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. **Plant Pathology**, London, v.34, n.6, p.571-577, June 1985.
- LI, Y.; CUI, F.; LIU, Z.; XU, Y.; ZHAO, H. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40, n.10, p.1381-1388, Oct. 2007.
- MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; VENTURA, G.M.; SANFUENTES, E.A. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de eucalyptus. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, DF, v.28, n.1, p.101-105, out. 2003.
- MAUPERIN, C.H.; MORTIER, F.; TACON, F.; CARR, G. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in calcium alginate gel. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.36, n.7, p.2326-2329, July 1987.
- MEDEIROS, A.C.S.; MENDES, M.A.S.; FERREIRA, M.A.S.V.; ARAGÃO, F.J.L. Avaliação quali-quantitativa de fungos associados a semente de aroeira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v.19, n.1, p.51-55, maio 1992.
- MEERSMAN, E. Use of monolayer carrier in brewery. **Cerevisiae and Biotecnology**, Elmsford, v.17, n.6, p.55-59, Nov. 1992.
- MELO, I.S.; COSTA, F.G. Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para o controle de fitopatógenos.

Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 5p. (Comunicado técnico da Embrapa, 31).

MOUDDEEB, H.; SANCHEZ, J.; BARDOT, C.; FICK, M. Membrane bioreactor for lactic acid production. **Journal of Molecular Catalysis**, Lausanne, v.93, n.5, p.59-71, May 1996.

NIGAM, J.N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.80, n.8, p.189-193, Aug. 2000.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.)**. 1991. 111f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnonology Advances**, New York, v.18, n.11, p.303-319, Nov. 2000.

PEREIRA, R.T.G.; PFENNING, L.H.; CASTRO, H.A. Characterization and dynamic of colonization of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries in coffee fruits (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.4, p.1112-1116, jul./ago. 2005.

PETHKAR, A.V.; KULKARNI, S.K.; PAKNIKAR, K.M. Comparative studies on bisorption by two strain of *Cladosporium cladosporioides*. **Bioresource Technology**, Essex, v.80, n.5, p.211-215, May 2001.

PETHKAR, A.V.; PAKNIKAR, K.M. Thiosulfate biodegradation-silver biosorption process for treatment of photofilm processing wastewater. **Process Biochemistry**, London, v.38, n.1, p.855-860, Feb. 2002.

PICCOLI-VALLE, R.H.; PASSOS, F.M.L.; PASSOS, F.J.V.; SILVA, D.D. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, n.5, p.135-140, May 2001.

PRADELLA, J.G.C. **Reatores com células imobilizadas: biotecnologia industrial**. São Paulo: E.Blücher, 2001. 372p.

ROSSI, M.J. **Produção de inoculante ectomicorrizico em biorreatores airlift para aplicação em viveiro florestais**. 2006. 188p. Dissertação (Mestrado em

Engenharia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SALGADO, M.L.S. **Formulação do fungo *Arthrobotrys conoides* em alginato de sódio para controle de fitonematóides**. 1993. 37f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, P.S.; LIMA, U.A.; SANTOS, H.S.; KIYOHARA, P. Preparation of channeled alumina and aluminium hydroxide beads and membrane for yeast cells immobilization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.70, n.8, p.23-24, ago. 1998.

SAUTOUR, M.; MANSUR, C.S.; BENSOUSSAN, M.; DIVIES, C.; DANTIGNY, P. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.28, n.10, p.311-315, Oct. 2002.

SONJAK, S.; FRISVAD, J.C.; CIMERMAN, N.G. Penicillium mycobiota in arctic subglacial ice. **Microbial Ecology**, New York, v.52, n.2, p.207-216, Apr. 2003.

TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S.; SIMPSON, C.G. Repeated removal of cooper by alginate beads and the enhancement by microalgae. **Biotechnology Techniques**, Netherlands, v.12, n.3, p.187-190, Mar. 1998.

TAMPION, J.; TAMPION, M.D. **Immobilized cells: principle and application**. Cambridge: Cambridge University, 1988. 257p.

TING, Y.P.; SUN, G. Comparative study on polyvinyl alcohol and alginate for cell immobilization in biorption. **Water Science Technology**, Oxford, v.45, n.7, p.85-90, July 2000.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 894p.

URIOSTE, D.; MEDEIROS, M.; CASTRO, H.F. Imobilização de células de leveduras do gênero *Saccaromyces* em matrizes alternativas para obtenção de xarope de açúcar invertido. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.23, n.2, p.79-84, Nov. 2003.

VAIDYA, A.A.; DAITYE, K.V. Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. **Colourate**, Kingdom, v.14, p.3-10, 1982.

VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J.M.; VASSILEV, N. Application of an encapsulation of inorganic phosphate. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.63, n.11, p.67-72, Nov. 1998.

