

SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO

**DESENVOLVIMENTO DE MICOINSETICIDAS: UMA ABORDAGEM
MULTIDISCIPLINAR VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DO PERCEVEJO
BRONZEADO DO EUCALIPTO *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)**

Botucatu

2018

SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO

**DESENVOLVIMENTO DE MICOINSETICIDAS: UMA ABORDAGEM
MULTIDISCIPLINAR VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DO PERCEVEJO
BRONZEADO DO EUCALIPTO *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Agronomia (Proteção de
Plantas)

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico
Wilcken
Coorientador: Prof. Dr. José Cola
Zanuncio

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M712d Moio Velozo, Simone Grazielle, 1991-
Desenvolvimento de micoinseticidas: uma abordagem multidisciplinar visando o controle biológico do percevejo bronzeado do eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) / Simone Grazielle Moio Velozo - Botucatu: [s.n.], 2018
187 p.: fots. color., grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientador: Carlos Frederico Wilcken
Coorientador: José Cola Zanuncio
Inclui bibliografia

1. Eucalipto - Doenças e pragas. 2. Percevejo (Inseto) - Controle biológico. 3. Fungos. 4. Patologia de insetos. I. Wilcken, Carlos Frederico. II. Zanuncio, José Cola. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

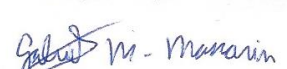
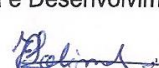
"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "DESENVOLVIMENTO DE MICOINSETICIDAS: UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DO PERCEVEJO BRONZEADO DO EUCALIPTO *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)"

AUTORA: SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO
ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN
COORIENTADOR: JOSÉ COLA ZANÚNCIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas
Dr. GABRIEL MOURA MASCARIN
Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente
Dra. INAJÁ MARCHIZELI WENZEL
Pesquisa e Desenvolvimento / Koppert Sistemas Biológicos
Prof. Dr. ÉVERTON PIRES SOLIMAN
Tecnologia Florestal / Suzano Papel e Celulose
Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO MARCONDES DE ALMEIDA
Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico

Botucatu, 07 de dezembro de 2018.

*A **Deus** que permitiu que tudo
pudesse ser realizado e que esteve presente em
todos os momentos me dando forças, saúde e
sabedoria.*

Dedico

*Ao meu esposo **Murilo R. Velozo** que com muito amor não mediu
esforços em me apoiar para tornar esse momento realidade.*

*Aos meus pais **Paulo e Vanderleia Moio** que sempre acreditaram
em mim e com muita garra investiram em minha formação.*

*À minha irmã **Camila M. Moio** que sempre demonstrou amor e
carinho incondicional.*

A todos meus familiares e grandes amigos

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas por investirem em minha formação desde o Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88881.134760/2016-01, pela concessão da bolsa de estudos na Alemanha e no Brasil Código de Financiamento 001.

Ao Prof. Dr. Carlos F. Wilcken, pela orientação, compreensão, confiança e amizade. Pois, durante mais de 7 anos compartilhou seus conhecimentos proporcionando-me um crescimento pessoal e profissional diário.

Ao Dr. Dietrich Stephan, pela orientação no exterior, confiança e por ter sido tão atencioso me ensinando o que há de mais novo na produção e formulação de fungos entomopatogênicos, enriquecendo minha formação e nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. José C. Zanuncio, pela co-orientação e por sempre nos fazer aspirar o melhor através de seus sábios conselhos científicos.

Ao Prof. Dr. José Raimundo de Souza Passos, pela grande orientação nas análises estatísticas e amizade durante as reuniões.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Proteção Vegetal (UNESP - FCA) que participaram de alguma forma durante o meu curso de Doutorado.

Aos membros da banca que aceitaram o convite de contribuir com o enriquecimento desse trabalho através da correção e avaliação, os Pesquisadores: Dr. Gabriel M. Mascarin, Dra. Inajá M. W. Rodrigues, Dr. José Eduardo M. de Almeida e Dr. Everton P. Soliman.

Ao IPEF-PROTEF e empresas florestais pelo apoio financeiro em muitas etapas desse trabalho, em especial ao Coordenador Técnico do PROTEF, MSc. Luis Renato Junqueira.

Ao Instituto Biológico, Laboratório de Controle Biológico, Unidade de Campinas, e ao Dr. José Eduardo M. de Almeida por terem nos confiado os isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nesse trabalho.

As empresas Malvern Panalytical e Oxiten (tensoativos e especialidades químicas), e aos representantes destas Sr. Henrique Kajiyama (Malvern), Sra. Fernanda O. Barreto Costa (Oxiten) e Cintia Favaro (Oxiten), por terem nos dado a oportunidade de utilizar as dependências das empresas e treinamento técnico nas análises físico-químicas. Também agradeço ao Prof. Dr. Marcelo da Costa Ferreira (UNESP, Jaboticabal) e a aluna de Doutorado Ana Beatriz Dilena Spadoni pelo grande apoio e abertura do convênio com as empresas citadas acima.

A Koppert Brasil pelo fornecimento de produto comercial para os bioensaios, em especial o Sr. Danilo Pedrazzoli e a Sra. Sonia Yamamoto por terem me proporcionado a grande oportunidade de uma visita na Koppert Biological Systems na Holanda, durante o meu período no exterior.

Ao Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) e todos os alunos de graduação, pós-graduação e as técnicas que foram meus amigos e me auxiliaram durante toda minha trajetória na UNESP. Em especial, Maurício Domingues, Luciane Becchi, Flavia Tedesco, Fernanda Paes e Lorena Hilário os quais participaram e contribuíram na realização desse trabalho.

Ao Julius Kühn-Institut, Centro Federal de Pesquisa de Plantas Cultivadas, Unidade de Controle Biológico (JKI-BI), Darmstadt, Alemanha, e a todos os funcionários do JKI-BI, que não só me aceitaram, mas me acolheram por 9 meses fazendo-me sentir parte integrante dos grupos de pesquisas.

À equipe do Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia do JKI-BI, pelo compartilhamento de conhecimentos e treinamentos acrescentando muito na minha experiência profissional. Principalmente à minha querida “irmã” e amiga Juliana Pelz que fez minha estada na Alemanha tão especial.

Aos meus queridos amigos “alemães” Adham Kassem, Jieun Kim, Jennifer Fuß, Marta Matek e Sabrina Schüssler que foram minha “família” na Alemanha e que se tornaram amigos para toda a vida.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com orações e amizade, torcendo por mim em todos os momentos.

Muito obrigada!

*“Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos
caminhos os meus caminhos...
Porque assim como o Céu é mais alto que a Terra, assim são os meus pensamentos
mais altos que os seus, diz o Senhor”*

(Isaias 55:8,9)

RESUMO

Thaumastocoris peregrinus Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), originário da Austrália e com ampla distribuição geográfica é responsável por perdas econômicas na cultura do eucalipto em várias regiões no mundo. Devido ao hábito alimentar deste inseto em várias espécies de *Eucalyptus*, este é classificado como uma praga de importância mundial. A busca por controle biológico de *T. peregrinus*, aliada à investigação de métodos para produção de micopesticidas bem como a necessidade de maior entendimento de fungos entomopatogênicos para controle de uma praga florestal, nos objetivou em estudar: seleção de isolados e avaliação da patogenicidade ao *T. peregrinus*; caracterização de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes temperaturas; fermentação sólida e líquida destes fungos nos biorreatores JKI-Solid Fermenter System, Laboratory Fermenter Prophyta L03® (*M. anisopliae*) e Minifors Infors HT® (*B. bassiana*) com diferentes escalas de produção; colheita de conídios puros oriundos de fermentação sólida; otimização dos processos de produção através de secagem em sistema estéril durante a produção do fungo; colheita e estabilidade de *M. anisopliae* através da secagem automatizada e caracterização de conídios puros dispersos em líquidos (Tween® 0,1% e óleo) quanto ao processo de sedimentação acelerada e distribuição do tamanho de partículas. *Metarhizium anisopliae*, *B. bassiana*, *Cordyceps* spp. e *Sporothrix insectorum* são fungos entomopatogênicos com alto potencial para controlar *T. peregrinus*, com destaque para *M. anisopliae*, o mais virulento. As temperaturas de 25 e 30 °C são ideais para a ação dos fungos *B. bassiana* (IBCB227), *M. anisopliae* (IBCB425) e *Cordyceps farinosa* (IBCB220) controlando *T. peregrinus*. Temperaturas acima de 37 °C podem causar a inativação dos isolados IBCB425 e IBCB227, sendo a condição ideal de 20 a 30 °C e de 15 a 30 °C, respectivamente. Na fase de produção, o biorreator JKI-Solid Fermenter System foi eficaz na produção de IBCB425 e IBCB227 em substratos sólidos com um rendimento máximo de aproximadamente $6,0 \times 10^9$ e $1,0 \times 10^9$ conídios/g de massa seca de fungo+substrato após 14 dias de fermentação, respectivamente, entretanto, a colheita de conídios secos só foi possível para IBCB425, devido ao não desprendimento dos esporos de IBCB227 no equipamento de colheita. Por esta razão, o Laboratory Fermenter Prophyta L03® foi utilizado para produzir grandes quantidade de conídios do isolado IBCB425 e obteve um rendimento de $6,4 \times 10^9$

conídios/g de massa seca de fungo+substrato. O Mycoharvester® versão 5b colheu e separou, eficazmente, partículas de *M. anisopliae*, entretanto, recomenda-se a secagem do substrato por 7 dias com uma taxa de aeração de 2L/min visando uma maior estabilidade do conídio a 25 °C. Na fase de formulação, o adjuvante Nimbus® apresentou efeito negativo na germinação dos conídios independentemente da combinação em que este adjuvante estava, resultando de 0 a 13% de germinação. As combinações Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%), Óleo de milho + Iharol Gold® (30%) e Óleo de milho + Assist® (30%) apresentaram germinação de 86,55; 89,66 e 97,55%, respectivamente, sendo as taxas mais altas de germinação dentre as formulações. As formulações testadas foram mais eficientes no controle de adultos de *T. peregrinus*, sendo que a formulação Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%) apresentou uma maior mortalidade. Além disso, os conídios de *M. anisopliae* apresentava melhores resultados quando em contato com o óleo, tanto para a distribuição do tamanho de partículas quanto para o processo de sedimentação acelerada. A fermentação líquida é outra possibilidade de produzir IBCB227 e IBCB425, onde meios de cultura a base de arroz têm um rendimento de $4,6 \times 10^8$ e $5,5 \times 10^7$ esporos/mL, respectivamente. *Beauveria bassiana* pode ter um rendimento aproximado de até 1×10^9 esporos/mL em biorreatores automatizados, sendo o consumo de glicose diretamente relacionado à capacidade de esporulação e produção de biomassa. Este estudo possibilitou a compreensão de várias etapas para produção de produtos biológicos a base de fungos, como multiplicação, colheita e aplicação desses produtos para controle de *T. peregrinus*, além disso, os métodos podem ser transferidos para outros insetos praga.

Palavras-chave: percevejo bronzeado, fungos entomopatogênicos, fermentação em estado sólido, fermentação submersa, produção de biopesticidas

ABSTRACT

Thaumastocoris peregrinus Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), originated in Australia and has a wide geographic distribution is responsible for economic losses in the eucalyptus plantations in several regions in the world. Due to the feeding behavior of this insect on several species of *Eucalyptus*, this is classified as a pest of world importance. The search for biological control of *T. peregrinus*, together with the investigation of methods to produce myopesticides as well as the need for a better understanding of entomopathogenic fungi to control a forest pest, aimed to study: selection of isolates and evaluation of pathogenicity to *T. peregrinus*; characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* at different temperatures; solid and liquid fermentation of these fungi in the JKI-Solid Fermenter System, Laboratory Fermenter Propphyta L03® (*M. anisopliae*) and Minifors Infors HT® (*B. bassiana*) bioreactors with different production scales; harvesting of pure conidia from solid fermentation; optimization of the production processes through drying in a sterile system during fungus production; harvesting and stability of *M. anisopliae* by automated drying and characterization of the pure conidia of this fungus dispersed in liquids (Tween® 0.1% and oil) in the process of accelerated sedimentation and distribution of particle size. *Metarhizium anisopliae*, *B. bassiana*, *Cordyceps* spp. and *Sporothrix insectorum* are entomopathogenic fungi with high potential to control *T. peregrinus*, with emphasis on *M. anisopliae*, the most virulent. Temperatures of 25 and 30 °C are the best for the fungi *B. bassiana* (IBCB227), *M. anisopliae* (IBCB425) and *Cordyceps farinosa* (IBCB220) controlling *T. peregrinus*. Temperatures above 37 °C can cause inactivation of IBCB425 and IBCB227 isolates, the ideal condition being 20-30 °C and 15-30 °C, respectively. In the production phase, the JKI-Solid Fermenter System bioreactor was effective in the production of IBCB425 and IBCB227 on solid substrates with a maximum yield of approximately 6.0×10^9 and 1.0×10^9 conidia/g of fungus+substrate dry mass after 14 days of respectively, however, the collection of dry conidia was only possible for IBCB425, due to the non-shedding of IBCB227 spores in the harvesting equipment. For this reason, Laboratory Fermenter Propphyta L03® was used to produce large conidia of IBCB425 isolate and yielded 6.4×10^9 conidia/g of fungus+substrate dry mass. Mycoharvester® version 5b efficiently harvested and separated *M. anisopliae* particles, however, drying of the substrate for

7 days at an aeration rate of 2L/min is recommended for greater conidial stability at 25 °C. In the formulation phase, the Nimbus® adjuvant had a negative effect on conidia germination regardless of the combination in which this adjuvant was present, resulting in 0 to 13% germination. The combination of sunflower oil + Natur'oleo® (40%), Corn oil + Iharol Gold® (30%) and Maize oil + Assist® (30%) presented germination of 86.55; 89.66 and 97.55%, respectively, being the highest germination rates among the formulations. The formulations tested were more efficient in the control of adults of *T. peregrinus*, and the formulation Sunflower oil + Natur'óleo ® (40%) had a higher mortality. In addition, the conidia of *M. anisopliae* presented better results when in contact with the oil, both for the particle size distribution and for the accelerated sedimentation process. Liquid fermentation is another possibility of producing IBCB227 and IBCB425, where rice-based culture media has a yield of 4.6×10^8 and 5.5×10^7 spores/mL, respectively. *Beauveria bassiana* can achieve an approximate yield of up to 1.0×10^9 spores/mL in automated bioreactors, and glucose consumption is directly related to sporulation capacity and biomass production. This study allowed the understanding of several stages for the production of biological products based on fungi, such as multiplication, harvest and application of these products to control *T. peregrinus*, in addition, the methods can be transferred to other insect pests.

Key words: bronze bug, entomopathogenic fungi, solid state fermentation, submerged fermentation, biopesticide production

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
 CAPÍTULO 1 - BIOEFICÁCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS AO PERCEVEJO BRONZEADO DO EUCALIPTO <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)	26
Resumo	26
Abstract	26
1.1 Introdução	27
1.2 Material e métodos	28
1.3 Resultados	31
1.4 Discussão	32
1.5 Conclusão	34
Referências	34
 CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Beauveria bassiana</i> EM ESCALA LABORATORIAL UTILIZANDO BIORREATOR PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	43
Resumo	43
Abstract	43
2.1 Introdução	44
2.2 Material e métodos	45
2.3 Resultados	51
2.4 Discussão	54
2.5 Conclusão	58
Referências	59
 CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> EM MÉDIA ESCALA COM BIORREATOR PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO LABORATORY FERMENTER PROPHYTA L03®	64
Resumo	64
Abstract	64
3.1 Introdução	65

3.2	Material e métodos	66
3.3	Resultados	71
3.4	Discussão	71
3.5	Conclusão	73
	Referências.....	74

CAPÍTULO 4 - AVANÇOS TECNOLÓGICOS NA COLHEITA DE CONÍDIOS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> PARA BIOPESTICIDAS VISANDO O CONTROLE DE <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)		78
	Resumo	78
	Abstract.....	78
4.1	Introdução.....	79
4.2	Material e métodos	79
4.3	Resultados	82
4.4	Discussão	82
4.5	Conclusão.....	83
	Referências.....	83

CAPÍTULO 5 - AERAÇÃO FORÇADA EM BIORREATOR DURANTE A PRODUÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> PODE MELHORAR A QUALIDADE DE COLHEITA E AUMENTAR DA ESTABILIDADE DO PRODUTO FINAL?		92
	Resumo	92
	Abstract.....	92
5.1	Introdução.....	93
5.2	Resultados	93
5.3	Discussão	95
5.4	Material e métodos	99
	Referências.....	102

CAPÍTULO 6 - EFEITO DE DIFERENTES ÓLEOS E ADJUVANTES NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS PUROS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> VISANDO O CONTROLE DO PERCEVEJO BRONZEADO <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE).....		114
---	--	-----

Resumo	114
Abstract	114
6.1 Introdução	115
6.2 Material e métodos	116
6.3 Resultados	123
6.4 Discussão	126
6.5 Conclusão	128
Referências	128

CAPÍTULO 7 - DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS E ESTABILIDADE FÍSICA DE FORMULAÇÕES BASEADAS EM CONÍDIOS DE <i>Metarhizium anisopliae</i>	
Resumo	133
Abstract	133
7.1 Introdução	134
7.2 Material e métodos	135
7.3 Resultados	140
7.4 Discussão	146
Referências	148

CAPÍTULO 8 - FERMENTAÇÃO LÍQUIDA PARA A PRODUÇÃO DE <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS	
Resumo	151
Abstract	151
8.1 Introdução	152
8.2 Material e métodos	153
8.3 Resultados	156
8.4 Discussão	158
8.5 Conclusão	159
Referências	160

CAPÍTULO 9 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA, CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS SUBMERSOS E CONSUMO DE GLICOSE POR <i>Beauveria bassiana</i> DURANTE A FERMENTAÇÃO LÍQUIDA EM BIORREATOR	162
Resumo	162
Abstract.....	162
9.1 Introdução.....	163
9.2 Material e métodos	164
9.3 Resultados.....	168
9.4 Discussão	171
9.4 Conclusão.....	172
Referências.....	172
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	175
REFERÊNCIAS	177

INTRODUÇÃO GERAL

Espécies de eucalipto são, em sua maioria, de origem australiana e consideradas uma das mais importantes fontes de fibra e celulose, com plantações em torno do Mediterrâneo, na África do Sul, na América do Sul e na Ásia (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011). O eucalipto, devido à sua rápida adaptabilidade, alta produtividade, ampla diversidade de espécies e alto potencial de aplicações, destaca-se no setor florestal do Brasil e no mundo (MORA; GARCIA, 2000; PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011; IBÁ, 2017). A área total de florestas plantadas no Brasil é de 7,84 milhões de hectares, sendo 72% as florestas compostas por *Eucalyptus* spp.; esses números são responsáveis por 91% de toda a madeira produzida para uso em indústrias e 6,2% de influência no PIB industrial brasileiro. A produção total é referente à celulose e papel (34%); produtores independentes (29%); carvão vegetal (14%); investidores financeiros (10%); painéis de madeira e pisos laminados (6%); produtos sólidos de madeira (4%) e outros (3%) (IBÁ, 2017). O cultivo de eucalipto no Brasil tem importância ambiental e socioeconômica, com benefícios ambientais e geração de emprego e renda (SANTAROSA et al., 2014).

O estabelecimento do eucalipto em vários continentes facilitou a entrada de insetos pragas de origem australiana com fluxo mais acentuado a partir do início do século XXI (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011). Esses insetos australianos invadiram e causaram danos em plantios de eucalipto no Brasil, com maior atenção para *Phoracantha semipunctata* Newman, 1840 (Coleoptera: Cerambycidae) (BIEZANKO; BOSQ, 1956); *Gonipterus platensis* Marelli, 1926 (Coleoptera: Curculionidae) (FENILLI, 1982); *Phoracantha recurva* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Cerambycidae) (BERTI-FILHO et al., 1995); *Glycaspis brimblecombei* Moore, 1964 (Hemiptera: Psyllidae) (WILCKEN et al. 2003); *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle, 2004 (Hymenoptera: Eulophidae) (COSTA et al., 2008) e *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae) (WILCKEN et al. 2010), este último de maior interesse neste trabalho.

Thaumastocoris peregrinus, conhecido como percevejo bronzeado, é um inseto com hábito alimentar sugador de folhas maduras de eucalipto (NADEL et al., 2010; SANTADINO et al., 2017). O corpo de *T. peregrinus* é achatado dorsoventralmente medindo, aproximadamente, 3 mm de comprimento e seus adultos possuem coloração marrom com áreas mais escuras (CARPINTERO;

DELLAPÉ, 2006). Os ovos desse inseto são de coloração preta e, geralmente, estes são encontrados agrupados em diversas partes da planta, como nas folhas, caules e frutos, formando uma mancha escura (JACOBS; NESSER, 2005; CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006). Ninfas e adultos possuem hábitos gregários e, por isso, um grande número de indivíduos pode ser encontrado em uma única folha, geralmente na face abaxial (JACOBS; NESER, 2005; MOIO et al., 2014; SANTADINO et al., 2017). Machos de *T. peregrinus* emitem compostos químicos que promovem o comportamento de agregação, com níveis variando com o horário e a presença da fêmea (GROBA et al., 2018). O período ninfal desse inseto é de 15 a 20 dias em temperaturas em torno de 17 a 26°C com cinco ínstaes (NOACK; ROSE, 2007; SOLIMAN et al., 2012; MARTINEZ et al., 2014). A longevidade de seus adultos varia com a temperatura e espécie de *Eucalyptus*, de 23 a 40 dias, aproximadamente (NOACK; ROSE, 2007; SOLIMAN et al., 2012; MARTINEZ et al., 2014). Essa espécie se reproduz sexualmente, com 60 a 75 ovos por fêmea, e *Eucalyptus urophylla* e *grandis* são as espécies mais adequadas para o desenvolvimento de *T. peregrinus* no Brasil (MARTINEZ; BIANCHI, 2010; SOLIMAN et al., 2012). Surto populacionais desse inseto assumem padrão cíclico relacionado com as estações do ano e menos evidentes no inverno (CUELO et al., 2018). O percevejo bronzeado é monitorado com armadilhas adesivas amarelas. Essas armadilhas devem ser fixadas na planta, pois *T. peregrinus* não apresenta muita habilidade para voo, mas é ágil em caminhar na planta (NOACK; ROSE, 2007; LIMA et al., 2016; CUELO et al., 2018).

A distribuição geográfica de *T. peregrinus* é ampla por ser um inseto de fácil disseminação, com presença confirmada no Brasil (WILCKEN et al., 2010) e em países de diferentes continentes, como África do Sul (JACOBS e NESER, 2005), Zimbábue, Malawi e Quênia (NADEL et al., 2010; HURLEY et al., 2011), Argentina (NOACK; COVIELLA, 2006; CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006), Uruguai (MARTINEZ; BIANCHI, 2010), Chile (IDE et al., 2011), Itália (LAUDONIA; SASSO, 2012), Nova Zelândia (SOPOW et al., 2012), Portugal (GARCIA et al., 2013), Israel (NOVOSELSKY; FREIDBERG, 2016), México (JIMÉNEZ-QUIROZ et al., 2016) e Estados Unidos (HODEL et al. 2016).

O percevejo bronzeado se disseminou rapidamente em vários estados do Brasil e encontra-se presente em Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul (WILCKEN et al., 2010), Bahia

(LIMA et al., 2010), Sergipe (RIBEIRO et al., 2015), Paraná (BARBOSA et al., 2010), Santa Catarina (SAVARIS et al., 2011) e Goiás (PEREIRA et al., 2013). O número de hospedeiros atacados por *T. peregrinus* é de, pelo menos, 30 espécies de *Eucalyptus* e três híbridos comerciais comuns (NADEL et al., 2010).

O hábito alimentar de *T. peregrinus* em sugar folhas de *Eucalyptus* spp., causa o prateamento seguido do bronzeamento da folha até a seca e morte da árvore em ataques severos pelo inseto (JACOBS; NESSER, 2005; LAUDONIA; SASSO, 2012). Esse inseto insere seu estilete na planta através das células epidérmicas e estômatos para se alimentar, atingindo os parênquimas das folhas e células subepidérmicas (MOIO et al., 2014; SANTADINO et al., 2017). Esse comportamento pode destruir tecidos vegetais, remover o cloroplasto e causar manchas cloróticas na superfície externa das folhas (MOIO et al., 2014; SANTADINO et al., 2017). Danos por *T. peregrinus* em clones de *E. urophylla* e *E. grandis* podem reduzir em 14% a produção de madeira com US\$380,00 de prejuízo por hectare (WILCKEN et al., 2017; JUNQUEIRA; BARBOSA; WILCKEN, 2018).

O controle biológico com parasitoides, predadores e patógenos regula populações de insetos pragas. Esse método é natural e traz vantagens para o ambiente e seres não alvos (DEBACH, 1968; ALVES, 1998). O controle biológico é o mais utilizado para *T. peregrinus*, com parasitoide de origem australiana (BARBOSA et al., 2017), predador nativo (SOUZA et al., 2012), e inseticidas microbiológicos à base de fungos (SOLIMAN, 2014; LORENCETTI et al., 2018).

O controle biológico clássico, através da importação do endoparasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae), de origem australiana, é o principal método de controle do percevejo bronzeado no mundo (LIN et al., 2007; NADEL; NOACK, 2012; BARBOSA et al., 2017). *Cleruchoides noackae* encontra-se estabelecido no Brasil com parasitismo de até 50% em condições de campo e laboratório (BARBOSA et al., 2017). Entretanto, o sistema de criação de *C. noackae* e *T. peregrinus* é intensamente manual, não havendo hospedeiros alternativos e dietas artificiais, dificultando o atendimento de grandes demandas de produção. Além da complexidade de criação do inseto, esse parasitoide tem ciclo de vida, relativamente, curto e especificidade pela idade do ovo da praga (MUTITO et al., 2013; SOUZA et al., 2016). E isso pode inviabilizar o uso comercial desse inseto. O manejo integrado com os predadores *Chrysoperla externa* Hagen (Neuroptera: Chrysopidae), *Supputius cincticeps* Stal (Heteroptera:

Pentatomidae), relatados, naturalmente, em campo, pode ser uma opção para complementação do uso do parasitoide (BARBOSA et al., 2010; SOUZA et al., 2012).

Fungos entomopatogênicos também podem ser utilizados no manejo do percevejo bronzeado (SOLIMAN, 2014; LORENCETTI et al., 2018). Esses microrganismos apresentam vantagens como fácil produção e aplicação com alto nível de dispersão e multiplicação no campo (MASCARIN; JARONSKI, 2016). Entretanto, o uso de fungos, como qualquer agente de controle biológico, requer cuidados especiais com conhecimento especializado e condições ambientais adequadas. A ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin 1912 (Hypocreales: Cordycipitaceae) (LORENCETTI et al., 2017), *Cordyceps cateniannulata* (*Paecilomyces cateniannulatus*) (Z.Q. Liang) Samson & Hywel-Jones 2005 (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Fusarium* spp. (SAN ROMAN et al., 2012; VELOZO, 2015), *Zoophtora radicans* Batko 1964 (Entomophthorales: Entomophthoraceae) (MASCARIN et al., 2012) foi registrada em populações de *T. peregrinus* no campo, e a eficácia de *B. bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* Wize 1904 (Hypocreales: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 (Hypocreales: Clavicipitaceae) foi comprovada (SOLIMAN, 2014; LORENCETTI et al., 2018). Além disso, o uso integrado de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e o parasitoide *C. noackae* é possível, desde que respeitando épocas específicas e aplicando-se separadamente, pois esses fungos têm reduzido impacto em organismos não-alvos (ZIMMERMANN, 2007a; ZIMMERMANN, 2007b; DOMINGUES et al., 2017). Plantios de eucalipto são ambientes adequados para fungos, com ocorrência natural de suas espécies. Além disso, as exigências da certificação do Conselho de Manejo Florestal (Forestry Stewardship Council – FSC) limitam o uso do controle químico e estimulam ferramentas sustentáveis no manejo de pragas florestais.

O reduzido número de registros de micopesticidas é uma das causas do baixo uso desses produtos contra insetos pragas em plantações de eucalipto no Brasil. O Boveril® é o único produto à base de fungo registrado para controle de *G. platensis* (AGROFIT, 2018). Esse fungo causa mortalidade de até 80% da população desse inseto, quando aplicado via pó polvilhado, com 2kg do produto comercial misturados em 12kg de talco por ha (MASCARIN et al., 2018; C.F. WILCKEN, informação pessoal). Fungos entomopatogênicos formulados são eficientes no controle de diversos insetos pragas, como o psílideo de concha e o percevejo bronzeado.

Entretanto, não há registros de produtos microbiológicos para essas pragas (DAL POGETTO et al., 2011; SOLIMAN, 2014; AGROFIT, 2018).

Os produtos à base de fungos desenvolvidos para uso na forma inundativa são, geralmente, conhecidos como “micoinseticidas” ou “biopesticidas” por serem usados de forma semelhante a inseticidas químicos (JACKSON; DUNLAP; JARONSKI, 2010). A importância de biopesticidas microbianos tem aumentado devido a preferência da sociedade, governo e mercado por alimentos orgânicos ou livre de resíduos de agrotóxicos (MASCARIN; JARONSKI, 2016). No entanto, um grande número de propágulos infecciosos de fungos é necessário para tratamentos inundativos, especialmente na aplicação foliar, devido às grandes áreas de plantios (JARONSKI; MASCARIN, 2017).

Propágulos fúngicos podem ser obtidos em grandes quantidades por fermentação sólida e líquida. A fermentação sólida exige um mínimo de água para hidratação do substrato e representa uma tecnologia para a produção de produtos microbianos, como alimentos, combustíveis, produtos químicos industriais, produtos farmacêuticos e biopesticidas (BARTLETT; JARONSKI, 1988; PANDEY, 2003). Processos de produção de conídios aéreos em fermentação sólida podem ser muito simples, mas intensivos em mão de obra (sacos autoclavados de grãos umedecidos inoculados com um entomopatógeno) ou mais eficientes, envolvendo um sistema de produção mais automatizado com o uso de biorreatores (BARTLETT; JARONSKI, 1988; JENKINS et al., 1998; MITCHELL, BEROVIČ E KRIEGER, 2006). A principal forma de produção de fungos no Brasil, para a comercialização como biopesticidas, é em arroz cozido e inoculado com o fungo em sacos plásticos ou bandejas (ALVES; PEREIRA, 1989; LI et al., 2010; MASCARIN et al., 2018). A fermentação líquida em biorreatores tem recebido maior atenção das indústrias do setor por ter vantagens sobre a fermentação sólida para produzir biopesticidas com diferentes estruturas celulares, alto rendimento, pouco uso de mão-de-obra, chances mínimas de contaminações e pouco tempo de cultivo (MASCARIN et al., 2018). Entretanto, estruturas produzidas em fermentação líquida são geralmente mais sensíveis à radiação ultravioleta (UV), a estresses de temperatura e por desidratação como ocorre no clima brasileiro (MASCARIN et al., 2018).

O produto aplicado deve ser formulado para levar o ingrediente ativo (fungo) ao alvo no campo. Formulações de biopesticidas à base de fungos devem atender vários requisitos para que sejam práticas e eficazes como: o ingrediente ativo

(fungos) deve ser mantido metabolicamente inativo, mas vivos, durante o armazenamento antes do uso (o armazenamento deve ser idealmente à temperatura ambiente, não refrigerado); o produto deve ser facilmente suspenso em calda para ser pulverizado; os propágulos precisam ser mantidos vivos no local tratado (copa da planta ou superfície do solo) o máximo tempo possível, especialmente sob condições adversas do ambiente, e devem ser compatíveis com a formulação e adjuvantes eventualmente misturados na calda antes da aplicação (JARONSKI; MASCARIN, 2017). A tecnologia de formulação deve ser considerada em todos os estágios desde a produção do microrganismo até a ação no inseto alvo, para se obterem formulações eficientes e de alta qualidade (JONES; BURGESS, 1998). No mercado mundial existem registradas aproximadamente 100 formulações a base de fungos entomopatogênicos, sendo 33% baseadas em *M. anisopliae* e outros 33% em *B. bassiana* (FARIA; WRAIGHT, 2007). Os gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Cordyceps* são facilmente encontrados em solos de agroecossistemas e florestas no mundo, além de serem de grande interesse para o uso como biopesticidas (CHANDLER et al., 1997; KELLER et al., 2003; FARIA; WRAIGHT, 2007; ZIMMERMANN, 2008; CASTRO et al., 2016; ROCHA et al., 2013). Os fungos *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp., *Cordyceps* spp., *Akanthomyces* spp., *Hirsutella thompsonii* Fisher, *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson, *Aschersonia aleyrodinis* Webber, *Culicinomyces clavosporus* Romney e Rao, e *Tolypocladium cylindrosporum* (Gams) são da ordem Hypocreales, sendo os três primeiros gêneros mais importantes para a patologia de insetos (JARONSKI, 2014).

A necessidade de se controlar *T. peregrinus* em plantios de eucalipto justifica esta tese cujo principal objetivo é busca por métodos inovadores para a produção de biopesticidas a base de fungos entomopatogênicos de origem brasileira. Os métodos foram baseados nas mais novas tecnologias para produção e formulação de fungos entomopatogênicos.

Este documento foi preparado em capítulos, sendo cada etapa um raciocínio lógico, de acordo com a seguinte sequência: seleção de isolados entomopatogênicos; caracterização de fungos em diferentes temperaturas; produção sólida de fungos em diferentes escalas de produção; colheita de conídios puros visando a formulação; otimização da colheita e estabilidade de fungos através da secagem automatizada; caracterização de conídios puros dispersos em óleo; possibilidades de produção de fungos em fermentação líquida. Com isso, esta

pesquisa objetivou-se em selecionar isolados de fungos entomopatogênicos e avaliar a patogenicidade destes ao *T. peregrinus*; caracterizar *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes temperaturas; estudar a fermentação sólida e líquida destes fungos nos biorreatores JKI-Solid Fermenter System, Laboratory Fermenter Prophyta L03® (*M. anisopliae*) e Minifors Infors HT® (*B. bassiana*) com diferentes escalas de produção; avaliar a colheita de conídios puros oriundos de fermentação sólida; otimizar os processos de produção através de secagem em sistema estéril durante a produção do fungo; avaliar a colheita e estabilidade de *M. anisopliae* através da secagem automatizada e caracterizar os conídios puros desse fungo dispersos em líquidos (Tween® 0,1% e óleo) quanto ao processo de sedimentação acelerada e distribuição do tamanho de partículas.

Essa pesquisa provou que métodos tecnológicos de produção de fungos utilizados no exterior podem ser adaptados para a produção de isolados fúngicos brasileiros. Além disso, testes de laboratório e semi-campo comprovaram a eficácia dos fungos e formulações selecionadas a *T. peregrinus* nessas condições.

CAPÍTULO 1
BIOEFICÁCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS AO PERCEVEJO
BRONZEADO DO EUCALIPTO *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)

Revista: Florida Entomologist

Resumo

O percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), inseto sugador de folhas de *Eucalyptus* spp., originário da Austrália, causa danos em plantios comerciais de eucalipto no Brasil desde 2008. Métodos de controle biológico com fungos entomopatogênicos podem ser um componente para o manejo integrado deste inseto. Portanto, a seleção de isolados virulentos e o estudo da patogenicidade são necessários. O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de isolados de fungos entomopatogênicos e avaliar a patogenicidade dos isolados mais virulentos em diferentes temperaturas. A patogenicidade de diferentes isolados fungicos foi avaliada com pulverização de suspensões conidiais sobre adultos e ninfas de *T. peregrinus*. *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912 (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Cordyceps* spp. e *Sporothrix insectorum* Hoog & H.C. Evans 1974 (Ophiostomatales: Ophiostomataceae) são fungos entomopatogênicos com alto potencial para controlar *T. peregrinus*, com destaque para *M. anisopliae*, o mais virulento. Os isolados *B. bassiana* (IBCB227), *M. anisopliae* (IBCB425) e *Cordyceps farinosa* (Holmsk.) Fr. 1832 (Hypocreales: Cordycipitaceae) (IBCB220) foram mais virulentos para *T. peregrinus* nas temperaturas de 25 e 30 °C. Fungos entomopatogênicos são potenciais para o controle de *T. peregrinus* em condições de laboratório, entretanto existem isolados que são mais virulentos e estes seriam os mais adequados para serem empregados.

Palavras-chave: percevejo bronzeado, fungo entomopatogênico, controle microbiano, seleção de isolados, floresta sustentável

Abstract

The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), a leaf-sucking insect from *Eucalyptus* spp., originating in Australia, causes damage to commercial eucalyptus plantations in Brazil since 2008. Methods of biological control with entomopathogenic fungi may be a component for the integrated management of this insect. Therefore, the selection of virulent isolates and the study of pathogenicity are required. The objective of this work was to evaluate the pathogenicity of isolates of entomopathogenic fungi and to evaluate the pathogenicity of the most virulent isolates at different temperatures. The pathogenicity of different fungal isolates was evaluated by spraying conidial suspensions on adults and *T. peregrinus* nymphs. *Metarhizium anisopliae* (Metschn.)

Sorokin 1883 (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912 (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Cordyceps* spp. and *Sporothrix insectorum* Hoog & H.C. Evans 1974 (Ophiostomatales: Ophiostomataceae) are entomopathogenic fungi with high potential to control *T. peregrinus*, with emphasis on *M. anisopliae*, the most virulent. The isolates *B. bassiana* (IBCB227), *M. anisopliae* (IBCB425) and *Cordyceps farinosa* (Holmsk.) Fr. 1832 (Hypocreales: Cordycipitaceae) (IBCB220) were more virulent for *T. peregrinus* at temperatures of 25 and 30 ° C. Entomopathogenic fungi are potential for control of *T. peregrinus* in laboratory conditions, however there are isolates that are more virulent and these would be the most suitable to be used.

Key-words: bronze bug, microbial control, entomopathogenic fungi, selection of isolates, sustainable forest

1.1 Introdução

As características, como o rápido desenvolvimento e capacidade de esporulação, de fungos entomopatogênicos favorecem o desenvolvimento de epizootias em insetos hospedeiros (Lacey et al. 2015). Os fungos começaram a ser estudados no início do século XIX com investigações em doenças que acometiam o bicho-da-seda na Europa (Imoulán et al., 2017). Espécies da ordem Hypocreales formam associações com relações antagônicas, sendo patogênicas a insetos ou plantas (Zhang et al. 2006; Sung et al. 2008; Lacey et al. 2015).

Fungos entomopatogênicos têm apresentado alguns sucessos no controle de pragas florestais no Brasil, principalmente de hemípteros e coleópteros em plantios de eucalipto (Dal Pogetto et al. 2011; Lorencetti et al. 2018; Mascarín et al. 2012; Moura Mascarín et al. 2018). Esses microorganismos apresentam vantagens, como ação de contato, penetrando no corpo do inseto e liberando substâncias tóxicas que matam o hospedeiro (Zimmermann 2007a). Além disso, grandes quantidades de propágulos fúngicos podem ser produzidas *in vitro* e formulados e aplicados como bioinseticidas.

O percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), é uma praga exótica de *Eucalyptus* spp., de origem australiana, e foi detectado no Brasil em 2008 (Wilcken et al. 2010). Danos por *T. peregrinus* estão relacionados ao hábito alimentar desse inseto resultando em prateamento (clorose), bronzeamento e secagem das folhas (Wilcken et al. 2010).

Thaumastocoris peregrinus é de difícil controle devido às suas características como ampla gama de espécies de eucalipto hospedeiras, além disso métodos de controle biológico estão em processo de estudo e validação (Noack & Rose 2007; Martinez & Bianchi 2010; Nadel et al. 2010; Soliman et al. 2012).

O controle biológico de *T. peregrinus* é o mais adequado e pode ser realizado com o parasitoide de ovos, *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae) (Barbosa et al. 2017); fungos entomopatogênicos (Lorencetti et al. 2018; Mascarin et al. 2012) ou complementado com o percevejo predador, *Supputius cincticeps* Stål, 1860 (Heteroptera: Pentatomidae) (Souza et al. 2012). Todavia, parasitoides e predadores exigem mão-de-obra intensiva por não existirem métodos automatizados para sua produção e poucas dietas artificiais para criação da praga hospedeira, além da ausência de hospedeiros alternativos para o parasitoide (Barbosa et al. 2017; Martinez et al. 2018). Isto dificulta sobremaneira a liberação inundativa desses agentes de controle em áreas extensas de plantios de eucalipto.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos ao percevejo bronzeado visando ao desenvolvimento de biopesticidas. Além disso, a virulência dos melhores isolados foi avaliada em diferentes temperaturas.

1.2 Material e Métodos

LOCAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) e Laboratório de Tecnologia de Aplicação, Departamento de Proteção Vegetal (DPV), Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA), Universidade Estadual Paulista (UNESP).

CRIAÇÃO DO INSETO

Ovos de *T. peregrinus*, da criação estoque do laboratório de entomologia da Embrapa Florestas em Colombo, Paraná, foram utilizados para iniciar a colônia desse inseto. Ninfas desses ovos foram mantidas em ramos de *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* (Myrtaceae) clone 433 em frascos Erlenmeyer de 500 mL com água

e acondicionados em bandeja plástica retangular (40 cm de comprimento x 35 cm de largura x 8 cm de altura). Adultos e ninfas das gerações em laboratório foram utilizados nos bioensaios de patogenicidade. A criação de *T. peregrinus* foi mantida em sala climatizada a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h (Barbosa et al. 2016).

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Diferentes isolados de fungos entomopatogênicos, espécies *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill. 1912 (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Cordyceps farinosa* (Holmsk.) Fr. 1832 (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Cordyceps fumosorosea* Wize 1904 (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Sporothrix insectorum* Hoog & H.C. Evans 1974 (Ophiostomatales: Ophiostomataceae) (Tabela 1), da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal em Campinas, São Paulo, Brasil, foram usados no bioensaio de patogenicidade para seleção dos mais virulentos à *T. peregrinus*. O inóculo inicial, de cada isolado, foi obtido pela propagação do fungo em placas de Petri com batata dextrose ágar, BDA (42 g L [Kasvi, Itália]) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro. O bioensaio foi realizado com fungos colhidos por raspagem superficial com alça Drigalski do meio de cultura para a retirada das estruturas infectantes (conídios). As colônias foram crescidas em 14 dias em meio BDA, para ambos os isolados. O material foi suspenso em Tween 80® [Sigma, Alemanha] (0,1%) e os conídios foram calibrados para concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL em hemocitômetro (Neubauer) com auxílio de um microscópio óptico [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha]. Em seguida, 2 mL de suspensão de conídios foram pulverizados com auxílio de uma Torre de Potter sobre 10 adultos de *T. peregrinus* com deposição de $1,4 \times 10^4$ conídios/mm². A testemunha recebeu apenas Tween 80® (0,1%). Os insetos foram separados da seguinte maneira, 10 adultos de *T. peregrinus*, da criação estoque de laboratório, foram transferidos para cada placa de Petri modificada (60 x 20 mm com tampas com abertura de 20 mm/diâmetro fechadas por tecido *voil* para trocas gasosas). Uma folha de *E. urophylla* var. *platyphylla*, clone 433, cortada com uma área de aproximadamente 6 cm² e com gel hidrorretentor® [Hydroplan-EB, Empresa de Base & Distribuidora

Ltda, Brasil] (1 g/400 mL) embaixo desta folha foi utilizada. A função do gel hidrorretentor® é auxiliar na turgescência da folha e evitar a fuga do inseto. O fungo foi aplicado nas placas de Petri com insetos e mantidas em incubadoras tipo B.O.D. a temperatura de $25,0 \pm 1,0$ °C, umidade relativa de $83,0 \pm 2,0\%$ e fotoperíodo de 12h. Cada repetição (placa de Petri) foi observada diariamente durante 7 dias, e os insetos mortos contabilizados, retirados e transferidos para câmaras úmidas (placas de Petri estéril contendo os insetos e acondicionadas em recipientes plásticos fechados com uma tampa e abaixo das placas eram colocados papéis absorventes, previamente, esterilizados e umedecidos com água destilada autoclavada) para estimular o desenvolvimento do fungo e comprovar a mortalidade do inseto. Testes de germinação foram realizados com os isolados e aqueles com viabilidade acima de 90% utilizados no bioensaio. O experimento foi composto por 11 tratamentos (isolados) e cinco repetições com 50 insetos por tratamento, sendo os ensaios repetidos duas vezes (blocos). Os isolados foram selecionados de acordo com o total de insetos mortos e o período de mortalidade para selecionar isolados de diferentes espécies de fungos.

PATOGENICIDADE DE *Beauveria bassiana*, *Cordyceps farinosa*, *Metarhizium anisopliae* AO PERCEVEJO BRONZEADO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Os isolados pré-selecionados *B. bassiana* (IBCB227), *M. anisopliae* (IBCB425) e *I. farinosa* (IBCB220) (seleção de isolados de fungos entomopatogênicos) foram utilizados para este bioensaio. Suspensões fúngicas foram preparadas e aplicadas da mesma forma que o descrito na metodologia do item de seleção de isolados e concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. Dez insetos (repetições) foram preparados da mesma forma, por placa de Petri modificada. As repetições, após a aplicação do fungo, foram mantidas em incubadoras B.O.D. sob temperaturas de 20, 25 ou 30°C com umidade relativa de $81,0 \pm 2,0\%$ e fotoperíodo de 12h. Cada repetição (placa de Petri) foi observada, diariamente, e os insetos mortos contados, retirados e transferidos para câmaras úmidas para estimular o desenvolvimento do fungo e comprovar a causa de mortalidade do inseto. Testes de germinação foram realizados para aqueles para os isolados com viabilidade acima de 90%. Os tratamentos foram compostos por quatro espécies de fungos (nível 1) e três temperaturas (nível 2) com cinco repetições totalizando 50 insetos por

tratamento/nível, sendo os ensaios repetidos duas vezes (blocos). Os isolados, de diferentes espécies de fungos, foram selecionados de acordo com o total de insetos mortos e a velocidade de mortalidade em dias.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística da proporção de morte dos insetos tendo como fatores isolados, e temperatura considerando o tempo e a repetição como covariáveis contínuas, além da covariável bloco, foram ajustados modelos lineares generalizados com a distribuição gama e função de ligação logarítmica (Nelder & Wedderburn, 1972). A velocidade média da mortalidade, definida como a razão entre o total de insetos mortos no período e o tempo total (em dias), foram ajustados modelos lineares generalizados com a distribuição gama e função de ligação logarítmica, considerando como fator os isolados. Foi utilizado o procedimento genmod para as análises de proporção de morte do Programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition, e o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999) utilizado para comparações entre tratamentos. Os gráficos foram plotados com o software SigmaPlot 12.0.

