

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE *Lecanicillium lecanii* EM MEIOS
LÍQUIDOS, SÓLIDOS E COMBINADOS EM SISTEMA
BIFÁSICO DE CULTIVO**

Ana Carolina Ribeiro Machado

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Microbiologia
Agropecuária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
2008

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA CAROLINA RIBEIRO MACHADO– Nasceu em 21 de abril de 1981, na cidade de Goiânia, Goiás e formou-se em Biologia (licenciatura plena) pela Universidade Estadual de Goiás (UEG) em 2004. Neste mesmo ano, iniciou o curso de especialização (***lato sensu***) em Microbiologia pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás, recebendo o referido título em 2005. Em março de 2006 ingressou no programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus Jaboticabal.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

Aos meus pais maravilhosos, **Fátima e José de Roma**,
pelo amor incondicional, apoio, por fazerem dos meus
sonhos o de vocês...enfim, por tudo o que sou hoje...

OFEREÇO E DEDICO

Ao meu amor **Edson Júnior** pelo incentivo, carinho,
companheirismo, por muitas vezes acreditar mais em mim
do que eu mesma!

AGRADEÇO EM ESPECIAL

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me proporcionado este desafio e a oportunidade de crescimento profissional e pessoal;

Ao meu mentor querido e amigos espirituais pelo amparo e vibrações positivas;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro por ter sido um orientador sempre presente, preocupado, pela confiança, amizade e aprendizado;

À Dr^a Inajá M. Wenzel e Dr^a Maria Silvia P. Leite pela atenção e carinho que tiveram com o trabalho e considerações valiosas para a melhoria desta;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao Sr. Octávio, proprietário da Okta Alimentos LTDA (Bebedouro/SP), por gentilmente ter cedido grande parte do material utilizado para realização dos experimentos, entre farelos e grãos;

À Corn Products Brasil (Mogi Guaçu/SP), representada pela zootecnista Thais Ap. Cardoso por gentilmente terem cedido o produto milhocina® utilizado nos experimentos;

A empresa Mandioquim (Itápolis/SP), representada pelo Sr. Sinibaldi por gentilmente ter cedido a água da prensa da mandioca utilizada nos experimentos;

À doutoranda Tammy Priscilla Chioda pela atenção e por gentilmente ter cedido o soro de queijo utilizado nos experimentos;

À Usina São Carlos (Jaboticabal/SP) por gentilmente ter cedido a vinhaça, leite de levedura e melaço de cana utilizados nos experimentos;

À prof. Dr^a Maria Inez Espagnoli G. Martins pela paciência e auxílio na análise econômica realizada para o ensaio bifásico;

Ao técnico Luis Carlos de Assis, sempre atencioso e com boas idéias;

À secretária Edna Maria T. Dáquila, pela amizade e carinho;

As amigas-irmãs Luciana Yoshida, Dinalva A. Mochi e Claudia S. Demetrio pela amizade verdadeira, carinho, aprendizado, pelos momentos incríveis de convivência;

Às amigas Aline Almeida e Beatriz Santos pela força, ajuda imprescindível na última etapa do trabalho e momentos divertidos;

Aos amigos Lucas Simi, Nancy Prette, Marcos Valério Garcia, Carime Moraes e Manuela Teodoro pelos bons momentos compartilhados, apoio e auto astral contagiante;

Aos meus tios queridos David, Luciane, Airton e em especial a tia Cidinha pelo amor, convivência, apoio e por suprirem de alguma forma a saudade que senti dos meu pais;

À Cris, Ed, Paula, Fernanda, Ricardo, Melissa e Joaquim pela acolhida, carinho e preocupação;

Às primas-irmãs Thalita, Thaís e Thatyana pelo carinho, força e torcida;

À grande amiga Jô Guedes pelo carinho, cuidados e por ter estado presente neste momento especial da minha vida;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho ou participaram deste momento...muitíssimo obrigada!

“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós; leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.

Há os que levam muito, mas há os que não levam nada; há os que deixam muito, mas há os que não deixam nada.

Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.”