XIAO, J.B.; HU, Y.Y. Biosorption of various dyes by Strain HX5. **Acta Science Circumstantiae**, Beijing, v.25, n.3, p.525-529, July 2005.

XU, Z.N.; YANG, S.T. Production of micophenolic acid by *Penicillium brevicompactus* immobilized in rotating fibrous-bed bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40, n.5, p.623-628, May 2006.

YESILADALI, S.K.; PEKIN, G.; BERMEK, H.; ARSLAN-ALATON, I.; ORHOON, D.; TAMERLER, C. Biorremediation of textile azo dyes by *Trichophyton rubrum* LSK 27. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.22, n.8, p.1027-1031, Nov. 2006.

ZHANG, S.J.; YANG, M.; YANG, Q.X.; ZHANG, Y.; XIN, B.P.; PAN, F. Biosorption of reactive dyes by the mycelium pellets of a new isolated of *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.25, n.6, p.1479-1482, June 2003.

ANEXOS

Páginas

TABELA 1 A	Resumo de análise de variância para variável índice de crescimento micelial em função das temperaturas de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo <i>Aspergillus niger</i> ...	47
TABELA 2 A	Resumo da análise de variância para a variável esporulação em função das temperaturas de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo <i>Aspergillus niger</i>	47
TABELA 3 A	Resumo da análise de variância para a variável índice de crescimento micelial em função da temperatura de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	48
TABELA 4 A	Resumo da análise de variância para a variável esporulação em função da temperatura de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	48
TABELA 5 A	Resumo da análise de variância para a variável índice de crescimento micelial em função da temperatura de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo <i>Penicillium solitum</i>	49
TABELA 6 A	Resumo da análise de variância para a variável esporulação em função da temperatura de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo <i>Penicillium solitum</i>	49

TABELA 1A Resumo de análise de variância para variável índice de crescimento micelial em função das temperaturas de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo *Aspergillus niger*.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio (p -valor)
		ICM
Temperat. Armaz (A)	2	0,012 (p=0,7362)
Erro 1	4	0,036
A x D	24	0,053 (p=0,3165)
Dia Cresc. (D)	12	0,167 (p=0,0003)
Erro 2	74	0,046
CV 1(%)		3,42
CV 2 (%)		3,83

TABELA 2A Resumo da análise de variância para a variável esporulação em função das temperaturas de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo *Aspergillus niger*

Fonte de variação	GL	Quadrado médio (p -valor)
		ICM
Temperat. Armaz (A)	2	578055,41 (p=0,0003)
Erro 1	2	369.86
A x D	24	9805,83 (p=0,0000)
Dia Cresc. (D)	12	9103,77 (p=0,0000)
Erro 2	37	1002.32
CV 1(%)		3,60
CV 2 (%)		5,92

TABELA 3A Resumo da análise de variância para a variável índice de crescimento micelial em função da temperatura de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo *Cladosporium cladosporioides*

Fonte de variação	GL	Quadrado médio (p -valor)
		ICM
Temperat. Armaz (A)	2	1,89 (p=0,0187)
Erro 1	4	0,15
A x D	28	0,46 (p=0,0000)
Dia Cresc. (D)	14	1,85 (p=0,0000)
Erro 2	86	0,055
CV 1(%)		15,43
CV 2 (%)		9,35

TABELA 4A Resumo da análise de variância para a variável esporulação em função da temperatura de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo *Cladosporium cladosporioides*

Fonte de variação	GL	Quadrado médio (p -valor)
		ICM
Temperat. Armaz (A)	2	148952,71 (p=0,0059)
Erro 1	2	882,75
A x D	28	0,46 (p=0,0019)
Dia Cresc. (D)	14	32622,14 (p=0,0000)
Erro 2	43	0,055
CV 1(%)		9,52
CV 2 (%)		17,64

TABELA 5A Resumo da análise de variância para a variável índice de crescimento micelial em função da temperatura de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo *Penicillium solitum*

Fonte de variação	GL	Quadrado médio (p -valor)
		ICM
Temperat. Armaz (A)	2	0,15 (p=0,5300)
Erro 1	4	0,21
A x D	26	0,12 (p=0,3880)
Dia Cresc. (D)	13	2,22 (p=0,0000)
Erro 2	80	0,119
CV 1(%)		15,29
CV 2 (%)		11,51

TABELA 6A Resumo da análise de variância para a variável esporulação em função da temperatura de armazenamento dos grânulos e dias de crescimento para o fungo *Penicillium solitum*

Fonte de variação	GL	Quadrado médio (p -valor)
		ICM
Temperat. Armaz (A)	2	505332,47 (p=0,0010)
Erro 1	2	494,54
A x D	26	9286,63 (p=0,0019)
Dia Cresc. (D)	13	146414,77 (p=0,0000)
Erro 2	40	0,055
CV 1(%)		4,20
CV 2 (%)		3,68