1.3 Resultados

Os isolados testados foram patogênicos a *T. peregrinus*, diferindo da testemunha ($P < 0,05$), esta com mortalidade de 24%. Os isolados diferiram entre si, sendo *M. anisopliae* (IBCB425) o mais virulento, com 100% de mortalidade e *Cordyceps* sp. (IBCB375), *B. bassiana* (IBCB617) e *S. insectorum* (IBCB79) os menos virulentos, com mortalidades de 76%, 74% e 74%, respectivamente. Estes isolados têm potencial para o controle de *T. peregrinus*, por terem causado mortalidade maior que 70% (Figura 1).

A velocidade da mortalidade de *T. peregrinus* diferiu entre os isolados com *M. anisopliae* (IBCB425) considerado o mais rápido e *B. bassiana* (IBCB617) o mais lento (Figura 2).

A patogenicidade de *B. bassiana* (IBCB227), *M. anisopliae* (IBCB425) e *I. farinosa* (IBCB220) para adultos de *T. peregrinus* diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$). A mortalidade de *T. peregrinus* foi maior na temperatura de 30 °C, para

todos os isolados, e menor na de 20 °C para IBCB227, IBCB220 e testemunha (controle não tratado). A mortalidade de *T. peregrinus* foi maior com os isolados IBCB227 e IBCB425 (100%), seguido do IBCB220 (94%) e da testemunha (20%) na temperatura de 30 °C. O isolado IBCB227 (96%) foi mais patogênico a *T. peregrinus* que os IBCB425 (94%), IBCB220 (90%) e na testemunha (18%) a 25°C (Tabela 2).

1.4 Discussão

Metarhizium anisopliae, *B. bassiana*, *Cordyceps* spp. e *S. insectorum* têm grande potencial para o controle biológico de *T. peregrinus* com seus conídios aplicados em suspensão. Diferentes isolados de *M. anisopliae*, incluindo os IBCB425 e IBCB348 causaram mortalidade de até 100% de outros hemípteros, como a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* Stål (Hemiptera: Cercopidae) (Loureiro et al. 2005). *Metarhizium anisopliae* causou mortalidade de 100% de adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) em laboratório (Orduño-cruz et al. 2015). Isolados de *M. anisopliae* tem alta especificidade para Hemiptera. No entanto, a gama de hospedeiros de *M. anisopliae* é ampla, com registros de 204 espécies e sete ordens, incluindo Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, mas, esses números não superam *B. bassiana* (Veen 1968). Os isolados têm características peculiares, como o local de origem e genes de virulência, sendo mais específicos a determinadas ordens de insetos (Zimmermann 2007a). A patogenicidade de isolados de *B. bassiana* e *Cordyceps* spp. a *T. peregrinus* concorda com efeito semelhante para esse inseto, com mortalidade entre 37% e 80,1% para diferentes isolados de *B. bassiana* e de 87% para *Cordyceps* sp. na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL (Lorencetti et al. 2018), a mesma utilizada neste trabalho. Fungos entomopatogênicos nativos podem aumentar as possibilidades de controle de pragas florestais introduzidas no manejo sustentável no setor florestal, como casos de sucesso sobre eficiência ou ocorrência natural de fungos como *B. bassiana*, *Cordyceps* sp., *Zoophtora radicans* (Wilcken et al. 2015; Mascarín et al. 2012; Lorencetti et al. 2018). O fungo *S. insectorum* controla o percevejo de renda da seringueira *Leptopharsa hevea* Drake & Poor, 1935 (Hemiptera: Tingidae), um programa de controle biológico efetivo contra esse inseto-praga (Li et al. 2010).

Entretanto, estes são os primeiros dados sobre sua patogenicidade para percevejo bronzeado.

A mortalidade mais rápida de *T. peregrinus* foi causada por isolados de *M. anisopliae* que a por isolado de *B. bassiana* a qual está relacionada à alta virulência do primeiro. A virulência de *M. anisopliae* (IBCB425) em causar mortalidade rápida de hemípteros é conhecida. Este isolado foi utilizado no controle de outros insetos, sendo produzido, comercialmente, com registro para *M. fimbriolata*, *Zulia entreriana* Berg, 1879 (Hemiptera, Cercopidae) e *Deois flavopicta* Stall, 1954 (Hemiptera, Cercopidae) no Brasil (Loureiro et al. 2005; Lima et al. 2014; Agrofit 2018).

Variações na patogenicidade de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. farinosa* a *T. peregrinus* com a temperatura e com maiores valores a 30 °C foram também observadas para *Maruca vitrata* Fabricius 1787 (Lepidoptera: Crambidae) com *M. anisopliae*, com mortalidade maior entre 25 e 30 °C (Tumuhaise et al. 2018). Entretanto, as temperaturas elevadas não foram as ideais para *B. bassiana* no controle de *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae), com alterações na patogenicidade entre 26 e 22 °C e maior valor a 34 °C (Lecuona et al. 2005). A temperatura pode reduzir a eficiência de entomopatógenos de diferentes maneiras, por exemplo, como afetar a germinação, crescimento, viabilidade e patogenicidade do fungo ao inseto hospedeiro. Além disso, altas temperaturas podem inativar o microrganismo antes do contato com o hospedeiro ou reduzir ou acelerar o crescimento do fungo dentro do inseto; enquanto as baixas temperaturas podem reduzir ou inibir a germinação e o crescimento do fungo, assim prejudicando ou prolongando uma infecção (Zimmermann 2007b). Os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *C. farinosa* são considerados mesófilos, com temperaturas ótimas de 15 a 35 °C, 23 a 28 °C e 20 a 30 °C, respectivamente, entretanto, isso pode variar de acordo com os isolados (Ekesi et al. 1999; Zimmermann 2007a; Zimmermann 2007b; Zimmermann 2008). Isto aumenta as possibilidades de uso de fungos entomopatogênicos para o controle de *T. peregrinus* com incidência em diversas regiões do Brasil, a maioria com clima quente. Os estados com presença de *T. peregrinus* são Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul (Wilcken et al. 2010), Bahia (Lima et al. 2010), Sergipe (Ribeiro et al. 2015), Paraná (Barbosa et al. 2010) Santa Catarina (Savaris et al. 2011) e Goiás (Pereira et al. 2013).

1.5 Conclusão

Metarhizium anisopliae, *B. bassiana*, *Cordyceps* spp. e *S. insectorum* são fungos entomopatogênicos com alto potencial contra *T. peregrinus*, com destaque para *M. anisopliae*. Os isolados *Beauveria bassiana* (IBCB227), *M. anisopliae* (IBCB425) e *C. farinosa* (IBCB220) foram mais patogênicos nas temperaturas de 25 e 30 °C contra *T. peregrinus*. O manejo sustentável de *T. peregrinus* em florestas plantadas de eucalipto com fungos entomopatogênicos possibilita o desenvolvimento do controle microbiano para este inseto.

Referências

- Agrofit. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: Controle de insetos pragas. Agrofit, Brasília. 2018. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. (último acesso 12 abr 2018).
- Barbosa LR, Rodrigues AP, Soler LS, Fernandes BV, Castro BMCC, Wilcken CF, Zanuncio JC. 2017. Establishment in the field of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an exotic egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). Florida Entomologist 100: 372–374.
- Barbosa LR, Santos F, Buhner CB, Nichele LA, Wilcken CF, Soliman EP. 2016. Criação massal do percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus*: Carpinteiro and Dellapé, 2006 (Hemiptera, Thaumastocoridae). Embrapa, <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/145907/1/Criacao-massal-do-percevejo-bronzeado.pdf>. (último acesso 12 nov 2017).
- Barbosa LR, Santos F, Wilcken CF, Soliman EP. 2010. Registro de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) no estado do Paraná. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo 30(61): 75-77.
- Dal Pogetto MHFA, Wilcken CF, Christovam RS, Prado EP, Gimenes MJ. 2011. Effect of formulated entomopathogenic fungi on red gum lerp psyllid *Glycaspis brimblecombei*. Research Journal of Forestry 5(2): 99-106.

- Ekesi S, Maniania NK, Ampong-Nyarko K. 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science and Technology* 9: 177-185.
- Hallsworth JE, Magan N. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal Invertebrate Pathology* 74: 261-266.
- Imoulan A, Hussain M, Kirk PM, Meziane AE, Yao YJ. 2017. Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20: 4.
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 1-41.
- Lecuona RE, Rodriguez J, La Rossa FR. 2005. Effect of constant and cyclical temperatures on the mortality of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) treated with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes). *Neotropical Entomology* 34(4): 675-679.
- Li Z, Alves SB, Roberts DW, Fan M, Delalibera Jr I, Tang J, Lopes RB, Faria M, Rangel DEN. 2010. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology* 20(2): 117-136.
- Lima ACV, Dias TKR, Barbosa LR, Soliman EP, Sa LAN, Masson MV, Neves DA, Wilcken CF. 2010. Primeira ocorrência do percevejo-bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) no estado da Bahia *In* Anais do 23º Congresso Brasileiro de Entomologia. Natal, Brasil, 26 – 30 set 2010.
- Lima ELO, Batista-Filho A, Almeida JEM, Gassen MH, Wenzel IM, Almeida AMB, Zapellini LO. 2014. Liquid production of entomopathogenic fungi and ultravioleta radiation and temperature effects on produced propagules. *Arquivos do Instituto Biológico* 81(4): 342-350.
- Lorencetti GAT, Potrich M, Mazaro SM, Lozano ER, Barbosa LR, Menezes MJS, Gonçalves TE. 2018. Eficiência de *Beauveria bassiana* Vuill. e *Cordyceps* sp.

- para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Ciência Florestal* 28(1) 403-411.
- Martínez G, Bianchi M. 2010. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). *Agrociencia* 14: 15-18.
- Martínez G, González A, Dicke M. 2018. Rearing and releasing the egg parasitoid *Cleruchoides noackae*, a biological control agent for the Eucalyptus bronze bug. *Biological Control* 123: 97-104.
- Mascarin GM, Duarte VS, Brandão MM, Delalibera Jr I. 2012. Natural occurrence of *Zoopththora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) na invasive pest recently found in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 401-404.
- Moore D, Langewald J, Obognon F. 1997. Effects of rehydration on the conidial viability of *Metarhizium avoviride* mycopesticide formulations. *Biocontrol Science and Technology* 7: 87-94.
- Moura Mascarin G, Biaggioni Lopes R, Delalibera Jr I, Kort Kamp EF, Luz C, Faria M. 2018. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* S0022-2011(17): 30365-30368.
- Nadel R, Slippers B, Scholes M, Lawson S, Noack A, Wilcken C, Bouvet J, Wingfield M. 2010. DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. *Biological Invasions*. 12(5): 1067-1077.
- Nelder JA, Wedderburn RW. 1972. Generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society Series A*, 135 (3): 370–384.
- Noack AE, Rose HA. 2007. Life-history of *Thaumastocoris peregrinus* and *Thaumastocoris* sp. in the laboratory with some observations on behaviour. *General and Applied Entomology*, 36: 27-34.
- Orduño-Cruz N, Guzmán-Franco AW, Rodríguez-Leyva E, Alatorre-Rosas R, González-Hernández H, Mora-Aguilera G. 2015. In vivo selection of entomopathogenic fungal isolates for control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), *Biological Control* 90: 1-5.
- Pereira JM, Melo APC, Fernandes PM, Soliman EP. 2013. Ocorrência de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera:

- Thaumastocoridae) no Estado de Goiás. *Ciência Rural*: Santa Maria 43(2): 254-257.
- Ribeiro GT, Sá JS, Rolim GS, Correia-Oliveira ME, Mendonça MC, Poderoso JCM. 2015. First report *Thaumastocoris peregrinus* in Eucalyptus plantations in the state of Sergipe, Brazil (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Entomologica Americana* 121(1-4): 23-26.
- Savaris M, Lampert S, Pereira PRVS, Salvadori JR. 2011. Primeiro registro de *Thaumastocoris peregrinus* para o estado de Santa Catarina, e novas áreas de ocorrência para o Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria 41(11): 1874-1876.
- Soliman EP, Wilcken CF, Pereira JM, Dias TKR, Zaché B, Dal Pogetto MHFA, Barbosa LR. 2012. Biology of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) in different eucalyptus species and hybrids. *Phytoparasitica* 40: 223-230.
- Souza GK, Pikart TG, Pikart FC, Serrão JE, Wilcken CF, Zanuncio JC. 2012. First Record of a Native Heteropteran Preying on the Introduced Eucalyptus Pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Brazil. *Florida Entomologist* 95(2): 517-520.
- Sung GH, Poinar GO, Spatafora JW. 2008. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal–arthropod symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 495-502.
- Tumuhaise V, Ekesi S, Maniania NK, Tonnang HEZ, Tanga CM, Ndegwa PN, Irungu LW, Srinivasan R, Mohamed SA. 2018. Temperature-dependent growth and virulence, and mass production potential of two candidate isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin for managing *Maruca vitrata* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) on cowpea. *African Entomology* 26(1): 73-83.
- Veen KH. 1968. Recherches sur la maladie due a` *Metarrhizium anisopliae* chez le criquet pe`lerin. Mededelingen Landbouwhogeschool. Wageningen 68(5): 1-77.
- Westfall PH, Tobias RD, Rom D, Wolfinger RD, Hochberg Y. 1999. Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System, SAS Institute Inc, Carolina do Norte, EUA.

- Wilcken CF, Soliman EP, Sá LAN, Barbosa LR, Dias TKR, Ferreira-Filho PJ, Oliveira RJR. 2010. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on Eucalyptus in Brazil and its distribution. *Journal of Plant Protection Research* 50(2): 201-206.
- Wilcken CF, Oliveira NC. 2015. Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* Marelli, pp. 779-791 *In* Villela EF, Zucchi RA [eds] *Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros*, 1ª edição, Fealq, Piracicaba, Brasil.
- Zhang N, Castlebury LA, Miller AN, Huhndorf SM, Schoch CL, Seifert KA, Sung GH. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98: 1076-1087.
- Zimmermann G. 2007a. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 879-920.
- Zimmermann G. 2007b. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 553-596
- Zimmermann G. 2008. The entomopathogenic fungi *Cordyceps farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Cordyceps fumosorosea* species complex (formerly known as *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and its use in biological control. *Biocontrol Science and Technology* 18: 865-901.

Tabela 1. Código dos isolados (Cód. Isolado), espécies, hospedeiros, ordens do hospedeiro (Ord.): Lepidoptera (Lep.), Coleoptera (Col.) e Hemiptera (Hem.) e regiões geográficas dos fungos entomopatogênicos dos gêneros *Beauveria bassiana* (Bb), *Metarhizium anisopliae* (Ma), *Cordyceps* sp.(Isa.), *Cordyceps farinosa* (Ifa), *Cordyceps fumosorosea* (Ifu) e *Sporothrix insectorum* (Si) utilizados

Cód. Isolado	Espécies	Hospedeiros	Ord.	Região geográfica
IBCB227	Bb	<i>Spod. frugiperda</i>	Lep.	São Paulo, Brasil
IBCB226	Bb	<i>B. gasipae</i>	-	
IBCB66	Bb	<i>Hyp. hampei</i>	Col.	
IBCB617	Bb	<i>Myzus persicae</i>	Hem.	
IBCB532	Bb	Lagarta	Lep.	
IBCB425	Ma	Solo	-	
IBCB348	Ma	<i>Mah. fimbriolata</i>	Hem.	
IBCB375	Isa	Cigarrinha	Hem.	
IBCB220	Ifa	Solo	-	
IBCB638	Ifu	<i>Bemisia tabaci</i>	Hem.	
IBCB79	Si	<i>Leptopharsa hevea</i>	Hem.	

Spod.= *Spodoptera*, *Hyp.*= *Hypothenemus*, *Mah.*= *Mahanarva*.

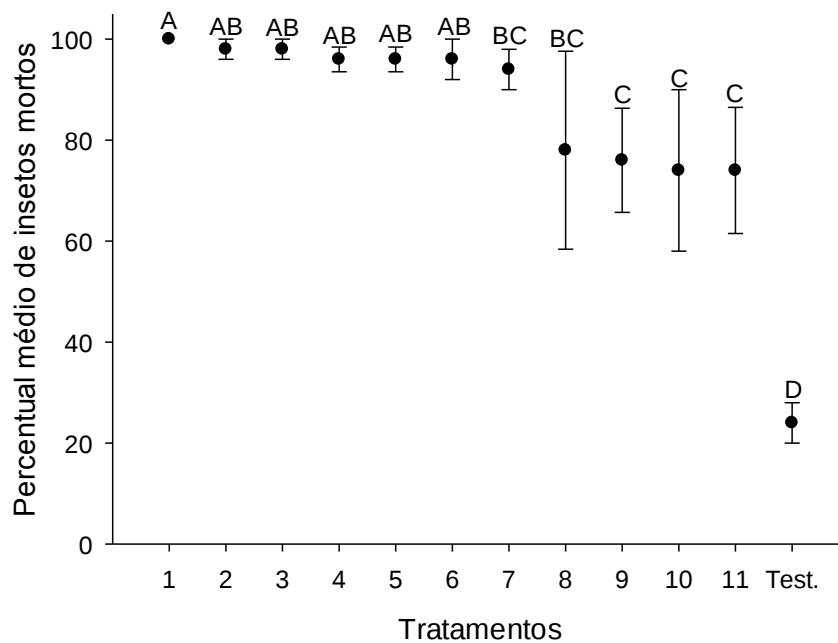


Figura 1. Percentual médio de adultos mortos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) por fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*: IBCB425 (1) e IBCB348 (2); *Beauveria bassiana*: IBCB532 (3); IBCB66 (6); IBCB227 (7); IBCB226 (8); IBCB617 (10); *Cordyceps farinosa*: IBCB220 (4); *Cordyceps fumusorosea* IBCB638 (5); *Cordyceps* sp. IBCB375 (9); *Sporothrix insectorum* IBCB79 (11) e Testemunha (Test.). Barras no gráfico indicam o erro padrão; letra maiúscula indica diferença significativa entre os tratamentos.

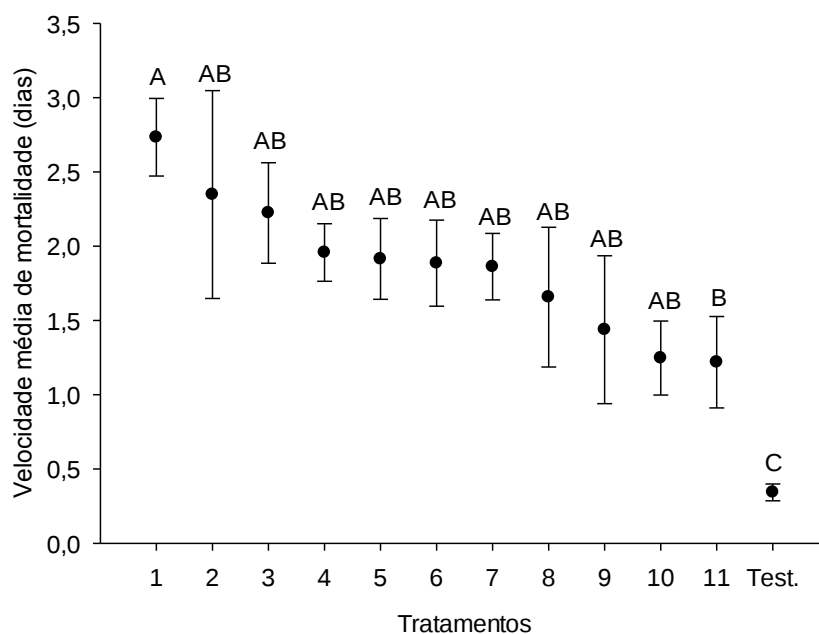


Figura 2. Velocidade de mortalidade (tempo médio/dias) de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) por fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*: IBCB425 (1) e IBCB348 (3); *Beauveria bassiana*: IBCB532 (4); IBCB66 (7); IBCB227 (6); IBCB226 (8); IBCB617 (11); *Cordyceps farinosa*: IBCB220 (2); *Cordyceps fumusorosea* IBCB638 (5); *Cordyceps* sp. IBCB375 (10); *Sporothrix insectorum* IBCB79 (9); Testemunha (Test.). Barras no gráfico indicam o erro padrão; letra maiúscula indica diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 2. Mortalidade de adultos (%) de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) por fungos entomopatogênicos sob diferentes temperaturas

Isolados	Temperatura (°C)		
	20 ^a	25 ^a	30 ^a
IBCB227	94±0,245 Ab	96±0,025 Aa	100±0,000 Aa
IBCB425	98±0,020 Aa	94±0,040 Bb	100±0,000 Aa
IBCB220	66±0,081 Ab	90±0,055 Ca	94±0,040 Ba
Testemunha	12±0,058 Ba	18±0,037 Da	20±0,071 Ca

^aMédias seguidas de mesma letra maiúscula, por coluna, ou minúscula, por linha, não diferem pelo teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) em nível de 5% de significância.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* E *Beauveria bassiana* EM ESCALA LABORATORIAL UTILIZANDO BIORREATOR PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Revista: Biocontrol Science and Technology

Resumo

A produção de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* por fermentação em estado sólido obtém conídios aéreos, que são relativamente resistentes às condições adversas e capazes de infectar uma grande variedade de insetos. O objetivo deste estudo foi investigar e selecionar as condições ótimas (temperatura e substrato) para produção dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* (IBCB425) e *B. bassiana* (IBCB227) por fermentação em estado sólido em um novo biorreator de laboratório com base no sistema tecnológico Prophyta®, permitindo a transferência dos resultados para a escala da indústria. Temperaturas acima de 37 °C causam a inativação dos isolados IBCB425 e IBCB227, sendo a condição ideal de 20 a 30 °C e de 15 a 30 °C, respectivamente. O biorreator JKI-Solid Fermenter System foi mais eficaz na produção de IBCB425 utilizando os substratos arroz e arroz + cevada (5:1) a 25 °C com um rendimento máximo de aproximadamente $6,0 \times 10^9$ conídios/g de massa seca. Arroz + cevada (5:1) e cevada gerou um rendimento de aproximadamente $1,0 \times 10^9$ conídios/g de massa seca para IBCB227. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho colaboram com o estudo de produção de biopesticidas, uma vez que antes de se produzir qualquer microrganismo é importante que sejam determinadas as condições ideais para desenvolvimento desse microrganismo a fim de se obter um produto final de qualidade comprovada.

Palavras-chave: biotecnologia, bioprocessos, fermentação em estado sólido, rendimento de conídios, biopesticidas, temperatura ideal

Abstract

The production of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation yields aerial conidia, which are relatively resistant to adverse conditions and capable of infecting a wide variety of insects. The objective of this study was to investigate and select the optimum conditions (temperature and substrate) for the production of the entomopathogenic fungi *M. anisopliae* (IBCB425) and *B. bassiana* (IBCB227) by solid state fermentation in a new laboratory bioreactor based on the technological system Prophyta®, allowing the transfer of results to the industry scale. Temperatures above 37 °C cause inactivation of isolates IBCB425 and IBCB227, the ideal condition being 20-30 °C and 15-30 °C, respectively. The JKI-Solid Fermenter System bioreactor was most effective in the production of IBCB425 using the rice and rice + barley (5:1) substrates at 25 °C with a maximum yield of approximately 6.0×10^9 conidia/g dry weight. Rice + barley (5: 1) and barley yielded a yield of approximately 1.0×10^9 conidia/g dry mass for IBCB227. Therefore, the results obtained in this work contribute to the study of the production of biopesticides,

because before any microorganism is produced it is important to determine the ideal conditions for the development of this microorganism in order to obtain a final product of proven quality.

Key-words: biotechnology, bioprocesses, solid state fermentation, yield of conidia, biopesticides, ideal temperature

2.1 Introdução

As áreas que utilizam o manejo integrado de pragas têm aumentado, consequentemente, o uso de biopesticidas está crescendo mundialmente exigindo otimizações nos sistemas de produção para obtenção de grandes quantidades de microrganismos entomopatogênicos (Faria & Wraight, 2007; Jaronski & Jackson, 2012; Muñiz-Paredes, Miranda-Hernández, Loera, 2017). Os fungos *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) e *Beauveria bassiana* sensu lato (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) são importantes exemplos desses microrganismos, amplamente utilizados no controle de pragas na agricultura, sendo principalmente produzidos por fermentação em estado sólido (FES) em muitos países (Zimmerman, 2007a, 2007b; Li et al., 2010).

A FES é um sistema que permite o crescimento de microrganismos em partículas sólidas e úmidas, onde entre as partículas é possível encontrar uma fase gasosa contínua com um mínimo de água visível (Mitchell, Berovič & Krieger, 2006). Esta tecnologia tem sido considerada como uma alternativa atraente para a produção de fungos de muitas espécies no lugar da fermentação submersa (FSm). Isto, devido às melhorias recentes e aplicações específicas em projetos de biorreatores onde o uso desse sistema de pequena a grandes produções de microrganismos foi facilitado (Couto & Sanromán, 2006). Existem diferentes tipos de biorreatores que podem ser divididos com base nas estratégias de aeração e agitação, tais como biorreatores de bandeja, biorreatores de leito fixo, biorreatores de tambor rotativo e biorreatores de mistura contínua ou de mistura intermitentemente com aeração forçada (Mitchell et al., 2006).

A produção de conídios aéreos por FES é uma maneira eficaz de abordar o processo natural de infecção por insetos, no entanto, este processo é marcado como um método primário em muitos países produtores onde as técnicas não foram melhoradas (Jaronski & Jackson, 2012). Conídios podem ser produzidos em vários

substratos naturais, tais como, derivados de arroz, cevada, sorgo, milho, trigo, além de outros produtos como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca de café, residual de batatas, dentre outros (Boas, Andrade & Oliveira, 1996; Dalla-Santa et al., 2004, 2005; Sahayaraj & Namasivayam, 2008; Prakash, Padmaya & Kiran, 2008; Mascarin, Alves & Lopes, 2010; Nuñez-Gaona, Saucedo-Castañeda, Alatorre & Loera, 2010; Muñiz-Paredes, Garza-López, Viniegra-González, Loera & 2016; Xie, Han, Kim & Lee, 2016, Muñiz-Paredes, Miranda-Hernández & Loera, 2017). O conídio é a base para muitos programas de formulação de micopesticidas, portanto, é muito importante a seleção de substratos e condições em que estes organismos irão crescer, visando o alto rendimento e qualidade em FES (Muñiz-paredes et al., 2017). Porém, países em desenvolvimento têm os procedimentos de produção em massa realizados com equipamentos simples, usando muitas etapas manuais que tornam a produção de fungos excessivamente trabalhosa (Li et al., 2010).

Os fungos entomopatogênicos precisam de condições ótimas de nutrientes, pH, temperatura, atividade de água e oxigênio, no entanto, em países como o Brasil, esses microrganismos são geralmente produzidos em sacos plásticos autoclaváveis ou colocados em bandejas sem controle rigoroso dos parâmetros (Alves & Pereira, 1989; Mitchell et al., 2006; Li et al., 2010; Mascarin et al., 2018). O objetivo deste trabalho foi investigar e selecionar as condições ótimas (temperatura e substrato) para produção dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* (IBCB425) e *B. bassiana* (IBCB227) por fermentação em estado sólido. Além disso, foi proposto um novo biorreator de laboratório com base no sistema tecnológico Prophyta®, permitindo a transferência dos resultados para a escala da indústria. Ou seja, para otimizar o uso de FES minimizando os custos de compra de um biorreator e para suprir a produção em pequena escala do laboratório, visou-se desenvolver o “JKI-Solid Fermenter System” (JKI-SFs), para FES com temperatura controlada, aeração e fornecimento de umidade.

2.2 Material e Métodos

Local e material biológico

Metarhizium anisopliae sensu lato (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) foi obtido de amostras de solo da Mata Atlântica no município de Iporanga, Estado de São Paulo, Brasil, e *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) (IBCB227) foi obtido de larvas de

Spodoptera frugiperda Smith, 1979 (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas no município de Casa Branca, São Paulo, Brasil. Ambos os isolados foram depositados na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal em Campinas, São Paulo, Brasil e foram utilizados para os experimentos. Os conídios puros do fungo foram mantidos a -80 ° C para preservação. Além disso, foi mantido a -20 °C em glicerol a 10% e a 6 ° C em tubos contendo meio de cultura malte, peptona de soja e ágar - MPA (extrato de malte 30 g L [Merck KGaA, Alemanha], peptona de soja 5 g L [Merck KGaA, Alemanha], Agar 18 g L Roth, Alemanha]) para fornecer material para os experimentos. O inóculo inicial foi obtido pela propagação do fungo em placas de Petri contendo o meio de cultura MPA. O inóculo cresceu a 25 ± 1 °C em escotofase total. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, Instituto de Controle Biológico, Instituto Julius Kühn, Darmstadt, Alemanha.

Bioensaios em placas de Petri

Caracterização da estrutura infectante produzida em estado sólido

Conídios dos isolados IBCB425 e IBCB227 foram colhidos através da raspagem superficial com auxílio de alça Drigalski do meio de cultura para a retirada da colônia do fungo, crescida em 14 dias em meio MPA, para ambos os isolados. Posteriormente, o material foi suspenso em Tween 80® [Sigma, Alemanha] (0,1%) e os conídios foram calibrados para concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL. Em seguida, 100 µL de suspensão de conídios foram distribuídos com auxílio de uma alça Drigalski em uma placa de meio MPA fresca (90-15mm) e estas foram mantidas em 25 °C em incubadora B.O.D por 14 dias em condições escuras. Posteriormente, para avaliação, 10 mL de Tween 80® (0,1%) foram adicionados em cada repetição, então, estas foram cuidadosamente submetidas ao vortex e então 100 µL de suspensão de conídios foram colocados sobre uma lâmina de vidro que recebeu em seguida uma lamínula sobre a suspensão fúngica. As lâminas frescas foram analisadas imediatamente através das imagens dos conídios que foram capturadas com o auxílio de um microscópio óptico [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha] acoplado a uma câmera Olympus e Software Olympus CellP. As análises foram compostas por medições dos conídios e descrição morfológica dos mesmos. Este

teste foi realizado 3 vezes nas mesmas condições com diferentes lotes do fungo e em momentos diferentes.

Crescimento radial sob diferentes regimes de temperatura

O crescimento radial dos isolados IBCB425 e IBCB227 a diferentes temperaturas foi determinado por inoculação do fungo no meio de cultura MPA em placas de Petri (90-15 mm). Utilizou-se um disco de ágar circular de 5 mm de diâmetro, cortado usando um furador, a partir da cultura do fungo com 4 dias de idade (pré-cultura). A pré-cultura foi previamente inoculada com 100 µL de conídios suspensos em Tween 80® (0,1%) calibrados para concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL que foi distribuída com auxílio de uma alça Drigalski em uma placa de meio de cultura MPA. As placas de Petri foram armazenadas a 15, 20, 25, 30 e 37 °C em incubadoras B.O.D. sob condições escuras. Posteriormente, cada repetição foi medida com régua milimétrica a partir do terceiro dia e até 21 dias, a medição foi feita ao longo do mesmo eixo em cada avaliação. Cada tratamento (temperatura) teve cinco repetições (placa de Petri) e este ensaio foi realizado 3 vezes nas mesmas condições com diferentes lotes do fungo e em momentos diferentes.

Esporulação sob diferentes regimes de temperatura

Para avaliar a capacidade de produção de esporos os conídios dos isolados IBCB425 e IBCB227 foram colhidos com uma alça Drigalski de uma pré-cultura de 14 dias crescida em meio MPA, para ambos os isolados. Posteriormente, os conídios foram suspensos em Tween 80® (0,1%) e foram calibrados para concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL. Posteriormente, 100 µL de suspensão de conídios foram distribuídos com auxílio de uma alça Drigalski em uma placa de meio MPA fresca (90-15mm) e estas foram mantidas em diferentes temperaturas 15, 20, 25, 30 e 37 °C em incubadora B.O.D por 14 dias em condições escuras. Posteriormente, 10 µL de Tween 80® (0,1%) foram adicionados em cada repetição, então, estas foram cuidadosamente submetidas ao vortex e os conídios foram contados em hemocitômetro (Thoma) com auxílio de um microscópio óptico. Os tratamentos foram compostos por 5 temperaturas e três repetições (placas de Petri). Este teste foi realizado 3 vezes nas mesmas condições com diferentes lotes do fungo e em momentos diferentes.

Bioensaios em biorreator

Obtenção do inóculo

Preparou-se uma pré-cultura fúngica utilizando o meio líquido Samsinakova adaptado (Glucose 25,0 g L [Merck KGaA, Alemanha], 20,0 g L “corn steep solid” [Sigma, Alemanha], 15,0 g L de cloreto de sódio [Merck KGaA, Alemanha]. Frascos Erlenmeyer de 100 mL foram preenchidos com volume de 50 mL do meio de cultura com auxílio de um dosador, em seguida o material foi esterilizado a 121 °C, durante 20 minutos em autoclave [Tuttnauer autoclave 5075EL - esterilizador a vapor, Holanda]. Em seguida, para a inoculação de cada repetição (frasco Erlenmeyer) utilizou-se 1 mL de uma suspensão do isolado IBCB425 e IBCB227 de culturas de 14 dias de idade, crescidas em meio de cultura MPA na concentração $1,0 \times 10^7$ conídios/mL, previamente contados em hemocitômetro (Thoma) com auxílio de um microscópio óptico. Posteriormente, os frascos Erlenmeyers foram colocados em uma incubadora tipo shaker [Multitron, Infors HT, Suíça] a 25 °C, 150 rpm para crescimento de fungos durante 72 horas.

Avaliação de um novo biorreator para produção e seleção de substrato em escala laboratorial visando a produção industrial

O “JKI-Fermenter System” (JKI-SFs) consistia em frascos de boca larga Schott Duran (1000 mL) com duas conexões fixas na parte inferior, uma para drenagem e outra para aeração que era acoplada a um sistema de filtragem para evitar possíveis contaminação durante o processo de fermentação. Além disso, as unidades de fermentação contavam com uma saída de exaustão na tampa dos frascos. O biorreator foi construído dentro de uma incubadora B.O.D. para controle de temperatura. Um sistema de aeração forçada (ar úmido) foi instalado na incubadora B.O.D. e este foi conectado ao JKI-SFs. O ar foi submetido à passagem em um recipiente contendo água deionizada para se tornar úmido antes que alimentasse o fermentador. Todas as conexões eram acopladas a filtros estéreis para evitar contaminações dentro do biorreator (Figura 1 e 2).

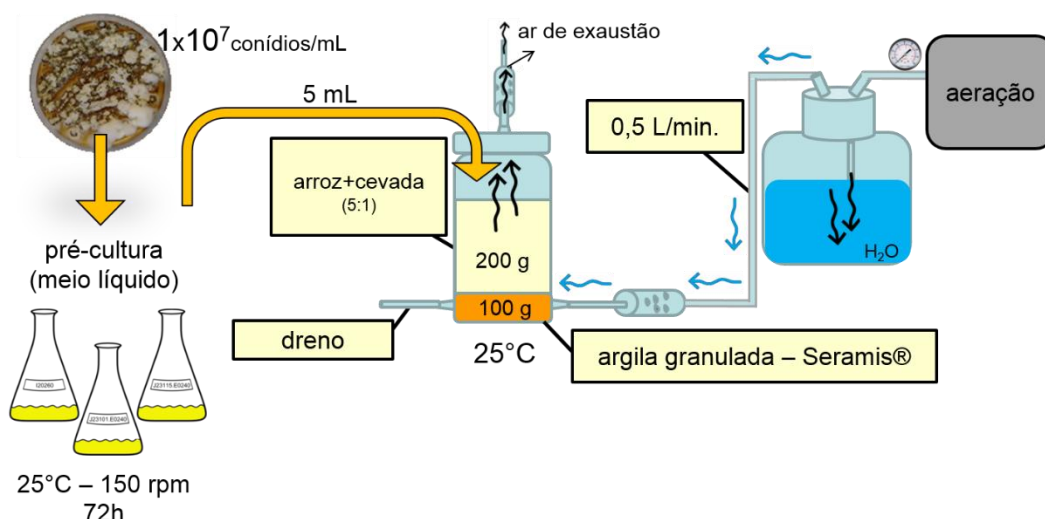


Figura 1. Metodologia para fermentação sólida de fungos entomopatogênicos utilizando o biorreator JKI-Solid Fermenter System em escala laboratorial



Figura 2. Biorreator JKI-Solid Fermenter System em operação

Diferentes composições de matriz para a produção de conídios

As unidades do JKI-SFs foram preenchidas com quatro diferentes materiais que compuseram os tratamentos para a produção de fungos (Tabela 2). Para isso, 100 g de argila granulada Seramis® foram colocados no fundo dos frascos para todos os tratamentos, e este foi separado a partir da camada de matriz por um papel de filtro (Ø 85 milímetros). A camada matriz foi formada por 200 g de substrato para cada tratamento (fervido por 5 min em 500 mL de água deionizada, com exceção da soja que foi fervida por 8 minutos). Os fermentadores inteiros foram subsequentemente autoclavados durante 20 min a 121 ° C.

Cada fermentador foi preenchido com água deionizada esterilizada, onde todo o substrato foi coberto com água para inoculação. Em seguida, 5 mL da pré-cultura de 72 horas foram pipetados sobre a água estéril que preenchia o biorreator. Após isso, agitando ligeiramente o frasco, a biomassa foi suspensa e a água descarregada lentamente pelo tubo de drenagem, enquanto a biomassa cobria a superfície do substrato e a inoculação era completada. Após 14 dias de fermentação a 25 ° C e taxa de aeração de 0,5 L * min⁻¹, os fermentadores foram colhidos. Posteriormente, 25 g do substrato foram lavados com 225 mL de Tween 80® (0,1%) para designar os conídios formados por g de massa seca. A suspensão foi agitada durante 10 min num agitador recíproco para individualizar os conídios. Em seguida, a concentração de conídios foi atribuída por hemocitômetro (Thoma) com auxílio de microscópio óptico. Com essa informação, a concentração de conídios foi relacionada à matéria seca como uma quantidade comparável. Cada tratamento consistiu em 1 repetição, por motivo de espaço limitado, mas este teste foi realizado 5 vezes nas mesmas condições com diferentes lotes do fungo e em momentos diferentes.

Tabela 1. Substratos para a produção de fungos por fermentação em estado sólido

Substrato	Quantidade (g)
Arroz parboilizado	200
Soja	200
Cevada	200
Arroz parboilizado ^a + Cevada ^b , 4:1	160 ^a + 40 ^b

Análise estatística

Para o crescimento em diâmetro, foi ajustado um modelo linear generalizado, com distribuição gama e função logarítmica (Nelder e Wedderburn, 1972), considerando a temperatura e os isolados como fatores e como covariável o bloco. Foi também estudado o efeito das temperaturas no crescimento radial, ajustando-se um modelo linear generalizado com distribuição gama e função de ligação logarítmica. Um modelo linear generalizado, com distribuição binomial negativa e função de ligação logarítmica para a produção de esporos considerando a temperatura como um fator, foi ajustado. Na análise estatística da contagem de esporos por grama, ajustou-se um modelo linear generalizado, com distribuição gama e função de ligação

logarítmica, considerando, os isolados e o substrato como fatores. Para todos os modelos, o *goodness-of-fit* foi avaliado pela análise de desvio. Os tratamentos foram comparados usando o Teste de Tukey-Kramer (Westfall et al., 1999) do procedimento de genmod em SAS Software - Software Livre Estatístico Estatístico, SAS University Edition, 2018.

2.3 Resultados

Caracterização da estrutura infectante produzida em estado sólido

Os conídios de *B. bassiana* (IBCB227) e *M. anisopliae* (IBCB425) tiveram dimensões médias de $2,98 \pm 0,03 \mu\text{m}$ de comprimento e $3,07 \pm 0,03 \mu\text{m}$ de largura, e $6,49 \pm 0,04 \mu\text{m}$ de comprimento e $2,61 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de largura, respectivamente. Os conídios de *B. bassiana* (IBCB227) apresentaram um formato circular e os conídios de *M. anisopliae* um formato cilíndrico (Figura 3).

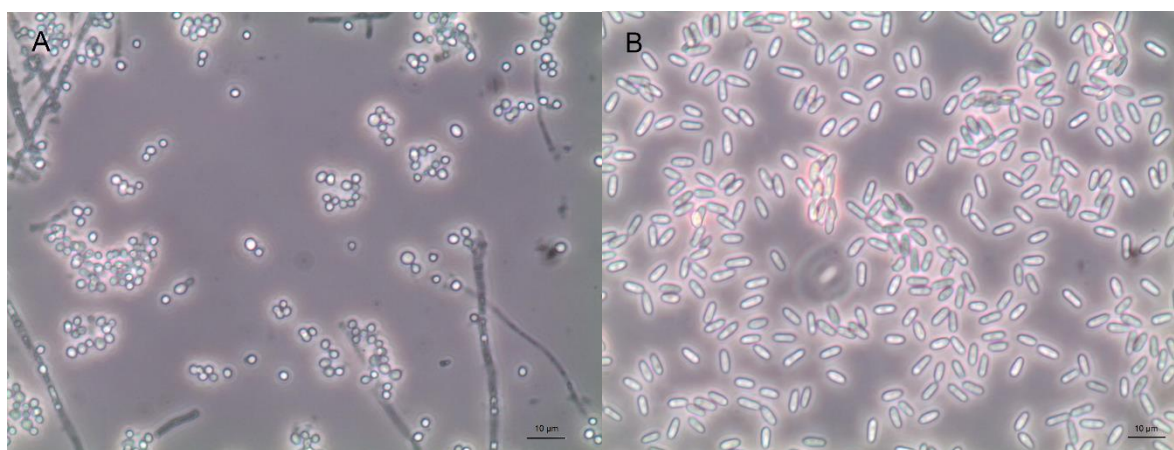


Figura 3. Conídios de *Beauveria bassiana* (IBCB227) (A) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) (B) produzidos em meio sólido MPA

Crescimento radial e esporulação sob diferentes regimes de temperatura

Metarhizium anisopliae (IBCB425) e *B. bassiana* (IBCB227) apresentaram crescimento radial em todas as temperaturas testadas, com exceção de 37 °C. Temperaturas de 25 e 30 °C podem ser consideradas ótimas para *M. anisopliae* (IBCB425), sem diferença significativa entre elas, entretanto, apenas a temperatura de 25 °C é a mais adequada para *B. bassiana* (IBCB227). *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) possui um maior crescimento radial nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, enquanto que *B. bassiana* (IBCB227) apresenta um melhor crescimento radial na menor temperatura, havendo diferença significativa entre os isolados (Tabela 3).

Metarhizium anisopliae (IBCB425) teve sua faixa ótima de esporulação a 20, 25 e 30 °C, e *B. bassiana* (IBCB227) apresentou esporulação em 15, 20, 25 e 30 °C, não apresentando diferença significativa. De maneira geral, houve uma maior esporulação, com diferença significativa, para *B. bassiana* (IBCB227) em todas as temperaturas, exceto a 20 °C, onde *M. anisopliae* (IBCB425) apresentou esporulação semelhante estatisticamente. Não ocorreu esporulação a 37 °C para ambos os isolados.

Tabela 3. Diâmetro médio (cm) do crescimento radial de *Beauveria bassiana* (IBCB227) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) sob diferentes regimes de temperatura

Temperatura (°C)	Isolado	
	IBCB227	IBCB425
15	1,19 ± 0,04 Da	0,98 ± 0,03 Cb
20	1,80 ± 0,04 Cb	2,27 ± 0,07 Ba
25	2,68 ± 0,06 Ab	3,34 ± 0,09 Aa
30	2,43 ± 0,05 Bb	3,27 ± 0,09 Aa

Médias das proporções seguidas de mesma letra maiúscula na coluna ou mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância.

Tabela 4. Esporulação (conídios/mL) de *Beauveria bassiana* (IBCB227) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) sob diferentes regimes de temperatura

Temperatura (°C)	Isolado	
	IBCB227	IBCB425
15	5,65 x 10 ⁸ ± 3,96 x 10 ⁷ Aa	2,33 x 10 ⁶ ± 4,64 x 10 ⁵ Bb
20	4,33 x 10 ⁸ ± 1,88 x 10 ⁷ Aa	3,39 x 10 ⁸ ± 2,77 x 10 ⁷ Aa
25	4,62 x 10 ⁸ ± 3,25 x 10 ⁷ Aa	2,73 x 10 ⁸ ± 2,76 x 10 ⁷ Ab
30	4,46 x 10 ⁸ ± 6,59 x 10 ⁷ Aa	2,64 x 10 ⁸ ± 2,82 x 10 ⁷ Ab

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna ou mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância.