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ANEXOS.....	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO 2 – RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E GRÃOS COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE <i>Lecanicillium</i> <i>lecanii</i>	12
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Fungo.....	15
2.2 Preparo dos meios líquidos.....	16
2.3 Preparo dos meios sólidos.....	17
2.4 Inoculação do fungo.....	18
2.5 Avaliação.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1 Produção de <i>Lecanicillium lecanii</i> em meios líquidos.....	22
3.2 Produção de <i>Lecanicillium lecanii</i> em meios sólidos.....	27
4. CONCLUSÕES	34
5. REFERÊNCIAS.....	35

	Página
CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE <i>Lecanicillium lecanii</i> PELO SISTEMA BIFÁSICO DE CULTIVO.....	39
RESUMO	39
ABSTRACT.....	41
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Fungo	45
2.2 Meios líquidos e sólidos utilizados para combinação bifásica.....	45
2.3 Preparo dos meios líquidos e sólidos.....	46
2.4 Inoculação e cultivo no sistema bifásico.....	47
2.5 Avaliação.....	47
2.6 Análise Econômica.....	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4. CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE.....	62

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

	Página
Tabela 1. Substratos e respectivas quantidades e proporções utilizadas no ensaio com meios sólidos, para o isolado JAB 02 de <i>Lecanicillium lecanii</i>	20
Tabela 2. Substratos e respectivas quantidades e proporções utilizadas no ensaio com meios sólidos, para o isolado JAB 45 de <i>Lecanicillium lecanii</i>	21
Tabela 3. Produção de conídios e biomassa micelial formada pelos isolados JAB 02 e JAB 45 de <i>Lecanicillium lecanii</i> em meios líquidos preparados a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais usados em diversas concentrações, após 20 dias de cultivo a 25°C e ausência de iluminação.....	23
Tabela 4. Produção e viabilidade de conídios dos isolados JAB 02 e JAB 45 de <i>Lecanicillium lecanii</i> cultivados em meios sólidos elaborados com misturas de substratos, em diversas proporções, após 15 dias de cultivo a 25°C e ausência de iluminação.....	29
Tabela 5. Desdobramento da interação substratos usados em maior proporção versus substratos usados em menor proporção para produção de conídios dos isolados JAB 02 e JAB 45 de <i>Lecanicillium lecanii</i> em meios sólidos.....	30

Tabela 6. Produção de conídios pelo isolado JAB 02 de <i>Lecanicillium lecanii</i> em função das proporções usadas para os tratamentos mais eficientes, após 15 dias a 25°C e na ausência de iluminação.....	31
--	----

Tabela 7. Produção de conídios pelo isolado JAB 45 de <i>Lecanicillium lecanii</i> em função das proporções usadas para os tratamentos mais eficientes, após 15 dias a 25°C e na ausência de iluminação.....	32
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. Produção de conídios, viabilidade e rendimento do processo bifásico de produção do isolado JAB 02 de <i>Lecanicillium lecanii</i> , após 7 dias de cultivo nos meios líquidos e 15 nos meios sólidos, a 25°C e na ausência de iluminação.....	51
---	----

Tabela 2. Produção de conídios, viabilidade e rendimento do processo bifásico de produção do isolado JAB 45 de <i>Lecanicillium lecanii</i> , após 7 dias de cultivo nos meios líquidos e 15 nos meios sólidos, a 25°C e na ausência de iluminação.....	53
---	----

Tabela 3. Custo de produção de um bioinseticida à base do isolado JAB 45 de <i>Lecanicillium lecanii</i> , utilizando as combinações bifásicas mais favoráveis.....	55
---	----

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Desembolso com mão-de-obra necessária para produção de <i>Lecanicillium lecanii</i> , considerando o piso salarial e encargos sociais mensais.....	63
Anexo 2. Custo da matéria-prima utilizada para produção do isolado JAB 45 de <i>Lecanicillium lecanii</i> pelo sistema bifásico em quatro meios sólidos.....	63
Anexo 3. Desembolso com equipamentos (quantidade, valor unitário, vida útil e depreciação dos bens) e demais materiais necessários para construção de uma biofábrica de pequeno porte para produção de <i>Lecanicillium lecanii</i> em sistema bifásico.....	64

CAPITULO 1 - PRODUÇÃO DE *Lecanicillium lecanii* EM MEIOS LÍQUIDOS E SÓLIDOS, E COMBINADOS EM SISTEMA BIFÁSICO.