Avaliação de um novo biorreator para produção e seleção de substrato em escala laboratorial visando a produção industrial

Os fungos produziram conídios nos substratos testados (Figura 4). O maior rendimento alcançado foi de aproximadamente 6,0 x 10⁹ conídios/g de massa seca

para *M. anisopliae* (IBCB425), e $1,0 \times 10^9$ conídios/g de massa seca para *B. bassiana* (IBCB227) utilizando o JKI-SFs. Não foram observados a presença de contaminantes para todos os processos fermentativos. O arroz e a combinação de arroz e cevada (5:1) apresentaram-se como melhor substrato ($P>0,05$) para produção de *M. anisopliae* (IBCB425) com $P=1,00$ do que quando comparados com soja com $P=0,0011$ e $P=0,0007$, respectivamente, e cevada com $P=0,04$ e $P=0,03$, respectivamente. Entretanto, foi possível notar uma diferença na manipulação do material para a colheita de *M. anisopliae* (IBCB425) mesmo não havendo diferença significativa entre a produção em arroz e a combinação de arroz e cevada (5:1). O material era facilmente manipulável quando o arroz estava em combinação com a cevada, e o tratamento arroz ficou fortemente agrupado, como um bloco, no final da fermentação. A produção foi melhor em cevada, combinação arroz e cevada (5:1) e arroz para *B. bassiana* (IBCB227), sem diferenças significativas. *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) foi o que apresentou um maior rendimento de conídios/g de massa seca em todos os substratos na comparação dos isolados, exceto em soja, que não houve diferença significativa com a produção de *B. bassiana* (IBCB227). Entretanto, esse foi o menor rendimento registrado para *M. anisopliae* (IBCB425) (Tabela 5).

Dados do teor de água não apresentaram interação com os dados de produção na análise estatística, e por isso não foram incluídos nos testes (Tabela 6). Os resultados contribuíram para eleger um isolado e um substrato para produção em média escala para futuras pesquisas.

Tabela 5. Produção (conídios/g de massa seca de substrato+fungo) de *Beauveria bassiana* (IBCB227) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) em diferentes substratos utilizando o biorreator JKI-Solid Fermenter System

Substrato	Isolado	
	IBCB227	IBCB425
arroz	$3,67 \times 10^8 \pm 6,69 \times 10^7$ Ab	$5,57 \times 10^9 \pm 1,57 \times 10^9$ Aa
arroz + cevada (5:1)	$8,88 \times 10^8 \pm 3,45 \times 10^8$ Ab	$5,84 \times 10^9 \pm 1,39 \times 10^9$ Aa
cevada	$1,08 \times 10^9 \pm 2,29 \times 10^8$ Aa	$1,43 \times 10^9 \pm 1,28 \times 10^8$ Ba
soja	$2,12 \times 10^8 \pm 6,54 \times 10^7$ Bb	$9,16 \times 10^8 \pm 2,44 \times 10^8$ Ba

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna ou mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância.



Figura 4. Produção de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em arroz parboilizado (a,e); soja (b,f); cevada (c,g) e arroz parboilizado e cevada (5:1) (d,h)

Tabela 6. Teor de água (%) após 14 dias de fermentação em estado sólido de *Beauveria bassiana* (IBCB227) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) utilizando o biorreator JKI-Solid Fermenter System

Substrato	Isolado	
	IBCB227	IBCB425
arroz	67,344 ± 3,09	48,33 ± 1,95
arroz + cevada (5:1)	63,11 ± 2,16	51,57 ± 1,74
cevada	66,81 ± 2,17	59,69 ± 1,72
soja	36,482 ± 1,94	31,83 ± 2,92

2.4 Discussão

Os conídios de *M. anisopliae* (IBCB425) e *B. bassiana* (IBCB227) apresentam um tamanho médio de acordo com as dimensões médias de fungos das espécies *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *B. bassiana*. Pois foi aceito que duas variedades de *M. anisopliae* são distinguidas de acordo com o comprimento dos conídios, onde *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresenta colônias verdes com conídios cilíndricos de

aproximadamente 5-8 μm de comprimento e *M. anisopliae* var. *majus* apresenta colônias verde escuras com conídios de 10-16 μm de comprimento, aproximadamente (Tulloch, 1976; Driver, Milner & Trueman, 2000). Já os conídios de *B. bassiana*, são hialinos com um formato elipsoidal e provenientes geralmente de culturas brancas, estes medem de 2,5 a 4,5 μm de comprimento (Benham & Miranda, 1953; Zimmermann, 2007b).

A temperatura influencia no desenvolvimento de *M. anisopliae* (IBCB425) e *B. bassiana* (IBCB227), mas os valores ótimos estão entre 20 a 30°C, assim como *M. anisopliae* (V90) teve uma ampla gama de crescimento, com as faixas de temperatura de 5 a 40 °C, porém com temperatura ótima de 30 °C (Hallsworth & Megan, 1999). *Beauveria bassiana* também cresce em uma ampla faixa de temperatura, de 8 a 35 °C, porém com um limite térmico de 37 °C (Fargues et al., 1997). Isolados de *B. bassiana* coletados em diferentes regiões do hemisfério indicaram que isolados de latitudes mais altas eram mais tolerantes ao frio que os isolados de perto do Equador, mas não foi encontrada uma correlação semelhante para tolerância ao calor (Fernandes et al., 2008). Os isolados IBCB425 e IBCB227 são intolerantes a 37°C, pois nessa temperatura não apresentam desenvolvimento. Comportamento semelhante a este foi relatado para *M. anisopliae* var. *anisopliae* (FI1029), que não cresceu nessa mesma temperatura, mas teve como temperatura ótima 25 °C; entretanto, três isolados de *M. anisopliae* var. *acridum* (FI985, CG423 e CG 863) apresentaram crescimento médio em diâmetro de 1,7, 1,0 e 1,0 cm, respectivamente, a 37 °C após 14 dias de incubação (Magalhães et al., 2003). Geralmente, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresenta menor crescimento ou inativação fora do intervalo de 15 a 32 °C (Driver, Milner & Trueman, 2000). O crescimento de *M. anisopliae* a 37 °C ou mais pode ocorrer, entretanto, isso pode estar relacionado com cada isolado, pois esse fato foi evidenciado por isolados provenientes de gafanhotos, *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae) em Madagascar (Welling et al., 1994). A inibição do desenvolvimento também pode ocorrer para *B. bassiana*, onde o CYT5 foi considerado sensível às temperaturas de 37, 38, 39 e 40 °C, uma vez que a taxa média de germinação reduziu significativamente após 2h de exposição às altas temperaturas (Wang & Zheng, 2012). A germinação de conídios, o crescimento e a esporulação de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentaram redução a 15 e 35°C, onde a faixa de temperatura adequada foi entre 20 e 30 °C para todos os isolados (Tefera & Pringle,

2003), o que vai de encontro com o observado para a faixa de temperatura de esporulação de IBCB425. Entretanto, a faixa de esporulação adequada para IBCB227 não sofreu interferência a 15 °C. A termotolerância é uma das principais características intrínsecas para um fungo entomopatogênico ser promissor no controle biológico. Entretanto, o fato de os isolados IBCB425 e IBCB227 não crescerem e não esporularem a 37 °C faz desses microrganismos mais seguros para humanos, uma vez que várias espécies fúngicas perdem a capacidade de desenvolvimento acima da temperatura ambiente. Pois, foi visto que em mamíferos, que apresentam uma temperatura média de 36,7 °C, zonas térmicas podem proteger o organismo contra infecções fúngicas (Bergman & Casadevall, 2010). Portanto, a temperatura é um fator abiótico muito importante e deve ser estudado, pois esta restringe o uso de fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico de insetos (Fernandes, Rangel, Moraes, Bittencourt & Roberts, 2008).

Metarhizium anisopliae (IBCB425) e *B. bassiana* (IBCB227) são isolados potenciais para a produção em larga escala utilizando a FES, com destaque para o IBCB425 em arroz e arroz e cevada (5:1), neste caso específico. Porém, as espécies *M. anisopliae* e *B. bassiana* podem chegar a produzir quantidades superiores como $6,2 \times 10^{10}$ e $2,3 \times 10^9$ conídios/g de arroz, respectivamente, onde parâmetros como pH, umidade e tipo de arroz (parboilizado ou não) são otimizados (Jenkins, Heviefo, Langewald, Cherry & Lomer, 1998; Roberts & Leger, 2004; Prakash et al., 2008; Taylor, Edgington, Luke & Moore, 2013). Pode-se considerar que o isolado IBCB425 produz grandes quantidades de conídios em condições não otimizadas, pois, valores comuns de produção de *M. anisopliae* está em torno de $1,0 \times 10^9$ conídios/g (Alves & Pereira, 1989; Barra-Bucarei, Vergara & Cortes, 2016). Entretanto *B. bassiana* (IBCB227) apresentou um baixo desempenho na produção por FES em arroz, onde valores de $2,7 \times 10^9$ conídios/g de arroz são maiores que o rendimento conseguido para o isolado IBCB227, mas são próximos a esse valor quando produzido em cevada (Ye, Ying, Chen & Feng, 2006). Dessa forma, *M. anisopliae* (IBCB425) seguido por *B. bassiana* (IBCB227) forneceria quantidades suficientes de conídios para o desenvolvimento de biopesticidas. Os conídios aéreos, em geral, são as unidades preferidas para produção em larga escala e aplicação de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, além disso, também é marcado como o estágio mais prático e infeccioso dos fungos entomopatogênicos (Wraight & Carruthers, 1999; Jaronski & Jackson, 2012). A FES tem sido bastante utilizada na

obtenção de conídios aéreos para o desenvolvimento de biopesticidas, tendo como principal substrato o arroz (Pandey, Soccol & Mitchell, 2000; Jaronski & Jackson, 2012). O uso do biorreator JKI-SFs produziu quantidades comparáveis com valores já relatados, como demonstrados acima, e além disso esse equipamento exigiu menor mão de obra e não houve contaminação do material. Portanto, esse biorreator pode otimizar a produção de fungos, pois este método apresenta características seguras para a produção de estruturas infectivas em um ambiente estéril. A produção de fungos por meios sólidos em condições laboratoriais, como em placas de Petri, frascos de vidro tipo Erlenmeyer, garrafas, sacos plásticos, dentre outros, é uma prática comum. Porém, esses sistemas muitas vezes não podem servir de modelo para biorreatores de escala industrial pela falta de controle do sistema, além de requerem intensa mão de obra (Moore, Langewald & Obognon, 1997; Dorta, Ertola & Arcas, 1996; Li et al. 2010; Méndez-González, Loera-Corral, Saucedo-Castañeda, Favela-Torres, 2018). Problemas em relação à temperatura podem surgir em sistemas de produção de fungos em FES devido ao calor gerado pela atividade metabólica do microrganismo, e este calor pode acumular-se no sistema (Nigan, Pandey, 2009). O calor precisa ser retirado do sistema para evitar problemas de superaquecimento em FES, sendo crucial em sistemas de larga escala de produção, pois o aumento de temperatura pode perturbar o desenvolvimento do fungo (Khanahmadi, Roostaazad, Safekordi, Bozorgmehri & Mitchell, 2004; Khanahmadi, Roostaazad, Mitchell, Miranzadeh, Bozorgmehri & Safekordi, 2006). Uma solução para esse problema pode ser a instalação de um sistema de aeração, o qual está presente no JKI-SFs, ou um sistema de refrigeração (Castro, Castilho & Freire, 2015; Manan & Webb, 2017). O ar é soprado para fora do biorreator no sistema de aeração, com isso ocorre a saída do calor forçada, entretanto, deve-se investigar e controlar a taxa de fluxo de ar injetado para que não ocorra uma perda excessiva de umidade do substrato fermentado (Castro et al., 2015; Shojaosadati, Hamidi-Esfahani, Hejazi, Farahani & Rinzema, 2007). Os requisitos básicos para a produção em massa de fungos são condições ideais de nutrição, temperatura, umidade e trocas gasosas (O_2 e CO_2) (Jaronski & Jackson, 2012; Jaronski & Mascarín, 2017), com isso, para a produção em laboratório, e com finalidade de transferência para a indústria, deve ser utilizado um sistema que possua funções similares de um biorreator industrial, sendo isso proposto com o JK-SFs.

O teor médio umidade do substrato foi relativamente alto, chegando a 67,34%, ao final da fermentação sólida de IBCB425 e IBCB227. Estudos envolvendo o papel da água em processos fermentativos sólidos são de grande importância, uma vez que quanto maior o teor de água no substrato pode refletir diretamente de forma negativa na colheita de conídios (Gervais & Molin, 2003; Prakash et al., 2008). Diante disso, o teor ótimo de água para o arroz foi definido em 22,24%; 73,21% para cevada e 75,68% para sorgo (Prakash et al., 2008). Portanto, processos fermentativos que atinjam teor de umidade superiores aos valores ótimos devem passar por processos de secagem, visando a melhora na qualidade de colheita (Jaronski, 2014). Isso sugere que processos de secagem poderiam melhorar a qualidade dos isolados testados, visando o processo de desenvolvimento de biopesticidas. Os resultados gerados com o JKI-SFs podem servir de suporte para a escolha dos parâmetros visando uma maior escala de produção, pois resultados parecidos são encontrados para biorreatores de escala laboratorial e industrial, como o Prophyta®, mas, em muitos casos, essas tecnologias não chegam em vários locais e muitas vezes podem ser de alto custo (Lüth & Eiben, 2003; Eiben & Luth, 2006; Grajales et al., 2012). O JKI-SFs é um sistema consideravelmente fácil de ser implementado e fornece uma produção de fungos comparável à escala industrial. Com esse sistema será possível desenvolver testes prévios visando a otimização da produção de fungos entomopatogênicos, como a escolha de substratos, estudos de aeração e temperatura no sistema, dentre outros.

2.5 Conclusão

A temperatura é um fator abiótico que pode influenciar no crescimento radial e esporulação de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, sendo que temperaturas acima de 37 °C podem causar a inativação dos isolados IBCB425 e IBCB227. Portanto a condição ideal para os isolados IBCB425 e IBCB227 é de 20 a 30 °C e de 15 a 30 °C, respectivamente. Além disso, os substratos arroz, arroz e cevada (5:1) e cevada são bons para produzir grandes quantidades de ingrediente ativo (conídio), com destaque para o isolado IBCB425 produzido em arroz e arroz e cevada (5:1). Porém, é necessária a substituição de métodos antigos e sem controle das condições intrínsecas FES por métodos tecnológicos de biorreatores visando a segurança e qualidade do produto. Diante disso, antes de produzir qualquer isolado fúngico é

importante que sejam determinadas as condições ideais de desenvolvimento desse microrganismo a fim de se obter um produto final de qualidade comprovada.

Referências

- Alves, S. B. & Pereira, R. M. (1989). Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in plastic trays. *Ecosistema*, 14, 188-192.
- Barra-Bucarei, L., Vergara, P. & Cortes A. (2016). Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 in different substrates. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 76(4), 448-454.
- Bergman, A. & Casadevall, A. (2010). Mammalian endothermy optimally restricts fungi and metabolic costs. *mBio*, 1(5), 212.
- Boas, A. M. V., Andrade, R. M. & Oliveira, J. V. (1996). Diversification of culture media for production of entomopathogenic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 39, 123–128.
- Benham, R. W. & Miranda, J. L. (1953). The Genus *Beauveria*, Morphological and Taxonomical Studies of Several Species and of Two Strains Isolated from Wharf-Piling Borers. *Mycologia*, 45(5), 727-746. <https://www.jstor.org/stable/4547753>.
- Castro, A. M., Castilho, L. R. & Freire, D. M. G. (2015). Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. *Biochemical Engineering Journal*, 93, 303–308.
- Couto, S. R. & Sanromán, M. A. (2006). Application of Solid-State Fermentation to Food Industry a Review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302.
- Dalla Santa, H. S., Sousa, N. J., Brand, D., Dalla Santa, O. R., Pandey, A., Sobotka M., ... Soccol, C. R. (2004). Conidia production of *Beauveria* sp. by solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillars. *Folia Microbiologica*, 49, 418–422.
- Dalla Santa, H. S., Dalla Santa, O. R., Brand, D., Vandenberghe, L. P. D., Soccol, C. R. (2005). Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 51–60.
- Dorta, B., Ertola, R. J. & Arcas, J. Á. (1996). Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(6), 434–9.

- Driver, F., Milner, R. J. & Trueman, J. W. H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104, 134–150.
- Eiben, U. & Lüth, P. (2006) Development of Novel Fungal Biocontrol Agents. http://Orgprints.org/7717/1/short_paper_prophyta,14.03.2006.PDF.
- Faria, M. R. & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43, 237–256.
- Fargues, J., Goettel, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A. & Rougier, M. (1997). Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, 89, 383-392.
- Fernandes, E. K., Rangel, D. E., Moraes, A. M., Bittencourt, V. R. & Roberts, D. W. (2008). Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*, *Journal Invertebrate Pathology* 98(1), 69-78.
- Gervais, P. & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation *Biochemical Engineering Journal*, 13, (2-3), 85-101.
- Grajales, L. M., Xavier, N. M., Henrique, J. P. & Thoméo, J. C. (2012). Mixing and motion of rice particles in a rotating drum. *Powder Technology*, 222, 167-175.
- Jaronski, S. T. (2014). Mass production on entomopathogenic fungi: state of the art. In J. A. Morales-Ramos, M. G. Rojas & D. I. Shapiro-Ilan (eds), *Mass production of beneficial organisms* (pp. 357–415) Amsterdam: Elsevier Inc.
- Jaronski, S. T. & Jackson, M. A. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (2^a ed.) (pp. 255-284) New York, NY: Academic Press.
- Jaronski, S. T. & Mascarín, G. M. (2017). Mass Production of Fungal Entomopathogens. In L. A. Lacey (Ed), *Microbial Control of Insect and Mite Pests* (pp. 141–155), New York, NY: Elsevier Inc.
- Jenkins, N. E., Heviefó, G., Langewald, J., Cherry, A. J. & Lomer, C. J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*, 19, 21N–31N. <http://cabweb.org/PDF/BNI/Control/BNIRA38.PDF>.
- Khanahmadi, M., Roostaazad, R., Mitchell, D. A., Miranzadeh, M., Bozorgmehri, R. & Safekordi, A. (2006). Bed moisture estimation by monitoring of air stream

- temperature rise in packed-bed solid-state fermentation. *Chemical Engineering Science*, 61(17), 5654–5663.
- Khanahmadi, M., Roostaazad, R., Safekordi, A., Bozorgmehri, R. & Mitchell, D. A. (2004). Investigating the use of cooling surfaces in solid-state fermentation tray bioreactors: Modelling and experimentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(11), 1228–1242.
- Li, Z., Alves, S. B., Roberts, D. W., Fan, M., Delalibera Jr, I., Tang, J., ... Rangel D. E. N. (2010). Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 20(2), 117-136.
- Lüth, P. & Eiben, U. (2003). Solid-state fermenter and method for solid-state fermentation United States Prophyta Biologischer Pflanzenschutz GmbH (Malchow, DE) 6620614. <https://patentimages.storage.googleapis.com/33/5a/c5/332f2e9d923201/US6620614.pdf>. Acesso em: 15 fev 2018.
- Magalhães, B. P., Tigano, M. S., Martins, I., Frazão, H. & Ramirez, H. G. (2003) Characterization of a Peruvian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, a pathogen of grasshoppers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(12), 1469-1475.
- Manan, M. A. & Webb, C. (2017). Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 4(1), 511–532.
- Mascarin, G. M., Alves, S. B. & Lopes, R. B. (2010). Culture media selection for mass production of *Cordyceps fumosorosea* and *Cordyceps farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 753–761.
- Méndez-González, F., Loera-Corral, O., Saucedo-Castañeda, G. & Favela-Torres, E. (2018). Bioreactors for the Production of Biological Control Agents Produced by Solid-State Fermentation. In A. Pandey, C. Larroche & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation* (pp. 109-121), Amsterdã: Elsevier Inc.
- Mitchell, D. A., Berovic, M. & Krieger, N. (2006). Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview. In D. A. Mitchell, N. Krieger & M. Berovic (Eds), *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation* (pp. 1-12), Heidelberg: Springer.
- Moura Mascarin, G., Biaggioni Lopes, R., Delalibera Jr, I., Kort Kamp Fernandes, E., Luz, C. & Faria M. (2018). Current status and perspectives of fungal

- entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal Invertebrate Pathology*, S0022-2011(17), 30365-30368.
- Muñiz-Paredes, F., Garza-López, P. M., Viniegra-González, G. & Loera, O. (2016) Comparison between superficial and solid-state cultures of *Cordyceps fumosorosea*: conidial yields, quality and sensitivity to oxidant conditions. *Journal Invertebrate Pathology*, 32, 111.
- Muñiz-Paredes F., Miranda-Hernández F. & Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: From inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 57.
- Nigam, P. S. N. & Pandey, A. (2009). Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. In: P. S. N. Nigam & A. Pandey (Eds), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 197-221). Berlin: Springer Science + Business Media.
- Nelder, J. A. & Wedderburn, R. W. (1972). Generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)*, 135(3), 370–384.
- Nuñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R. & Loera, O. (2010). Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 771–777.
- Pandey, A., Soccol, C. R. & Mitchell, D. (2000). New Developments in Solid State Fermentation: Bioprocesses and Products. *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169.
- Prakash, G. V. S. B., Padmaja, V. & Kiran, R. R. S. (2008). Statistical, optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 99, 1530–1537.
- Roberts, D. W. & Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 1-70.
- Sahayaraj, K. & Namasivayam, S. K. R. (2008). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *African Journal of Biotechnology*, 7, 1907–1910.
- Shojaosadati, S. A., Hamidi-Esfahani, Z., Hejazi, P., Farahani, E. V. & Rinzema, A. (2007). Evaluation of strategies for temperature and moisture control in solid state packed bed bioreactors. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(4), 219–225. http://www.ijbiotech.com/article_7008_c7744cc405837649672b5ac8a7a4dbaa.pdf.

- Taylor, B., Edgington, S., Luke, B. & Moore, D. (2013). Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. *Journal of Stored Products Research* 53, 23-26.
- Tefera, T. & Pringle, K. (2003). Germination, Radial Growth, and Sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates and Their Virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at Different Temperatures, *Biocontrol Science and Technology*, 13: 7, 699-704.
- Tulloch, M. (1976). The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(3), 407-411.
- Wang, J. & Zheng, C. (2012). Characterization of a newly discovered *Beauveria bassiana* isolate to *Frankliniella occidentalis* Perganda, a non-native invasive species in China. *Mycological Research*, 167(2), 116-120.
- Welling, M., Nachtigall, G. & Zimmermann, G. (1994). *Metarhizium* spp. isolates from Madagascar: morphology and effect of high temperature on growth and infectivity to the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Entomophaga* 39(3-4):351–361.
- Westfall, P. H., Tobias, R. D. & Wolfinger, R. D. (1999). Multiple Comparisons and 584 Multiple Tests Using the SAS System. Cary, North Carolina, SAS Institute Inc.
- Wraight, S. P. & Carruthers, R. I. (1999). Production, delivery, and use of mycoinsecticides for control of insect pests of field crops. In: F. R. Hall & J. J. Menn (Eds.), *Biopesticides: Use and Delivery (Methods in Biotechnology)*, (5^a ed.) (pp. 233–269), Jersey, NJ: Humana Press.
- Ye, S. D., Ying, S. H., Chen, C. & Feng, M. G. (2006). New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*, 28, 799-804.
- Zimmermann, G. (2007a). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 879-920.
- Zimmermann, G. (2007b). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 553-596.

CAPÍTULO 3
PRODUÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* EM MÉDIA ESCALA COM
BIORREATOR PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO LABORATORY
FERMENTER PROPHYTA L03®

Revista: Applied Microbiology and Biotechnology

Resumo

Fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica usada para fermentar microorganismos com um mínimo de água no sistema. Este tipo de fermentação, uma ferramenta antiga, é a principal maneira de produzir biopesticidas em muitos países para obter conídios aéreos. Inovações em projetos de biorreatores de FES ocorreram nos últimos 20 anos, mas os programas de controle biológico de pragas continuam usando sacolas plásticas ou bandejas para produzir fungos. Portanto, é necessária a busca por novos métodos para reduzir o uso intensivo de atividade manual e produzir microorganismos com segurança. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho do Biorreator Laboratory Fermenter Propphyta L03® para produzir conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) (IBCB425) em substrato natural sólido. O biorreator foi eficiente para produzir conídios do isolado IBCB425 com rendimento de $6,4 \times 10^9$ conídios/g de peso seco, mas essa produção não foi homogênea nas três subunidades do equipamento. A melhoria da produção de fungos entomopatogênicos requer adaptações no biorreator FES.

Palavras-chave: biorreatores, biopesticidas, fermentação em estado sólido, controle de qualidade, produção de conídios

Abstract

Solid state fermentation (SSF) is a technique used to produce microorganisms with a minimum of water in the system. This type of fermentation, an ancient tool, is the main way to produce biopesticides in many countries to obtain aerial conidia. Innovations in SSF bioreactor projects have occurred in the last 20 years, but biological pest control programs continue to use plastic bags or trays to produce fungi. Therefore, it is necessary to search for new methods to reduce the intensive use of labor activity and produce microorganisms safely. The objective of this work was to evaluate the performance of the bioreactor Laboratory Fermenter Propphyta L03® to produce conidia of the fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) (IBCB425) on a solid complex organic substrate. The bioreactor was efficient to produce conidia of isolate IBCB425 with yield of 6.4×10^9 conidia/g dry weight, but this yield was not homogeneous in the three subunits of the equipment. Improving the production of entomopathogenic fungi requires adaptations in the SSF bioreactor.

Key-words: biopesticides, bioreactors, solid state fermentation, quality control, conidia production

3.1 Introdução

A fermentação em estado sólido (FES), potencialmente importante na biotecnologia, é um sistema para crescimento de microrganismos em materiais sólidos com baixo teor de umidade e sem ou quase ausência de água livre (Pandey et al. 2000; Manan e Webb 2017). Esse tipo de fermentação é, bastante, conhecido mundialmente na produção de microrganismos, como fungos entomopatogênicos, para formulações biopesticidas (Faria and Wraight 2007; Jaronski e Mascarin, 2017). As estruturas infectivas, como conídios, são utilizadas como ingrediente ativo nas formulações e geralmente obtidas com processos primários com baixa tecnologia, em países em desenvolvimento (Jaronski e Jackson, 2012).

A demanda por biopesticidas está crescendo e, conseqüentemente, a escala de produção. No entanto, com a utilização intensiva de atividade manual em métodos primários pode não suprir a necessidade de ingredientes ativos, além de aumentar o risco de contaminações (Jaronski e Jackson 2012; Muñiz-Paredes et al. 2017; Mascarin et al. 2018). O desenvolvimento de biorreatores de alto desempenho, para superar problemas na produção de microrganismos, tem sido pesquisado em países desenvolvidos para a produção de biopesticidas, a exemplo do biorreator para fermentação sólida Prophyta® (Lüth e Eiben 2003; Durand 2003; Soccol et al. 2017). Os tipos de biorreatores a FES incluem os de bandejas, rotatório, leito fixo e leito fluidizado. O Prophyta® foi baseado em biorreator de leito fixo de coluna com aeração forçada para a produção de grandes quantidades de microrganismo, ou seja, em escala industrial, podendo ser totalmente autoclavado e permitindo uma produção 100% livre de contaminantes (Lüth e Eiben 2003; Mitchell et al. 2006). Contudo, esta tecnologia é de difícil acesso e, por isto, a tecnologia Prophyta® foi pouco divulgada.

O objetivo foi produzir conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) (IBCB425) em substrato natural sólido com o biorreator Laboratory Fermenter Prophyta L03®.

3.2 Material e Métodos

Local e material biológico

Um isolado do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* (IBCB425) foi obtido de amostras de solo da Mata Atlântica do município de Iporanga, Estado de São Paulo, Brasil, e depositado na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal em Campinas, São Paulo, Brasil. Os conídios puros do fungo foram mantidos a -80 °C para preservação. Além disso, foi mantido a -20 °C em glicerol a 10% e a 6 °C em tubos com meio de cultura malte, peptona de soja e ágar - MPA (extrato de malte 30 g/L [Merck KGaA, Alemanha], peptona de soja 5 g/L [Merck KGaA, Alemanha], Agar 18 g/L Roth, Alemanha]) para fornecer material para os experimentos. O inóculo inicial foi obtido pela propagação do fungo em placas de Petri com meio de cultura MPA. O inóculo cresceu a 25 ± 1 °C em condições escuras. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, Instituto de Controle Biológico, Instituto Julius Kühn, Darmstadt, Alemanha.

O Laboratory Fermenter Prophyta L03®: Configuração geral do biorreator

O fermentador produzido em metal suporta altas temperaturas, inclusive a esterilização em autoclave, sendo composto por 4 subunidades, cada uma representando um nível de produção, exceto a subunidade 4 com função de aeração umidificada do fermentador. As subunidades 1, 2 e 3 têm um sistema de refrigeração composto por tubulações de metal no meio do substrato. A temperatura é controlada dentro do biorreator, não permitindo que o calor produzido durante o processo fermentativo oscile a temperatura configurada no início da fermentação. O fermentador é conectado a uma central por monitor eletrônico multiparâmetros [Prolatec, Alemanha], conectada a um computador para monitorar e controlar os parâmetros envolvidos no processo fermentativo como O₂, CO₂, temperatura e umidade. A concentração de O₂ pode ser controlada e monitorada desde a entrada até a saída no sistema. O CO₂ não é inoculado no fermentador, mas é produzido durante o processo fermentativo e, por isto, sua concentração dentro do fermentador é controlada, pelo aumento na concentração de O₂ e exaurido sempre que necessário.

O sistema de refrigeração é conectado a um equipamento de circulação de refrigeração e aquecimento “Chiller” [Julabo GmbH, Alemanha] que pode refrigerar ou aquecer a água que transita, constantemente, na tubulação do sistema de controle de temperatura dentro do fermentador (serpentina) (Figuras 1, 2 e 3).

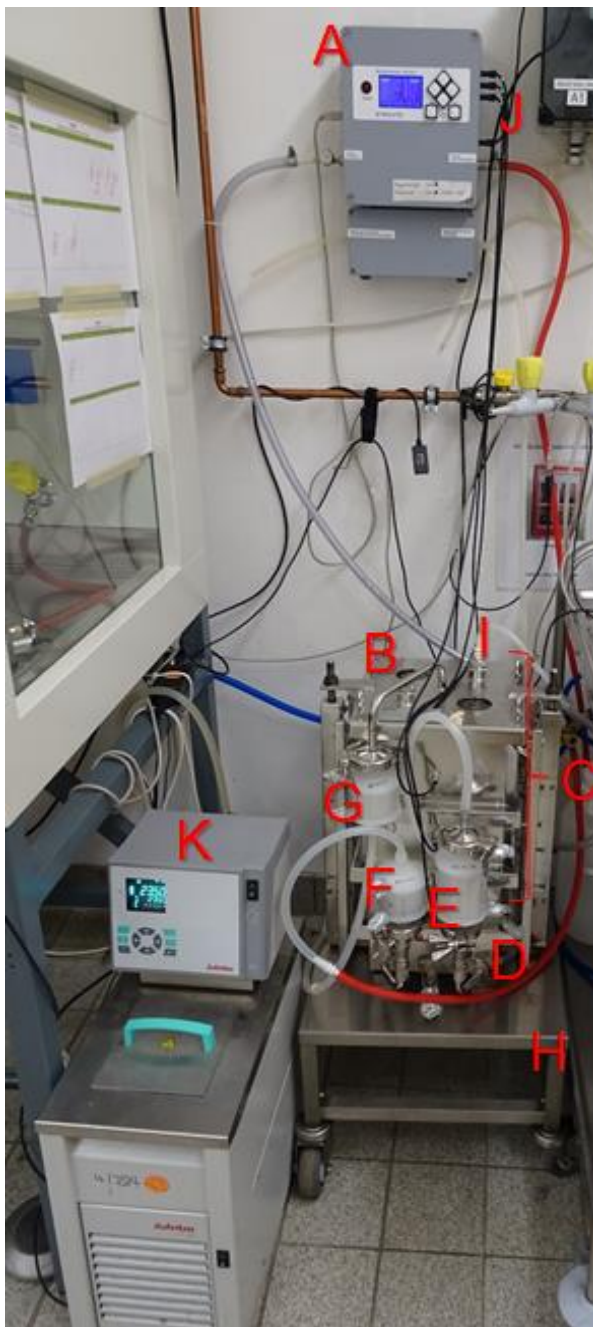


Figura 1. Laboratory Fermenter Prophyta L03®. a- Monitor eletrônico multiparâmetros [Prolatec, Alemanha]; b- Laboratory Fermenter Prophyta L03®; c- Bandejas de fermentação; d- Bandeja de suprimento de ar e umidade; e- Sistema purificador de água Sartorius Stedim Biotech [Sartorius, Alemanha]; f- Sistema Purificador de ar de entrada Sartorius Stedim Biotech [Sartorius, Alemanha]; g- Sistema Purificador de ar de saída Sartorius Stedim Biotech [Sartorius, Alemanha]; h- Base para movimentação do Laboratory Fermenter Prophyta L03®; i- Acesso de

inoculação; j- Sensores de temperatura das bandejas; k- Circulador de refrigeração e aquecimento “Chiller” [Julabo GmbH, Alemanha]

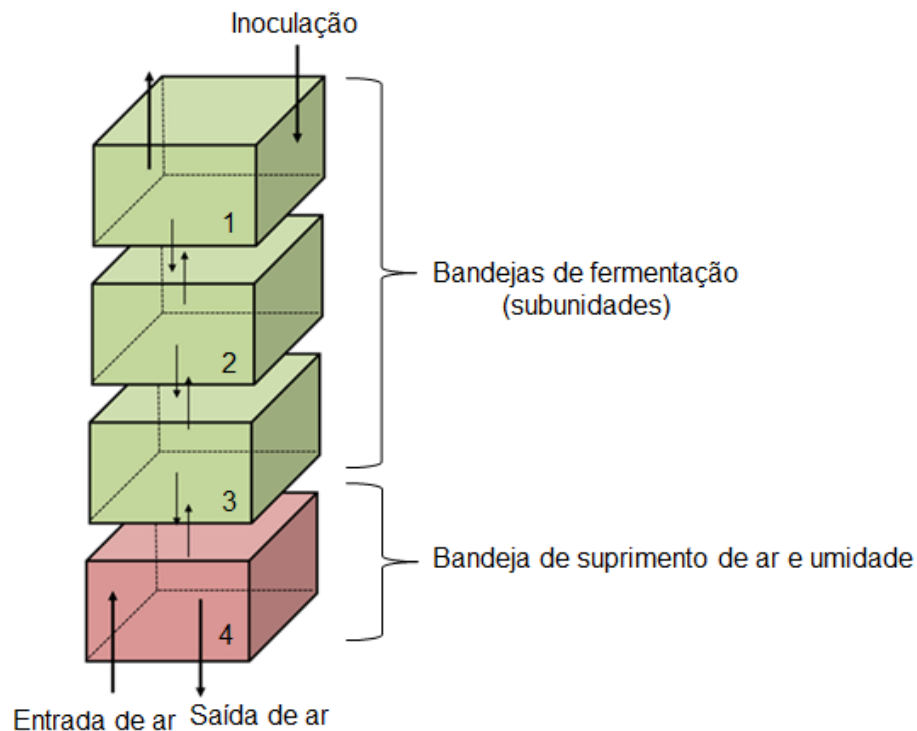


Figura 2. Esquema geral do Laboratory Fermenter Prophyta L03®



Figura 3. Detalhe do processo de esterilização do Laboratory Fermenter Prophyta L03® em autoclave de 160 L [Tuttnauer autoclave 5075EL - esterilizador a vapor, Holanda]

Qualidade de produção de conídios: comparação do rendimento nas subunidades do equipamento

Preparo do inóculo

Uma pré-cultura do fungo *M. anisopliae* (IBCB425) foi preparada em meio líquido Samsinakova adaptado com 25,0 g/L de glicose [Merck KGaA, Alemanha], 20,0 g/L de sólidos de milho “corn step solid” [Merck KGaA, Alemanha] e 5,0 g/L de cloreto de sódio [Merck KGaA, Alemanha], o volume completado em um litro com água deionizada em ebulição e o meio de cultura foi misturado com o auxílio de um homogeneizador magnético durante 10 minutos. Posteriormente, frascos Erlenmeyer de 100 mL foram preenchidos com 50 mL do meio de cultura com auxílio de um dosador e este material autoclavado a 121 °C e 1 bar, durante 20 minutos em autoclave [Tuttnauer autoclave 2540EL - esterilizador a vapor, Holanda]. O inóculo inicial foi obtido com 1 mL de conídios de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL de uma cultura fúngica com 14 dias de idade, cultivada em meio de cultura MPA e utilizado para a inoculação. O crescimento do fungo foi feito com os frascos Erlenmeyer em agitador automático Multitron [Infors HT, Suíça] sob condições controladas de 25 °C, 150 rpm, e sem luz, durante 72 horas.

Preparo do biorreator

O fungo *M. anisopliae* (IBCB425) e o substrato arroz parboilizado + cevada (5:1) foram utilizados para a produção em média escala no Laboratory Fermenter Prophyta L03®.

O biorreator Laboratory Fermenter Prophyta L03® tem 4 compartimentos de produção, os três primeiros acima preenchidos com 800g de substrato nutricional (arroz + cevada na proporção de 5:1, fervidos por 5 min em 500 mL de água deionizada) para o crescimento do microrganismo e o último e 4º compartimento abaixo com 500 g de argila granulada [Seramis GmbH, Alemanha]. Os poros deste material absorvem a água para manter a umidade do sistema.

O fermentador foi autoclavado por 20 min, 121°C e 1 bar em autoclave. O fermentador, antes da inoculação, foi preenchido com água deionizada cobrindo-se todo o substrato. A água foi filtrada em um sistema purificador de água Sartorius Stedim Biotech [Sartorius, Alemanha] antes de entrar no sistema de fermentação. Depois, 60 mL da pré-cultura de 72 horas foram introduzidos no biorreator através

de um bico receptor de inoculação do equipamento e foi realizada uma rápida agitação do equipamento, para suspender a biomassa. A água foi descartada, lentamente, pela saída do dreno e, durante a redução do nível da água, a biomassa do fungo envolveu e fixou-se na superfície do substrato para a inoculação ser completada. Na sequência, o fermentador foi conectado ao monitor eletrônico multiparâmetros [Prolatec, Alemanha], ao sensor de temperatura (1 em cada bandeja de fermentação), ao sistema circulador de refrigeração e aquecimento “Chiller” [Julabo GmbH, Alemanha] e ao regulador de fluxo de O₂ presente no monitor eletrônico multiparâmetros. A fermentação ocorreu durante 14 dias a 25 °C e aeração de 150 L/h⁻¹.

Colheita no biorreator e avaliação do desempenho

Três amostras, de cada bandeja, foram retiradas para se avaliar o rendimento da produção por subunidade como amostragem de cada subunidade. Um total de 25 g do substrato com 225 mL de Tween 80 (0,1%) por amostra foi lavado para designar os conídios formados por g de massa seca. A suspensão foi agitada durante 10 min em agitador compacto Shaker Orbital KS 15A [Edmund Bühler GmbH, Alemanha] para individualizar os conídios por “lavagem” do substrato. Depois disso, a concentração de conídios foi avaliada em hemocitômetro (Thoma) com auxílio de um microscópio óptico [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha]. A concentração de conídios foi relacionada à matéria seca como quantidade comparável. Este experimento foi repetido 5 vezes nas mesmas condições.

Análise estatística

Na análise estatística da contagem de esporos por grama, considerando como fator as sub-unidades e como covariável o bloco, foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição gama e função de ligação logarítmica. Foi utilizado o procedimento genmod (do Programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition e para comparações entre tratamentos foi utilizado foi o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999). Foi feita também a análise de correlação de Spearman entre a contagem de esporos por grama e a umidade relativa, seguidas dos valores-p do teste cuja hipótese de nulidade considera a correlação nula, contra a hipótese de que a correlação é diferente de zero. Os gráficos foram plotados com o software SigmaPlot 12.0.

3.3 Resultados

A produção de conídios diferiu entre as subunidades do biorreator Laboratory Fermenter Prophyta L03® com maior rendimento, $6,4 \times 10^9$ e $6,2 \times 10^9$ conídios/g de massa seca nas subunidades 1 e 2, respectivamente. O menor rendimento foi obtido da subunidade 3 foi de $3,6 \times 10^9$ conídios/g de massa seca (Figura 4 – a).

O teor de umidade do substrato colhido ao final da fermentação foi 57,9% não diferiu entre os compartimentos do biorreator (Figura 4 – b).

A temperatura foi de 25 ± 2 °C e a concentração média de O₂ e CO₂ de 16,5% e 0,13%, respectivamente, onde proporcionaram condições adequada para o funcionamento do biorreator.

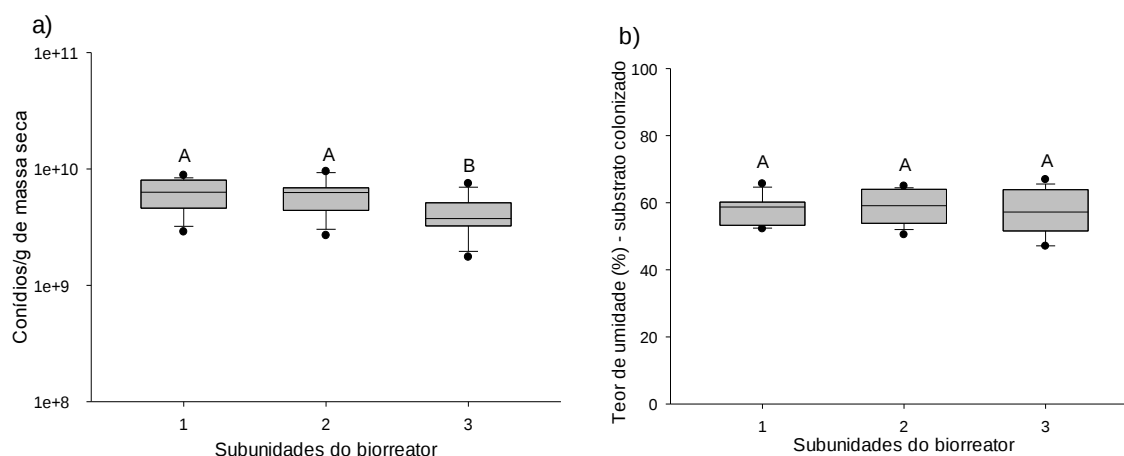


Figura 4. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) no biorreator Laboratory Fermenter Prophyta L03® (a) e teor de umidade (%) do substrato arroz + cevada (5:1) colonizado por IBCB425 ao final da fermentação no biorreator (b)

3.4 Discussão

Diferenças no rendimento de conídios entre as subunidades podem estar relacionadas ao efeito do substrato (matriz) como papel de "filtro", reduzindo a concentração do inóculo inicial ao passar por diferentes níveis (subunidades). Por isto, sugere-se que a inoculação deve ser realizada por subunidade como ajustes no biorreator para aumentar sua produção. Isto é necessário pois o Solid State Fermenter System Prophyta®, umas das mais recentes invenções de biorreator de larga escala em estado sólido, foi desenvolvido para atender a produção industrial de biopesticidas na Alemanha e precisa de mais pesquisas (Lüth et al. 2003; Durand 2003; Jaronski 2014). O uso dessa tecnologia para produzir fungos entomopatogênicos possui informações restritas, onde foi apenas apresentado uma

produção de mais de $1,0 \times 10^9$ conídios/g para dois isolados dentre quatro isolados testados, os nomes destes últimos não foram revelados, entretanto valores parecidos foram registrados para *M. anisopliae* (IBCB425) (Eiben e Luth, 2006). Esse biorreator, em escala industrial, tem uma coluna com 9 bandejas (subunidades) que recebem o substrato para produzir o microrganismo; além disso, essas subunidades têm placas perfuradas para a passagem de ar e do líquido para a inoculação (Lüth et al., 2003; Eiben e Lüth 2006). O modelo laboratorial reduziu o rendimento de conídios na subunidade inferior, mas o mesmo pode ser maior no modelo industrial devido ao maior número de subunidades. Os resultados apresentados podem contribuir para se entender e melhorar o sistema de produção, pois esta não foi homogênea entre compartimentos do equipamento. Biorreatores, desenvolvidos para diferentes áreas, podem ser utilizados para obtenção de diferentes produtos, como metabólitos secundários (Durand 2003; Soccol et al. 2017). O uso dessas ferramentas para a produção de fungos entomopatogênicos em larga escala é escasso em países em desenvolvimento como o Brasil, onde empresas produtoras de biopesticidas usam, principalmente, sacos plásticos autoclaváveis e bandejas (Alves e Pereira 1989; Li et al. 2010; Mascarin et al. 2018). Esse tipo de produção tem riscos como o não controle de temperatura, aeração, contaminações e uso excessivo de mão-de-obra. A produção de *M. anisopliae* economizou em até 70% em menor espaço de tempo em biorreator de coluna com leito fixo com aeração forçada comparado com sacos plásticos, ambos com arroz como substrato. Além disso, o biorreator com a aeração forçada permite a remoção de calor metabólico produzido durante a fermentação (Méndez-González et al. 2018). *Metarhizium anisopliae* tem sido produzido de três diferentes maneiras em biorreatores: a primeira em sacos plásticos como no projeto LUBILOS (Jenkins et al. 1998), a segunda em biorreatores de leito fixo (Dorta e Arcas 1998) e a terceira em biorreatores de mistura (Breukelen et al. 2011). O uso de biorreatores de mistura inviabiliza a produção de *M. anisopliae* através da quebra de estruturas do fungo e sensibilidade deste a esse tipo de tecnologia, sendo o de leito fixo o mais adequado para a produção desse fungo (Breukelen et al. 2011).

O teor de umidade do substrato, nas três subunidades do biorreator, se manteve estável ao final da fermentação, mas com valor acima do ideal para a umidade do arroz, em torno de 22 a 30% (Prakash et al. 2008). Portanto, o teor de água do substrato antes da colheita do fungo deve ser reduzido, pois isso pode

refletir na qualidade do material com a redução na produção de conídios e dificultar o processo de colheita dos conídios (Gervais e Molin, 2003).

O controle da temperatura do biorreator, durante todo o processo fermentativo, é importante para garantir a qualidade na produção. Biorreatores pequenos, de leito fixo com aeração forçada, tem sucesso na produção de *Metarhizium* sp. e o controle de temperatura pode ter contribuído para o maior rendimento de esporos em farelo de arroz (Dorta et al. 1996; Breukelen et al. 2011). O acúmulo do calor metabólico pode aumentar a temperatura do biorreator com perda de água e, conseqüentemente, afetar o desenvolvimento do microrganismo (Dorta e Arcas 1998). Esses problemas foram solucionados com a tecnologia Prophyta® com placas perfuradas para acomodar o substrato e permitir a passagem de ar estéril, além de trocadores de calor, ou seja, estes ficam entre o substrato para que a temperatura seja controlada (Durand 2003). A concentração média de oxigênio no biorreator de 16,5% foi semelhante à do fungo *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* em 16% de O₂, o qual teve a mesma produção quando configurado em condições de atmosfera normal de 21% de O₂. Entretanto, o oxigênio pode afetar a produção de conídios, com concentrações de 26 e 30% podendo aumentar a produção, mas teores maiores de oxigênio, como 40%, podem comprometer a qualidade dos conídios, apesar de aumentar o rendimento (Garcia-Ortiz et al. 2015). A concentração de CO₂ no biorreator Laboratory Fermenter Prophyta L03® pode ser considerada segura por ter acumulado até 0,13% de CO₂. O CO₂ pode ser acumulado no sistema como um produto do metabolismo do microrganismo, entretanto, a alteração da atmosfera para uma concentração de 5% de CO₂ reduziu em 85% a produção de conídios de *Beauveria bassiana* (Garza-Lopez et al. 2011). Altas concentrações de CO₂ podem inviabilizar a produção de conídios, portanto, a inoculação de O₂ no biorreator é importante para reduzir a concentração de CO₂. Diante disso, o monitoramento e controle de O₂ e CO₂ são indispensáveis durante a FES.

3.5 Conclusão

A produção de *M. anisopliae* (IBCB425) no biorreator Laboratory Fermenter Prophyta L03® é adequada para a obtenção de grandes quantidades de conídios de maneira segura. Esse método dispensa trabalho manual intensivo. Além disso, assegura as condições de temperatura, oxigênio e ausência de contaminantes para

produção em pequena escala e podendo chegar a larga escala. Melhorias no biorreator devem visar a maior homogeneidade de produção de conídios nas subunidades (bandejas).

Referências

Alves SB, Pereira RM (1989) Production of *Metarhizium anisoplae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in plastic trays. *Ecossistema* 14:188-192.

van Breukelen FR, Haemers S, Wijffels RH, Rinzema A (2011) Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisoplae*. *Process Biochem* 46:751–757. doi:10.1016/j.procbio.2010.11.023

Dorta B, Arcas JA (1998) Sporulation of *Metarhizium anisoplae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme Microb Technol* 23:501-505. doi: 10.1016/S0141-0229(98)00079-9

Dorta B, Ertola RJ, Arcas JA (1996) Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisoplae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme Microb Technol* 19(6):434–439. doi: 10.1016/S0141-0229(96)00017-8

Durand A (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem Eng J* 13: 113–125. doi: 10.1016/S1369-703X(02)00124-9

Eiben U, Lüth P (2006) Development of novel fungal biocontrol agents. http://orgprints.org/7717/1/short_paper,_prophyta,14.03.06.PDF. Acesso em: 26 maio 2018.

Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 43:237–256. doi: 10.1016/j.biocontrol. 2007.08.001

Garcia-Ortiz N, Tlecuil-Beristain S, Favela-Torres E, Loera O (2015) Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. Appl Microbiol Biotechnol 99:2783-2791. doi: 10.1007/s00253-014-6225-2

Garza-López PM, Konigsberg M, Saucedo-Castañeda G, Loera O (2011) Perfiles diferenciales de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. en respuesta al CO₂: producción de conidios y amilasas. Agrociencia, 45(7), 761-770. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000700002&lng=es&tlng=pt. Acesso em 08 jul 2018

Gervais, P Molin P (2003) The role of water in solid-state fermentation. Biochem Eng J 13(2-3):85-101. doi: 10.1016/S1369-703X(02)00122-5.

Jaronski ST (2014) Mass production on entomopathogenic fungi: state of the art. In: Morales-Ramos JA, Rojas MG, Shapiro-Ilan DI (eds) Mass production of beneficial organisms, edn. Elsevier Inc., Amsterdam, pp 357–415

Jaronski, ST, Jackson, MA (2012) Mass production of entomopathogenic Hypocreales. Lacey, LA (Ed) Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (second ed.), Academic Press, New York, pp 255-284.

Jaronski ST, Mascarín GM (2017) Mass production of fungal entomopathogens. In: Lacey LA (ed) Microbial Control of Insect and Mite Pests, 1^a ed. Elsevier Inc., Amsterdam, pp. 141–155. doi: 10.1016/B978-0-12-803527-6.00009-3

Jenkins NE, Heviefo G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ (1998) Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News & Info 19:21N–31N. <http://cabweb.org/PDF/BNi/Control/BNIRA38.PDF>. Acesso em: 11 abr 2018

Li Z, Alves SB, Roberts DW, Fan M, Delalibera Jr I, Tang J, Lopes RB, Faria M, Rangel DEN (2010) Biological control of insects in Brazil and China: history, current

programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci Technol* 20(2):117-136. doi: 10.1080/09583150903431665

Lüth P, Eiben U (2003) Solid-state fermenter and method for solid-state fermentation United States Prophyta Biologischer Pflanzenschutz GmbH (Malchow, DE) 6620614. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/33/5a/c5/332f2e9d923201/US6620614.pdf>. Acesso em: 15 fev 2018.

Manan MA, Webb C (2017) Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *J Appl Biotechnol Bioeng* 4(1):511–532. doi: 10.15406/jabb.2017.04.00094

Mascarin GM, Biaggioni Lopes R, Delalibera Jr I, Kort Kamp Fernandes E, Luz C, Faria M (2018) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J Invertebr Pathol* S0022-2011(17):30365-30368. doi: 10.1016/j.jip.2018.01.001

Méndez-González F, Loera O, Favela-Torres E (2017) Conidia production of *Metarhizium anisopliae* in bags and packed column bioreactors. *Curr Biotechnol* 5:1–5. doi: 10.2174/2211550105666160926123350

Mitchell DA, Berovič M, Krieger N (2006) Solid-State Fermentation Bioreactors. In: Mitchell DA, Krieger N, Berovič M (Eds), Springer, Heidelberg, 19.

Muñiz-Paredes F, Miranda-Hernández F, Loera O (2017) Production of conidia by entomopathogenic fungi: From inoculants to final quality tests. *World J Microbiol Biotechnol* 33:57. doi: 10.1007/s11274-017-2229-2

Pandey A, Carlos R Soccol, David Mitchell. 2000. New developments in solid state fermentation. I: processes and products. *Process Biochem* 35(10):1153–1169. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00152-7

Prakash GVSB, Padmaja V, Kiran RRS (2008) Statistical, optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. Bioresource Technol 99:1530–1537. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.031

Soccol CR, Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LPS (2017) Recent developments and innovations in solid state fermentation. Biotechnol Res Innov 1(1):52-71. doi: 10.1016/j.biori.2017.01.002

Westfall PH, Tobias RD, Rom D, Wolfinger RD, Hochberg Y (1999) Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System, SAS Institute Inc., Carolina do Norte, EUA.

CAPÍTULO 4
COLHEITA DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae* PARA BIOPESTICIDAS
NO MANEJO DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)

Revista: Royal Society Open Science

Resumo

Os insetos praga introduzidos nas plantações de eucalipto no Brasil são na maioria de origem australiana, e os microrganismos nativos têm potencial para manejá-los. A produção de biopesticida de alta qualidade baseada em fungos entomopatogênicos depende de tecnologias adequadas. O objetivo foi avaliar a tecnologia Mycoharvester® para coletar e separar partículas para obter conídios de *Metarhizium anisopliae* puros para o manejo de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae). Mycoharvester® versão 5b coletou e separou as partículas de *M. anisopliae*. O teor de umidade de 6,36% do produto puro mostra sua qualidade comparada a umidade do produto aglomerado, separados pelo Mycoharvester®. O produto colhido causou alta mortalidade de ninfas e adulto de *T. peregrinus*. O Mycoharvester® otimiza o sistema de produção de fungos, com conídios puros, para formular biopesticidas para o manejo de insetos praga.

Palavras-chave: biopesticidas, colheita de conídios, fungo entomopatogênico, Mycoharvester®, conídio puro

Abstract

Introduced insect pests in eucalyptus plantations in Brazil are mostly of Australian origin, and native microorganisms have potential to manage them. High quality biopesticide production based on entomopathogenic fungi depends on adequate technologies. The objective was to evaluate the Mycoharvester® technology to collect and separate particles to obtain pure *Metarhizium anisopliae* conidia to manage *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae). Mycoharvester® version 5b collected and separated *M. anisopliae* particles. The moisture content of 6.36% of the pure product shows its quality compared to moisture of the agglomerated product, separated by Mycoharvester®. The product harvested caused high *T. peregrinus* nymph and adult mortality. Mycoharvester® optimizes the fungal production system with pure conidia to formulate biopesticides for pest insect management.

Key-words: biopesticides, entomopathogenic fungus, forest pests, Mycoharvester®, pure conidia

4.1 Introdução

As florestas plantadas contribuem para a economia brasileira com 7,8 milhões de hectares, sendo 72% de *Eucalyptus* spp. e fornecer 91% da madeira produzida no país [1]. Insetos introduzidos como *Glycaspis brimblecombei* Moore, 1964 (Hemiptera: Psyllidae), *Gonipterus platensis* Marelli, 1926 (Coleoptera: Curculionidae) e *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero e Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae) ameaçam estes números [2, 3, 4]. *Thaumastocoris peregrinus*, uma praga em *Eucalyptus* spp. plantações, tem alta capacidade de dispersão e danifica diferentes espécies deste gênero [5]. A monitoração é essencial para determinar o número de adultos, ninfas e ovos de *T. peregrinus* no dossel da planta para o manejo dessa praga [6]. O controle biológico de *T. peregrinus* com o parasitóide *Cleruchoides noackae* Lin e Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae) [7], predadores [8, 9] e fungos entomopatogênicos, são importantes para o manejo desse inseto e de outros insetos florestais [10, 11 12]. No entanto, a produção desses microrganismos nos países em desenvolvimento requer intenso trabalho manual, principalmente na fase de colheita, o que pode reduzir a quantidade e a qualidade do produto final [13, 14]. Isso aumenta as dificuldades de se obter grandes quantidades de biopesticidas para atender a demanda de áreas florestais.

O objetivo é avaliar uma tecnologia para obtenção de propágulos fúngicos que serão empregados no desenvolvimento de biopesticidas, através da coleta e separação de partículas para obter conídios puros de *Metarhizium anisopliae* e avaliar a patogenicidade do produto obtido contra *T. peregrinus*.

4.2 Material e Métodos

Obtenção do fungo por fermentação sólida

O fungo *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Hypocreales, Clavicipitaceae) (IBCB425) foi isolado de solo da Mata Atlântica no Município de Iporanga, São Paulo, Brasil e depositado na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal em Campinas, São Paulo, Brasil. Grandes quantidades de IBCB425 foram obtidas com processo de fermentação em estado

sólido. O biorreator Laboratory Fermenter ProPhyta L03 System® foi preenchido com o substrato arroz parboilizado^a + Cevada^b, 4:1 (160g^a + 40g^b) para produção em massa desse fungo a 25 °C com taxa de aeração de 150L/h⁻¹ [15]. Os conídios de *M. anisopliae* foram colhidos a partir de 14 dias da fermentação.

Colheita do produto e o sistema Mycoharvester®

O equipamento Mycoharvester® [Mycoharvester Company, UK] separa conídios puros e aglomerados a partir de substratos colonizados por fungos utilizando tecnologia de ciclone duplo [16]. Um total de 150 g do substrato + fungo, por tratamento e repetição, foi colocado dentro do Mycoharvester® para a colheita dos conídios. O peso de conídios (gramas), o número de conídios por grama e a porcentagem de umidade dos produtos foram obtidos para se avaliar a qualidade de colheita. Além disso, o produto obtido (substrato + fungo) foi avaliado, após o período de fermentação e após a colheita, para se determinar o número de conídios formados por grama de massa seca. Vinte e cinco gramas do substrato foram lavados com 225 mL de Tween 80® [Sigma, Alemanha] (0,1%). Em seguida, a suspensão foi agitada durante 10 minutos em agitador compacto Shaker Orbital KS 15A [Edmund Bühler GmbH, Alemanha] 420 rpm para individualizar os conídios. Os conídios produzidos no substrato foram contados antes e após passar pelo sistema de colheita. Esse experimento foi repetido três vezes (blocos) nas mesmas condições, mas em momentos e com lotes diferentes do fungo, com nove procedimentos de colheita cada um. A produção do fungo e os experimentos de colheita foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, Instituto de Controle Biológico, Instituto Federal Julius Kühn, Darmstadt, Hessen, Alemanha.

Patogenicidade a *Thaumastocoris peregrinus* (ninfas e adultos)

Os conídios puros foram suspensos em Tween 80® [Sigma, Alemanha] (0,1%) e sua quantidade calibrada para concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL para avaliar sua patogenicidade. Em seguida, 2 ml de suspensão de conídios foram pulverizados com auxílio de uma Torre de Potter em 10 adultos e 10 ninfas de *T. peregrinus* (cada fase do inseto separadamente), proveniente de criação estoque de laboratório e constituindo uma repetição. A testemunha recebeu apenas Tween 80®

(0,1%). Os insetos foram mantidos em placas de Petri com abertura na tampa coberta com tecido *voil* permitindo trocas gasosas com uma folha de *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* de árvores com seis anos de idade, para alimentação dos insetos, além disso, esta foi colocada sobre uma fina camada de hidrogel (1 g/400 ml) [Hydroplan-EB, Empresa de Base & Distribuidora Ltda, Brasil] para manter a turgescência da mesma e evitar a fuga do inseto. As placas, após a aplicação do fungo com os insetos, foram mantidas em incubadoras tipo B.O.D. a temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ e fotoperíodo de 12h. Cada repetição (placa de Petri) foi observada, diariamente, e os insetos mortos contabilizados, retirados e transferidos para câmaras úmidas para confirmação da patogenicidade do fungo. O experimento foi composto por três repetições com 10 insetos cada e os ensaios repetidos duas vezes, totalizando 60 insetos por tratamento. Os experimentos de patogenicidade foram realizados no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista (LCBPF, DPV, FCA, UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

Análise estatística

Modelos lineares generalizados com distribuição gama e função de ligação logarítmica foram ajustados para o número de esporos por grama antes e depois da colheita, considerando uma estrutura de medidas repetidas pelo método de Equações de Estimação Generalizadas [17, 18, 19]. O primeiro considerou a massa de conídios em gramas como um fator de tipo de produto e os blocos como covariáveis; o segundo, a umidade relativa considerando o tipo de produto como fator e o bloco como covariáveis e o terceiro a taxa de mortalidade por estágio do inseto como fator e tempo e replicação como covariáveis contínuas e como covariáveis [17]. O procedimento utilizado foi o genmod (do SAS Statistical Software Statistical Software, SAS University Edition) e o teste de Tukey-Kramer para comparar os tratamentos [20]. Os gráficos foram plotados com o software SigmaPlot 12.0.

4.3 Resultados

O rendimento de *M. anisopliae* foi de $4,8 \times 10^9 \pm 3,8 \times 10^8$ conídios/g de massa seca de substrato + fungo de com teor médio de água de $57,7\% \pm 1,06$. Um total de 150g de substrato colonizado por $4,8 \times 10^9$ conídios/g do fungo (Figura 2 – b) possibilitou a obtenção de $3,12 \pm 0,21$ g conídios puros (Figura 2 – d) e $1,14 \pm 0,09$ g conídios aglomerados (Figura 1 – a), este último com conídios, micélios e resíduos do substrato. A produção de substrato + fungo na versão 5b do Mycoharvester® (Figura 2a) antes e depois (Figura 2b, c) usando este sistema foi de $4,8 \times 10^9 \pm 3,8 \times 10^8$ conídios/g e $6,9 \times 10^8 \pm 7,1 \times 10^7$ conídios/g de massa seca, respectivamente, comprovando que esse método coleta e separa os conídios do fungo (Figura 1c, 2d).

O teor de umidade dos produtos obtidos diferiu, com $6,36\% \pm 0,13$ para o conídio puro e de $34,84\% \pm 0,65$ para o aglomerado (Figura 1 – c).

O conídio puro de *M. anisopliae* (IBCB425) aplicado na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL foi, altamente, patogênico para ninfas e adultos de *T. peregrinus* (Figura 3 e Figura 4 – a,b).

4.4 Discussão

A produção de *M. anisopliae* (IBCB425) em biorreator sólido foi adequada e permitiu a coleta de quantidades significativas de conídios puros deste fungo. A maior produção de *M. anisopliae* do que a deste fungo em fermentação sólida com arroz como substrato, $1,0 \times 10^9$ conídios/g evidenciou a qualidade deste método, embora a otimização de fatores como a umidade do substrato entre 22 e 30% permitisse obter para $6,2 \times 10^{10}$ conídios/g com o último método [21, 22]. A qualidade da produção de *M. anisopliae* em biorreator sólido com $3,4 \times 10^9$ conídios/g obtidos com farelo de arroz foi a melhor em um teste com diferentes substratos no biorreator de leite arejado [23].

O rendimento da colheita e a separação de conídios no Mycoharvester® é semelhante ou superior ao obtido com os métodos de peneiramento e lavagem Tween 80 (0,02%) [24]. Os conídios aéreos são facilmente produzidos com altos níveis de infecção nos insetos alvo e, portanto, são, em geral, as unidades de maior interesse para a produção e aplicação em grande escala de fungos

entomopatogênicos [25]. O Mycoharvester® melhora a colheita de conídios puros, sem o uso de água, o que pode prejudicar a estabilidade e a pureza do produto, com o objetivo de desenvolver novas formulações oleosas à base de *Metarhizium* spp. para controlar os gafanhotos em África [26].

O teor de umidade dos produtos, 6% para conídios puros e 34% para o aglomerado, mostra a adequação do Mycoharvester® à produção de biopesticida, a partir de fungos entomopatogênicos. O teor de umidade dos conídios de substratos sólidos deve ser inferior a 5 ou 9% para permitir uma vida útil ideal, independentemente de o produto ser formulado ou não [27, 25, 13].

A patogenicidade de *M. anisopliae* (IBCB425), na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/ml, foi adequada para o controle de ninfas de *T. peregrinus* e adultos. O uso de fungos entomopatogênicos nativos no manejo de pragas florestais introduzidas aumenta as possibilidades de programas sustentáveis, como a ocorrência natural de fungos como *B. bassiana*, *Cordyceps* sp. e *Zoophtora radicans* contra este inseto [11, 28, 29, 12]. A mortalidade de *T. peregrinus*, 37% e 80,1%, com diferentes isolados de *B. bassiana* e 87% com *Isaria* sp. na concentração $1,0 \times 10^8$ conídios / ml, mostra o potencial desses microrganismos para o manejo dessa praga [12]. Casos de sucesso, no setor agrícola com fungos entomopatogênicos, foram registrados, especialmente com *M. anisopliae*, por décadas, contra pragas de Hemiptera em cultura de cana-de-açúcar no Brasil [14].

4.5 Conclusão

O equipamento Mycoharvester® coletou e separou o fungo do substrato fornecendo conídios puros de *M. anisopliae*. O uso dos conídios puros foi eficaz para o manejo de *T. peregrinus*.

Referências

1. Ibá. Anuário estatístico da Indústria Brasileira de Árvores: ano base 2016. 2017. Brasília: 77p. https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf. (Last access: 13 september 2018).

2. Wilcken CF, Soliman EP, Sá LAN, Barbosa LR, Dias TKR, Ferreira-Filho PJ, Oliveira RJR. 2010 Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on Eucalyptus in Brazil and its distribution. *J. Plant. Prot. Res.* **50**(2), 201–206. (doi:10.2478/v10045-010-0034-0)
3. Wilcken CF, Couto EB, Orlato C, Ferreira-Filho PJ, Firmino DC. 2003 Ocorrência do psílideo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) em florestas de eucalipto no Brasil. *Circular Técnica IPEF* **201**, 1–11.
4. Wilcken CF, Oliveira NC, Sartório RC, Loureiro EB, Bezerra JRN, Rosado-Neto GH. 2008 Ocorrência de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) em plantações de eucalipto no estado do Espírito Santo. *Arq. Inst. Biol.* **75**(1), 113–115.
5. Soliman EP, Wilcken CF, Pereira JM, Dias TKR, Zaché B, Dal Pogetto MHFA, Barbosa LR. 2012 Biology of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) in different eucalyptus species and hybrids. *Phytoparasitica* **40**(3), 223–230. (doi:10.1007/s12600-012-0226-4)
6. Lima ACV, Wilcken CF, Ferreira-Filho PJ, Serrão JE, Zanuncio JC. 2016 Intra-plant spatial distribution of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus grandis* plants. *Phytoparasitica* **44**(3), 411–418. (doi:10.1007/s12600-016-0526-1)
7. Barbosa LR, Rodrigues AP, Soler LS, Fernandes BV, Castro BMCC, Wilcken CF, Zanuncio JC. 2017 Establishment in the field of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an exotic egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Fla. Entomol.* **100**(2), 372–374. (doi:10.1653/024.100.0237)
8. Souza GK, Pikart TG, Pikart FC, Serrão JE, Wilcken CF, Zanuncio JC. 2012 First record of a native heteropteran preying on the introduced eucalyptus pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Brazil. *Fla. Entomol.* **95**(2), 517–520. (doi:10.1653/024.095.0245)

9. Dias TKR, Wilcken CF, Soliman EP, Barbosa LR, Serrão JE, Zanuncio JC. 2014 Predation of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) by *Atopozelus opsimus* (Hemiptera: Reduviidae) in Brazil. *Isj-Invert. Surviv. J.* **11**(1), 224–227.

10. Dal Pogetto MHFA, Wilcken CF, Christovam RS, Prado EP, Gimenes MJ. 2011 Effect of formulated entomopathogenic fungi on red gum lerp psyllid *Glycaspis brimblecombei*. *J. Forest. Res-Jpn.* **5**(2), 99–106. (doi:10.3923/rjf.2011.99.106)

11. Wilcken CF, Oliveira NC. 2015 Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* Marelli, pp. 779–791. In: Villela EF, Zucchi, RA [eds.], *Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros*. Piracicaba: Fealq.

12. Lorencetti GAT, Potrich M, Mazaro SM, Lozano ER, Barbosa LR, Menezes MJS, Gonçalves TE. 2018 Eficiência de *Beauveria bassiana* Vuill. e *Isaria* sp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Cienc. Florest.* **28**(1), 403–411. (doi:10.5902/1980509831612)

13. Jaronski ST. 2014 Mass production on entomopathogenic fungi: state of the art, p. 357–415. In: Morales-Ramos JA, Rojas MG, Shapiro-Ilan DI [eds], *Mass production of beneficial organisms*. Amsterdam: Elsevier Inc.

14. Li Z, Alves SB, Roberts DW, Fan M, Delalibera Jr. I, Tang J, Lopes RB, Faria M, Rangel DEN. 2010 Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci. Techn.* **20**(2), 117–136. (doi:10.1080/09583150903431665)

15. Lüth P, Eiben U. 2003 Solid-state fermenter and method for solid-state fermentation United States Propytha Biologischer Pflanzenschutz GmbH (Malchow, DE) 6620614. <https://patentimages.storage.googleapis.com/33/5a/c5/332f2e9d923201/US6620614.pdf>. (Last access: 13 September 2018)

16. Bateman R. 2012 Operating Instructions for the MycoHarvester Version 5b. http://www.dropdata.net/mycoharvester/Operating_Instructions_MycoHarvester_Vb.pdf. (Last access: 12 september 2017)
17. Nelder, John A; Wedderburn, Robert W. 1972 Generalized linear models. *JR Stat Soc Series B.* **135**(3), 370–384.
18. Diggle PJ, Heagerty PJ, Liang KY and Zeger SL. 2002 Analysis of Longitudinal Data. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.
19. Gbur EE, Stroup WW, McCarter KS, Durham S, Young LJ, Christman M, West M, Kramer M. 2012 Analysis of Generalized Linear Mixed Models in the Agricultural and Natural Resources Science. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, and Crop Science Society of America, Inc., Wisconsin.
20. Westfall PH, Tobias RD, Rom D, Wolfinger RD, Hochberg, Y. 1999 Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System. Carolina do Norte: SAS Institute Inc.
21. Prakash GVSB, Padmaja V, Kiran RRS. 2008 Statistical, optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technol.* **99**(6), 1530–1537. (doi:10.1016/j.biortech.2007.04.031)
22. Barra-Bucarei L, Vergara P, Cortes A. 2016 Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 in different substrates. *Chil. J. Agr. Res.* **76**(4), 448–454. (doi:10.4067/S0718-58392016000400008)
23. van Breukelen FR, Haemers S, Wijffels RH, Rinzema A. 2011 Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem.* **46**(3), 751–757. (doi: 10.1016/j.procbio.2010.11.023)

24. Liu H, Wang P, Hu Y, Zhao G, Liu H, Li Z, Wu H, Wang L, Zheng Z. 2015 Optimised fermentation conditions and improved collection efficiency using dual cyclone equipment to enhance fungal conidia production. *Biocontrol. Sci. Techn.* **25**(9), 1011–1023. (doi:10.1080/09583157.2015.1025701)

25. Jaronski ST, Jackson MA. 2012 Mass production of entomopathogenic Hypocreales, p. 255-284 *In*: Lacey, LA [ed.], *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. 2nd ed. New York: Academic Press.

26. Bateman R. 2003 The 'Mycoharvester': Cleaning up locust control. *International Pest Control*. **45**(2):76–77.

27. Bateman R. 2007 Production Processes for Anamorphic Fungi. IPARC, Silwood Park, Ascot, Berks. http://www.dropdata.net/mycoharvester/Mass_production.PDF. (Last access: 4 august 2018)

28. Mascarin GM, Duarte VS, Brandão MM, Delalibera JR I. 2012 Natural occurrence of *Zoopththora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) an invasive pest recently found in Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* **110**(3), 401–404. (doi:10.1016 / j.jip.2012.03.025)

29. Lorencetti GAT, Potrich M, Mazaro SM, Lozano ER, Gonçalves TE, Dellacort S. 2017 Ocorrência espontânea de *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill. 1912 (Ascomycetes: Clavicipitaceae) sobre *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Cienc. Florest.* **27**(4), 1403–1407. (doi:10.5902/1980509830222)

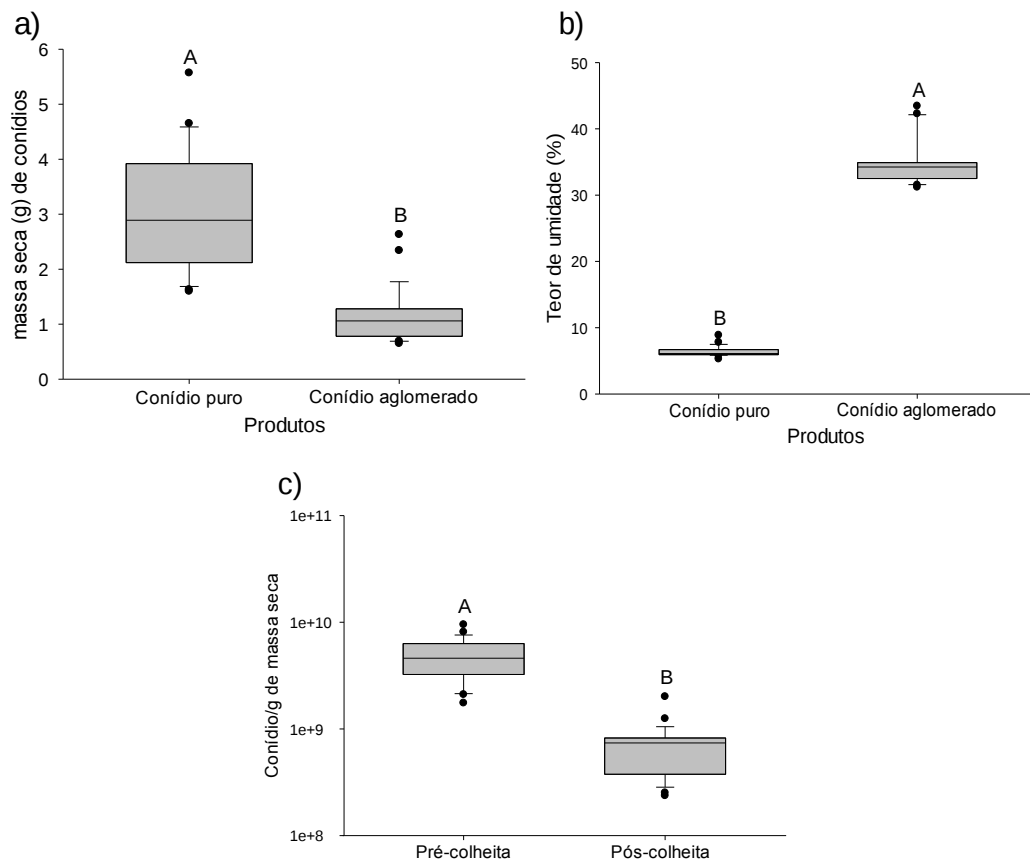


Figura 1. Avaliação da colheita de conídios com o sistema Mycoharvester®. a: Massa seca (g) de conídios puros e aglomerada em 150g de substrato colonizado ($P < 0,0001$). b: teor de umidade dos conídios e aglomerados puros de *Metarhizium anisopliae* após a colheita do material ($P < 0,0001$). c: desempenho de Mycoharvester® versão 5b na colheita de conídios de *Metarhizium anisopliae*: comparação do substrato + fungo antes e após o procedimento de colheita ($P < 0,0001$). As médias seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey-Kramer ao nível de significância de 5%.



Figura 2. Sistema Mycoharvester®. Equipamento Mycoharvester®, versão 5b (a); substrato colonizado por *Metarhizium anisopliae* antes (b) e após a colheita (c); conídios puros de *Metarhizium anisopliae* (d).

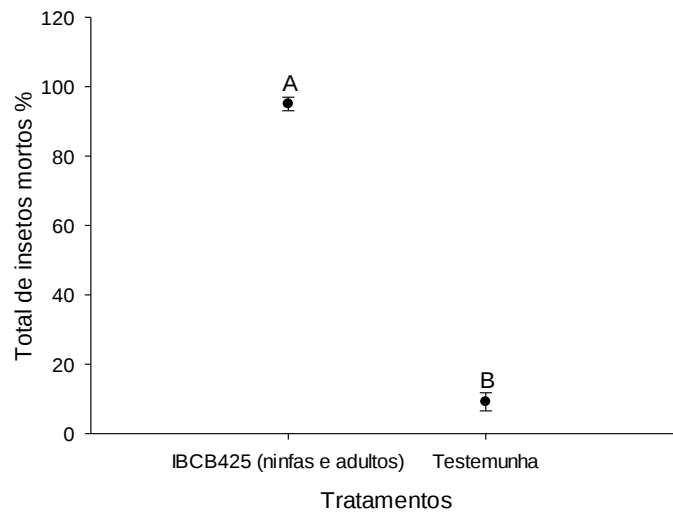


Figura 3. Patogenicidade dos conídios puros de *Metarhizium anisopliae* para ninfas e adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) após sete dias de aplicação ($P < 0,0001$). Os meios seguidos por letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey-Kramer ao nível de significância de 5%.

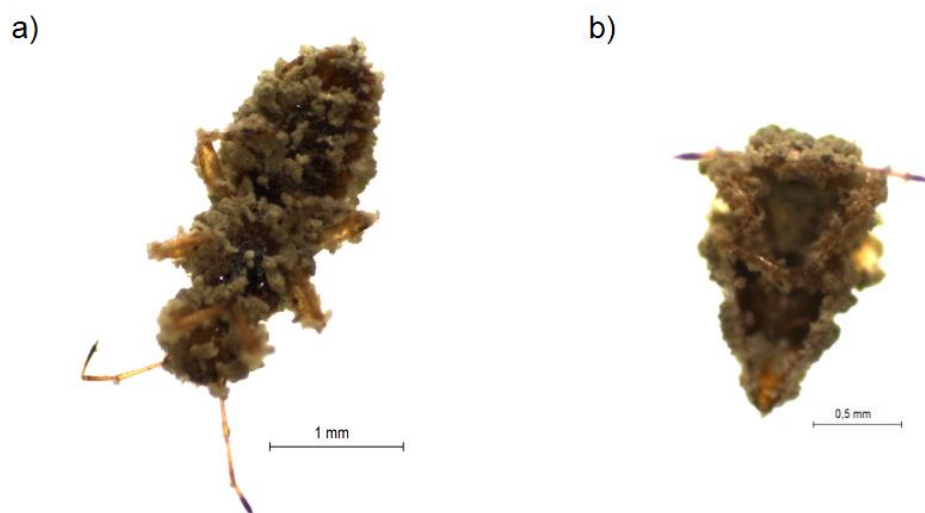


Figura 4. Colonização do fungo. Adulto (a) e ninfa (b) *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) colonizados por *Metarhizium anisopliae*

CAPÍTULO 5
AERAÇÃO FORÇADA EM BIORREATOR DURANTE A PRODUÇÃO DE
***Metarhizium anisopliae* PODE MELHORAR A QUALIDADE DE COLHEITA E**
AUMENTAR DA ESTABILIDADE DO PRODUTO FINAL?

Revista: Scientific Reports

RESUMO

Micopesticidas à base de conídios podem perder a eficiência, rapidamente, se não forem armazenados a baixas temperaturas. Esses produtos devem ser armazenados em condições ideais e muitos usuários não tem instalações refrigeradas nos armazéns para grandes quantidades. Isto aumenta a importância de estudos de estabilidade de fungos entomopatogênicos, visando buscar métodos seguros e de fácil acesso. O objetivo desse trabalho foi investigar efeitos de diferentes períodos de aeração forçada, durante a fermentação de *Metarhizium anisopliae* em biorreator de fermentação em estado sólido, visando melhorar a colheita a uma maior estabilidade de conídios puros armazenados a 25 °C. Três tratamentos foram utilizados como os períodos de 0, três e sete dias de aeração forçada após 12 dias de fermentação. O melhor resultado foi com o período de sete dias de aeração forçada, obtendo-se um teor de água de 18,95% do substrato, aproximadamente, de 6% do conídio puro e, além disso, esse período foi essencial para aumentar a colheita e a estabilidade de conídios puros. Métodos de secagem são, portanto, essenciais para uma maior estabilidade e qualidade dos conídios produzidos em fermentação em estado sólido.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos, aeração forçada, método de secagem, qualidade de colheita, aumento do tempo de prateleira de conídios

ABSTRACT

Conidia-based micropesticides can quickly lose its efficiency if is not stored at low temperatures. These products should be stored in ideal condition and many users do not have refrigerated facilities in the warehouses for large quantities. This increases the importance of stability studies of entomopathogenic fungi, aiming at safe and easily accessible methods. The objective of this work was to investigate the effects of different periods of forced aeration during the fermentation of *Metarhizium anisopliae* in a solid state fermentation bioreactor, aiming at improved harvesting and higher stability of pure conidia stored at 25 ° C. Three treatments were used as the 0, three and seven days of forced aeration after 12 days of fermentation. The best result was with the seven days of forced aeration, obtaining a moisture content of approximately 18.95% of the substrate of 6% of the pure conidium and, in addition, this period was essential to increase the harvest and the stability of pure conidia. Drying methods are therefore essential for a higher stability and quality of the conidia produced in solid state fermentation.

Key words: entomopathogenic fungi, forced aeration, drying method, harvest quality, increased shelf life of conidia

5.1 Introdução

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) é amplamente utilizado como agente de controle biológico para muitos insetos-praga¹. Esse fungo tem sido multiplicado, principalmente, em fermentação em estado sólido (FES) na maioria dos programas de controle biológico, sendo o conídio a principal estrutura produzida².

O conídio aéreo é o principal propágulo infeccioso produzido pelo fungo, sendo a forma mais prática para fim de aplicação, pois, na natureza são produzidos naturalmente na superfície dos insetos³. Esse propágulo deve ser mantido em estágio infeccioso, porém inativo, seguro e fácil de ser aplicado; dessa forma, um micopesticida à base de conídios pode ter sucesso no controle biológico⁴. Além disso, os custos para o usuário final e um longo prazo de validade do propágulo na prateleira são essenciais para o sucesso de um biopesticida⁵. Portanto, a sobrevivência do conídio depende em mitigar sua germinação precoce, reduzindo-se o metabolismo do fungo com a desidratação a um grau de umidade < 9% ou <5%^{6,7,8,9}, pois a umidade é um fator limitante para o processo de germinação desses microrganismos¹⁰.

O objetivo foi avaliar os efeitos de diferentes períodos de aeração forçada durante a fermentação de *M. anisopliae* em biorreator de FES visando à obtenção de uma melhor qualidade de colheita dos conídios e um maior período de armazenamento do fungo não formulado.

5.2 Resultados

Produção e colheita do fungo versus tempos de secagem. O tempo de secagem de sete dias reduziu a produção de conídios comparado aos demais tempos. A produção média de conídios para os tempos de secagem 0, três e sete dias foi de $3,7 \times 10^9 \pm 9,1 \times 10^8$, $4,0 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^9$ e $3,0 \times 10^9 \pm 8,4 \times 10^8$ conídios/g de massa seca, respectivamente (Figura 1). A colheita diferiu entre os momentos de contagem pré e pós colheita, $6,5 \times 10^9 \pm 4,0 \times 10^8$ e $6,4 \times 10^8 \pm 5,7 \times 10^7$ conídios/g de massa seca, ou seja o Mycoharvester® colhe significativa quantidade de conídios do substrato. Os dados da colheita entre os tempos de secagem foram semelhantes e, por isso, os dados foram agrupados (Figura 2). O rendimento em gramas de conídios puros foi maior no tempo de secagem de sete

dias que o dos demais tempos ($P>0,05$), pois a comparação entre sete e 0 dias foi de $P=0,0020$, e sete e três dias foi de $P=0,0002$, não havendo diferença estatística entre 0 e três dias com $P=0,8022$. O rendimento médio de conídios puros para os tempos de secagem 0, três e sete dias foi de $2,89 \pm 0,33\text{g}$, $2,63 \pm 0,34\text{g}$ e $4,49 \pm 0,15\text{g}$, respectivamente (Figura 3 – a). O rendimento médio dos conídios aglomerados foi de $1,27 \pm 0,29\text{g}$, $1,01 \pm 0,24\text{g}$ e $0,43 \pm 0,06\text{g}$ com os tempos de secagem de 0, três e sete dias, respectivamente, sendo o menor rendimento com sete dias (Figura 3 – b). O número de conídios por grama foi semelhante entre os três tempos de secagem, para conídios puros com aproximadamente $6,0 \times 10^{10}$ conídios/g de conídios puros (Figura 4 – a). Também não houve diferença significativa entre os três tempos de secagem dos conídios aglomerados (Figura 4 – b) sendo de aproximadamente $1,6 \times 10^{10}$ conídios/g de conídios aglomerados.

Grau de umidade dos diferentes produtos obtidos.

O grau médio de umidade do substrato variou significativamente, com maior valor nos tempos de 0 e três dias, $56,8 \pm 0,68\%$ e $50,95 \pm 1,6\%$, respectivamente. O grau médio de umidade com sete dias de secagem foi de $18,95 \pm 2,47\%$ (Figura 5 – a). Já o conídio puro apresentou um grau de umidade com pouca variação, mas diferiu entre os tempos de secagem, com maior valor com sete dias, $6,05 \pm 0,19\%$, que com 0 e três dias, $5,47 \pm 0,17\%$ e $5,01 \pm 0,18\%$, respectivamente (Figura 5 – b). Entretanto, o teor de umidade do conídio aglomerado foi significativamente menor com sete dias de secagem, $8,3 \pm 0,52\%$, seguido pelos três e 0 dias, $21,21 \pm 2,69\%$ e $30,57 \pm 2,75\%$, respectivamente (Figura 10 – c). O produto final, conídio puro, teve umidade final de 5 a 6%, o qual foi obtido com o Mycoharvester®.

Controle de qualidade: “Shelf-life”.

O processo de secagem influenciou a estabilidade em semanas do produto obtido (conídio puro), com maior sobrevivência do produto não formulado armazenado a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ com o tempo de secagem de sete dias. A aeração forçada para a secagem do material após o 12º dia de fermentação e durante 0, três e sete dias de operação manteve uma viabilidade média de $27,92 \pm 2,85\%$, $34,98 \pm 2,90\%$ e $80,9 \pm 1,21\%$, respectivamente, e com germinação na décima semana de 0%, 0% e $50,89 \pm 0,7\%$, respectivamente (Figura 6). A germinação dos conídios, após o processo de fermentação e secagem, não diferiu entre os métodos (Figura 6). O método de secagem por aeração forçada aumentou

a estabilidade do fungo que mesmo após 10 semanas de armazenamento a 25°C apresentou aproximadamente 51% de viabilidade quando secos durante 7 dias.

5.3 Discussão

A redução no rendimento de conídios com a secagem por sete dias, valor de $3,0 \times 10^9 \pm 8,4 \times 10^8$ conídio/g de massa seca de substrato + fungo, não baixo, por ser semelhante as produções massais de *M. anisopliae* em grãos de arroz, $1,5 \times 10^9$ conídios/g no projeto LUBILOSA¹¹. Entretanto, a otimização de parâmetros como, umidade, pH, nitrogênio aumenta o rendimento de, até, $6,2 \times 10^{10}$ conídios/g de arroz como substrato¹². Esses autores utilizaram o saco plástico como biorreator para produção dos fungos, porém, biorreatores de coluna com leito fixo e aeração forçada, com melhores condições para microrganismos, tornam possível um aumento de até 70,6% da produção comparado ao uso de sacos plásticos¹³. A aeração forçada não aumenta a esporulação de *M. anisopliae*, entretanto, excessivamente pode reduzir a esporulação para a produção do fungo, que foi melhor com umidade do substrato de 57-58%¹⁴. A aeração forçada de 2 L/min^{-1} não afetou o período de crescimento do fungo, pois o grau de umidade inicial do substrato era de $47,0 \pm 2\%$ e a duração do processo de crescimento dos fungos, geralmente, varia de sete a 14 dias⁶. Entretanto, valores diferentes foram registrados para a umidade, com 22,34%, 73,21% e 75,68% relatadas como as melhores para a esporulação de *M. anisopliae* em arroz, sorgo e cevada, respectivamente¹². Portanto, a modificação de um biorreator visando à otimização da produção deve-se levar em conta fatores como desenvolvimento do fungo, produção de propágulos infectivos e o excesso de aeração para não prejudicar a qualidade do produto final. O Mycoharvester® remove os conídios do substrato, mas com quantidade residual no substrato, isso mostra a necessidade de se melhorar este aspecto. Métodos de colheita de fungos como peneiramento, agitação mecânica e uso de coletores a ar foram revisados^{3,6,15}, mas o mais sofisticado, o Mycoharvester® com tecnologia dual ciclone, foi considerado o melhor na colheita de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, seguido de peneiramento e lavagem com Tween® 0,02%. Além disso, os métodos mais simples de colheita, como o peneiramento, são demorados e produzem muita poeira, logo não são tão eficazes para remover os conídios do substrato¹⁵. Além disso, uma distribuição homeogênea de alta qualidade no tamanho de partículas é essencial para o sucesso de uma formulação, e pode ser conseguido com o

Mycoharvester®⁷. O residual de conídios no substrato poderia ser destinado a outros tipos de formulações, como granuladas, pois produtos técnicos que envolvem a trituração do fungo e o substrato poderiam causar problemas na pulverização do produto, no caso das formulações líquidas (D. Stephan, informação pessoal). Portanto, a facilidade em separação de partículas oferecida pelo Mycoharvester® pode colaborar com a qualidade do produto final. A melhoria na colheita dos conídios em gramas pelo processo de secagem, com rendimento médio na secagem por sete dias, 4,49g/150g de substrato, se assemelha ao rendimento de conídios puros de *M. anisopliae*, aproximadamente 5g/150g de substrato, colhido com o Mycoharvester® em um sistema de produção com umidade do substrato de 15,5%¹⁶. Além disso, a redução da massa em gramas dos conídios aglomerados torna a secagem durante sete dias, ainda, mais relevante, pois esse tipo de produto, com aglomerações de conídios e resíduos de micélio e substrato, seria inadequado para a formulação dos biopesticidas. A separação de conídios com o Mycoharvester® elimina partículas com tamanhos >100 µm e as maiores que isto poderiam bloquear os pulverizadores¹⁵. A distribuição de tamanho de partículas detectou uma maior densidade de gotas de 100µm em aplicações a ultra-baixo volume (UBV) com equipamento Ulva+®, enquanto partículas na formulação do Green Muscle® (*Metarhizium anisopliae*) tiveram uma maior distribuição de tamanho de partículas de aproximadamente 5µm¹⁷. Partículas menores são melhor acomodadas nas gotas para atingir o alvo. O número de $6,0 \times 10^{10}$ conídios/g de conídio puro é ideal, pois conídios puros e secos de *Metarhizium* spp. podem ter de $5-6,0 \times 10^{10}$ conídios/g³. O período de sete dias, necessário para secar o substrato colonizado por *M. anisopliae* (IBCB425) a uma umidade final de 18,95% é longo pois, geralmente, os substratos sólidos colonizados por *B. bassiana* secam rapidamente, 2-3 dias, mas *Metarhizium* spp. demoram mais de 5 dias³. O uso de sacos de papel Kraft para secar os fungos reduz as chances de contaminações e a instalação de climatizadores e desumidificadores industriais pode ser uma opção para a secagem de grandes quantidades de substrato colonizado por fungos⁷. Todavia, métodos de secagem em salas não são estéreis e podem haver contaminações do material e o fungo que está secando pode contaminar o ar do ambiente. Além disso, o fungo tem um período para secar adequadamente e isto dever ser respeitado, pois a velocidade de secagem do substrato (arroz) colonizado por *Metarhizium flavoviride* pode influenciar a longevidade dos conídios¹⁸. A secagem mais rápida do arroz colonizado em

bandejas dispostas em gabinete com aeração forçada durante 16 h e durante cinco dias, com umidade relativa de 10-12% e 45-75% respectivamente, reduziu, mais rapidamente, a umidade relativa do substrato de 40 a 43% para 15 a 22%, e o método mais lento para 27 a 32%, porém a germinação dos conídios foi menor para o método mais rápido de secagem¹⁸. Métodos de secagem por temperatura do substrato colonizado por *B. bassiana* podem reduzir contaminações por bactérias, mas a exposição do material a altas temperaturas e por longos períodos, 35 °C e > 9h, podem reduzir a germinação do fungo para 9,3%¹⁹. O grau de umidade do conídio no processo final de colheita entre 5 a 6% é satisfatório para armazenamento e formulação, pois após a colheita, os conídios devem ter umidade menor que 9 ou 5% para permitir períodos maiores de prateleira^{7,6,9}. Entretanto, propágulos infectivos secos quando imersos em água para a reidratação rápida podem ter graves danos às membranas plasmáticas, os quais são, geralmente, letais em organismos unicelulares²⁰. Isto ocorreu para conídios secos de *M. anisopliae* suspensos em água a 0,5 °C e 33 °C com taxas de germinação de 0,9% e 94%, respectivamente, quando reidratados, mostrando a importância de cuidados durante a reidratação. A viabilidade dos conídios após 10 semanas de armazenamento a 25 °C confirma a necessidade de adoção de métodos de secagem durante a fermentação de *M. anisopliae* (IBCB425), necessário para o sucesso controle biológico de insetos. Além disso, deve ser considerado o estudo de técnicas que aumentem ainda mais a sobrevivência desses conídios. A identificação de fatores que afetam a longevidade dos conídios durante a produção e manuseio pós-colheita é vital para o sucesso dos fungos entomopatogênicos^{21,18}. A umidade relativa do conídio está relacionada com sua capacidade de germinação durante períodos de armazenamento, e umidades relativas de 2,5% a 6,2% foram ideais para a alta germinação de conídios de *M. flavoviride* a 50°C²². Altas temperaturas podem reduzir a estabilidade dos conídios e, por isto, formulações oleosas podem proteger os conídios de *M. flavoviride* a altas temperaturas. Além disso, a sílica gel nas formulações pode garantir uma estabilidade, ainda maior após uma exposição de cinco horas a 60 °C²¹. O armazenamento de conídios a baixas temperaturas em refrigeradores mantém a viabilidade do fungo por mais de dois anos⁸, entretanto, a adoção de grandes instalações refrigeradas em armazéns pode ser um fator limitante para muitos usuários. A viabilidade dos conídios puros não formulados após 10 semanas de armazenamento, aproximadamente 51%, pode ser melhorada

com métodos de formulação de produtos como aquecimento, liofilização e secagem por pulverização e leito fluidizado (“Spray” e “Fluid Bed Dryer”), os quais foram estudados para a preservação de *Beauveria brongniartii* e *M. anisopliae*. A maior tolerância *M. anisopliae* a temperatura em intervalos de exposição e valores crescentes comparado a *B. brongniartii*, mostraram que 30 segundos de exposição resultaram em taxas de viabilidade de 97 e 0%, respectivamente. O processo de secagem por pulverização reduziu a germinação dos fungos, à medida que o ar de entrada aumentou. Além disso, *B. brongniartii* e *M. anisopliae* sobreviveram ao congelamento a -80 °C e descongelamento a temperaturas ambientes com taxas de germinação de 91 e 92%, respectivamente. Entretanto, o processo de liofilização causou a morte de 30 e 91% dos conídios de *B. brongniartii* e *M. anisopliae*, respectivamente, e a secagem por leito fluidizado reduziu a germinação desses fungos de 16 e 4%, respectivamente, mostrando a necessidade da adição de agentes protetores nas formulações para uma maior viabilidade dos fungos⁴. A adição de leite em pó desnatado (10 ou 20%) garantiu uma viabilidade de 88% de esporos submersos de *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *B. bassiana* e *Cordyceps fumosorosea* após o processo de secagem por pulverização²³. Outras técnicas podem ser exploradas, como técnicas de encapsulamento que podem aumentar a vida útil de conídios de *Metarhizium brunneum*, onde conídios não encapsulados caíram de 10^7 UFC para $4,4 \times 10^3$ UFC após 6 meses de armazenamento a 25 °C, além disso a viabilidade de conídios encapsulados e embalados em sacos lacrados de alumínio foi doze vezes maior a 5 °C e seis vezes maior a 25 °C que os conídios formulados e não embalados²⁴. O encapsulamento de *M. anisopliae* (IBCB425) com polímeros biodegradáveis manteve a viabilidade dos conídios desse fungo próxima de 100% por 12 meses a 25 °C²⁵. Outra técnica pode ser o uso de embalagens de atmosfera modificada que preservou 71% de viabilidade dos conídios de *B. bassiana* a 40 °C por 16 meses²⁶. Esta tecnologia, para a embalagem de blastosporos de *B. bassiana*, foi essencial para preservar a viabilidade do fungo que armazenado a 4 °C em comparação com 28 °C praticamente não apresentou perda de viabilidade por mais de seis meses, independentemente do método de secagem²⁷. Fatores que influenciam a perda da viabilidade de agentes biológicos devem ser estudados no desenvolvimento de produtos biológicos. A alta umidade remanescente no substrato prejudica os conídios que serão armazenados, os quais devem ser secos em

sistema estéril de fermentação durante sete dias para manter a qualidade necessária no momento da formulação e armazenamento do produto final.

5.4 Métodos

Informações gerais e local.

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) (IBCB425) obtido de amostras de solo da Mata Atlântica no município de Iporanga, Estado de São Paulo, Brasil, e depositado na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal em Campinas, São Paulo, Brasil, foi utilizado para os experimentos. A produção do fungo e os experimentos de colheita foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, Instituto de Controle Biológico, Instituto Federal Julius Kühn, Darmstadt, Hessen, Alemanha. Os experimentos tiveram três tratamentos com duas repetições e foram repetidos três vezes nas mesmas condições.

Preparação de Inóculo.

Uma pré-cultura fúngica foi preparada em meio líquido Samsinakova adaptado (Glucose 25,0 g L [Merck KGaA, Alemanha], 20,0 g L “corn steep solid” [Sigma, Alemanha], 15,0 g L de cloreto de sódio [Merck KGaA, Alemanha]. Frascos Erlenmeyer de 100 mL foram preenchidos com 50 mL do meio de cultura com auxílio de um dosador e, em seguida o material foi esterilizado a 121 °C, durante 20 minutos em autoclave [Tuttnauer autoclave 5075EL - esterilizador a vapor, Holanda]. Em seguida, 1 mL de uma suspensão do isolado IBCB425 de culturas de 14 dias de idade, crescidas em meio de cultura MPA na concentração $1,0 \times 10^7$ conídios/mL, previamente contados em hemocitômetro (Thoma) com auxílio de um microscópio óptico [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha] foi utilizada para a inoculação em cada repetição (frasco Erlenmeyer). Posteriormente, os frascos Erlenmeyers foram colocados em uma incubadora tipo shaker [Multitron, Infors HT, Suíça] a 25 °C, 150 rpm para crescimento de fungos durante 72 horas.

Processo de fermentação.

O “JKI-Fermenter System” (JKI-SFs) consistia em frascos de boca larga Schott Duran (1000 mL) com duas conexões fixas na parte inferior, uma para drenagem e outra para aeração acoplada a um sistema de

filtragem para evitar possíveis contaminação durante o processo de fermentação. Além disso, as unidades de fermentação contavam com uma saída de exaustão na tampa dos frascos. O biorreator foi construído dentro de uma incubadora B.O.D. para controle de temperatura. Um sistema de aeração forçada (ar úmido) foi instalado na incubadora B.O.D. e este foi conectado ao JKI-SFs. O ar foi submetido à passagem em um recipiente contendo água deionizada antes que alimentasse o fermentador para aumentar sua umidade. A instalação do sistema de aeração forçada foi realizada através de uma adaptação do “JKI-Fermenter System” (JKI-SFs), onde foi instalado um conector com bifurcação na conexão de drenagem do biorreator. Essa conexão foi composta por uma entrada de ar acoplada a um sistema de filtragem e permaneceu fechada até o momento que o segundo sistema de ar foi ativado (Figura 1). Após os 12 dias de fermentação o recipiente que umedecia o ar teve a água deionizada esgotada. As unidades do JKI-SFs foram preenchidas com 200 g de substrato nutricional (160g de arroz parboilizado + 40g de cevada (4:1), fervidos por 5 min em 500 mL de água deionizada) com teor de umidade de $47,0 \pm 2\%$ para produção de fungos. Além disso, 100 g de argila granulada Seramis® foram colocados no fundo dos frascos em todos os tratamentos separado a partir da camada de matriz por um papel de filtro ($\varnothing$ 85 milímetros). Os fermentadores inteiros foram, subsequentemente, autoclavados durante 20 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada fermentador foi preenchido com água deionizada esterilizada com todo o substrato coberto para a inoculação. Em seguida, 5 mL da pré-cultura de 72 horas foram pipetados sobre a água que cobria o substrato. Após isso, a biomassa foi suspensa agitando-se, ligeiramente, o frasco e a água descarregada, lentamente, pelo tubo de drenagem, enquanto a biomassa cobria a superfície do substrato e a inoculação era completada. Após 12 dias de fermentação a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e taxa de aeração de $0,5\text{ L/min}^{-1}$, os fermentadores, que compuseram o tratamento controle, foram colhidos. Em seguida, o sistema de aeração forçada foi acionado a uma taxa de aeração de $2,0\text{ L/min}^{-1}$, com a segunda conexão de ar, também, estava em operação (Figura 7). As colheitas foram realizadas em diferentes momentos após 12 dias de fermentação, sendo o controle colhido sem processo de secagem; o tratamento 1 e 2 com 3 e 7 dias de secagem, respectivamente. Isto foi realizado para avaliar o potencial de secagem do sistema e as consequências deste para o produto final. Todos os tratamentos foram avaliados para designar os conídios formados por g de massa seca após a fermentação e, após a colheita com o Mycoharvester®

[Mycoharvester Company, UK], 25 g do substrato foram lavados com 225 mL de Tween 80® (0,1%). A suspensão foi agitada durante 10 min num agitador recíproco para individualizar os conídios. Em seguida, a concentração de conídios foi atribuída por hemocítômetro (Thoma) com auxílio de microscópio óptico [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha]. Essa informação permitiu se relacionar a concentração de conídios com a matéria seca como uma quantidade comparável.

Colheita dos conídios. O equipamento Mycoharvester® separa conídios puros e aglomerados a partir de substratos colonizados por fungos utilizando tecnologia de ciclone duplo (Batman, 2012). Um total de 150 g do substrato + fungo, por tratamento e repetição, foi colocado dentro do Mycoharvester® para a colheita dos conídios. O peso de conídios (gramas), o número de conídios por grama e a porcentagem de umidade dos produtos foram obtidos para se avaliar a qualidade de colheita. Os conídios foram contados a partir do substrato antes e depois desse processo, para quantificar o material que poderia ser perdido pelo sistema de acordo com o que foi descrito no item de processo de fermentação. A designação do número de conídios por grama foi obtida com 0,1 g de conídio puro e aglomerado que foram colocados em Tween 80® (0,1%) e posteriormente contados em hemocítômetro (Thoma) com auxílio de microscópio óptico.

Controle de qualidade: “Shelf-life”. A germinação de esporos foi adotada como finalidade de avaliar o “shelf life” das amostras obtidas. O material colhido (conídio puro) foi separado em alíquotas de 0,1 g em tubos Eppendorf 2 mL fechados e colocados em placas de Petri seladas com parafilme. Este material foi armazenado em incubadoras a 25 °C durante 10 semanas, e a germinação dos conídios avaliadas semanalmente. Para isso, 100 µL de uma suspensão conidial ($1,0 \times 10^7$ conídios/mL) com Tween 80® (0,1%) de cada amostra foram espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski na superfície do meio de cultura MPA (extrato de malte 30 g/L [Merck KGaA, Alemanha], peptona de soja 5 g/L [Merck KGaA, Alemanha], Agar 18 g/L Roth, Alemanha) em placas de Petri (90-15mm). Três pedaços de meio de cultura em formato quadrado medindo aproximadamente 4 cm² com auxílio de um bisturi foram retirados para a avaliação após 24 horas da inoculação e colocados em lâmina microscópica e coberto com microscópio slide, depois cada amostra foi avaliada em microscópio óptico. Os conídios com ou sem o

tubo germinativo foram contados com auxílio de um contador automático e, para isto, a soma dessas variáveis deve ser igual a 100. Foram realizadas 6 repetições e contados 600 conídios por tratamento, e o experimento foi repetido 3 vezes nas mesmas condições, porém, em diferentes momentos e com diferentes lotes do fungo.

Análise estatística. Na eficiência de colheita, para análise estatística da contagem de esporos por grama, considerando como fatores tempo de secagem e momento, considerando os blocos como covariável, foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição binomial negativa e função de ligação logarítmica. A análise estatística da eficiência de secagem foi com base na umidade relativa no substrato em percentual, na umidade relativa do conídio puro e do conídio aglomerado em percentual, na massa em gramas do conídio puro e conídio aglomerado, no total de conídios/g de conídio puro e conídio aglomerado, considerando como fator o tempo de secagem e os blocos como covariáveis, foram ajustados modelos lineares generalizados com distribuição gama e função de ligação logarítmica. Na avaliação de “shelf-life”, para análise estatística da germinação em percentual, considerando como fatores tempo de secagem e tempo em semanas como covariável, foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição gama e função de ligação logarítmica. Foi utilizado o procedimento *genmod* (do Programa estatístico SAS – *Free Statistical Statistical Software*, SAS *University Edition* e para comparações entre tratamentos foi utilizado foi o teste de Tukey-Kramer²⁸. Os gráficos foram plotados com o software SigmaPlot 12.0.

Referências

1. Li, Z., Alves, S. B., Roberts, D. W., Fan, M., Delalibera Jr, I., Tang, J., Lopes, R. B., Faria, M. & Rangel, D. E. N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci Techn* **20**(2), 117-136. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150903431665> (2010).
2. Moura Mascarin, G., Biaggioni Lopes, R., Delalibera Jr, I., Kort Kamp Fernandes, E., Luz, C. & Faria, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J*

Invertebr Pathol **S0022-2011**(17), 30365-30368.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001> (2018).

3. Jaronski, S. T. & Jackson, M. A. Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology 2^a ed.* 255-284 (Academic Press, New York, 2012).
4. Horaczek, A. & Viernstein, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biol Control* **31**, 65-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.04.016> (2004).
5. Jackson, M. A., Dunlap, C. A. & Jaronski, S.T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol* **55**, 129-145. <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-009-9240-y> (2010).
6. Jaronski, S. T. Mass production on entomopathogenic fungi: state of the art. In: *Mass production of beneficial organisms* 357–415 (Elsevier Inc, Amsterdam) (2014).
7. Bateman, R. Production Processes for Anamorphic Fungi. IPARC, Silwood Park, Ascot, Berks, http://www.dropdata.net/mycoharvester/Mass_production.PDF (2007).
8. Blanford, S., Jenkins, N. E., Christian, R., Chan, B. H. K., Nardini, L., Osae, M., Koekemoer, L., Coetzee, M., Read, A. F. & Thomas, M. B. Storage and persistence of a candidate fungal biopesticide for use against adult malaria vectors. *Malar J* **11**, 354. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-354> (2012).
9. Jaronski, S. T. & Mascarin, G. M. Mass Production of Fungal Entomopathogens. In *Microbial Control of Insect and Mite Pests* 141–155 (Elsevier Inc, New York) (2017).
10. Zimmermann, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Techn* **17**, 879-920. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150701593963> (2007).

11. Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. J. & Lomer, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Inform* **19**, 21N–31N. <http://cabweb.org/PDF/BNi/Control/BNIRA38.PDF> (1998).
12. Prakash, G. V. S. B., Padmaja, V. & Kiran, R. R. S. Statistical, optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technol* **99**, 1530–1537. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.031> (2008).
13. Méndez-González, F., Loera, O. & Favela-Torres, E. Conidia production of *Metarhizium anisopliae* in bags and packed column bioreactors. *Curr Biotechnol* **5**, 1–5. <http://dx.doi.org/10.2174/2211550105666160926123350> (2017).
14. Arzumanov, T., Jenkins, N. & Roussos, S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochem* **40**, 1037-1042. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.03.013> (2005).
15. Liu, H., Wang, P., Hu, Y., Zhao, G., Liu, H., Li, Z., Wu, H., Wang, L. & Zheng, Z. Optimised fermentation conditions and improved collection efficiency using dual cyclone equipment to enhance fungal conidia production. *Biocontrol Sci and Technol* **25**(9), 1011-1023. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2015.1025701> (2015).
16. Chen, C., Wang, Z., Ye, S. & Feng, M. Synchronous production of conidial powder of several fungal biocontrol agents in series fermentation chamber system. *Afr J Biotechnol* **8**(15), 3649–53. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/61867/49938> (2009).
17. Bateman, R., & Chapple, A. The spray application of mycopesticide formulations. In *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems, and Potential* 289-309 (CABI Publishing, New York) (2001).

18. Hong, T. D., Jenkins, N. E. & Ellis, R. H. The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. Mycol Res **104**, 662-665. <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756299001872> (2000).
19. Li, Z., Lin, J. W., Ma, J. C., Wu, D. & Zhang, Y. J. Influence of different drying temperatures for solid substrate after fermentation on conidia characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Wei Sheng Wu Xue Bao (Acta Microbiologica Sinica) **48**(7), 887-892. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-WSXB200807011.htm (2008).
20. Faria, M., Hajek, A. E. & Wraight, S. P. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. Biol Control **51**, 346-354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.06.012> (2009).
21. McClatchie, G. V., Moore, D., Bateman, R. P. & Prior, C. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. Mycol Res **98**, 749-756. [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81049-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81049-6) (1994).
22. Hong, T. D., Jenkins, N. E., Ellis, R. H. & Moore D. Limits to the negative logarithmic relationship between moisture content and longevity in conidia of *Metarhizium flavoviride*. Ann Bot **81**, 625-630. <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1998.0609> (1998).
23. Stephan, D. & Zimmermann, G. Development of a Spray-drying Technique for Submerged Spores of Entomopathogenic Fungi, Biocontrol Sci Technol **8**(1), 3-11. <http://dx.doi.org/10.1080/09583159830388> (1998).
24. Przyklenk, M., Vemmer, M., Hanitzsch, M. & Patel, A. A bioencapsulation and drying method increases shelf life and efficacy of *Metarhizium brunneum* conidia. J Microencapsul **34**, 498-512. <http://dx.doi.org/10.1080/02652048.2017.1354941> (2017).
25. Wenzel Rodrigues, I. M., Batista Filho, A., Giordano, I. B., Denadae, B. E., Fernandes, J. B., Forim, M. R. Compatibility of polymers to fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their formulated products stability. Acta

Sci Agron **39**(4), 457-464. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v39i4.32903> (2017).

- 26.** Faria, M., Hotchkiss, J. H., Wraight, S. P. Application of modified atmosphere packaging (gas flushing and active packaging) for extending the shelf life of *Beauveria bassiana* conidia at high temperatures. Biol Control **61**, 78-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.008> (2012).
- 27.** Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W. & Delalibera Jr, I. Improved shelf life of *Beauveria bassiana* blastospores by convective drying methods and active packaging. Appl Microbiol Biotech **100**, 8359-8370. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7597-2> (2016).
- 28.** Westfall, P. H., Tobias, R. D., Rom, D., Wolfinger, R. D. & Hochberg, Y. Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System (SAS Institute Inc., Carolina do Norte)(1999).

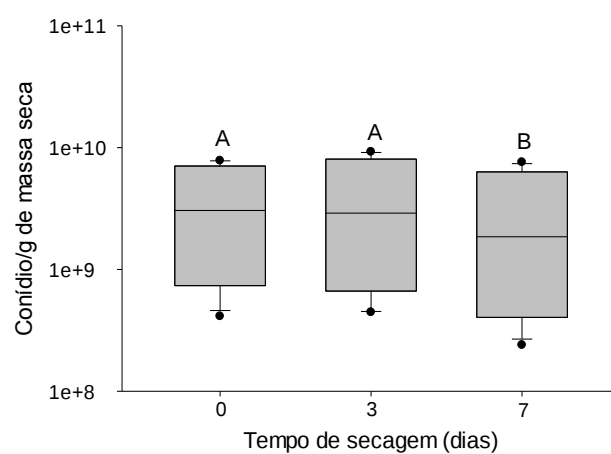


Figura 1. Produção de *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) por fermentação sólida sob diferentes tempos de aeração forçada

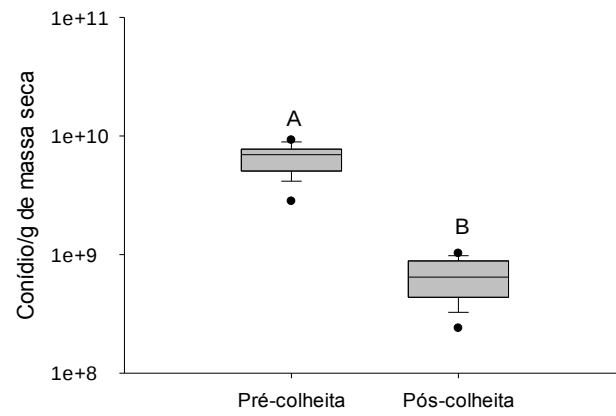


Figura 2. Concentração de conídios de *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) formados por g de massa seca antes e depois de ser colhido pelo Mycoharvester®

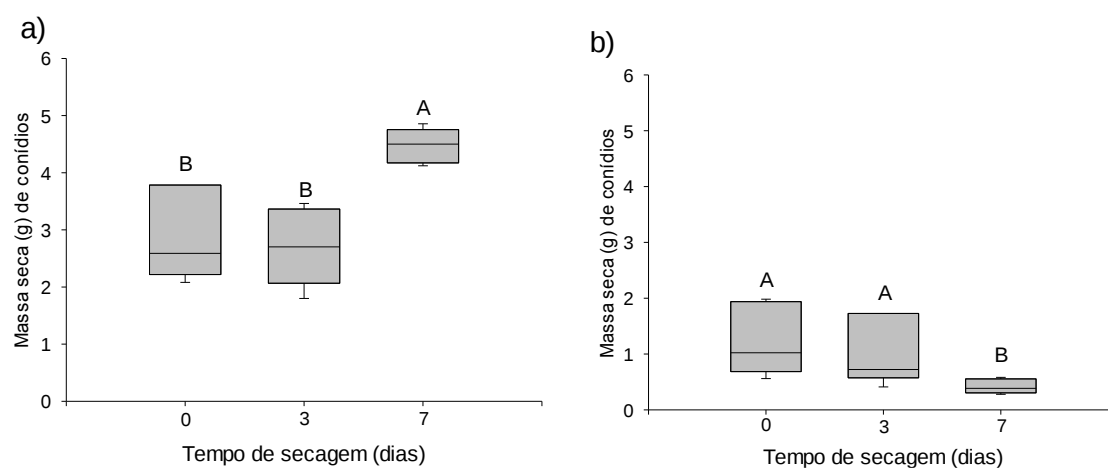


Figura 3. Rendimento de conídios puros (a) e aglomerados (b) separados pelo Mycoharvester®

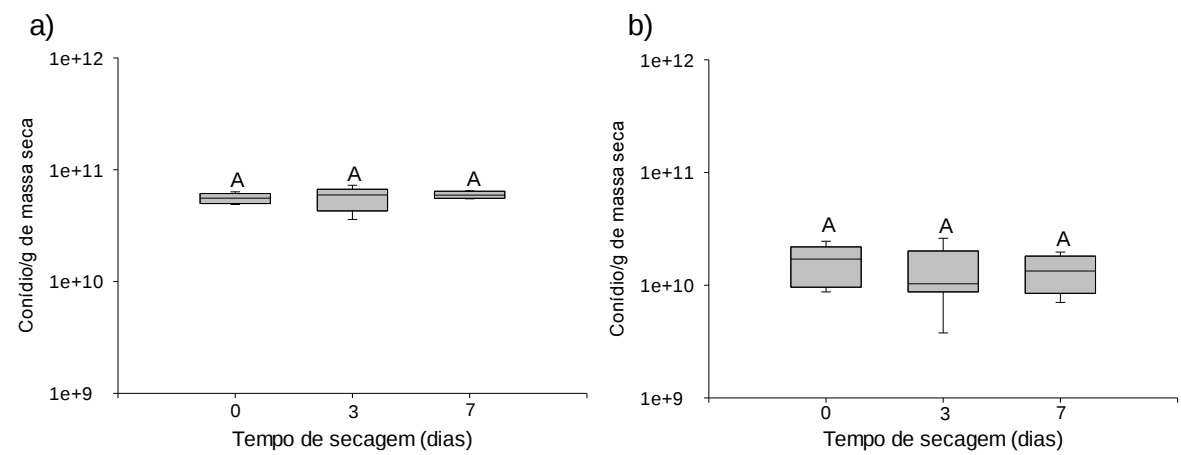


Figura 4. Concentração de conídios puros/g (a) e aglomerados/g (b) de massa seca

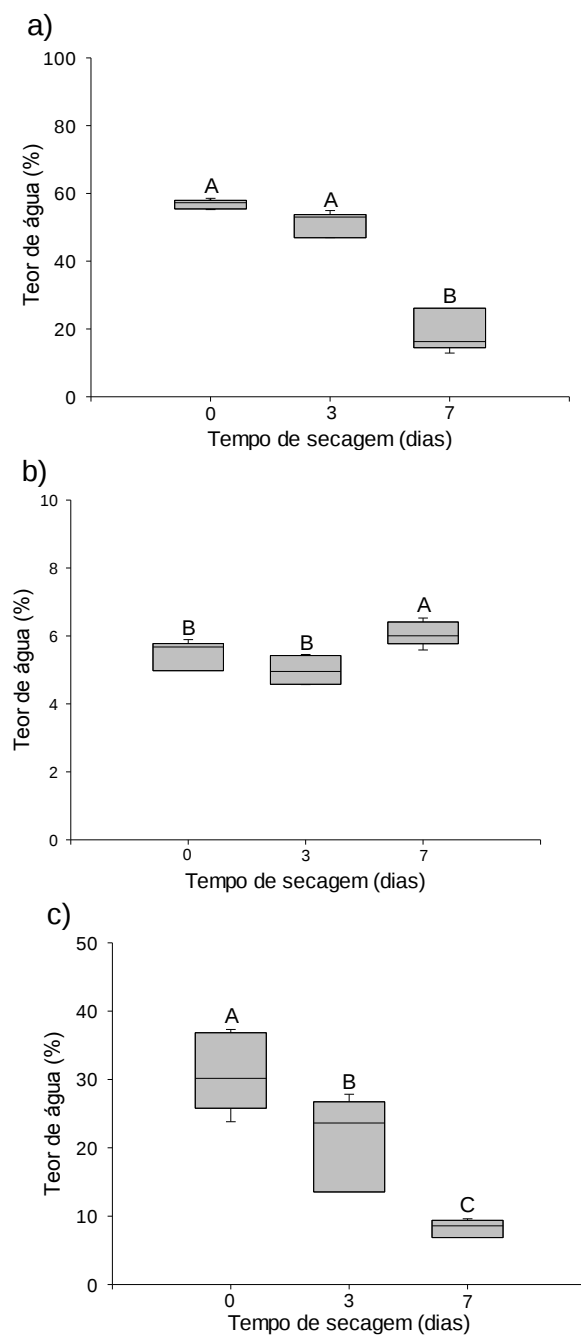


Figura 5. Teor médio de água (%) do substrato + fungo (a), conídio puro (b) e conídio aglomerado (c) ao final da fermentação sob diferentes tempos de aeração forçada

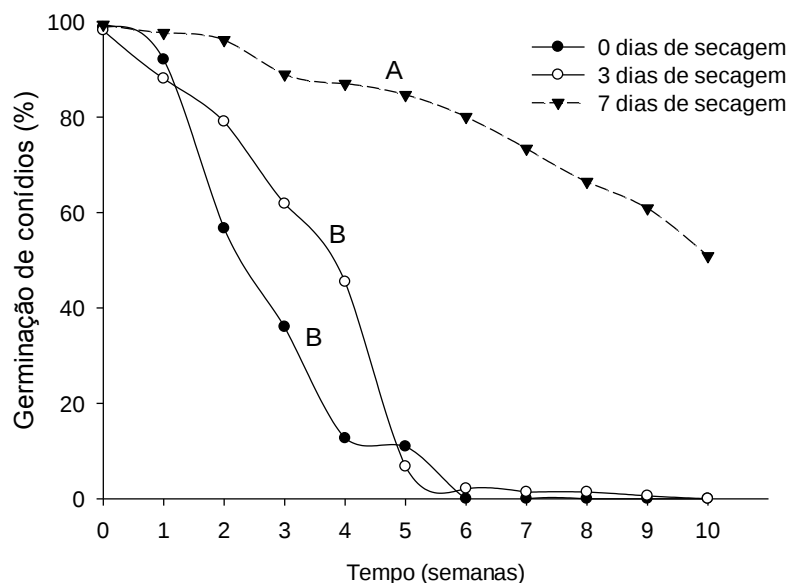


Figura 6. Avaliação da germinação do conídio puro (%) armazenado a 25 °C e proveniente da fermentação em estado sólido sob diferentes tempos de aeração forçada visando o acompanhamento do “Shelf-life”

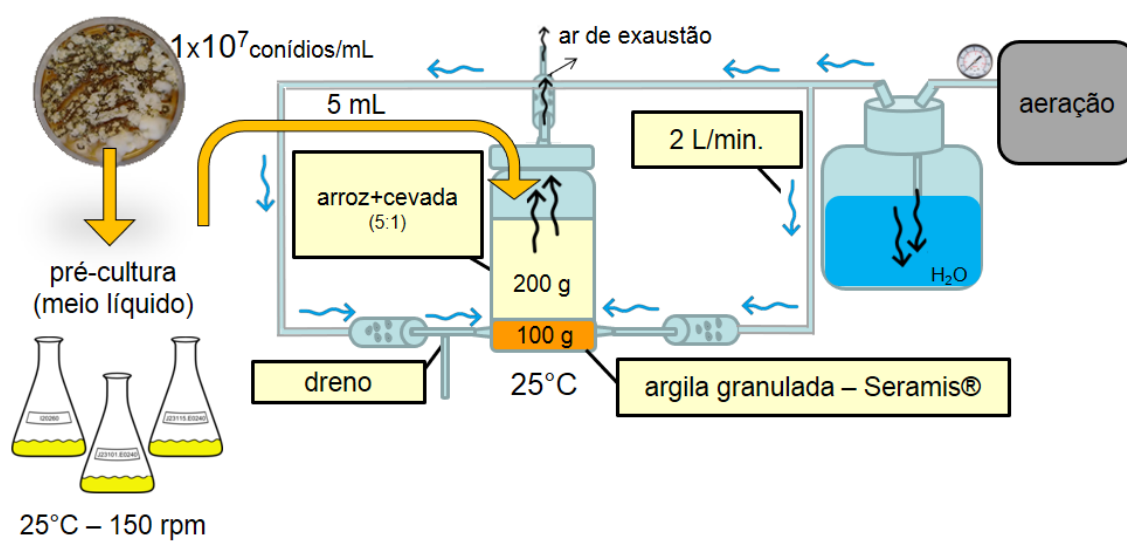


Figura 7. Metodologia para fermentação sólida de fungos entomopatogênicos utilizando o biorreator JKI-Solid Fermenter System adaptado em escala laboratorial

CAPÍTULO 6
EFEITO DE DIFERENTES ÓLEOS E ADJUVANTES NA GERMINAÇÃO DE
CONÍDIOS PUROS DE *Metarhizium anisopliae* VISANDO O CONTROLE DO
PERCEVEJO BRONZEADO *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)

Revista: Journal of Insect Science

Resumo

A busca de compostos que sejam compatíveis com o conídio, fisicamente e biologicamente, é necessária, pois as formulações apresentam um papel importante no controle biológico de pragas. O controle de *Thaumastocoris peregrinus* torna-se difícil, devido ao comportamento do inseto e a altura das árvores, além disso, não existem formulações de biopesticidas registradas para este inseto no Brasil. Diante disso, objetivou-se encontrar novas ferramentas para o controle de *T. peregrinus* através do uso de fungos entomopatogênicos formulados em óleo e em pó e comparados com o conídio puro. O adjuvante Nimbus® apresentou efeito negativo na germinação dos conídios independentemente da combinação em que este adjuvante estava com 0 a 13% de germinação. As combinações Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%), Óleo de milho + Iharol Gold® (30%) e Óleo de milho + Assist® (30%) apresentaram germinação de 86,55; 89,66 e 97,55%, respectivamente, sendo as taxas mais altas de germinação dentre as formulações. As formulações testadas foram eficientes no controle de adultos de *T. peregrinus* com até 96,67% e 57,5% de mortalidade em condições de laboratório e semi-campo, respectivamente. Estudos como este são importantes e devem ser realizados a fim de estimular o desenvolvimento de produtos biológicos para o setor florestal.

Palavras-chave: formulação baseada em óleo, fungos entomopatogênicos, pragas florestais, germinação de conídios, controle microbiano

Abstract

The search for compounds that are compatible with conidia, physically and biologically, is necessary, since the formulations play an important role in the biological control of pests. The control of *Thaumastocoris peregrinus* becomes difficult, due to the behavior of the insect and the height of the trees, in addition, there are no biopesticidal formulations registered for this insect in Brazil. The objective of this study was to find new tools for the control of *T. peregrinus* through the use of entomopathogenic fungi formulated in oil and powder and compared with pure conidium. The Nimbus® adjuvant had a negative effect on conidia germination regardless of the combination in which this adjuvant had 0 to 13% germination. The combination of sunflower oil + Natur'oleo® (40%), Corn oil + Iharol Gold® (30%) and Maize oil + Assist® (30%) presented germination of 86.55; 89.66 and 97.55%, respectively, being the highest germination rates among the formulations. The formulations tested were efficient in controlling *T. peregrinus* adults with up to 96.67% and 57.5% mortality in laboratory and semi-field conditions, respectively.

Studies such as this are important and should be carried out in order to stimulate the development of organic products for the forestry sector.

Key-words: oil-based formulation, entomopathogenic fungi, forest pests, conidial germination, microbial control

6.1 Introdução

O mercado de micopesticidas têm crescido mundialmente, com cerca de 171 produtos registrados nesse mercado, sendo a maioria à base de *Beauveria bassiana* (33,9%), *Metarhizium anisopliae* (33,9%), *Cordyceps fumosorosea* (5,8%) e *B. brongniartii* (4,1%), os quais são formulados de diferentes maneiras, tais como concentrados técnicos (substratos e fungo-colonizados) (26,3%), pós molháveis (20,5%) e dispersões em óleo (15,2%) (Faria; Wraight, 2007). O cenário desses produtos tem se mostrado promissor no Brasil nos últimos anos e vários casos foram registrados, inclusive no setor florestal (Li et al. 2010, Mascarin et al. 2018).

A produção de eucalipto no Brasil tem sido prejudicada por diversos insetos exóticos e o percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), inseto sugador de folhas de eucalipto e encontrado no Brasil em 2008, está entre os insetos com maior potencial de dano, podendo chegar a perdas de 14% na produção de madeira (Wilcken et al., 2010; Junqueira et al., 2018). Entretanto, não existem registros de micopesticidas para o percevejo bronzeado, mesmo havendo dados promissores do controle deste inseto por tal método (Lorencetti et al. 2018, C. F. Wilcken, informação pessoal). Fungos são excelentes candidatos para uso em biocontrole de "inundação" por causa de sua capacidade de infectar ativamente e matar a praga alvo (Jackson et al., 2010), e estes podem apresentar um bom desempenho na cultura do eucalipto devido à altura dos plantios e a possibilidade dos produtos serem aplicados com aviões (Gan-Mor e Matthews 2003). Para que os propágulos infectivos do fungo alcancem o alvo de maneira eficaz estes devem estar formulados, sendo que a formulação deve manter o fungo vivo e com capacidade de causar mortalidade no inseto alvo (Jones e Burges 1998, Jackson et al. 2010). Além disso, as formulações devem ser compatíveis com o equipamento de aplicação (Gan-Mor e Matthews, 2003). Esse trabalho teve como objetivo a investigação do efeito de diferentes combinações de óleos (vegetais e minerais) e adjuvantes na germinação e eficácia de conídios de *M. anisopliae*

(IBCB425) visando ao manejo de *T. peregrinus* em condições de laboratório e semi-campo.

6.2 Material e Métodos

Local e informações gerais

O fungo foi produzido e colhido no Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, Instituto de Controle Biológico, Instituto Julius Kühn, Darmstadt, Alemanha. Os experimentos de patogenicidade em condições de laboratório e de germinação (compatibilidade) foram realizados no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (LCBPF, DPV, UNESP, FCA). O experimento de patogenicidade em condições de semi-campo foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Aplicação, DPV, UNESP, FCA. O conídio puro produzido no exterior, devido às instalações tecnológicas do local, foi enviado ao Brasil devidamente acondicionado em embalagens de alumínio lacradas (próprias para biopesticidas) e contendo 2 sachês de sílica gel em cada embalagem. As amostras foram transportadas em baixas temperaturas para manter a viabilidade do fungo que foi avaliada antes de cada experimento através de testes de germinação dos conídios. Se algum lote apresentasse viabilidade menor que 90% seriam descartados.

Obtenção do fungo

O fungo *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Hypocreales, Clavicipitaceae) (IBCB425), isolado de solo da Mata Atlântica no Município de Iporanga, São Paulo, Brasil, e depositado na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal em Campinas, São Paulo, Brasil foi utilizado neste trabalho. Grandes quantidades de IBCB425 foram obtidas com processo de fermentação em estado sólido. O biorreator Laboratory Fermenter ProPhyta L03 System® foi preenchido com o substrato arroz parboilizado^a + Cevada^b, 5: 1 (160g^a + 40g^b) para produção em massa desse fungo a 25 °C com taxa de aeração de 150L/h⁻¹ (Lüth, Eiben 2003, adaptado). Os conídios de *M. anisopliae* foram colhidos a partir de 14 dias da fermentação. O equipamento Mycoharvester® [Mycoharvester Company, UK] separa conídios puros e aglomerados a partir de substratos colonizados por fungos

utilizando tecnologia de ciclone duplo e este foi utilizado para a obtenção dos conídios puros (Batman 2012).

Determinação da Concentração Letal (CL₅₀) e do Tempo Letal (TL₅₀) de conídios puros de *Metarhizium anisopliae* aos adultos e ninfas do percevejo bronzeado

Para determinar a CL₅₀ suspensões fúngicas a partir do conídio puro foram preparadas. Para isso, foi pesado 1g de conídio puro e posteriormente o material foi suspenso em Tween 80® [Merck KGaA, Alemanha] (0,1%). As suspensões fúngicas foram calibradas em diferentes concentrações com o auxílio de um hemocitometro (Neubauer), sendo utilizadas as concentrações $1,0 \times 10^7$, 10^8 , 10^9 conídios/mL, as quais compuseram os tratamentos. Em seguida, 2 mL de suspensão de conídios foram pulverizados com auxílio de uma Torre de Potter sobre 10 indivíduos de *T. peregrinus* em cada repetição (10 ninfas de 2° e 3° ínstaes e 10 adultos separadamente). A testemunha recebeu apenas Tween 80® (0,1%). A preparação dos insetos procedeu-se da seguinte maneira, 10 adultos de *T. peregrinus* provenientes da criação estoque de laboratório foram transferidos para placas de Petri modificadas. Essas placas mediam 60 x 20 mm e possuíam tampas com uma abertura de 20 mm/diâmetro com fechamento por tecido *voil*, permitindo então trocas gasosas. Dentro das placas foi colocada uma folha de *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*, clone 433 (Myrtaceae), cortada com uma área de aproximadamente 6 cm², e embaixo desta folha foi preenchida a placa com gel hidrorretentor® [Hydroplan-EB, Empresa de Base & Distribuidora Ltda, Brasil] (1 g/400 mL), o hidrogel teve a função de auxiliar na turgescência da folha e evitar a fuga do inseto. Após a aplicação do fungo as placas de Petri contendo os insetos foram mantidas em incubadoras tipo B.O.D. sob condições de temperatura de $25,0 \pm 1,0$ °C, umidade relativa média de $85,0 \pm 3,0\%$ e fotoperíodo de 12h. Para avaliação, cada repetição (placa de Petri) foi observada diariamente, e os insetos mortos foram contabilizados, retirados e transferidos para câmaras úmidas (placa de Petri estéril contendo os insetos e acondicionadas em recipientes plásticos fechados com uma tampa e abaixo das placas eram colocados papéis absorventes previamente esterilizados e umedecidos com água destilada autoclavada) para estimular o desenvolvimento do fungo e assim comprovar a mortalidade do inseto. Foram realizados testes de germinação para o fungo utilizado, e foram utilizados no bioensaio aqueles lotes com

viabilidade acima de 90%. O experimento foi composto por 5 tratamentos (concentrações e testemunha) e 3 repetições totalizando 30 insetos por tratamento, o ensaio foi repetido 3 vezes, em diferentes momentos e com diferentes populações e lotes do fungo.

Toxidade diferentes óleos e adjuvantes a *Metarhizium anisopliae*

Com a finalidade de avaliar a toxidade de diferentes veículos oleosos a conídios puros de *M. anisopliae* (IBCB425) foi proposta a seguinte metodologia. Diferentes concentrações de adjuvantes foram misturadas a 4 tipos de óleos, sendo óleo mineral [Destilaria Bauru, Brasil], óleo de milho [Destilaria Bauru, Brasil], óleo de girassol [Destilaria Bauru, Brasil] e óleo de soja [Cargill, Brasil] e com isso foram escolhidos os tratamentos em que se obteve uma emulsão quando colocados em água (Tabela 1). A emulsão foi proporcionada de acordo com a quantidade do adjuvante adicionado, pois na composição destes existem agentes emulsionantes. Para a avaliação da germinação, pesou-se 0,1g de conídio puro em tubos falcon de 50 mL com auxílio de uma balança analítica de precisão, assumindo-se que a diluição deste em 9,9 mL é aproximado a $5,0 \times 10^8$ conídios/mL. Em seguida, os conídios foram suspensos nos líquidos que compuseram os tratamentos por 24 horas e a $25,0 \pm 1,0$ °C, exceto a testemunha 2, que só foi suspensa em líquido (Tween 80® 0,1%) no momento do teste de germinação, mas que o pó de conídios foi armazenado também por 24 horas.

A germinação de esporos foi adotada como finalidade de avaliar a compatibilidade dos tratamentos ao fungo entomopatogênico. Para isso, 100µl de cada tratamento foi adicionado em 9,9mL de água destilada estéril, em seguida, cada amostra foi devidamente misturada em vortex e 100µl foram espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski na superfície do meio de cultura MPA (extrato de malte 30 g/L [Merck KGaA, Alemanha], peptona de soja 5 g/L [Merck KGaA, Alemanha], Agar 18 g/L Roth, Alemanha]) em placas de Petri (90-15mm). Para a avaliação, com 24 horas da inoculação foram retirados três pedaços de meio de cultura em formato quadrado medindo aproximadamente 4 cm² com auxílio de um bisturi, e então colocado em uma lâmina microscópica e coberto com uma lâminula, depois cada amostra foi avaliada com auxílio de um microscópio óptico em uma ampliação de 40x. Foram contados os conídios que apresentaram e não apresentaram a presença do tubo germinativo com auxílio de um contador automático, para isto, a soma das

duas variáveis deve ser igual a 100. O ensaio de germinação foi composto por 3 repetições por tratamento e cada ensaio foi repetido 3 vezes, utilizando diferentes lotes do fungo e em diferentes momentos.

Tabela 1. Misturas de óleos emulsionáveis utilizados para avaliação da toxidade a *Metarhizium anisopliae* (IBCB425)

Tratamentos	Adjuvante (%)	Natureza do adjuvante	Empresa produtora
Óleo mineral + Nimbus®	20	óleo mineral	Syngenta
Óleo mineral + Assist®	30	óleo mineral	Basf
Óleo mineral + Iharol Gold®	30	óleo mineral	Ihara
Óleo de milho + Assist®	30	óleo mineral	Basf
Óleo de milho + Iharol Gold®	30	óleo mineral	Ihara
Óleo de girassol + Natur'oleo®	40	óleo vegetal	Stoller
Óleo de girassol + Nimbus®	30	óleo mineral	Syngenta
Óleo de soja + Nimbus®	30	óleo mineral	Syngenta
Água + Tween 80® (Testemunha 1)	0,1	Polissorbato 80	Merck KGaA
Seco* (Testemunha 2)	-	-	-

*Conídios foram mantidos sem adição de produtos por 24h e suspenso em Tween 80 0,1% para o teste de germinação

Patogenicidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* dispersos em óleo emulsionável para controle do percevejo bronzeado: laboratório e semi-campo

Para avaliar a patogenicidade em condições de laboratório os tratamentos selecionados no teste de compatibilidade foram utilizados, além disso, foi incluído nos tratamentos o conídio puro de IBCB425 e o produto comercial Metarril® (Tabela 2), sendo os tratamentos com viabilidade maior que 90%. Para isso, assumiu-se que 1g de conídios apresentava uma concentração de $5,3 \times 10^{10}$ conídios/g, posteriormente, preparou-se os tratamentos com concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. A testemunha não recebeu tratamento. Em seguida, 2 mL de cada tratamento foram pulverizados com auxílio de uma Torre de Potter sobre 10 indivíduos de *T. peregrinus* em cada repetição (ninfas e adultos separadamente). A preparação dos insetos e as avaliações procederam-se da mesma maneira que o realizado no terceiro item. O experimento foi composto por 5 tratamentos (produtos e testemunha) e 3 repetições totalizando 30 insetos por tratamento, os ensaios foram

repetidos 2 vezes, em diferentes momentos e com diferentes populações e lotes do fungo.

Para avaliar a patogenicidade em condições de semi-campo foram utilizados os tratamentos selecionados do ensaio em condições de laboratório (Tabela 3), e os conídios foram preparados da mesma maneira. Para a aplicação dos tratamentos foi utilizado um Simulador de pulverização (Figura 4), o qual foi calibrado da seguinte maneira 5 km/h; ponta AXI 110 03, pressão 40 psi, vazão 1,07 L/min (256 L/ha), e as condições do local eram 14,8 °C; 62% UR. Ramos de eucalipto clone 433 foram preparados, para isso, os ramos foram cortados de árvores de 6 anos de idade, em seguida foram lavados com uma solução de detergente e hipoclorito a 1%, secos naturalmente e padronizados com 7 folhas em cada. Posteriormente, a face abaxial das folhas presentes nos ramos receberam os tratamentos através da pulverização do Simulador, aguardou-se a secagem dos produtos e os insetos foram transferidos para cada ramo com auxílio de um pincel. Cada ramo (repetição) recebeu 20 insetos, sendo 10 ninfas e 10 adultos. Em seguida, cada repetição foi acomodada dentro de uma gaiola, que foi estruturada com aço galvanizado e revestida com tecido *voil* para impedir a fuga dos insetos, as gaiolas mediam 90 cm de altura x 30 cm de diâmetro (figura 5). As gaiolas contendo as repetições dos tratamentos foram mantidos em casa de vegetação nas condições de $23,5 \pm 4$ °C e umidade relativa de $52,1 \pm 10\%$. Foram realizadas avaliações diárias e os insetos mortos foram coletados e armazenados em câmara úmida para posterior confirmação da esporulação do fungo. O experimento foi composto por 4 tratamentos (produtos e testemunha) e 4 repetições totalizando 80 insetos por tratamento (40 ninfas e 40 adultos). A testemunha não recebeu tratamento.

Tabela 2. Produtos utilizados para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em condições de laboratório

Tratamentos	Ingrediente ativo (I.a.)	Qtd I.a.* Dose**
Óleo de milho + Iharol Gold® (30%)	Conídio (IBCB425)	100g/L*
Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%)	Conídio (IBCB425)	100g/L*
Conídio puro	Conídio (IBCB425)	100g/L*
Metarril®	Conídio (<i>M. anisopliae</i>)	3g/L**
Testemunha	-	-

**dosagem de acordo com a recomendação da bula para *Mahanarva fimbriolata*

Tabela 3. Produtos utilizados para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em condições de semi-campo

Tratamentos	Ingrediente ativo (I.a.)	Qtd I.a.* Dose**
Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%)	Conídio (IBCB425)	100g/L*
Conídio puro	Conídio (IBCB425)	100g/L*
Metarril®	Conídio (<i>M. anisopliae</i>)	3g/L**
Testemunha	-	-

**dosagem de acordo com a recomendação da bula para *Mahanarva fimbriolata*



Figura 4. Simulador de pulverização em operação.



Figura 5. Gaiolas contendo os tratamentos em casa de vegetação

Análise estatística

A Concentração Letal (CL_{50}) como também o Tempo letal 50 (TL_{50}), seguidos dos intervalos de confiança, foram obtidas ajustando-se modelos de regressão logística com distribuição binomial e função de ligação probit (Nelder e Wedderburn 1972). A variável resposta foi a proporção de insetos tendo como fator concentração, considerando o tempo e a repetição como covariáveis contínuas. Posteriormente, foram novamente ajustados modelos de regressão logística, como feito anteriormente, considerando cada combinação de isolado e fase do inseto, como também considerando somente cada isolado. Para a proporção de insetos mortos, tendo como fatores a fase do inseto e a concentração e considerando blocos como covariável, foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição gama e função de ligação logarítmica. Foi utilizado o procedimento probit (com a opção `inverse cl`) do Programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition. Na análise estatística da germinação em percentual considerando os tratamentos como fatores, foi ajustado um modelo de regressão linear generalizado com distribuição gama e função de ligação logarítmica. No bioensaio de patogenicidade em condições de laboratório foi realizada a análise considerando como fatores tratamentos e as fases dos insetos e como covariáveis repetição e o tempo, foi ajustado um modelo de regressão linear generalizado com distribuição binomial e função de ligação complemento log-log. E na análise estatística de

patogenicidade em condições de semi-campo foi feita a análise considerando como fatores tratamento e fases do inseto, e como covariáveis repete e o tempo, foi ajustado um modelo de regressão linear generalizado com distribuição binomial e função de ligação logito. Foi utilizado o procedimento *genmod* (do Programa estatístico SAS – *Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition* e para comparações entre tratamentos foi utilizado foi o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999).

6.3 Resultados

Determinação da Concentração Letal (CL₅₀) e do Tempo Letal (TL₅₀) de conídios puros de *Metarhizium anisopliae* aos adultos e ninfas do percevejo bronzeado

Metarhizium anisopliae (IBCB425) exige uma concentração de $6,4 \times 10^7$ conídios/mL com intervalo à 95% de confiança de $2,7 \times 10^7$ a $1,6 \times 10^8$ conídios/mL para causar a mortalidade de 50% da população de *T. peregrinus*. Além disso, são necessários 4,06 dias com intervalo à 95% de confiança de 3,81 a 4,33 dias para causar a mortalidade de 50% da população dos insetos. O isolado IBCB425 foi mais virulento ao *T. peregrinus* na maior concentração com 99,17% de mortalidade acumulada e a menor mortalidade ocorreu na concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL seguido da testemunha, 52,5% e 9,17%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito de conídios puros de *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) (%) em diferentes concentrações (conídios/mL) na mortalidade de ninfas e adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)

Concentração	Isolado
	IBCB425 ^a
0,00E+00	9,17 ± 2,60 C
1,00E+07	52,50 ± 6,41 B
1,00E+08	95,0 ± 1,95 A
1,00E+09	99,17 ± 0,83 A

^aMédias das proporções seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância

Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com diferentes óleos e adjuvantes

A germinação dos conídios foi significativamente prejudicada nos tratamentos Óleo mineral + Iharol Gold® (30%), Óleo de girassol + Nimbus® (30%), Óleo de soja + Nimbus® (30%), onde não houve germinação. O tratamento Óleo mineral +

Nimbus® (20%) teve efeito negativo na germinação, com apenas $13 \pm 2,285\%$, seguido de Óleo mineral + Assist® (30%) com $37,77 \pm 5,353\%$. Os demais tratamentos apresentaram germinação significativa, sendo o Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%) com média de germinação um pouco maior que Tween® (0,1%), $97,55 \pm 1,405\%$ contra $81,55 \pm 2,028\%$, respectivamente, porém, sem diferença estatística. Mas isso indica que a formulação em óleo manteve o fungo em estado de dormência. Selecionou-se os 3 tratamentos com maior média para os ensaios de patogenicidade, sendo: Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%), Óleo de milho + Iharol Gold® (30%) e conídio puro (testemunha) (Tabela 5).

Em todos os tratamentos em que foram colocados o fungo formulado em água obteve-se uma emulsão não estável, entranto, uma emulsão estável foi conseguida na ausência do fungo, sugerindo necessidade de aprimoramento da formulação final.

Tabela 5. Porcentagem média da germinação de *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) em combinação com diferentes formulações

Tratamentos	% média de germinação ^a
Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%)	$97,55 \pm 1,405$ A
Óleo de milho + Iharol Gold® (30%)	$89,66 \pm 2,793$ A
Óleo de milho + Assist® (30%)	$86,55 \pm 2,392$ A
Óleo mineral + Assist® (30%)	$37,77 \pm 5,353$ B
Óleo mineral + Nimbus® (20%)	$13,00 \pm 2,285$ C
Óleo mineral + Iharol Gold® (30%)	-
Óleo de girassol + Nimbus® (30%)	-
Óleo de soja + Nimbus® (30%)	-
Tween 80® (0,1%)	$81,55 \pm 2,028$ A
Conídio puro (testemunha)	$98,00 \pm 1,013$ A

^aMédias das proporções seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância.

Patogenicidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* dispersos em óleo emulsionável para controle do percevejo bronzeado: laboratório e semi-campo

Os tratamentos óleo de girassol + Natur'óleo® (40%) e conídio puro foram os que causaram maior mortalidade em ninfas e adultos de *T. peregrinus*, onde a mortalidade acumulada de ninfas foi de 56,67% e 73,33%, respectivamente, e de adultos 96,67 e 92,1%, alta mortalidade também foi registrada para o tratamento óleo de milho + Iharol Gold® (30%), porém somente aos adultos, onde a mortalidade

acumulada foi de 80%, e seguido por Metarril®, com mortalidade acumulada dos adultos de 66,67%. As ninfas de *T. peregrinus* foram menos suscetíveis nos tratamentos óleo de milho + Iharol Gold® (30%) e Metarril®, 16,67% de mortalidade para ambos os tratamentos. A testemunha diferiu significativamente de todos os tratamentos ($P < 0,05$) (Tabela 6).

Os tratamentos não diferiram entre si na mortalidade acumulada de adultos e ninfas, exceto para a testemunha em ambos os estágios do inseto e Metarril® em ninfas, que apresentaram as menores mortalidades com 7,5 e 2,5%. Os adultos morreram mais em todos os tratamentos, exceto na testemunha e quando tratados com conídios puros, sem diferença estatística entre as fases em cada tratamento (Tabela 7).

Tabela 6. Mortalidade acumulada (%) de ninfas e adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) a diferentes formulações em condições de laboratório após 7 dias de aplicação

Tratamentos	Fase	
	Ninfa ^a	Adulto ^a
Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%)	56,67 ± 23,33 Ab	96,67 ± 3,33 Aa
Óleo de milho + Iharol Gold® (30%)	16,67 ± 6,66 Bb	80,0 ± 5,77 Aa
Metarril®	16,67 ± 6,66 Bb	66,67 ± 12,01 Ba
Conídio puro	73,33 ± 12,01 Ab	92,1 ± 2,95 Aa
Testemunha	0 ± 0,0 Ca	6,67 ± 6,6 Ca

^aMédias das proporções seguidas de mesma letra maiúscula na coluna ou mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância

Tabela 7. Mortalidade acumulada (%) de ninfas e adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) a diferentes formulações em condições de semi-campo após 7 dias de aplicação

Tratamentos	Fase	
	Ninfa ^a	Adulto ^a
Óleo de girassol + Natur'óleo® (40%)	15,0 ± 6,45 Ab	57,5 ± 8,54 Aa
Metarril®	2,5 ± 2,50 Bb	52,5 ± 4,79 Aa
Conídio puro	30,0 ± 7,07 Aa	47,5 ± 11,09 Aa
Testemunha	2,5 ± 2,50 Ba	7,5 ± 4,79 Ba

^aMédias das proporções seguidas de mesma letra maiúscula na coluna ou mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância.

6.4 Discussão

Metarhizium anisopliae (IBCB425) causou maior mortalidade nas maiores concentrações, e para causar a mortalidade de 50% da população de *T. peregrinus* foram necessários $6,4 \times 10^7$ conídios/mL e 4,06 dias. Essa concentração foi próxima da concentração encontrada, $3,6 \times 10^7$ conídios/mL, para produtos comerciais no controle desse mesmo inseto, entretanto, foram necessários 7 dias para a mortalidade dos insetos (Soliman 2014). Além disso, maiores concentrações causaram mortalidade de mais insetos. Uma concentração $3,8 \times 10^5$ conídios/mL de um produto comercial à base de *M. anisopliae* foi suficiente para causar a mortalidade de 50% da população de *Glycaspis brimblecombei* Moore 1964 (Hemiptera: Psyllidae) em 4,2 dias (Dal pogetto et al. 2011). Menor valor de CL_{50} também pode ser atribuído a *M. anisopliae* no controle de *Diaphorina citri* Kuwayama 1908 (Hemiptera: Liviidae), sendo necessário apenas uma concentração de $1,3 \times 10^4$ conídios/mL (Orduño-Cruz et al., 2016). O isolado IBCB425 foi virulento a *T. peregrinus* com alta mortalidade nas maiores concentrações, e devido às altas concentrações de *M. anisopliae*, $8,0 \times 10^8$, houve mortalidade de até 61% em larvas de *Ephestia kuehniella* Zeller 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) com apenas 2 dias de exposição a 30 °C (Athanassiou et al. 2017). Além disso, *M. anisopliae* (ICIPE 62) foi utilizado no manejo de *Aphis craccivora* Koch 1854 (Hemiptera: Aphididae) e apresentou um baixo tempo letal (TL_{50}) para a mortalidade do inseto, com média de 3,3 dias e com concentração letal de $2,3 \times 10^6$ conídios/mL (Mweke et al. 2018).

Óleo mineral e o adjuvante Nimbus® são altamente prejudiciais à germinação de conídios de *M. anisopliae* (IBCB425). Os óleos vegetal e mineral são altamente tóxicos a *M. anisopliae* em altas concentrações, acima de 100ppm (Soliman 2014). Diferentes óleos minerais e vegetais foram prejudiciais a *M. anisopliae* em condições de armazenamento a 4 e 26 °C (Daoust et al., 1983). Entretanto, o óleo de canola e o óleo mineral conferiram termoproteção aos conídios de *M. anisopliae* com germinação excedendo 80% após 8 horas de exposição a 45 °C (Paixão et al. 2017). Já os óleos emulsionáveis não conferiram tal proteção, e com isso a germinação foi menor que 20%. As formulações dos conídios em óleo apresentaram uma excelente característica física, com total mistura, entretanto, mesmo se tratando de um óleo emulsionável, houve uma desestabilidade da calda, onde os conídios ficaram conectados com as micélias de óleo, e que não se misturaram na água. Várias

formulações micopesticidas são baseadas em óleo, uma vez que os conídios, como os de *M. anisopliae* são hidrofóbicos e possuem maior afinidade pelo óleo (Faria e Wraight, 2007, Luke et al. 2015), neste caso o uso de outros aditivos para melhora da formulação torna-se necessário. Entretanto, nota-se uma sensibilidade dos fungos entomopatogênicos a diversos produtos, sendo então, de extrema importância a investigação de métodos seguros para formulação dos produtos. As formulações são muito importantes para os microrganismos, pois além de levá-los até o alvo (veículos), podem também assumir papel importante na fixação do ingrediente ativo, protegê-lo de condições adversas e mantê-los viáveis por longos períodos (Jones e Burges 1998). Mesmo que os ingredientes sejam compatíveis com o microrganismo formulado, existe a necessidade de maiores estudos visando a melhora na qualidade da calda, se o produto for misturado em água.

As formulações oleosas não aumentaram a bioeficácia de IBCB425, pois não houve diferença significativa entre os formulados e não formulados de conídios puros. Entretanto, além de algumas formulações biopesticidas auxiliarem na proteção do fungo podem causar maior mortalidade em insetos, apesar do efeito negativo sobre a viabilidade dos conídios na formulação à base de óleo a 46 °C após 6 horas de exposição, redução de 76%, a mortalidade de *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Crambidae) chegou a 40% em condições de laboratório (Oliveira et al. 2018).

Os produtos testados causaram maior mortalidade de adultos de *T. peregrinus* em condições de semi-campo. No projeto LUBILOSAs formulações oleosas de *Metarhizium flavoviride* são eficazes para controlar populações de gafanhoto na África, com aplicação em ultra-baixo volume (1-2 L/ha) proporcionando controle de mais de 90% (Lomer et al. 1997). Conídios formulados em óleo e esporos submersos formulados em emulsão foram eficazes no controle de gafanhotos em condições de laboratório e campo, com até 100% de controle (Kassa et al. 2004). A formulação de *B. bassiana* em dispersão em óleo foi significativamente melhor no controle de *Aphis gossypii* do que uma formulação pó molhável do mesmo fungo (Wraight et al. 2016). Formulações de conídios dispersos em óleo podem apresentar uma melhor eficácia no controle de insetos e têm recebido atenção nos últimos tempos (Fargues et al. 1997, Wraight et al. 2016). As propriedades lipofílicas apresentadas pelo óleo aumentam a aderência do produto na cutícula dos insetos, além disso, podem causar o rompimento da camada protetora das ceras

epicuticulares de insetos, facilitando a penetração dos fungos no hospedeiro (Bateman et al. 1993, Ibrahim et al. 1999, Wraight et al. 2016). Em geral, a mortalidade de adultos foi maior que a mortalidade de ninfas em condições de laboratório e semi-campo. Insetos em estágios imaturos podem apresentar alguma resistência contra os fungos entomopatogênicos, pois através do simples fato de trocarem de ínstar podem causar a inviabilização do processo infeccioso pelo conídio, ou seja, o fungo não consegue completar seu ciclo e penetrar no inseto (Vandenberg e Ramos 1998, Kim e Roberts 2012). O mecanismo de troca de cutícula é um processo natural do inseto e isso apresenta consequências frente a um processo de infecção (Ortiz-Urquiza e Keyhani 2013). Isso já foi relatado para *T. peregrinus*, onde os adultos foram mais suscetíveis a fungos entomopatogênicos que as ninfas (Soliman 2014).

6.5 Conclusão

O efeito negativo de óleos e adjuvantes utilizados na formulação de micopesticidas é possível e isso deve ser investigado com cautela, uma vez que conídios não viáveis são incapazes de promover a infecção do fungo no inseto. Óleos minerais podem inviabilizar o fungo, sendo preferível o uso do óleo vegetal. Além disso, o controle de *T. peregrinus* pode ser alcançado utilizando o isolado IBCB425 formulado em óleo. Entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de se obter uma emulsão mais estável na calda de aplicação.

Referências

Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Rumbos, C. I., e Kontodimas, D. C. 2017. Influence of Temperature and Relative Humidity on the Insecticidal Efficacy of *Metarhizium anisopliae* against Larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) on Wheat. J Insect Sci 17(1): 1017-1022.

Bateman, R., 2012. Large-Scale Spore Extraction Unit (MycoHarvester Mk 3). http://www.mycoharvester.info/MH3_2012.pdf. Acesso em: 4 de abril de 2018.

Bateman, R. P., Carey, M., Moore, D., e Prior, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in formulations to desert locusts at low humidities. *Ann App Biol* 122: 145-152.

Dal Pogetto, M. H. F. A., Wilcken, C. F., Christovam, R. S., Prado, E. P., Gimenes, M. J. 2011. Effect of formulated entomopathogenic fungi on red gum lerp psyllid *Glycaspis brimblecombei*. *Res J For* 5(2): 99-106.

Daoust, R. A., Ward, M. G., e Roberts, D. W. 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. *J Invertebr Pathol* 41: 151–160.

Fargues, J., Ouedraogo, A., Goettel, M. S., e Lomer, C. J. 1997. Effect of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Sci Techn* 7: 345-356.

Faria, M. R., e Wraight, S. P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 43: 237-256.

Gan-Mor, S., and Matthews, G. A. 2003. Recent developments in sprayers for application of biopesticides – an overview. *Biosyst Eng* 84(2): 119-125.

Ibrahim, L., Butt, T. M., Beckett, A., e Clark, S. J. 1999. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* 103: 901-907.

Jackson, M. A., Dunlap, C. A., e Jaronski, S. T., 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol* 55: 129-145.

Jones, K., e Burges, H. D. 1998. Technology of formulation and application, 7-30. In H. D. Burges (ed), *Formulation of microbial pesticides – beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Springer, Dordrecht.

Junqueira, L. R., Barbosa, L. R., e Wilcken, C. F. 2018. Quantification of damages by *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in eucalypt. In Book of Abstracts First IUFRO Working Party 7.02.13 meeting (Punta del Este 21 a 23 de Março), Punta del Este, 2018. Disponível em: https://www.iufro.org/download/file/28424/6631/70213-puntadeleste18-bstracts_pdf/.

Kassa, A., Stephan, D., Vidal, S., Zimmermann, G. 2004. Laboratory and field evaluation of different formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged spores and aerial conidia for the control locusts and grasshoppers. *BioControl* 49:63-81.

Kim, J. J., e Roberts, D. W. 2012. The relationship between conidial dose, moulting and insect developmental stage on the susceptibility of cotton aphid, *Aphis gossypii*, to conidia of *Lecanicillium attenuatum*, an entomopathogenic fungus. *Biocontrol Sci Techn.* 22: 319-331.

Li Z., Alves, S. B., Roberts, D. W., Fan, M., Delalibera Jr, I., Tang, J., Lopes, R. B., Faria, M., e Rangel, D. E. N. 2010. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci Techn* 20(2): 117-136.

Lomer, C. J., Prior, C., e Kooyman, C. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts. *Mem Entomol Soc Can* 129: 265-286.

Lorencetti, G. A. T., Potrich, M., Mazaro, S. M., Lozano, E. R., Barbosa, L. R., Menezes, M. J. S., e Gonçalves, T. E. 2018. Eficiência de *Beauveria bassiana* Vuill. e *Cordyceps* sp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Cienc Florest* 28(1): 403-411.

Luke, B., Faull, J., e Bateman, R. 2015. Using particle size analysis to determine the hydrophobicity and suspension of fungal conidia with particular relevance to formulation of biopesticide, *Biocontrol Sci Techn* 25(4): 383-398.

Mascarin, G., Biaggioni Lopes, R., Delalibera Jr, I., Kort Kamp Fernandes, E., Luz, C., e Faria, M. 2018. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J Invertebr Pathol* S0022-2011(17): 30365-30368.

Mweke, A., Ulrichs, C., Nana, P., Akutse, K. S., Fiaboe, K. K. M., Manianiam, N. K., e Ekesi, S. 2018. Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Cordyceps* sp. for the Management of *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphidididae). *J Econ Entomol* 111(4): 1587-1594.

Nelder, J. A e Wedderburn, R. W. 1972. Generalized linear models. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc*, 135 (3): 370–384.

Oliveira, D. G. P., Lopes, R. B., Rezende, J. M., e Delalibera, I. 2018. Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. *J Invertebr Pathol* 151: 151-157.

Orduño-Cruz, N., Guzmán-Franco, A. W., e Rodríguez-Leyva, E. 2016. Populações de *Diaphorina citri* portadoras do fitopatógeno, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, são mais suscetíveis à infecção por fungos entomopatogênicos do que populações livres de bactérias. *Agric For Entomol* 18: 95-98.

Ortiz-Urquiza, A., e Keyhani, N. O. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4: 357-374.

Paixão, F.R.S., Muniz, E.R., Barreto, L.P., Bernardo, C.C., Mascarin, G.M., Luz, C., Fernandes, É.K. 2017. Increased heat tolerance afforded by oil-based conidial formulations of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium robertsii*. *Biocontrol Sci Technol*, 27, 324–337.

Soliman, E. P. 2014. Controle biológico de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos. Tese, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, Brasil.

Vandenberg, J. D., Ramos, M., e Altre, J. A. (1998) Dose-response and age- and temperature-related susceptibility of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). Environ Entomol 27: 1017-1021.

Westfall, P. H., Tobias, R. D., Rom, D., Wolfinger, R. D., and Hochberg, Y. (1999), Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System, SAS Institute Inc., Carolina do Norte, EUA.

Wilcken, C. F., Soliman, E. P., Sá, L. A. N., Barbosa, L. R., Dias, T. K. R., Ferreira-Filho, P. J., e Oliveira, R. J. R. 2010. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on Eucalyptus in Brazil and its distribution. J Plant Prot Res 50(2) 201-206.

Wraight, S. P., Filotas, M. J., e Sanderson, J. P. 2016. Comparative efficacy of emulsifiable-oil, wettable-powder, and unformulated-powder preparations of *Beauveria bassiana* against the melon aphid *Aphis gossypii*, Biocontrol Sci Techn, 26(7): 894-914.

CAPÍTULO 7

DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS E ESTABILIDADE FÍSICA DE FORMULAÇÕES BASEADAS EM CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae*

Revista: World Journal of Microbiology and Biotechnology

Resumo

A qualidade de um produto à base de microrganismos é um ponto-chave para o sucesso no controle de insetos-praga. Um microrganismo em condições inadequadas de formulação pode apresentar problemas durante o uso e o armazenamento. Formulações utilizando inertes que não apresentam compatibilidade físico-química com o ingrediente ativo podem causar problemas no uso final, como partículas de tamanho indesejado e também problema de sedimentação. Estudos para avaliar a qualidade físico-química de microrganismos é um dos primeiros passos para ter sucesso no processo de formulação. O objetivo desse trabalho foi avaliar a distribuição do tamanho de partículas de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio líquido (Tween 80® 0,1% e óleo vegetal) e uma formulação comercial (pó molhável) à base de *M. anisopliae* com a tecnologia Malvern Mastersizer®. Além disso, foi avaliado o processo de sedimentação dos conídios de *M. anisopliae* suspensos em Tween 80® 0,1% e óleo vegetal. Os conídios de *M. anisopliae* apresentam melhores resultados quando em contato com o óleo, tanto para a distribuição do tamanho de partículas quanto para o processo de sedimentação acelerada. Os resultados contribuem para uma melhor escolha dos inertes a serem utilizados em um processo de formulação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*.

Palavras-chave: fungo entomopatogênico, formulações, análises físico-químicas, controle de qualidade, distribuição do tamanho de partículas, estabilidade física

Abstract

The quality of a product based on microorganisms is a key point for success in controlling pest insects. A microorganism under inadequate formulation conditions may present problems during use and storage. Formulations using inerters that do not show physicochemical compatibility with the active ingredient can cause problems in end use, such as unwanted size particles and also sedimentation problem. Studies to evaluate the physicochemical quality of microorganisms are one of the first steps to be successful in the formulation process. The objective of this work was to evaluate the distribution of the size of conidial particles of *Metarhizium anisopliae* in liquid medium (Tween 80® 0,1% and vegetable oil) and a commercial formulation (wetttable powder) based on *M. anisopliae* with Malvern technology Mastersizer®. In addition, the sedimentation process of conidia of *M. anisopliae* suspended in 0.1% Tween 80® and vegetable oil was evaluated. The conidia of *M. anisopliae* present better results when in contact with the oil, both for the particle size distribution and for the accelerated sedimentation process. The results contribute to a better choice of the inerters to be used in a process of formulation of the entomopathogenic fungus *M. anisopliae*.

Key words: entomopathogenic fungus, formulations, physicochemical analyzes, quality control, particle size distribution, physical stability

7.1 Introdução

O controle biológico utilizando microrganismos tem sido alvo de atenções nos últimos tempos, e a arte de formular esses organismos tem crescido significativamente com um grande número de produtos no mercado, principalmente para os fungos entomopatogênicos (Mascarin e Jaronski, 2016, Mascarin et al. 2018, Faria e Wraight, 2007).

Para formular conídios de fungos é essencial entender como eles se dispersam em meios líquidos, pois o comportamento do fungo pode influenciar na estabilidade da formulação (Luke et al. 2015). Uma instabilidade pode ocorrer pelo fato que partículas grandes, como os conídios agregados, podem reduzir o acerto no alvo quando o produto for pulverizado, pois uma desigual quantidade de conídios será pulverizada; além disso, grandes aglomerados na formulação são mais propensos a causar obstruções no pulverizador (Bateman 2004, Chapple et al. 2007).

Além do controle de qualidade em relação ao tamanho de partículas dispersas em uma formulação, o processo de sedimentação deve ser considerado, pois um produto precisa resistir às forças que levam as partículas precipitarem-se durante o armazenamento (Jones e Burges, 1998).

Novos métodos tecnológicos como o Malvern Mastersizer® para a avaliação da distribuição de tamanho de partículas e o LUMiSizer® para avaliar de forma acelerada a estabilidade de produtos, são seguros e produzem resultados com informações mais detalhadas (Luke et al. 2015, Pereira et al. 2018). O presente trabalho objetivou-se em investigar o comportamento dos conídios de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Hypocreales, Clavicipitaceae) quando suspenso em diferentes meios líquido, sendo os parâmetros avaliados a distribuição do tamanho de partículas e o processo de sedimentação. Para a distribuição do tamanho de partículas incluiu-se nos tratamentos uma formulação comercial pó molhável para comparação entre os tipos de formulações.

7.2 Material e Métodos

Local

Os experimentos foram realizados em diferentes locais devido às instalações tecnológicas portadas pelos colaboradores no projeto. O fungo foi produzido e colhido no Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, Instituto de Controle Biológico, Instituto Julius Kühn, Darmstadt, Alemanha. Os experimentos de avaliação de tamanho de partículas foram realizados na empresa Malvern Panalytical, Grande São Paulo, São Paulo, Brasil. Os experimentos de avaliação acelerada da estabilidade foram desenvolvidos na empresa Oxiteno, Unidade Química, Laboratório de Análises Físico-Químicas, Mauá, São Paulo, Brasil.

Obtenção do fungo

O fungo *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Hypocreales, Clavicipitaceae) (IBCB425), isolado de solo da Mata Atlântica no Município de Iporanga, São Paulo, Brasil, e depositado na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal em Campinas, São Paulo, Brasil foi utilizado neste trabalho. Grandes quantidades de IBCB425 foram obtidas com processo de fermentação em estado sólido. O biorreator Laboratory Fermenter ProPhyta L03 System® foi preenchido com o substrato arroz parboilizado^a + Cevada^b, 5: 1 (160g^a + 40g^b) para produção em massa desse fungo a 25 °C com taxa de aeração de 150L/h*⁻¹ (Lüth, Eiben 2003, adaptado). Os conídios de *M. anisopliae* foram colhidos a partir de 14 dias da fermentação. O equipamento Mycoharvester® [Mycoharvester Company, UK] separa conídios puros e aglomerados a partir de substratos colonizados por fungos utilizando tecnologia de ciclone duplo e este foi utilizado para a obtenção dos conídios puros (Batman, 2012). O produto comercial foi cedido pela empresa fabricante Koppert Biological Systems, Piracicaba, Brasil.

Determinação do tamanho de partículas por difração a laser

Para determinação da distribuição média do tamanho de partículas de conídios em suspensões aquosas e oleosas (Tabela 1) utilizou-se um Malvern Mastersizer® [MS3000, Malvern Panalytical, Reino Unido] (Fig 1 – a,b). O princípio de medição é baseado na detecção simultânea de vários ângulos de luz dispersa. O comportamento de espalhamento é fortemente dependente do tamanho das partículas. Suspensões de conídios e do produto comercial (Metarril® WP, Koppert, Brasil), os quais compuseram os tratamentos (Tabela 1), foram adicionados à célula de medição sob agitação de 2500rpm visando que uma obscuridade entre 5 e 15% fosse alcançada e com volume de líquido de 100 mL. O equipamento foi configurado para medições a cada 2 minutos durante 30 minutos. E as amostras foram previamente homogeneizadas em um ultra-som de banho-maria [Quimis, Brasil].

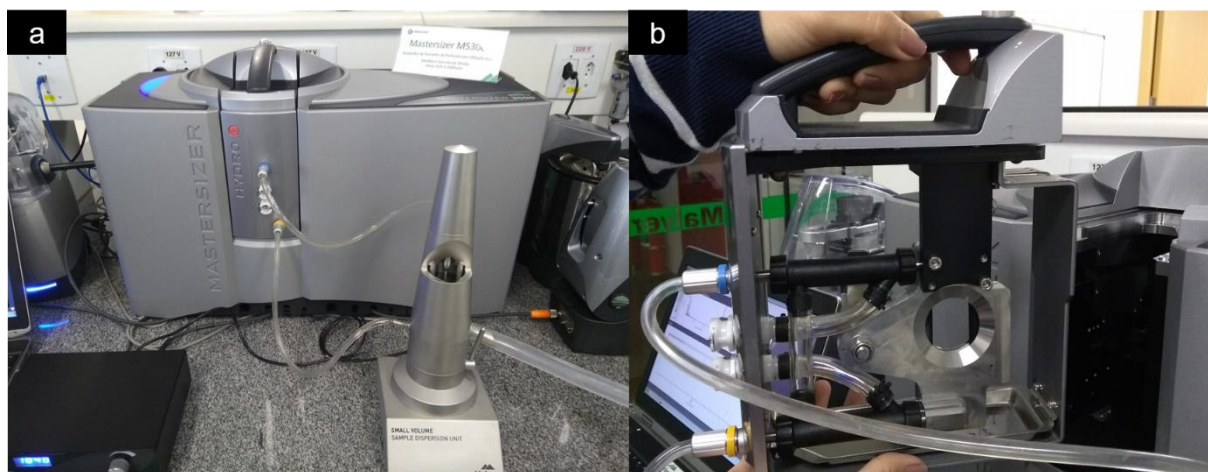


Fig 1. Equipamento Malvern Mastersizer® (a) Célula de medição do Sistema Mastersizer® (b) [MS3000, Malvern Panalytical, Reino Unido]

Tabela 1. Tratamentos utilizados para a determinação do tamanho de partículas por difração a laser

Produto	Meio líquido no equipamento	Concentração*/Dose**
Conídio (IBCB425)	Óleo de girassol (puro)	$5,0 \times 10^5$ conídio/mL*
Conídio (IBCB425)	Tween 80® 0,1%	$5,0 \times 10^5$ conídio/mL*
Metarril®	Tween 80® 0,1%	0,3g/L**

Avaliação da estabilidade (sedimentação e separação) de conídios em Tween 80® 0,1% e óleo de girassol

O comportamento acelerado de estabilidade e separação das suspensões de *M. anisopliae* (IBCB425) foi avaliado usando LUMiSizer® [LUM GmbH, Alemanha]. As amostras frescas de cada tratamento (Tabela 2) foram lentamente adicionadas em cubetas, Modelo 110 - 131 - xy (retangular, plástico (PP), 2mm caminho óptico). Em seguida, as cubetas foram colocadas horizontalmente no equipamento e expostas à força centrífuga sob as seguintes configurações: 36,34 xg, velocidade do rotor de 500 rpm, a 25 °C e durante 30 minutos e 40 segundos. Um total de 10 perfis foram registrados em intervalos de 10 segundos no primeiro ciclo, e no segundo ciclo foram registrados 58 perfis em intervalos de 30 segundos. A análise foi realizada em triplicata para cada tratamento.

Tabela 2. Tratamentos utilizados para a avaliação do comportamento acelerado de estabilidade e separação das suspensões de *Metarhizium anisopliae* (IBCB425)

Produto	Meio líquido no equipamento	Concentração
Conídio (IBCB425)	Óleo de girassol	$1,0 \times 10^8$ conídio/mL
Conídio (IBCB425)	Tween 80® 0,1%	$1,0 \times 10^8$ conídio/mL



Figura 3. Metodologia para a avaliação do comportamento acelerado de estabilidade e separação de suspensões de conídios: cubeta contendo amostra (a), equipamento LUMiSizer® (b), amostras em cubetas no equipamento (c).

Análise estatística

Na análise de estabilidade foram ajustados, segundo cada tipo de amostra, o seguinte modelo de regressão não linear Gompertz:

$$Instability_Index_i = \alpha \exp\left(-\exp(\gamma(\beta - tempo_i))\right) + e_i$$

$$Position_i = \alpha \exp\left(-\exp(\gamma tempo_i)\right) + e_i$$

Em que,

$Instability_Index_i$ é a i-ésima observação da estabilidade; α, β e γ são parâmetros do modelo; α é a assíntota do modelo, β, γ é a abscissa da inflexão (tempo para o

qual encontramos a maior velocidade instantânea); $tempo_i$ é o i-ésimo tempo e e_i é o componente aleatório referente a i-ésima observação ($e_i \sim N(0, \sigma_e^2)$).

Na análise estatística do volume acumulado da distribuição do tamanho de partículas foram ajustados, segundo as combinações de tratamento e repetição, modelos de regressão não linear Gompertz:

$$cumulative_volume_i = \alpha \exp\left(-\exp(\gamma(\beta - size_classe_i))\right) + e_i$$

Em que,

$cumulative_volume_i$ e $size_classe_i$ são, respectivamente, a i-ésima observação do volume acumulado e das classes de tamanho; α, β e γ são parâmetros do modelo; α é a assíntota do modelo, β é a abscissa da inflexão (tempo para o qual encontramos a maior velocidade instantânea) ; $tempo_i$ é o i-ésimo tempo e e_i é o componente aleatório referente a i-ésima observação ($e_i \sim N(0, \sigma_e^2)$). Após o ajuste dos modelos, foram obtidas as estimativas dos parâmetros ($\hat{\alpha}, \hat{\beta}$ e $\hat{\gamma}$). Foram também estimados: o lagtime (valor do $size_classe$ em que o processo de crescimento do $cumulative_volume$ se inicia) e o ponto de estabilidade (valor do $size_classe$ em que o processo de crescimento do $cumulative_volume$ se estabiliza) (Passos et al. 2012). Para cada um dos parâmetros estimados, considerados como variáveis resposta, tendo como fatores os tratamentos, foram ajustados modelos lineares generalizados com distribuição gama e função de ligação logarítmica.

Para o ajuste dos modelos de regressão não linear foi utilizado o procedimento *nlin* (do Programa estatístico SAS – *Free Statistical Statistical Software*, SAS University Edition e para comparações entre tratamentos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (Westfall et al. 1999). Os gráficos foram plotados com o software SigmaPlot 12.0.

7.3 Resultados

Determinação do tamanho de partículas por difração a laser

Os três tratamentos apresentaram diferença significativa na distribuição do tamanho de partículas. O produto comercial Metarril® em Tween 80® 0,1% teve o ponto inicial de inflexão com média de 0,71µm (Lag time), menor partícula entre os tratamentos, entretanto, o ponto de inflexão médio (Beta) e o ponto de estabilidade foram os maiores 5,2 e 12,91, respectivamente (Tabela 3). Os gráficos de distribuição de tamanho de partículas demonstram a base mais estreita para os conídios em óleo, ou seja, com uma maior distribuição entre 0,9 a 8,73µm (Figura 4). O conídio em Tween 80® 0,1% e o produto comercial Metarril® em Tween 80® 0,1% apresentaram a base mais larga que o conídio em óleo, com partículas variando de <1µm a 1000µm (Figuras 5 e 6).

Tabela 3. Distribuição do tamanho de partículas (µm) pelo Modelo de Gompertz

Tratamentos	Ponto de Inflexão		Ponto de Estabilização
	Lag time	Beta	
Metarril® + Tween® 0,1%	0,71 ± 0,030 C	5,2 ± 0,02 A	12,91 ± 0,123 A
Conídios + Tween® 0,1%	1,61 ± 0,012 B	3,39 ± 0,01 B	6,44 ± 0,070 B
Conídios + óleo de girassol	1,81 ± 0,007 A	3,28 ± 0,04 C	5,80 ± 0,100 C

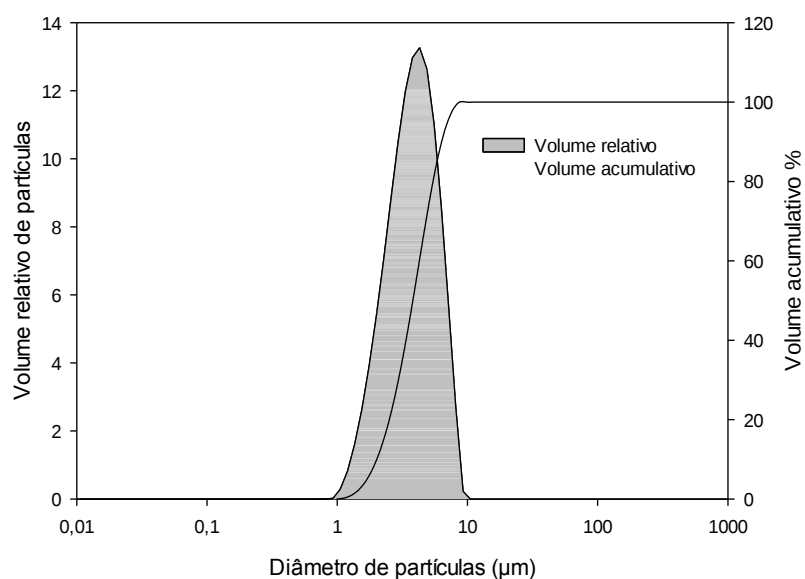


Figura 4. Distribuição do tamanho de partículas em função da densidade de volume (%) e volume cumulativo (%) de conídios puros em óleo de girassol

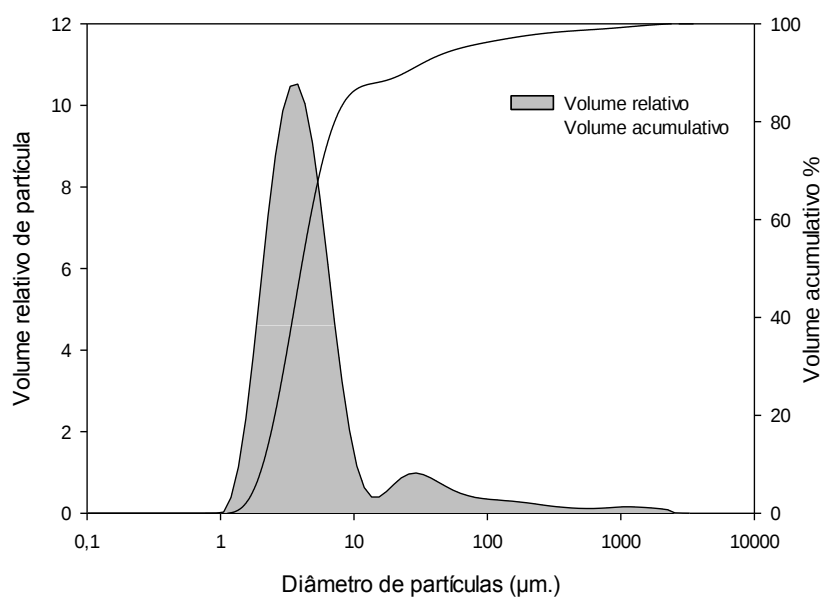


Figura 5. Distribuição do tamanho de partículas em função do volume relativo e volume acumulado (%) de conídios puros em Tween 80® 0,1%

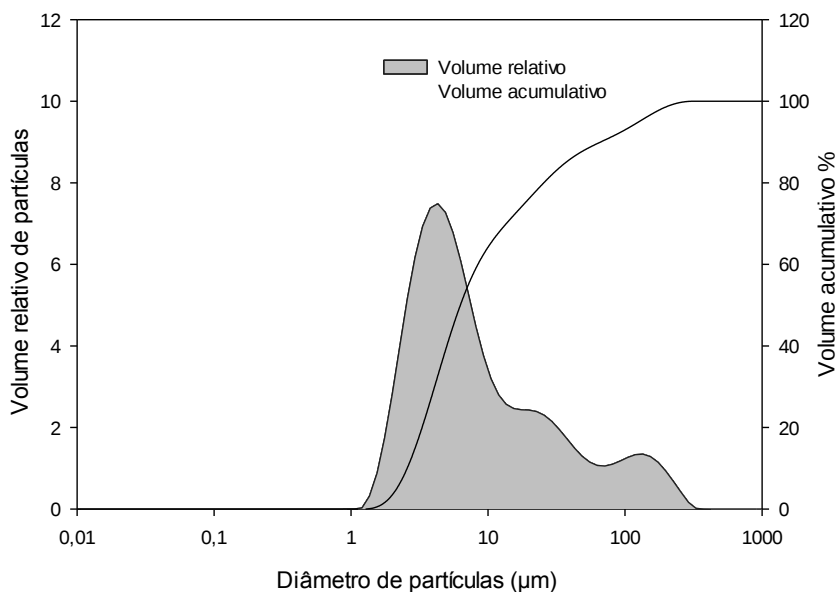


Figura 6. Distribuição do tamanho de partículas em função da densidade de volume (%) e volume acumulativo (%) de Metarril® (formulação pó molhável) em Tween 80® 0,1%

Avaliação da estabilidade (sedimentação e separação) de conídios em Tween 80® 0,1% e óleo de girassol

Os conídios de *M. anisopliae* (IBCB425) apresentaram maior estabilidade após submetidos à força centrífuga quando estavam dispersos em óleo do que quando estavam em Tween 80® 0,1%. Todo o material que estava suspenso em Tween 80® 0,1% sedimentou no fundo da cubeta (Figura 7 - 1,b), entretanto, o material suspenso em óleo apresentou pouca sedimentação (Figura 7 - 2,b). Isso foi confirmado analisando os gráficos de perfil de transmissão (Figuras 8), gerados pelo Software LUMiSizer®, percebe-se uma curva vermelha, esta corresponde aos pontos iniciais, a medida que o experimento está próximo do fim, formam-se curvas de coloração verde. Os conídios dispersos em Tween 80® 0,1% é de separação rápida, pois a sua transmitância é alta desde o início do experimento (Figura 8 - a), diferente do que pode ser observado para o conídio disperso em óleo de girassol, que se manteve mais estável (Figura 8 - b).

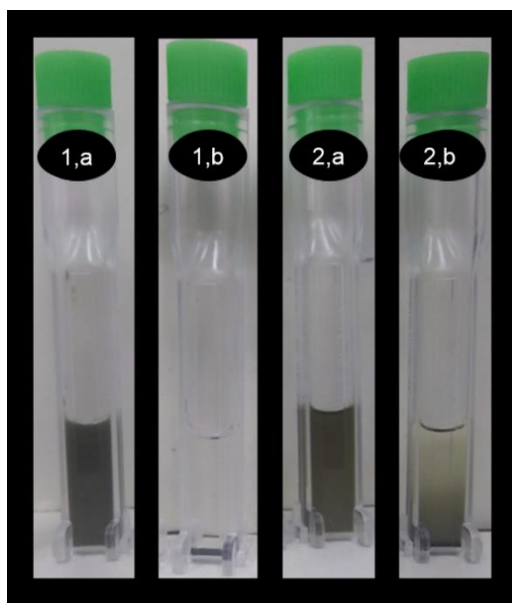


Figura 7. Comportamento acelerado de estabilidade e separação de suspensões de conídios: Conídio em Tween 80® 0,1% (1) e Conídio em óleo de girassol (2) antes (a) e depois (b) do processo de centrifugação no LUMiSizer®.

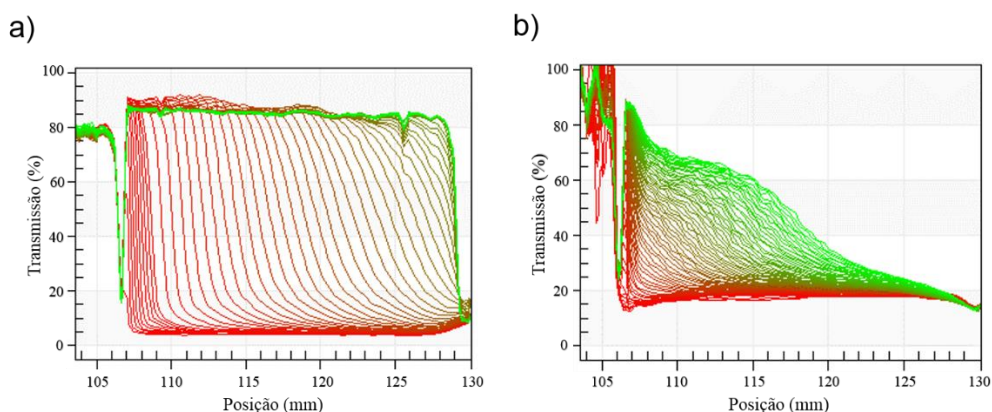


Figura 8. Perfil de transmissão do conídio disperso em Tween 80® 0,1% (a) e em óleo de girassol (b)

Quando avaliado o índice de estabilidade em função do tempo (s), é possível notar que o conídio disperso em Tween 80® 0,1% apresenta estabilidade após total separação da amostra e formação do precipitado, após aproximadamente 17 minutos do início do processo (Figura 10). O conídio em óleo de girassol também não é totalmente estável, apresentando uma instabilidade, com crescimento da curva contínuo e lento (Figura 10). Ambos os tratamentos irão alcançar a total sedimentação (α), mas, com velocidade diferente do crescimento da curva (β e γ), de acordo com o estimado através do modelo Gompertz (Tabela 4). Isso pode ser confirmado através da velocidade média de separação que se confirma que o conídio suspenso em Tween 80® 0,1% separa-se mais rapidamente que o conídio

suspensão em óleo de girassol, com velocidade média de separação de 25,71 e 8,74 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ (Tabela 5). As assíntotas de posição (mm) diferem estatisticamente ao nível de 5% de confiança, pois os intervalos de confiança não se interceptam. Ou seja, o conídio em Tween 80® 0,1% tem assíntota estatisticamente maior (123,4) do que o conídio em óleo (115,1) (Tabela 6). As curvas da posição (mm) em função do tempo (s) também demonstram que o conídio em Tween 80® 0,1% separam-se rapidamente, onde a posição de aproximadamente 130mm foi alcançada com apenas 14,5 minutos, após o início da análise. A amostra de conídio em óleo atingiu a posição aproximada de 120mm após 30 minutos de análise, período total de avaliação (Figura 11).

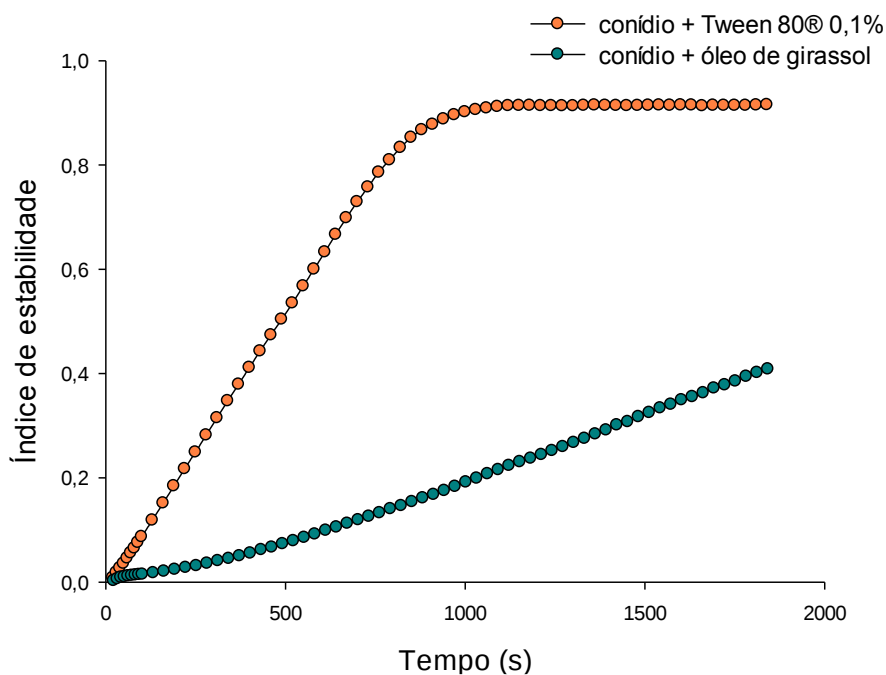


Figura 10. Índice de estabilidade de conídios dispersos em diferentes meios (Tween 80® 0,1% e óleo de girassol) em função do tempo em segundos (s)

Tabela 4. Estimativa de estabilidade pelo Modelo de Gompertz

Tratamento	α^1	β^2	γ^3
Conídio + Tween 80® 0,1%	0,737 ± 0,66 - 0,81A	374,1 ± 291,0 - 457,2B	0,003 ± 0,002 - 0,004A
Conídio + óleo de girassol	0,606 ± 0,59 - 0,62B	1130,7 ± 1106,2 - 1155,3A	0,001 ± 0,001 - 0,001B

Médias das proporções seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância. ^{1,2,3} α, β e γ são parâmetros do modelo; α é a assíntota do modelo, β, γ é a abscissa da inflexão (tempo para o qual encontramos a maior velocidade instantânea)

Tabela 5. Velocidade média de separação (µm/s) de conídios dispersos em diferentes meios (Tween 80® 0,1% e óleo de girassol)

Tratamento	Velocidade média de separação (µm/s)
conídio + Tween 80® 0,1%	25,71 ± 0,95 A
conídio + óleo de girassol	8,74 ± 0,43 B

Médias das proporções seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância

Tabela 6. Estimativa de posição (mm) pelo Modelo de Gompertz

Tratamento	α	γ
Conídio + Tween 80® 0,1%	123,4 (122,3 a 124,5)A	-0,077 (-0,09 a -0,06) A
Conídio + óleo de girassol	115,1 (114 a 115,8)B	-0,011 (-0,012 a -0,01) A

Médias das proporções seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância

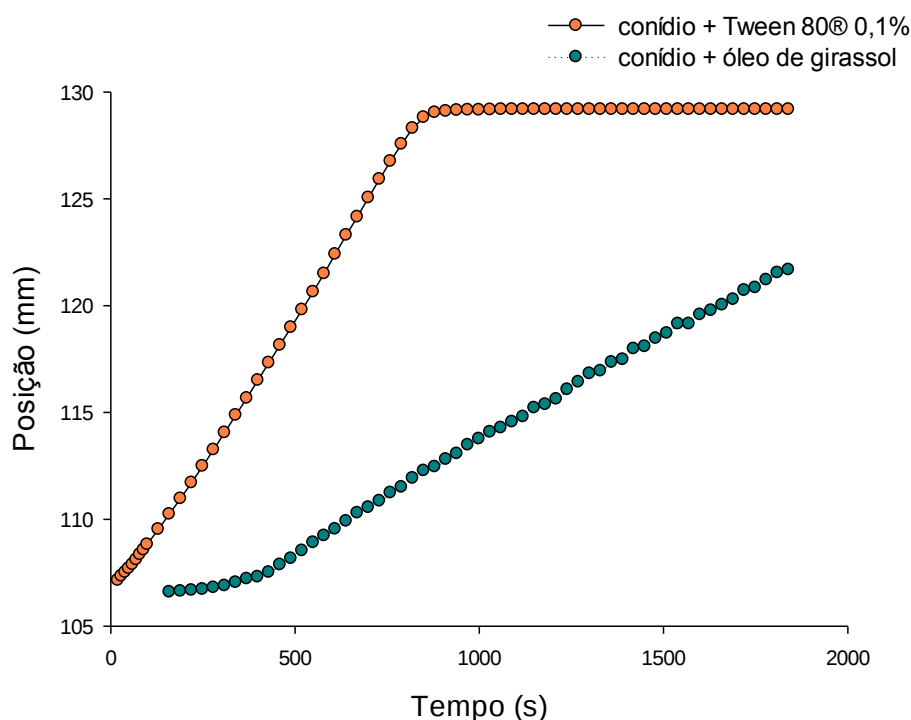


Figura 11. Velocidade de separação de conídios dispersos em diferentes meios (Tween 80® 0,1% e óleo de girassol) em função do tempo em segundos (s)

7.4 Discussão

O meio em que os conídios estão dispersos e o tipo de formulação influenciam significativamente na distribuição do tamanho de partículas. Conídios de *M. anisopliae*, *Metarhizium acrididum*, *Beauveria bassiana* e *Trichoderma* spp. também apresentaram diferenças na distribuição do tamanho de partículas quando comparados três meios de dispersão, sendo água, água e Tween 80® 0,05% e óleo Shellsol T®. Todos os fungos, exceto *Trichoderma* spp., suspenderam melhor em óleo do que em água, ou seja, em óleo conseguiu-se os menores tamanhos de partículas, sugerindo que *Trichoderma* spp. são hidrofílicos e os demais fungos são lipofílicos (Luke et al. 2015). Quando os conídios lipofílicos são suspensos em água, estes tendem a formar aglomerados, o que resulta em partículas maiores, além disso, produtos comerciais formulados em pó molhável apresentam partículas maiores que os conídios em sua formulação. Os conídios de *M. anisopliae* apresentam comprimento médio de aproximadamente 5-8µm quando medidos utilizando a microscopia óptica, isso confirma os dados obtidos que estão dentro dessa faixa de tamanho quando suspenso em óleo (Tulloch 1976, Driver et al. 2000). Formulações em pó podem apresentar diferentes ingredientes como veículos

(inertes), como por exemplo o talco, argilas, carbonato de cálcio, entre outros (Bernhard et al. 1998). Se o objetivo é reduzir o volume de aplicação no campo, visando a formulações de ultra-baixo volume (UBV) o conhecimento do tamanho de partículas é de extrema importância. Gotas pequenas seriam incapazes de carregar partículas aglomeradas com tamanhos maiores 100µm e isso poderia influenciar na quantidade de células infectivas na gota, consequentemente o controle do inseto poderia ser prejudicado (Batman 2004, Luke et al. 2015).

A densidade do óleo pode ter sido um dos principais fatores que permitiu a suspensão dos conídios na amostra com melhor estabilidade do que quando o material era suspenso em Tween 80® 0,1%. Para que uma formulação com sólidos dispersos tenha qualidade, um dos pré-requisitos é que não haja sedimentação rápida do produto; o ideal é que os sólidos fiquem suspensos no líquido por longos períodos, sendo esse um dos principais desafios desse tipo de formulação (Castelani 2014). A reologia assume um importante papel na suspensão de sólidos em líquidos, e a viscosidade do óleo de girassol é maior que a viscosidade da água, com aproximadamente 58,3 e 0,89 mPa.s, respectivamente (Korson et al. 1969, Barnes 2000, Brock et al. 2008). Durante o repouso do produto, as forças gravitacionais causam sedimentação porque as partículas são mais densas que a fase líquida. Uma maneira de superar esse efeito é equilibrar a densidade da fase dispersa e da fase líquida (Castelani et al. 2014). Os problemas de sedimentação em formulações agroquímicas podem ser minimizados por meio do uso de aditivos ou modificadores reológicos visando o aumento da viscosidade e conferindo maior estabilidade, sendo a goma de xantana bastante conhecida no mercado para essa finalidade (Tadros 1996, Castelani 2014). Agentes dispersantes também podem ser uma solução para evitar problemas com sedimentação em formulações líquidas (Jones e Burges 1998).

O fato do conídio sedimentar-se mais rápido quando suspenso em Tween 80® 0,1% do que em óleo, além de possuir relação com a viscosidade, como discutido acima, pode também apresentar relação com o tamanho das partículas suspensas no meio líquido. Como foi visto no item anterior, os conídios podem apresentar tamanhos de partículas maiores quando suspensos em Tween 80® 0,1% devido à hidrofobicidade dessas partículas, com isso, podem então apresentar instabilidade em líquidos que não sustentam a densidade dessa formação de aglomerados. Uma mistura de inseticidas com diferentes propriedades físico-químicas, como

neonicotinoides e piretróides, foi formulada com sucesso em um tipo de formulação OD devido ao uso de dispersantes, emulsificantes e modificadores de reologia adequados para este produto. Estabilidade acelerada, testes de reologia e diluição em água mostraram que estas formulações eram estáveis em um longo prazo de validade e com desempenho desejável (Castelani et al. 2016). Os autores concluíram que o uso de substâncias que melhorem a formulação é importante para o bom desempenho do produto e novas possibilidades para o mercado de pesticidas, entretanto, quando o ingrediente ativo é uma célula viva testes de compatibilidade devem ser priorizados. A investigação da viabilidade dos conídios quando em contato com componentes da formulação é importante para garantir a segurança do microrganismo, pois até os óleos minerais e vegetais podem ser uma ameaça à viabilidade de *M. anisopliae* (Daoust et al. 1983).

7.5 Conclusão

Métodos para avaliação do comportamento de conídios em diferentes meios é importante para o planejamento de formulações do ingrediente ativo. Entretanto, mesmo se tratando de organismos vivos essas análises continuam tendo importância, uma vez que estas podem auxiliar com informações que melhorem o desenvolvimento dos biopesticidas. O meio que os conídios estão dispersos devem ser considerados, uma vez que estes podem influenciar no tamanho de partículas e na estabilidade dos sólidos suspensos no líquido.

Referências

- Barnes HA (2000) A Handbook of Elementary Rheology. Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, University of Wales, Aberystwyth.
- Bateman R (2004) Constraints and enabling technologies for mycopesticide development. *Outlooks Pest Manag*, 15: 64-69.
<https://doi.org/10.1564/15apl07>
- Bateman R. 2012. Operating Instructions for the MycoHarvester Version 5b. Disponível em:
http://www.dropdata.net/mycoharvester/Operating_Instructions_MycoHarvester_Vb.pdf. (Último acesso 12 set 2017).

- Bernhard K, Holloway PJ, Burges HD (1998) Appendix I: a catalogue of formulation additives: function, nomenclature, properties and suppliers. In: Burges HD (ed) Formulation of microbial pesticides – beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Springer, Dordrecht, pp 7-30.
- Brock J, Nogueira MR, Zakrzewski C, Corazza FC, Corazza ML, Oliveira JV (2008) Determinação experimental da viscosidade e condutividade térmica de óleos vegetais. Food Sci Technol 28(3): 564-570.
- Castelani P, Antunes MCF, Leal FLS (2016) Oil Dispersion Formulations: Stability Assessment and Field Trials. In: Goss G (ed) 35th Symposium on Pesticide Formulation and Delivery Systems: Pesticide Formulations, Adjuvants and Spray Characterization. ASTM, New Orleans LA, pp 1-14.
- Castelani P (2014) Formulação agroquímica do tipo dispersão em óleo, uso das formulações agroquímicas do tipo dispersão em óleo e processo de obtenção de formulação agroquímica do tipo dispersão em óleo. Patente: WO 2014/169363 Al.
<https://patentimages.storage.googleapis.com/93/58/75/d092eaaf3339bd/WO2014169363A1.pdf>. Acessado 22 setembro 2018.
- Chapple AC, Downer RA, Bateman RP (2007) Theory and practice of microbial insecticide application. In: Lacey LA, Kaya HK (eds.), Field manual of techniques in invertebrate pathology, 2^a edn. Springer, The Netherlands, pp 9-34.
- Daoust RA, Ward MG, Roberts DW (1983) Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. J Invertebr Pathol 41:151–160.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90214-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90214-8)
- Driver F, Milner RJ, Trueman JWH (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol Res 104: 134-150. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001756>
- Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol Control 43: 237-256.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Jones K, Burges HD (1998) Technology of formulation and application. In: Burges HD (ed). Formulation of microbial pesticides – beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Springer, Dordrecht, pp 7-30

- Korson L, Drost-Hansen W, Millero FJ (1969) Viscosity of water at various temperatures. J Phys Chem 73 (1): 34-39.
<https://doi.org/10.1021/j100721a006>
- Luke B, Faull J, Bateman R (2015) Using particle size analysis to determine the hydrophobicity and suspension of fungal conidia with particular relevance to formulation of biopesticide, Biocontrol Sci Technol 25(4): 383-398.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2014.979396>
- Mascarin GM, Jaronski ST (2016) The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. World J Microbiol Biotechnol 32: 1-26.
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Moura Mascarin G, Biaggioni Lopes R, Delalibera Jr I, Kort Kamp Fernandes E, Luz C, Faria M (2018) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. J Invertebr Pathol S0022-2011(17): 30365-30368. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>
- Pereira I, Zielinska A, Ferreira NR, Santos AC, Severino P, Silva AM, Souto EB (2018) Optimization of linalool-loaded solid lipid nanoparticles using experimental factorial design and long-term stability studies with a new centrifugal sedimentation method. Int J Pharm 549(1-2): 261-270.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.068>
- Tadros TF (1996) Surfactants in Agrochemicals, (Surfactant Science Series 54), Marcel Dekker, Inc., 1995. J Disper Sci Technol 17(1): 97-97.
<https://doi.org/10.1080/01932699608943491>
- Tulloch M (1976) The genus *Metarhizium*. Trans Br Mycol Soc 66(3): 407-411.
[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80209-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80209-4)
- Westfall PH, Tobias RD, Rom D, Wolfinger RD, Hochberg Y (1999) *Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System*, Cary, NC: SAS Institute Inc.

CAPÍTULO 8
FERMENTAÇÃO LÍQUIDA PARA A PRODUÇÃO DE *Beauveria bassiana* E
***Metarhizium anisopliae* EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS**

Revista: Biocontrol Science and Technology

Resumo

A produção de fungos entomopatogênicos em meio líquido tem recebido atenção dos pesquisadores e da indústria devido ao menor uso de mão de obra e maior controle e uniformidade dos parâmetros de fermentação comparada à fermentação em estado sólido. Além disso, esse método pode apresentar possibilidades de escalonamento e aumentar ainda mais a produção de micoinseticidas em sistemas industriais. Cada etapa do processo deve ser explorada para que o sucesso seja alcançado, considerando em primeiro lugar o meio em que o microrganismo irá se desenvolver. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura. O meio de cultura composto por farinha de arroz foi o melhor meio de cultura para ambos os fungos dentre os sete meios testados. A fermentação líquida foi mais promissora para *B. bassiana* devido ao seu maior rendimento em todos os meios de cultura utilizados. Portanto, testes de “screening” de meio de cultura são indispensáveis, uma vez que alguns fungos como *M. anisopliae* pode não se desenvolver em algumas condições nutricionais.

Palavras-chave: fermentação líquida, fungo entomopatogênico, seleção de meios de cultura, biomassa, esporo submerso

Abstract

The production of entomopathogenic fungi in liquid medium has received attention from researchers and industry due to the lower use of labor and greater control and uniformity of fermentation parameters compared to solid state fermentation. In addition, this method may present scaling possibilities and further increase the production of mycoinsecticides in industrial systems. Each step of the process should be explored so that success is achieved, considering in the first place the medium in which the micro-organism will develop. The objective of this work was to evaluate the production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in different culture media. The culture medium composed of rice flour was the best culture medium for both fungi among the seven media tested. Liquid fermentation was more promising for *B. bassiana* because of its higher yield in all culture media used. Therefore, culture medium screening tests are indispensable, since some fungi such as *M. anisopliae* may not develop in some nutritional conditions.

Key-words: liquid fermentation, entomopathogenic fungus culture media, selection, biomass, submerged spore

8.1 Introdução

Os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são bem conhecidos no manejo de artrópodes-praga em áreas agrícolas e florestais (Li et al. 2010; Mascarin et al. 2018). Esses microrganismos podem ser produzidos, basicamente, por fermentação sólida e líquida e, também por fermentação bifásica, com fase líquida (inóculo inicial) e outra sólida (produção de conídios) (Jenkins et al. 1998). A fermentação líquida tem sido estudada, mas a sólida está presente na maioria dos países em desenvolvimento como o principal método de produção em larga escala (Jaronski, 2014; Moura Mascarin, 2018).

A fermentação líquida para a produção de fungos entomopatogênicos pode ser considerada uma grande oportunidade para produzir grandes quantidades de fungo em uma escala industrial. Esse método apresenta alta estabilidade devido ao controle de vários parâmetros e em poucos dias ou horas já é possível obter células infectivas (Jaronski e Jackson, 2012). A fermentação líquida utilizando biorreatores com agitação permite o monitoramento e controle do sistema, isso resulta em um ambiente nutricionalmente homogêneo, e com temperatura, pH, oxigênio dissolvido monitorados e controlados (Mascarin e Jaronski, 2016). Esse sistema de produção pode gerar diferentes propágulos, tais como blastosporos, conídios submersos, microescleródios e micélios (Kobori et al., 2015). A obtenção de determinados propágulos depende do método de produção, sendo o meio de cultura um dos principais fatores chave (Fargues et al. 2002; Jackson e Jaronski, 2009). Fungos filamentosos necessitam de fontes de carbono e nitrogênio em quantidades pré-determinadas nos meios de cultura para crescerem e se desenvolverem adequadamente (Jaronski, 2014; Jackson e Jaronski, 2009).

A produção por fermentação líquida de grandes quantidades de fungos pode ser um grande desafio devido a forma de crescimento dos fungos filamentosos, como em meios de cultura muito viscosos, não apropriados ao fungo, entre outros (Gibbs et al. 2000). O objetivo foi avaliar diferentes meios de cultura líquidos para a produção de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

8.2 Material e Métodos

Obtenção do fungo e local

Um isolado do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales, Clavicipitaceae) (IBCB425) foi obtido de amostras de solo da Mata Atlântica no município de Iporanga, Estado de São Paulo, Brasil, e um isolado do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) (IBCB227) foi obtido de larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith, 1979 (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas no município de Casa Branca, São Paulo, Brasil. Ambos os isolados foram depositados na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal em Campinas, São Paulo, Brasil. Os conídios puros do fungo foram mantidos a -80 ° C para preservação. Além disso, foi mantido a -20 °C em glicerol a 10% e a 6 °C em tubos contendo meio de cultura malte, peptona de soja e ágar - MPA (extrato de malte 30 g L [Merck KGaA, Alemanha], peptona de soja 5 g L [Merck KGaA, Alemanha], Agar 18 g L Roth, Alemanha) para fornecer material para os experimentos. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, Instituto de Controle Biológico, Instituto Julius Kühn, Darmstadt, Alemanha.

Inóculo inicial

O inóculo inicial (pré-cultura) foi obtido de colônias dos fungos preservadas a 6 °C. O fungo foi inoculado utilizando uma alça estéril em diferentes meios líquidos (Tabela 1). Frascos Erlenmeyer de 100 mL foram preenchidos com volume de 50 mL de cada meio de cultura com auxílio de um dosador, em seguida o material foi esterilizado a 121 °C, durante 20 minutos em autoclave [Tuttnauer autoclave 5075EL - esterilizador a vapor, Holanda]. Em seguida, procedeu-se a inoculação de três pré culturas para cada tratamento (meio de cultura), como descrito acima. Posteriormente, colocou-se os frascos Erlenmeyers em uma incubadora tipo shaker [Multitron, Infors HT, Suíça] a 25 °C, 150 rpm para crescimento de fungos durante 72 horas, em condições escuras.

Tabela 1. Meios líquidos de cultura (meios) que compuseram os tratamentos, ingredientes e respectivos pH

Meios	Quantidade para preparar 1L	pH
MPB	extrato de malte (30,0g) [Merck KGaA, Alemanha], peptona de soja (5,0g) [Merck KGaA, Alemanha]	4,54 ± 0,19
Samsinakova (SAMSI 8)	glicose (25,0g) [Merck KGaA, Alemanha], "corn steep solid" (20,0g) [Merck KGaA, Alemanha], cloreto de sódio (NaCl) (5,0g) [Merck KGaA, Alemanha]	4,81 ± 0,01
Sabourand (SDAY)	glicose (40,0g), peptona de soja (10,0g), levedura (5,0g) [Merck KGaA, Alemanha]	3,95 ± 0,02
Adamek	glicose (40,0g), levedura (40,0g), "corn steep solid" (30,0g)	4,93 ± 0,003
Catroux	sacarose (30,0g) [Carl Roth, Alemanha], "corn steep solid" (20,0g), nitrato de potássio (KNO ₃) (5,0g) [Merck KGaA, Alemanha], Dihidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄) (6,8 g) [Merck KGaA, Alemanha], carbonato de cálcio (CaCO ₃)(0,2g) [Merck KGaA, Alemanha], heptahidrato de sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)(0,1g) [Merck KGaA, Alemanha]	5,216 ± 0,11
Arroz	Glicose (25,0g), farinha de arroz orgânica (60,0g) [Bauk Hof, Alemanha], cloreto de sódio (NaCl) (5,0g)	3,61 ± 0,003
Samsinakova 8 + arroz	Glicose (25,0g), "corn steep solid" (20,0g), cloreto de sódio (NaCl) (5,0g), farinha de arroz orgânica (20,0g)	4,67 ± 0,02

Configuração do experimento

Inoculou-se o fungo crescido a partir da pré-cultura em um novo frasco Erlenmeyer (100mL) contendo 50mL de cada meio de cultura (Tabela 1), o total de esporos foi calculado por calibração em hemocitômetro (Thoma) e com o auxílio de um microscópio óptico [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha] foi calculado um total de 1×10^6 esporos/mL de meio de cultura, sendo esta a concentração inicial de cada repetição e em cada tratamento. Em seguida, colocou-se os frascos Erlenmeyers em uma incubadora tipo shaker a 25 °C, 150 rpm para crescimento de fungos durante 72 horas, em condições escuras. A esporulação e a produção de biomassa de cada fungo foram avaliadas após 72 horas. O pH não foi controlado durante o experimento, este foi apenas conferido antes da inoculação do fungo, foi utilizado um pHmetro de bancada. O experimento foi composto por duas espécies fungicas, sete tratamentos (meio de cultura) e 3 repetições para cada tratamento (frasco Erlenmeyer), que foi repetido três vezes nas mesmas condições, porém, em momentos diferentes e utilizando diferentes lotes do fungo.

Avaliação

O total de esporos produzidos por mL em fermentação líquida foi determinado em hemocitômetro (Thoma) com auxílio de microscópio óptico. O isolamento da biomassa para a avaliação do total produzido/mL seguiu um protocolo. A biomassa produzida a partir de um volume de 5 mL por repetição e por tratamento foi avaliada com esse volume por tubo Falcon de 15 mL previamente pesado e, em seguida, centrifugado durante 10 min a 3220 xg a 25 °C, em centrífuga Eppendorf 5810R, Alemanha. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de água deionizada para o processo de lavagem. Esta etapa de lavagem foi repetida três vezes para limpar completamente a amostra, em particular os componentes do meio dissolvidos. Após a última lavagem, o sedimento foi pesado e ressuspenso com 2 mL de água deionizada. Posteriormente, a amostra foi colocada na bandeja de metal e a umidade final foi determinada por um analisador de umidade [Sartorius, Alemanha].

Análise estatística

Na análise da contagem de esporos, considerando como fatores o meio e isolados, foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição binomial negativa e função de ligação logarítmica. A biomassa de cada amostra foi calculada com a seguinte fórmula antes da realização da análise estatística:

$$100\% - \% \text{ do teor de umidade da amostra} = \% \text{ biomassa seca}$$

$$\text{amostra e tubo Falcon em mg} - \text{tubo Falcon em mg} = \text{peso da amostra em mg}$$

$$\frac{\left(\text{massa da amostra} \frac{\text{mg}}{100} \% \right) * \% \text{ biomassa seca}}{5\text{mL}} = \text{biomassa seca mg/mL}$$

Na análise estatística biomassa seca (mg/mL), considerando como fatores meio e isolados, foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição gama e função de ligação logarítmica. Foi utilizado o procedimento genmod (do Programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition e para comparações entre tratamentos foi utilizado foi o teste de Tukey-Kramer (Westfall et al. 1999). Os gráficos foram plotados com o software SigmaPlot 12.0.

8.3 Resultados

Esporulação em diferentes meios líquidos

A esporulação dos isolados IBCB227 e IBCB425 diferiu entre os meios de cultura ($P < 0,05$) com maior valor no de cultura arroz para ambos os fungos. A esporulação máxima foi de $4,59 \times 10^8$ esporos/mL para o IBCB227 e de $5,47 \times 10^7$ esporos/mL para o IBCB425. A baixa produção de esporos submersos (Tabela 2; Figura 1) indicaram os meios Catroux e Samsi8 + arroz os menos indicados para a fermentação líquida dos isolados IBCB227 e IBCB425, respectivamente (Tabela 2; Figura 1). O meio de cultura de Arroz fica muito viscoso quando preparado, entretanto, durante o processo fermentativo reduz a alta viscosidade ficando pouco viscoso no final da fermentação.

A fermentação líquida foi mais adequada para o isolado IBCB227 de *B. bassiana* que para o isolado IBCB425 de *M. anisopliae* em todos os tratamentos (meio de cultura), pois a maior produção ocorreu em IBCB227. Em alguns tratamentos como MPB, SDAY e Adamek não houve produção de esporos para IBCB425, apenas houve a formação de pellets (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidade média de esporos de *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) e *Beauveria bassiana* (IBCB227) produzidos em diferentes meios líquidos

Meio de cultura	Isolados	
	IBCB227 ^a	IBCB425 ^a
MPB	1,53E+08 ± 2,08E+07 BC	-
Samsinakova (SAMSI 8)	2,51E+08 ± 3,71E+07 ABa	5,11E+06 ± 5,97E+05 Bb
Sabourand (SDAY)	1,88E+08 ± 5,83E+07 BC	-
Adamek	1,13E+08 ± 7,61E+06 C	-
Catroux	3,69E+07 ± 9,77E+06 Da	6,53E+06 ± 1,17E+06 Bb
Arroz	4,59E+08 ± 5,75E+07 Aa	5,47E+07 ± 7,60E+06 Ab
SAMSI 8 + arroz	2,26E+08 ± 5,86E+07 ABCa	1,67E+06 ± 2,28E+05 Cb

^aMédias das proporções seguidas de mesma letra maiúscula por coluna ou mesma letra minúscula por linha, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey–Kramer (Westfall, et al., 1999) ao nível de 5% de significância.

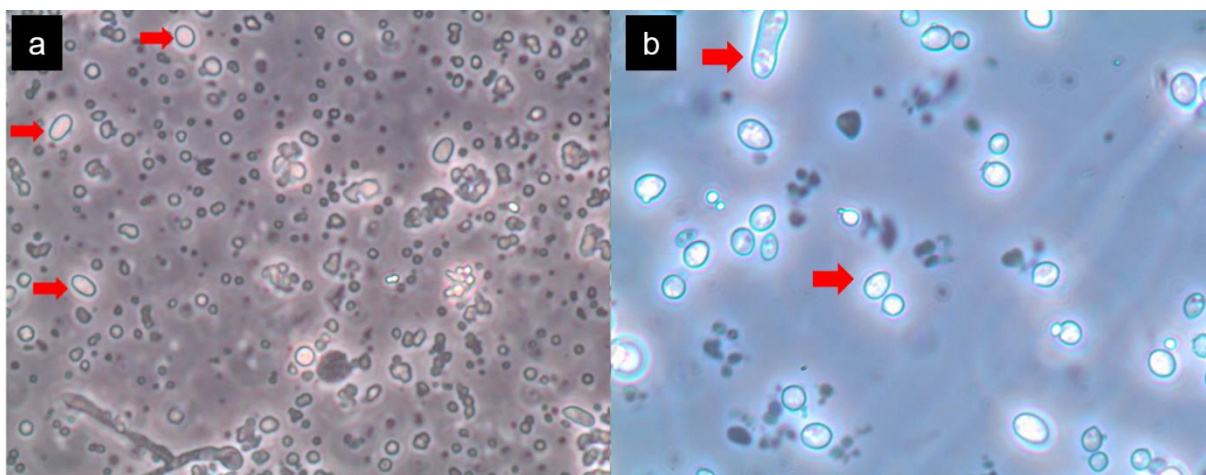


Figura 1. *Metarhizium anisopliae* (a) e *Beauveria bassiana* (b) produzidos em meio líquido à base de arroz, setas indicam o fungo.

Produção de biomassa em diferentes meios líquidos

A biomassa seca em mg/mL dos fungos foi semelhante, mas variou entre meios de cultura ($P < 0,05$). A biomassa produzida foi maior no meio de cultura Catroux, com biomassa seca média em mg/mL de $0,67 \pm 0,03$ e menor em MPB, $0,03 \pm 0,01$ (Figura 2).

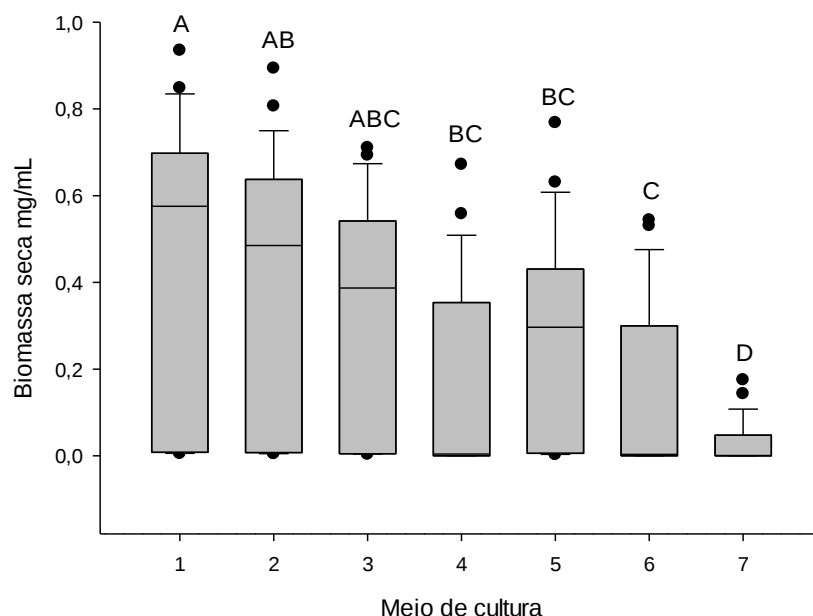


Figura 2. Quantidade de biomassa seca em mg/mL de *Metarhizium anisopliae* (IBCB425) e *Beauveria bassiana* (IBCB227) nos meios líquidos: Catroux (1); Samsinakova 8 + arroz (2); Arroz (3); Adamek (4); Samsinakova (SAMSI 8) (5); Sabourand (SDAY) (6); MPB (7)

8.4 Discussão

A produção de esporos submersos (blastosporos) de ambos os fungos no meio de cultura com farinha de arroz foi maior, assim como o arroz, no meio de cultura, foi o responsável pela alta produção de esporos submersos de *Cordyceps fumosorosea* (ESALQ1296) e *Cordyceps farinosa* (ESALQ1205) em meios líquidos, com produção máxima de $2,8 \times 10^6$ e $1,9 \times 10^7$ esporos/mL, respectivamente (Mascarin et al. 2010). No entanto, estes valores foram inferiores aos dos isolados IBCB277 e IBCB425 ($4,59 \times 10^8$ e $5,47 \times 10^7$ esporos/mL). O arroz é adequado na produção de fungos por fermentação em estado sólido (Jenkins et al. 1998; Prakash et al. 2008), entretanto, este ingrediente também pode ter potencial na fermentação líquida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* como demonstrado para IBCB227 e IBCB425. O conteúdo nutricional é importante pois os fungos necessitam de fontes de carbono e nitrogênio. Além disso, meios de cultura com alta viscosidade, durante o processo fermentativo podem resultar em uma distribuição heterogênea de oxigênio dissolvido e nutrientes disponíveis dentro do biorreator com efeito negativo ao microrganismo (Gibbs et al. 2000).

Produzir *B. bassiana* em fermentação líquida foi relativamente mais fácil do que produzir *M. anisopliae*. A busca pelo meio de cultura ideal para a fermentação líquida de *M. anisopliae* é o ponto chave o sucesso na produção desse microrganismo, entretanto, dificuldades são comuns de serem encontradas, vários casos de insucesso já foram detectados em laboratório (D. Stephan, informações pessoais). A produção de *M. anisopliae* em seis diferentes meios de cultura baseados em glicose, ácido casiminos e sais resultou na produção de diferentes células do fungo, em especial os microescleródios. Essas estruturas apresentam potencial de uso para controle de insetos praga no solo, devido à sua estabilidade quando comparado com outras células submersas (Jackson e Jaronski, 2009). Apesar de o isolado IBCB425 apresentar baixa produção em Catroux e Adamek ($6,53 \times 10^6$ e $0,0$ esporos/mL) esses meios de cultura foram adequados para *Metarhizium flavoviride* com produção de $2,0 \times 10^8$ e $2,4 \times 10^8$ esporos/mL, respectivamente, e $5,0 \times 10^8$ esporos/mL em 2 dias (Fargues et al. 2001; Iwanicki et al., 2018).

A biomassa do fungo, após a fermentação, foi maior, com meio de cultura Catroux, mas esporulação de IBCB227 foi menor com este meio de cultura. Esse meio de cultura poderia ser considerado o menos adequado para a produção de *B. bassiana* dependendo do objetivo. Altas quantidades de biomassa no biorreator pode ser um problema para a fermentação e colheita dos esporos submersos, devido a redução do oxigênio disponível dificultando a separação do material produzido (Gibbs et al. 2000).

Meios de cultura líquido são potenciais para a produção de *B. bassiana* IBCB227, mas, atenção especial deve ser dada ao fungo *M. anisopliae* IBCB425 para a viabilização da produção desse isolado em meio líquido. A realização de novos testes torna-se necessária, onde outros meios de cultura disponíveis na literatura e também o desenvolvimento de novos meios podem solucionar os problemas de produção desse isolado.

8.5 Conclusão

O uso de frascos Erlenmeyers para testes de “screening” são eficazes, uma vez que em curto espaço de tempo e em pouco espaço é possível experimentar diversos meios de cultura visando uma produção em larga escala. Além disso, testes de

“screening” são extremamente importantes o sucesso da produção de fungos entomopatogênicos, visto que alguns meios de cultura podem inviabilizar o desenvolvimento dos fungos. Portanto, antes de iniciar uma produção em maior escala, em biorreatores, deve-se investigar qual o meio de cultura ideal para o fungo em questão.

Referências

- Fargues, J., Smits, N., Vidal, C., Vey, A., Vega, F., Mercadier, G. & Quimby, P. (2002). Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia* 154, 127-138.
- Gibbs, P. A., Seviour, R. J. & Schmid, F. (2000). Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(1), 17–48.
- Iwanicki, N. S., Ferreira, B. O., Mascarin, G. M. & Delalibera Jr., I. (2018). Modified Adamek's medium renders high yields of *Metarhizium robertsii* blastospores that are desiccation tolerant and infective to cattle-tick larvae. *Fungal Biology*, 122(9), 883-890.
- Jaronski, S. T. (2014). Mass production on entomopathogenic fungi: state of the art. In J. A. Morales-Ramos, M. G. Rojas & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.), *Mass production of beneficial organisms* (pp. 357-415), Amsterdam, Netherlands: Elsevier Inc.
- Jaronski, S. T. & Jackson, M. A. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (2^a ed.) (pp. 255-284) New York, NY: Academic Press.
- Jackson, M. A. & Jaronski, S. T. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, 113(8), 842-850.
- Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. J. & Lomer, C. J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Inform*, 19, 21N–31N. <http://cabweb.org/PDF/BNI/Control/BNIRA38.PDF>. (acessado 11 Julho 2018).

- Kobori, N. N., Mascarin, G. M., Jackson, M. A. & Schisler, D. A. (2015). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 119(4):179-190.
- Li, Z., Alves, S. B., Roberts, D. W., Fan, M., Delalibera Jr, I., Tang, J., Lopes, R. B., Faria, M. & Rangel, D. E. N. (2010). Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 20, 2, 117-136.
- Prakash, G. V. S. B., Padmaja, V. & Kiran, R. R. S. (2008). Statistical, optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 99, 1530-1537.
- Mascarin, G. M., Alves, S. B. & Lopes, R. B. (2010). Culture media selection for mass production of *Cordyceps fumosorosea* and *Cordyceps farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4), 753-761.
- Mascarin, G., Biaggioni Lopes, R., Delalibera Jr., I., Kort Kamp, E. F., Luz, C. & Faria, M. (2018). Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal Invertebrate Pathology*, S0022-2011(17), 30365-30368.
- Mascarin, G. M. & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 32, 1–26.
- Westfall, P. H., Tobias, R. D., Rom, D., Wolfinger, R. D. & Hochberg, Y. 1999. Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System, Cary, NC: SAS Institute Inc.

CAPÍTULO 9

CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE *Beauveria bassiana* DURANTE A FERMENTAÇÃO LÍQUIDA EM BIORREATOR

Revista: Biocontrol Science and Technology

Resumo

Os processos de fermentação são essenciais para a produção de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912 (Hypocreales: Cordycipitaceae), que é usado no controle de muitos insetos praga em áreas agrícolas e florestais. A fermentação líquida é um sistema industrialmente empregado para produzir em diferentes escalas uma variedade de estruturas fúngicas em curto espaço de tempo. Entretanto, devido à forma de crescimento de fungos específicos, há muitos problemas envolvendo a fermentação líquida e que devem ser estudados. Por esta razão, é necessário usar biorreatores especializados para estudar parâmetros específicos. O biorreator Minifors InforsHT® foi utilizado para avaliar o rendimento de *B. bassiana* produzido em fermentação líquida durante 72 horas, a 25 ° C, utilizando meio líquido Adamek. Avaliou-se a produção de esporos e biomassa relacionados ao consumo de glicose; o pH e o O₂ (%) foram monitorados. As amostras foram coletadas a cada 4 horas e esta experiência foi repetida 3 vezes com diferentes lotes do fungo. *Beauveria bassiana* apresentou um rendimento aproximado de 1×10^9 esporos/mL, a produção máxima de biomassa seca foi de 1,2mg/mL, sendo o consumo de glicose foi diretamente relacionado à capacidade de esporulação e produção de biomassa. O pH foi de 3,53 (0,092) e a concentração de O₂ 70,12% (1,071). A produção do fungo *B. bassiana* isolado IBCB227 através da fermentação líquida em biorreatores de bancada é possível, permitindo a transferência desta tecnologia para escala industrial. O tempo de produção, menos de 3 dias, pode incentivar a produção de biopesticida no Brasil por fermentação líquida, quando comparado aos 14 dias de fermentação sólida.

Palavras-chave: esporos submersos, controle biológico, produção de fungos, consumo de glicose, fermentação líquida, biorreator.

Abstract

Fermentation processes are essential for producing entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana*, which is used for control of many insect pests in agricultural and forest areas. Liquid fermentation is a system industrially employed to produce at different scales a variety of fungal structures in a short time. However, due to the growth form of specific fungi, there are many problems involving liquid fermentation that must be studied. For this reason, it is necessary to use specialized bioreactors to study specific parameters. The Minifors InforsHT® bioreactor was used to evaluate the yield of *B. bassiana* produced in liquid fermentation during 72 hours at 25 °C using Adamek liquid medium. The production of spores and biomass related to glucose consumption was evaluated; pH and O₂ (%) were monitored. Samples were collected every 4 hours and this experiment was repeated 3 times with different batches of the fungus. *Beauveria bassiana* presented an approximate yield of 1×10^9

spores / mL, the maximum dry biomass production was 1.2 mg/mL and the glucose consumption was directly related to sporulation capacity and biomass production. The pH was 3.53 (0.092) and the O₂ concentration was 70.12% (1.071). The production of *B. bassiana* fungus isolated IBCB227 through liquid fermentation in bench bioreactors is possible, allowing the transfer of this technology to industrial scale. The production time, less than 3 days, can encourage the production of biopesticide in Brazil by liquid fermentation, when compared to the 14 days of solid fermentation.

Key-words: submerged spores, biological control, fungi production, glucose consumption, liquid fermentation, bioreactor.

9.1 Introdução

Os setores agrícola e florestal têm passado por um momento de transformação nos últimos tempos, onde tecnologias biológicas vêm ganhando espaço nesses setores devido à busca por métodos sustentáveis. Porém, as áreas de culturas agrícolas e plantios florestais ocupam uma extensa área no Brasil que correspondem a 284 milhões e 7,84 milhões de hectares plantados, respectivamente (Fao 2016; Ibá 2017). Dessa forma, podem existir diversas limitações no uso de agentes microbiológicos, principalmente relacionado ao volume de produto produzido para tratar todas as áreas. Portanto, torna-se necessários a utilização de métodos para aumentar a quantidade de microrganismos produzidos, e que preservem a qualidade dos mesmos.

A cultura submersa ou fermentação líquida é um sistema empregado industrialmente para a produção de uma variedade de produtos e metabólitos oriundos de microrganismos de importância, como os fungos filamentosos (Gibbs et al. 2000). Entre os fungos filamentosos, encontram-se as principais espécies de fungos entomopatogênicos, as quais apresentam grande importância para o controle de pragas no Brasil, como por exemplo o fungo *Beauveria bassiana* (Zimmermann 2007; Li et al. 2010). Esse tipo de fermentação caracteriza-se como um processo rápido e de custo efetivo que possibilita a obtenção de células infectivas em curto espaço de tempo quando comparado à fermentação em estado sólido (Mascarin et al. 2015a,b; Mascarin e Jaronski 2016; Mascarin et al. 2018). Além disso, foi verificado em alguns trabalhos já realizados que a infecção e morte do inseto hospedeiro, a mosca branca, pode ser mais rápida pelo produto originado da

fermentação líquida do que o produto da fermentação sólida, sendo os blastosporos mais eficazes que os conídios em condições controladas (Mascarin et al. 2015b).

A produção líquida em larga escala de um fungo, como *B. bassiana*, é desenvolvida gradativamente, ou seja, inicia-se em pequenas escalas para definição de parâmetros básico visando às melhores condições de produção (Mascarin e Jaronski 2016). Esses parâmetros como meio de cultura, pH, temperatura, O₂ dissolvido, agitação, são otimizados durante o processo de experimentação em frascos Erlenmeyer (Gibbs et al. 2000; Jaronski e Jackson, 2012; Mascarin e Jaronski, 2016). Vários equipamentos chamados biorreatores de bancada foram desenvolvidos para que o sistema seja transferido em escalas industriais, tendo produções iniciais de até 6L nesses biorreatores, por exemplo.

Este trabalho objetivou o estudo da fermentação em estado líquido do fungo *B. bassiana* visando a produção massal, sendo avaliados principalmente a produção de blastosporos, a produção de biomassa e o consumo de glicose durante 72 horas do processo fermentativo.

9.2 Material e Métodos

Obtenção do fungo e local

Para a fermentação líquida utilizou-se um isolado do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) (IBCB227) obtido de larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith, 1979 (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas no município de Casa Branca, São Paulo, Brasil. Ambos os isolados foram depositados na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal em Campinas, São Paulo, Brasil. Os conídios puros do fungo foram mantidos a -80 ° C para preservação. Além disso, foi mantido a -20 °C em glicerol a 10% e a 6 °C em tubos contendo meio de cultura malte, peptona de soja e ágar - MPA (extrato de malte 30 g L [Merck KGaA, Alemanha], peptona de soja 5 g L [Merck KGaA, Alemanha], Agar 18 g L Roth, Alemanha]) para fornecer material para os experimentos. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, Instituto de Controle Biológico, Instituto Julius Kühn, Darmstadt, Alemanha.

Inóculo inicial

O inóculo inicial (pré-cultura) foi obtido pela propagação do fungo proveniente das culturas preservadas a 6 °C. O fungo foi inoculado utilizando uma alça estéril em meio de cultura líquido Adamek (40,0g/L de glicose [Merck KGaA, Alemanha], 40,0g/L de levedura [Merck KGaA, Alemanha], 30,0g/L “corn steep solid” [Merck KGaA, Alemanha]) (Adamek, 1963). Frascos Erlenmeyer de 100 mL foram preenchidos com volume de 50 mL de cada meio de cultura com auxílio de um dosador, em seguida o material foi esterilizado a 121 °C, durante 20 minutos em autoclave de 160L [Tuttnauer autoclave 5075EL - esterilizador a vapor, Holanda]. Em seguida, procedeu-se a inoculação de três pré culturas, como descrito acima. Posteriormente, colocou-se os frascos Erlenmeyers em uma incubadora tipo shaker [Multitron, Infors HT, Suíça] a 25 °C, 150 rpm para crescimento de fungos durante 72 horas, em condições escuras.

Configuração do equipamento: O Minifors, Infors HT®

O biorreator de bancada Minifors [infors HT®, Suíça] está detalhadamente explicado na figura 1 de acordo com os dados do fornecedor. Foi realizada a verificação e limpeza de todas as partes do equipamento antes de iniciar os experimentos. Todas as conexões foram fixadas (tubos de silicone, eletrodos, filtros) e protegidos com papel alumínio, devido ao processo de esterilização. Em seguida, o biorreator foi preparado utilizando o meio líquido Adamek. Para isso, o biorreator foi preenchido com o volume total preparado desse meio (3L) com auxílio de um funil. O eletrodo de pH foi calibrado utilizando o painel da unidade base e reagentes ácido e base. O suporte do vaso do biorreator, incluindo o vaso, os tubos conectados, o silicone anti-espuma [Merck KGaA, Alemanha] e os tubos de ensaio para amostragem foram autoclavados a 121 °C, durante 20 minutos em autoclave de 160L. Após a esterilização e esfriamento do equipamento realizou-se a calibração do eletrodo de O₂ (sensor polarográfico de O₂ dissolvido). Para isso, foi realizado a definição do ponto 100% com a inoculação de O₂ e o ponto 0% com a retirada do O₂ do sistema com a inoculação de CO₂.

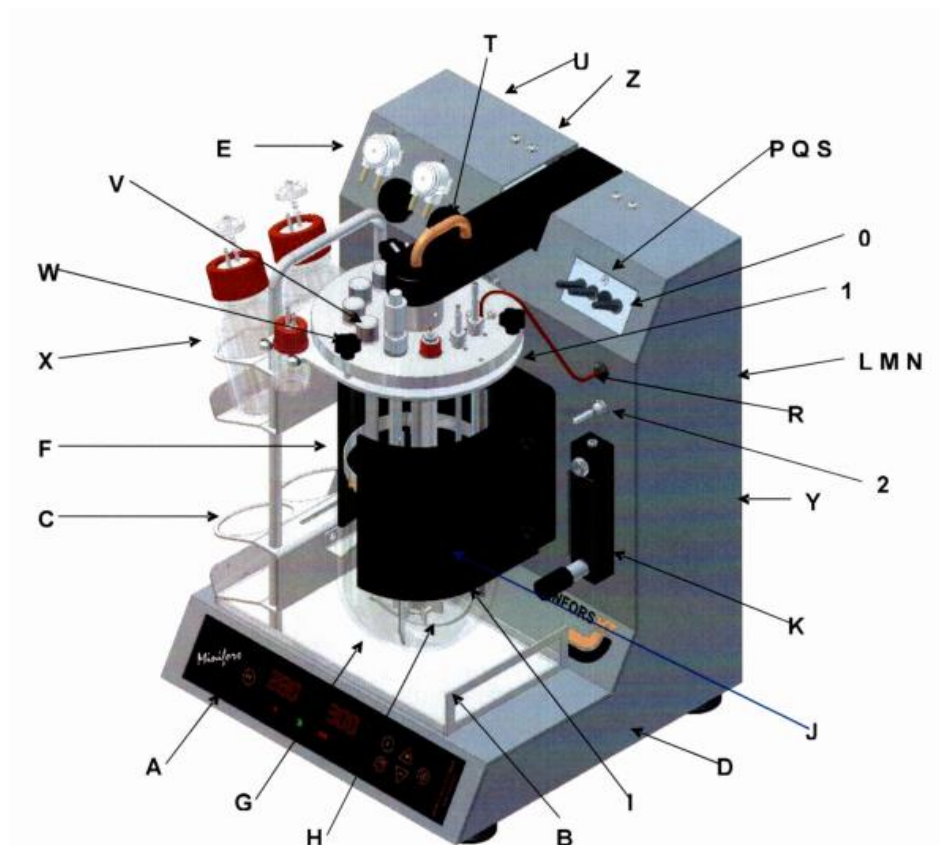


Figura 1. Detalhamento das partes do Minifors, Infors HT®: A- painel de operação; B- suporte do vaso; C- suporte de garrafa de reagente; D- unidade base; E- bombas peristálticas; F- bloco aquecedor; G- vaso; H- aspersor de gases; I- eixo de transmissão; J- placa refletora de calor; K- rotâmetro; L- entrada de ar (traseira); M- entrada de água (traseira); N- saída de água (traseira); O- amplificador operacional; P- cabo do sistema pH (eletrodo); Q- cabo do sistema anti-espuma; R- sonda de temperatura; S- cabo do sistema O₂ (sensor polarográfico de O₂ dissolvido); T- alça de elevação para remoção da unidade base; U- interruptor principal (traseira); V- encaixes de acesso; W- parafuso de fixação para o vaso; X- garrafa de reagente; Y- células de entrada de O₂ e CO₂ (traseira); Z- Porta de dados serial RS-232 (traseira); 1- Localização do posto de aterramento; 2- Localização da entrada de ar (opcional). Imagem fornecida pela Infors HT®.

Inoculação do fungo no biorreator

Inoculou-se o fungo crescido a partir da pré-cultura de 72 horas de idade no biorreator. Foi realizada a contagem de esporos submersos produzidos e a concentração foi definida através da calibração em hemocitômetro (Thoma) e com o auxílio de um microscópio óptico [Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha], o valor

da esporulação foi calculado para que o meio de cultura tivesse um total de 1×10^6 esporos/mL, sendo esta a concentração inicial do processo fermentativo. Em seguida, já com o biorreator em funcionamento, este foi configurado para 25 °C, 600 rpm, 2,0L de ar/L de meio/min para crescimento de fungos durante 72 horas. Durante o processo de fermentação foram realizadas amostragens a cada 4 horas, totalizando 18 amostras. Vários parâmetros foram avaliados para cada amostra, sendo, a esporulação, a produção de biomassa e a quantidade de glicose. O pH e o O₂ dissolvido no meio foram monitorados durante todo o processo. Foram realizadas 3 fermentações em momentos diferentes e com diferentes lotes do fungo.

Avaliação

O total de esporos produzido por mL a partir de cada amostra coletada do biorreator, em fermentação líquida foi determinada em hemocitômetro (Thoma) com o auxílio de um microscópio óptico. Um protocolo de isolamento da biomassa para a avaliação do total produzido foi adotado. A biomassa produzida a partir de um volume de 5 mL foi avaliada por repetição e por tratamento (amostragem em horas), foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL previamente pesado e, em seguida, centrifugou-se o material durante 10 min a 3220 xg a 25 °C, em centrífuga Eppendorf 5810R, Alemanha. Posteriormente, o sobrenadante foi reservado para a análise de glicose, que foi realizada através de um sistema de monitorização precisa da glicemia [Accu-Chek®, Alemanha]. O sedimento foi ressuspenso em 5 mL de água deionizada para o processo de lavagem. Esta etapa de lavagem foi repetida três vezes para limpar completamente a amostra, em particular os componentes do meio dissolvidos. Após a última lavagem, o sedimento foi pesado e ressuspenso com 2 mL de água deionizada. Posteriormente, a amostra foi colocada na bandeja de metal e o teor de umidade foi determinado por um analisador de umidade [Sartorius, Alemanha].

Análise estatística

Na análise de contagem de esporos, considerando como fator o tempo em horas, foi ajustado um modelo de regressão linear generalizado com distribuição binomial negativa e função de ligação logarítmica. A biomassa de cada amostra foi calculada com a seguinte fórmula antes da realização da análise estatística:

$$100\% - \% \text{ do teor de umidade da amostra} = \% \text{ biomassa seca}$$

$$\text{amostra e tubo Falcon em mg} - \text{tubo Falcon em mg} = \text{peso da amostra em mg}$$

$$\frac{\left(\left(\text{massa da amostra} \frac{\text{mg}}{100} \% \right) * \% \text{ biomassa seca} \right)}{5\text{mL}} = \text{biomassa seca mg/mL}$$

Na análise estatística da biomassa em mg/mL e total de glucose em g/L, considerando como fatores contínuo o tempo em horas, foram ajustados modelos de regressão linear generalizado com distribuição gama e função de ligação logarítmica. Foi feita também a análise de correlação de Spearman entre a biomassa seca em mg/mL, a contagem de esporos e o total de glicose em g/L, seguidas dos valores-p do teste cuja hipótese de nulidade considera a correlação nula, contra a hipótese de que a correlação é diferente de zero. Os gráficos foram plotados com o software SigmaPlot 12.0.

9.3 Resultados

O rendimento máximo de *B. bassiana* foi de, aproximadamente, $1,0 \times 10^9$ esporos/mL com 48 horas de fermentação (Figura 2 e 4) e o de biomassa seca, de 1,2mg/mL foi registrado com 68 horas de fermentação (Figura 3). O consumo de glicose foi expressivo e decrescente, a partir de 40g/L do meio de cultura, com queda brusca da glicose entre 28 e 48 horas de fermentação, chegando a 0,07g/L no final da fermentação (Figura 2 e 3). O total de glicose g/L, a produção de biomassa e esporulação se correlacionaram significativamente com valores $<.0001$ na correlação de Spearman, sendo -0,892 e -0,81216, respectivamente. O pH final foi de $3,53 \pm 0,092$ durante todo o processo fermentativo e a quantidade de O_2 dissolvido no meio de cultura foi de $70,12 \pm 1,071\%$.

A curva do desenvolvimento do fungo, em relação a esporulação, durante 72h de fermentação pode ser dividida em quatro fases, a de Lag entre 0 a 22h como adaptação às condições dentro do sistema; a de Log entre 24 a 48h com o microrganismo tendo crescimento exponencial; a estacionária de 48 a 64h e a do início da fase de declínio com 68h caracterizada pelo início da germinação das células produzidas (Figura 2). O desenvolvimento do fungo em função do tempo

ocorre com o desenvolvimento do inóculo inicial e poucas células são detectadas na microscopia. A germinação é detectada as 12h de fermentação, rapidamente se formam massas miceliais e com 36h há uma esporulação evidente com crescimento até 56h, pois a germinação das células inicia-se novamente com aumento crescimento de hifas as 60h de fermentação, consequentemente há redução do espaço no biorreator, além do meio de cultura ser visivelmente mais viscoso (Figura 4).

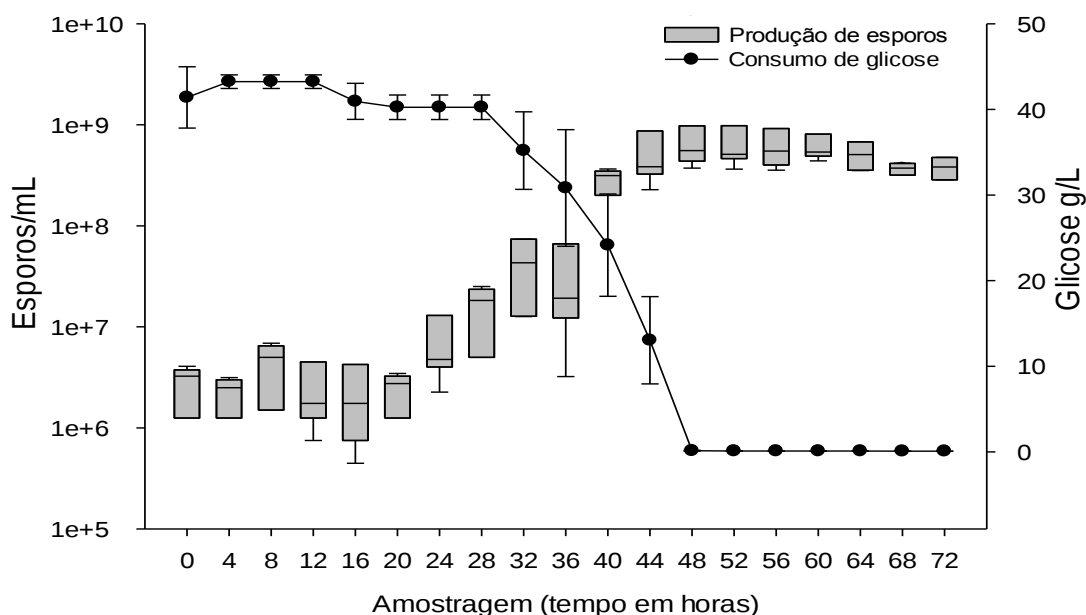


Figura 2. Esporulação *versus* consumo de glicose de *Beauveria bassiana* (IBCB 227) durante 72h de fermentação líquida em biorreator Minifors, InforsHT®

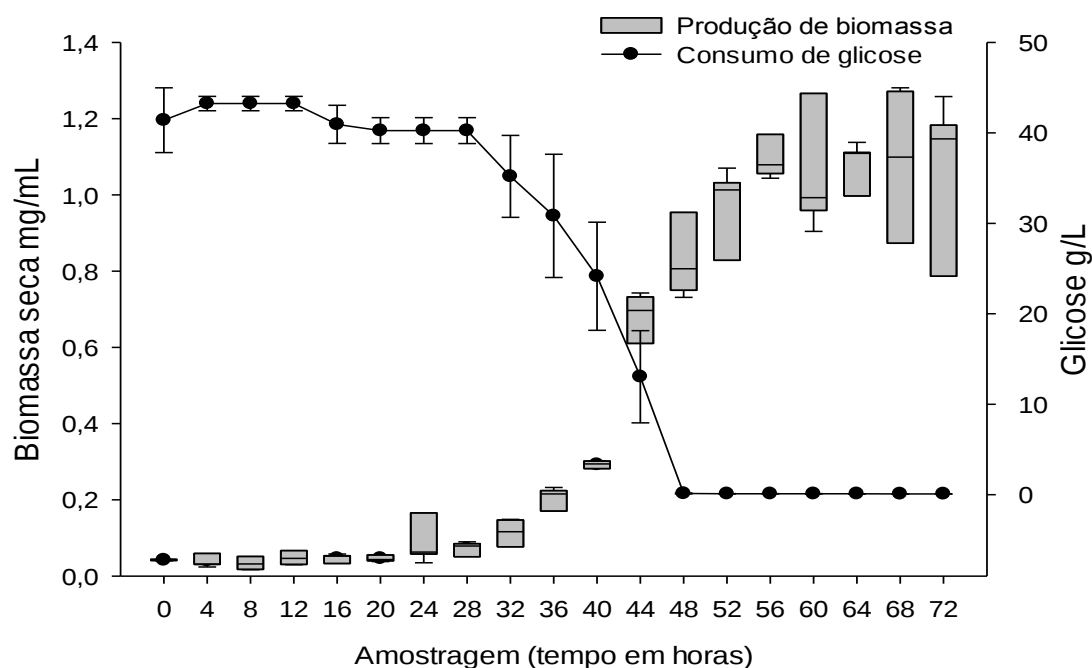


Figura 3. Produção de biomassa *versus* consumo de glicose de *Beauveria bassiana* (IBCB227) durante 72h de fermentação líquida em biorreator Minifors, InforsHT®

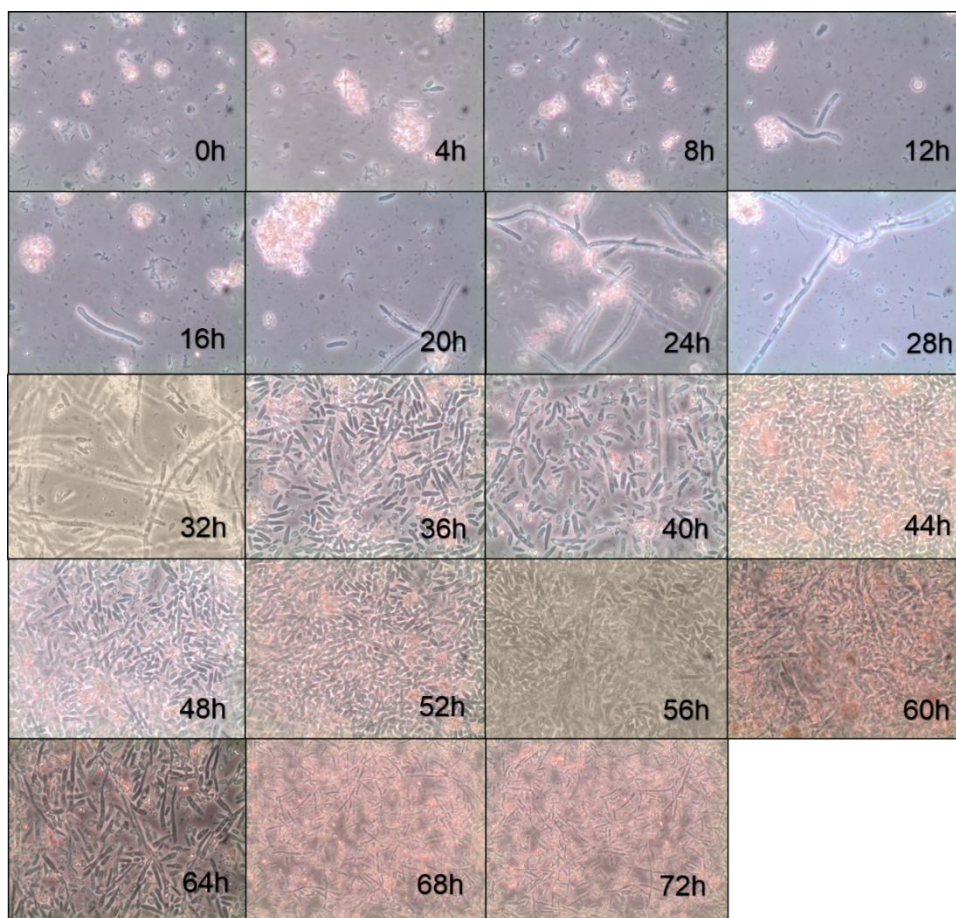


Figura 4. Amostragem do desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (IBCB227) a cada 4 horas durante o processo de fermentação líquida

9.4 Discussão

A produção do fungo *B. bassiana* por fermentação líquida em biorreatores de bancada permite uma alta concentração de esporos com quantidades suficientes de nutrientes e oxigênio dissolvido. No entanto, uma possível alimentação do sistema com glicose poderia aumentar a taxa de esporulação. O consumo de glicose está, diretamente, relacionado com a esporulação e a produção de biomassa, pois o crescimento do microrganismo cresce e os níveis de glicose diminuem. Isto é comprovado pela correlação de Spearman, onde os valores encontrados são negativos. Quando os valores são negativos em uma correlação significa que quando uma variável aumenta a outra variável diminui (Mukaka 2012). Altas concentrações de glicose com altas taxas de oxigênio aumenta a produção de blastosporos de *B. bassiana*, com até $1,4 \times 10^9$ esporos/mL após três dias de fermentação (Mascarin et al. 2015a), próximos aos do presente trabalho. A concentração de oxigênio dissolvido influenciou na produção de *Metarhizium flavoviride* em biorreator de 5L e concentrações próximas a 100% podem aumentar a quantidade de blastosporos produzidos chegando a $3,6 \times 10^8$ esporos/mL (Issaly et al. 2005). Entretanto, com um valor médio de 70,12% de oxigênio dissolvido *B. bassiana* (IBCB227) apresentou uma maior concentração de esporos e em menor tempo. O tempo total de produção em apenas 3 dias pode aumentar a produção de biopesticida no Brasil, quando comparado aos 14 dias de fermentação sólida. A fermentação líquida pode produzir rapidamente altos rendimentos de blastosporos estáveis e infectantes de *B. bassiana* ou *C. fumosorosea* a mosca branca, sendo os blastosporos mais eficazes que os conídios (Mascarin et al. 2015b). Além disso, outros fungos como *Metarhizium* spp. também podem se beneficiarem desse sistema de produção originando blastosporos resistentes à dessecação e efetivos no controle de carrapatos (Iwanick et al. 2018).

O comportamento da curva e as fases de desenvolvimento obtidos durante a fermentação de *B. bassiana* é bastante comum entre os microrganismos. Microrganismos, em especial bactérias, são caracterizados por apresentarem diferentes fases no desenvolvimento. Curva típica de crescimento bacteriano, durante a cultura em batelada, pode ter fases distintas de crescimento: fase de Lag, sendo uma fase de adaptação e anterior à fase exponencial ou Log; fase exponencial, onde a divisão celular procede a uma taxa constante; fase estacionária, quando as condições se tornam desfavoráveis para o crescimento e o

microrganismo para de se replicar, podendo chegar a fase de morte ou declínio (Maier 2000; Finkel 2006; Yates e Smotzer, 2007).

9.5 Conclusão

Grandes quantidades de propágulos de *B. bassiana* podem ser produzidos por fermentação líquida, em biorreator, entretanto, o processo de produção deve ser otimizado com o incremento de glicose durante o processo fermentativo, por exemplo. A fermentação líquida de *B. bassiana* permite a transferência desta tecnologia para escala industrial, consequentemente, o período de produção, menos de três dias, pode aumentar a produção de biopesticida no Brasil, por ser menor que 14 dias de fermentação sólida.

Referências

- Adamek, L. (1963). Submerged cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). Folia Microbiologica, 10, 255-257.
- FAO (2016). FAOSTAT Statistical Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/#country/21>. Acessado em 02 outubro 2018
- Finkel, S. E. (2006). Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. Nature Reviews Microbiology, 4(2), 113-120.
- Gibbs, P. A., Seviour, R. J. & Schmid, F. (2000). Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. Critical Reviews in Biotechnology, 20(1), 17–48.
- IBÁ – Industria Brasileira de Árvores (2017). Anuário estatístico da Indústria Brasileira de Árvores: ano base 2016. http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf. Acesso em: 05 de junho 2018
- Issaly, N., Chauveau, H., Aglevor, F., Fargues, J. & Durand, A. (2005). Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture, Process Biochemistry, 40(3–4), 1425-1431.
- Iwanicki, N. S., Ferreira, B. O., Mascarin, G. M. & Delalibera Jr., I. (2018). Modified Adamek's medium renders high yields of *Metarhizium robertsii* blastospores

- that are desiccation tolerant and infective to cattle-tick larvae. *Fungal Biology*, 122(9), 883-890.
- Jaronski, S. T. & Jackson, M. A. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In L. A. Lacey (Ed), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (2^a ed.) (pp 255-284) New York, NY: Academic Press.
- Li, Z., Alves, S. B., Roberts, D. W., Fan, M., Delalibera Jr., I., Tang, J., Lopes, R.B., Faria, M. & Rangel, D.E.N. (2010). Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science Technology*, 20(2), 117-136.
- Maier, R. M. (2000). Bacterial growth. In: Maier RM, Pepper IL, Gebr CP (Eds.), *Environmental Microbiology*, Academic Press, UK, pp. 43-59.
- Mascarin, G. M., Biaggioni, R. L., Delalibera Jr., I., Kort Kamp, E. F., Luz, C. & Faria, M. (2018). Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal Invertebrate Pathology*, S0022-2011(17), 30365-30368.
- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W. & Delalibera Jr., I. (2015b) Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps fumosorosea* strains. *Journal Invertebrate Pathology*, 127, 11-20.
- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W., Dunlap, C. A. & Delalibera Jr., I. (2015a). Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(16), 6653-6665.
- Mascarin, G. M. & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-26.
- Mukaka, M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, 24, 69-71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576830/>. Acessado em 12 outubro 2018
- Yates, G. T. & Smotzer, T. (2007). On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. *Journal of Theoretical Biology*, 244, 511-517.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 553-596.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico de pragas florestais é um mercado promissor, pois as empresas têm investido nesse tipo manejo dos insetos de importância com organismos entomopatogênicos, parasitoides e predadores. Além disso, os órgãos certificadores exigem o uso de métodos sustentáveis, abrindo oportunidades para pesquisas e desenvolvimento de produtos a base de organismos vivos. Dessa forma, fungos entomopatogênicos possuem mercado, devido o setor florestal preferir agentes biológicos, no controle de insetos praga e a facilidade de produção quando comparados aos parasitoides e predadores, comumente utilizados no controle de pragas florestais.

Os fungos entomopatogênicos agem diferente de parasitoides e predadores, no modo de ação, produção e formulação. Esses microrganismos agem por contato, são facilmente produzidos em substratos sólidos ou meio de cultura líquido, e ainda podem ser formulados conferindo maior período de armazenamento. Entretanto, esses agentes são sensíveis e peculiares, como qualquer inimigo natural exigindo cuidados.

A escolha do método ideal para o desenvolvimento de um biopesticida a base de fungos entomopatogênicos vão além dos conhecimentos biológicos, e por isso a estreita relação dos profissionais da área com especialistas em química e física, por exemplo, podem gerar resultados potenciais e com aplicabilidade. Além disso, o investimento em pesquisas na universidade voltadas para produção e otimização de processos visando a transferência para a indústria podem aumentar o mercado dos micopesticidas. Portanto, a experimentação de novas possibilidades para melhorar a produção e formulação de fungos entomopatogênicos podem impulsionar o uso destes microrganismos na área florestal e também gerar resultados que poderão ser utilizados no setor agrícola e vice-versa.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: Controle de insetos pragas. Agrofit, Brasília. 2018. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 30 jul. 2018.
- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. (ed). **Controle microbiano de insetos**. Fealq, Piracicaba, 2ed, v. 4, p. 21-34, 1998.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Production of *Metarhizium anisoplae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in plastic trays. **Ecossistema**, v. 14, p. 188-192, 1989.
- BARBOSA, L.R.; RODRIGUES, A.P.; SOLER, L.S.; FERNANDES, B.V.; CASTRO, B.M.C.C.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J.C. Establishment in the field of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an exotic egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Florida Entomologist**, v. 100, p. 372–374, 2017.
- BARBOSA, L.R.; SANTOS, F.; WILCKEN, C.F.; SOLIMAN, E.P. Registro de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) no estado do Paraná. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 30, p.75-77, 2010.
- BARTLETT, M.C.; JARONSKI, S.T. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In: Burge, M.N. (ed) **Fungi in biological control systems**. Manchester, UK; Manchester University Press, pp. 61-85, 1988.
- BERTI FILHO, E.; ALVES, S. B.; CERIGNON, J. A. Ocorrência de *Beauveria brongnartii* (Sacc.) Petch em *Phoracantha semipunctata* (Fabricius) (Coleoptera: Cerambycidae). **Revista de agricultura**, v. 70, p. 346, 1995.
- BIEZANKO, C. M.; BOSQ, J. M. Cerambycidae de Pelotas e seus arredores. **Agros**, v. 9, p. 3-15, 1956.

BIEZANKO, C. M.; BOSQ, J. M. Cerambycidae de Pelotas e seus arredores. **Agros**, v. 9, p. 3-15, 1956.

CARPINTERO, D.L.; DELLAPÉ, P.M. A new species of *Thaumastocoris Kirkaldy* from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). **Zootaxa**, v. 1228, p. 61-68, 2006. Disponível em: <http://www.mapress.com/zootaxa/2006f/z01228p068f.pdf>. Acesso em: 12 abr 2018.

CASTRO, T.; MAYERHOFER, J.; ENKERLI, J.; EILENBERG J.; MEYLING, N. V.; MORAL, R.A.; DEMÉTRIO, C.G.B.; DELALIBERA, I. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 233, p. 361-369, 2016.

COSTA, V.A.; BERTI FILHO, E.; WILCKEN, C.F.; STAPE, J.L.; LA SALLE, J.; TEIXEIRA, L.D. Eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) in Brazil. New Forest pest reaches the new world. **Revista de Agricultura**, v. 83, p.136-139, 2008. Disponível em: http://www.fealq.org.br/ojs/index.php/revistadeagricultura/article/view/1479/pdf_1106. Acesso em: 12 abr 2018.

CHANDLER, D.; HAY, D. B.; REID, A.P. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. **Applied Soil Ecology**, v. 5, p. 133–141, 1997.

CUELLO, E.M.; ANDORNO, A.V.; HERNÁNDEZ, C.M.; LÓPEZ, S.N. Population Development of the invasive species *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) on four eucalyptus species of the subgenus *Symphyomyrtus*. **Neotropical Entomology**, p. 1-10, 2018.

DAL POGETTO, M.H.F.A.; WILCKEN, C.F.; CHRISTOVAM, R.S.; PRADO, E.P.; GIMENES, M.J. Effect of formulated entomopathogenic fungi on red gum lerp psyllid

Glycaspis brimblecombei. **Research Journal of Forestry**, v. 5, n. 2, p. 99-106, 2011.
doi: 10.3923/rjf.2011.99.106

DEBACH, P. **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**. Editora Continental, S.A., México, 1968. p. 927.

DOMINGUES, M.M.; BECCHI, L.K.; VELOZO, S.M.; SOUZA, A.R.; BARBOSA, L.R.; WILCKEN, C.F. Efeitos subletais de bioinseticidas ao parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). In: V SIMPROT - Simpósio em Proteção de Plantas, 20 a 22 de setembro de 2017, Botucatu - SP. Entomologia, 2017.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237–256.

FENILLI, R. Primeiro registro de *Gonipterus platensis* Marelli, 1926 e *Gonipterus gibberus* (Boisduval, 1835) (Coleoptera, Curculionidae, Gonipterinae) no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 11, p. 293–294, 1982.

GARCIA, A.; FIGUEIREDO, E.; VALENTE, C.; MONSERRAT, V. J.; BRANCO, M. First record of *Thaumastocoris peregrinus* in Portugal and of the neotropical predator *Hemerobius bolivari* in Europe. **Bulletin of Insectology**, v. 66, p. 251-256, 2013. Disponível em: <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol66-2013-251-256garcia.pdf>. Acesso em: 12 abr 2018.

HODEL, D.R.; ARAKELIAN, G.; OHARA, L.M. The Bronze Bug: another new threat to eucalypts in California. **Palm Arbor**, v. 5, p. 1–11, 2016. Disponível em: <http://ucanr.edu/sites/HodelPalmsTrees/files/248430.pdf>. Acesso em: 12 abr 2018.

HURLEY B., SLIPPERS B., WINGFIELD M. *Thaumastocoris peregrinus* in Africa and South America. In: International Union of Forest Research Organizations (IUFRO).

Supplement to the Montecarlo Declaration. IUFRO meeting Montecarlo, Monastery, Spain, 23-27 March 2011.

IBÁ – Industria Brasileira de Árvores. 2017. Anuário estatístico da Indústria Brasileira de Árvores: ano base 2016. Brasília: 77p. Disponível em: http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf. Acesso em: 05 jun 2018.

IDE, S.M.; RUIZ, C.G.; SANDOVAL, A.C.; VALENZUELA, J.E. Detección de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) asociado a *Eucalyptus* spp. em Chile. **Bosques**, v. 32, p. 309-313, 2011.

JACOBS, D.H.; NESER, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to Eucalyptus trees: research in action. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 101, p. 233- 236, 2005. Disponível em: http://journals.co.za/docserver/fulltext/sajsci/101/5-6/sajsci_v101_n5_a12.pdf?expires=1533655601&id=id&accname=guest&checksum=336A91563E58868729E489FEEF657396. Acesso em: 05 abr 2018.

JACKSON, M.A.; DUNLAP, C.A.; JARONSKI, S.T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect Biocontrol. **BioControl**, v. 55, p. 129-145, 2010.

JARONSKI, S. T. Mass production on entomopathogenic fungi: state of the art. In: Morales-Ramos, J.A.; Rojas M.G.; Shapiro-Ilan, D.I. (eds) **Mass production of beneficial organisms**. Elsevier Inc., Amsterdam, p. 357–415, 2014.

JARONSKI, S.T.; MASCARIN, G.M. Mass production of fungal entomopathogens. In: Lacey, L.A. (ed) **Microbial Control of Insect and Mite Pests**, Elsevier Inc., Amsterdam, p. 141–155, 2017.

JENKINS, N.E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News Inform**, v. 19, p. 21N–31N, 1998. Disponível em: <http://cabweb.org/PDF/BNi/Control/BNIRA38.PDF>. Acesso em: 14 set 2017.

JIMÉNEZ-QUIROZ, E.; VANEGAS-RICO, J.M.; MORALES-MARTÍNEZ, O.; LOMELI-FLORES, J.R.; RODRÍGUEZ-LEYVA, E. First record of the bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Mexico. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 32, p. 35-39, 2016.

JONES, K.; BURGESS, H.D. Technology of formulation and application. In: BURGESS, H.D (ed). **Formulation of microbial pesticides – beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**. Springer, Dordrecht, p. 7-30, 1998.

JUNQUEIRA, L.R.; BARBOSA, L.R; WILCKEN, C.F. Quantification of damages by *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in eucalypt. In: First IUFRO Working Party 7.02.13 meeting (Punta del Este 21 a 23 de Março). Book of Abstracts...Punta del Este, 2018. Disponível em: https://www.iufro.org/download/file/28424/6631/70213-puntadeleste18-bstracts_pdf/. Acesso em: 01 de jul de 2018.

KELLER, S.; KESSLER, P.; SCHWEIZER, C. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **BioControl**, v. 48, p. 307–319, 2003.

LAUDONIA, S.; SASSO, R. The bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*: a new insect recorded in Italy, damaging to Eucalyptus trees. **Bulletin of Insectology**, v. 65, p. 89-93, 2012. Disponível em: <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol65-2012-089-093laudonia.pdf>. Acesso em: 12 abr 2018.

LI, Z.; ALVES, S.B.; ROBERTS, D.W.; FAN, M.; DELALIBERA Jr, I.; TANG, J.; LOPES, R.B.; FARIA, M.; RANGEL, D.E.N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, p. 117-136, 2010.

LIMA, A.C.V.; DIAS, T.K.R.; BARBOSA, L.R.; SOLIMAN, E.P.; SA, L.A.N.; MASSON, M.V.; NEVES, D.A.; WILCKEN, C.F. Primeira ocorrência do percevejo-bronzeado

Thaumastocoris peregrinus (Hemiptera: Thaumastocoridae) no estado da Bahia. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010, Natal. Anais... Natal: Sociedade Brasileira de Entomologia: Emparn, 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/61452/1/SP5668.pdf>. Acesso em: 12 abr 2018.

LIMA, A.C.V.; WILCKEN, C.F.; FERREIRA-FILHO, P.J.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C. Intra-plant spatial distribution of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus grandis* plants. **Phytoparasitica**, v. 44, p. 411, 2016.

LIN, N.; HUBER, J. T.; LA SALLE, J. The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Zootaxa**, v. 1596, p. 1-111, 2007. doi: 10.11646/zootaxa.1596.1.1

LORENCETTI, G.A.T.; POTRICH, M.; MAZARO, S.M.; LOZANO, E.R.; GONÇALVEZ, T.E.; DALLACORT, S. Ocorrência espontânea de *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill. 1912 (Ascomycetes: Clavicipitaceae) sobre *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1403-1407, 2017.

LORENCETTI, G.A.T.; POTRICH, M.; MAZARO, S.M.; LOZANO, E.R.; BARBOSA, L.R.; MENEZES, M.J.S.; GONÇALVEZ, T.E. Eficiência de *Beauveria bassiana* Vuill. e *Cordyceps* sp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 403-411, 2018. doi: 10.5902/1980509831612

MARTÍNEZ, G.; BIANCHI, M. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). **Agrociencia**, v. 14, p. 15-18, 2010. Disponível em: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482010000100003&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 12 abr 2018.

MARTÍNEZ, G.; LÓPEZ, L.; CANTERO, G.; GONZÁLEZ, A.; DICKE, M. Life-history analysis of *Thaumastocoris peregrinus* in a newly designed mass rearing strategy.

Bulletin of Insectology, v. 67, p. 199–205, 2014. Disponível em:

[http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3801/1/Bulletin-of-](http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3801/1/Bulletin-of-Insectology2014v67n2p199-205-Martinez.pdf)

[Insectology2014v67n2p199-205-Martinez.pdf](http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3801/1/Bulletin-of-Insectology2014v67n2p199-205-Martinez.pdf). Acesso em: 12 abr 2018.

MASCARIN, G.M.; DUARTE, V.S.; BRANDÃO, M.M.; DELALIBERA Jr., I. Natural occurrence of *Zoophthora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) na invasive pest recently found in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, p. 401-404, 2012.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-26, 2016.

MITCHELL, D.A.; BEROVIČ, M.; KRIEGER, N. Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview. In: MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIČ, M. (eds). **Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**, Springer, Heidelberg, p. 1-12, 2006.

MOIO, S.G.; CORAL, D.J.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E.; WILCKEN, C.F. *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) feeding behavior on native Myrtaceae and *Eucalyptus urophylla* in Brazil. In: XXXVI Congreso Nacional de Entomología 2014 (Santiago 26, 27 y 28 de noviembre). Anais...Santiago, 2014.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. Sociedade Brasileira de Silvicultura, São Paulo. 111p.

MOURA MASCARIN, G.; BIAGGIONI LOPES, R.; DELALIBERA Jr, I.; FERNANDES, E. K. K.; LUZ, C., FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2018.

MUTITU, E.K.; GARNAS, J.R.; HURLEY, B.P.; WINGFIELD, M.J.; HARNEY, M.; BUSH, S.J.; SLIPPERS, B. Biology and rearing of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for biological control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, p. 1979-1985, 2013.

NADEL, R. L.; NOACK, A. E. Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy. **International Journal of Pest Management**, v. 58, p. 257–266, 2012.

NADEL, R.L.; SLIPPERS, B.; SCHOLE, M.C.; LAWSON, S.A.; NOACK, A.E.; WILCKEN, C.F.; BOUVET, J.P.; WINGFIELD, M.J. DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. **Biological Invasions**, v. 12, p. 1067-1077, 2010.

NOACK, A.E.; COVIELLA, C.E. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Hemiptera: Thaumastocoridae): first Record of this invasive pest of Eucalyptus in the Americas. **General Applied Entomology**, v.35, p.13-14, 2006.

NOACK A.E., ROSE H.A. Life-history of *Thaumastocoris peregrinus* and *Thaumastocoris* sp. in the laboratory with some observations on behaviour. **General and Applied Entomology**, v. 36, p. 27-34, 2007.

NOVOSELSKY, T.; FREIDBERG, A. First record of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in the Middle East, with biological notes on its relations with eucalyptus trees. **Israel Journal of Entomology**, v. 46, p. 43-55, 2016.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84., 2003.

PAINE, T.D.; STEINBAUER, M.J.; LAWSON, S.A. Native and exotic pests of Eucalyptus: a worldwide perspective. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 181-201, 2011.

PEREIRA, J.M.; MELO, A.P.C.; FERNANDES, P.M.; SOLIMAN, E.P. Ocorrência de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, 2013.

RIBEIRO, G.T.; SÁ, J.S.; ROLIM, G.S; CORREIA-OLIVEIRA, M.E.; MENDONÇA, M.C; PODEROSO, J.C.M. First report *Thaumastocoris peregrinus* in Eucalyptus plantations in the state of Sergipe, Brazil (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Entomologica Americana*, v. 121, p. 23-26, 2015.

ROCHA, L.F.N.; INGLIS, P.W; HUMBER, R.A.; KIPNIS, A.; LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. *Journal of Basic Microbiology*, v. 53, p. 251–259, 2013.

SAN ROMAN, L.M.; FIRMINO, A.C.; FURTADO, E.L.; WILCKEN, C.F. Identificação e caracterização de *Fusarium* sp. e *Paecilomyces* sp. entomopatogênicos isolados do percevejo-bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). In: XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2012, Curitiba/PR. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia. Anais...Curitiba: Embrapa, 2012.

SANTADINO, M.; BRENTASSI, M.E.; FANELLO, D.D.; COVIELLA, C. First evidence of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) feeding from mesophyll of Eucalyptus leaves. **Environmental Entomology**, v. 46, p. 251–257, 2017.

SANTAROSA, E.; PENTEADO JUNIOR, J.F.; GOULART, I.C.G. **Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda**. Colombo: Embrapa Florestas, 2014. 136 p.

SAVARIS, M.; LAMPERT, S.; PEREIRA, P.R.V.S.; SALVADORI, J.R. Primeiro registro de *Thaumastocoris peregrinus* para o estado de Santa Catarina, e novas áreas de ocorrência para o Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1874-1876, 2011.

SOLIMAN, E.P. **Controle biológico de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos**. 2014. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2014.

SOLIMAN, E.P.; WILCKEN, C.F.; PEREIRA, J.M.; DIAS, T.K.R.; ZACHÉ, B.; DAL POGETTO, M.H.F.A.; BARBOSA, L.R. Biology of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) in different *Eucalyptus* species and hybrids. **Phytoparasitica**, v. 40, p. 223-230, 2012.

SOPOW, S.; GEORGE, S.; WARD, N. Bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*: a new Eucalyptus pest in New Zealand. **Surveillance**, v. 39, p. 43-46, 2012.

SOUZA, A.R.; CANDELARIA, M.C.; BARBOSA, L.R.; WILCKEN, C.F.; CAMPOS, J.M.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C. Longevity of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), with various honey concentrations and at several temperatures. **Florida Entomologist**, v. 99, p. 33-37. 2016.

SOUZA, G.K.; PIKART, T.G.; PIKART, F.C.; SERRÃO, J.E.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J.C. First record of a native Heteropteran preying on the introduced eucalyptus pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 95, p. 517-520, 2012.

VELOZO, S.G.M. **Identificação, caracterização e avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de *Fusarium* spp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)**. 2015. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2015.

WILCKEN, C.F.; BARBOSA, L.R.; VELOZO, S.G.M.; BECCHI, L.K.; JUNQUEIRA, L.R.; SÁ, L.A.N.; ZANUNCIO, J.C. Biological control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in *Eucalyptus* plantations in Brazil: an update. In: 5th

International Symposium of Biological Control of Arthropods - ISBCA, 2017, Langkawi. 5th International Symposium of Biological Control of Arthropods - ISBCA, 2017, Langkawi. Proceeding of 5th ISBCA. Wallingford: CABI, 2017. v. 1. p. 105-107.

WILCKEN, C. F.; COUTO, E. B.; ORLATO, C.; FERREIRA-FILHO, P. J.; FIRMINO, D. C. Ocorrência do psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) em florestas de eucalipto no Brasil. Circular técnica IPEF, Piracicaba, v. 201, p. 1-11, 2003. Disponível em: <http://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr201.pdf>. Acesso em: 12 abr 2018.

WILCKEN, C.F.; SOLIMAN, E.P.; SÁ, L.A.N.; BARBOSA, L.R.; DIAS, T.K.R.; FERREIRA-FILHO, P.J.; OLIVEIRA, R.J.R. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on Eucalyptus in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, p. 201-206, 2010.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 553-596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 879-920, 2007b.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Cordyceps farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Cordyceps fumosorosea* species complex (formerly known as *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and its use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, p. 865-901, 2008.