RESUMO - A busca por meios de cultura alternativos e métodos de produção, são aspectos importantes para viabilizar a utilização de fungos entomopatogênicos em larga escala. O presente trabalho avaliou, em ensaios distintos, a produção dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* em meios líquidos obtidos de resíduos e subprodutos agroindustriais (água do cozimento de arroz e da prensa da mandioca, vinhaça, leite de levedura e melaço de cana-de-açúcar, soro de queijo e milhocina), e em misturas de substratos sólidos obtidos de diferentes grãos e derivados (trigo grosso e farelos de trigo e de soja com lentilha, painço, sorgo, trigo em grão, quirela de milho). A determinação dos meios mais eficientes para produção dos isolados foi baseada na avaliação da produção de conídios e de biomassa nos meios líquidos e a produção e viabilidade de conídios obtidos nos meios sólidos. Para ambos os isolados, a produção em meios líquidos favoreceu a formação de biomassa micelial, obtendo-se os maiores valores nos meios a base de água da prensa da mandioca, soro de queijo, milhocina[®] e melaço de cana-de-açúcar. Os meios sólidos que proporcionaram melhores resultados para o isolado JAB 02 foram obtidos da mistura de trigo grosso e de farelo de trigo com lentilha e com sorgo. Para JAB 45, obtiveram-se as maiores produções de conídios usando a mistura de trigo grosso com lentilha, e de farelo de trigo com painço, lentilha e trigo em grão, destacando-se a última no qual a produção foi de $1,05 \times 10^8$ con g substrato^{-1} . Os meios líquidos e sólidos que proporcionaram os melhores resultados foram, posteriormente, combinados em um sistema bifásico de cultivo. Neste ensaio foram avaliadas a esporulação e viabilidade de conídios e o rendimento do processo. O método de cultivo não influenciou a produção de conídios pelo isolado JAB 02, mantendo-se da ordem de 10^7 con g substrato^{-1} em todos os tratamentos. Para

JAB 45 houve um incremento significativo na produção, comparando-se à produção direta nos meios sólidos. Entre as combinações testadas destacou-se a de soro de queijo (85%) com farelo de trigo e trigo em grão (70:30%), em que a produção de conídios atingiu valor de $1,45 \times 10^9$ conídios/g substrato⁻¹. A viabilidade dos conídios, aspecto importante a ser levado em consideração para garantir a eficiência de um bioinseticida, manteve-se acima de 97% tanto no ensaio com meios sólidos quanto no ensaio bifásico. Visando a produção em escala comercial, foi feita uma análise econômica considerando os meios sólidos que proporcionaram os melhores resultados para o isolado JAB 45 no cultivo bifásico. O menor custo operacional total foi obtido utilizando o meio preparado a partir de farelo de trigo e trigo em grão (70:30%), com valor de R\$ 10,12/kg de produto.

Palavras-chave: controle biológico, sistema bifásico, produção de fungos

CHAPTER 1- PRODUCTION OF *Lecanicillium lecanii* IN LIQUID AND SOLID MEDIA AND COMBINED IN TWO-PHASE SYSTEM

ABSTRACT – The search for alternative media and production methods are important aspects for the large scale use feasibility of entomopathogenic fungi. The present work evaluated the production of the isolates JAB 02 and JAB 45 of *Lecanicillium lecanii*, in liquid media obtained from agroindustrial residuals and byproducts (water of cooked rice and cassava bran, sugarcane vinasse, years cream, sugar cane molasses, cheese whey and milhocina[®]) and in combination with solid substrates obtained from different grains and its derivatives (ground wheat and wheat and soybean bran's with lentil, Italian millet sorghum, wheat grain, cracked corn). The most favorable media were combined in a two-phase system, where the fungus was initially cultivated in a liquid medium and then the micelial mass was transferred to a solid medium. The determination of the most efficient production media for the isolates was based, in the liquid media, on the evaluation of conidia and biomass production, and, in the solid media, on conidia production and viability. For both isolates, the production in liquid media favored large quantity of micelial biomass, emphasizing the media based on water from cassava bran, cheese whey, milhocina[®] and sugar cane molasses. The solid media that proportionated better results, for JAB 02, were obtained from the mixture of ground wheat and wheat bran with lentil and sorghum. For JAB 45, the biggest production of conidia were obtained by the mixture of ground wheat with lentil and wheat bran combined with Italian millet, lentil and wheat grain and with lentil, emphasizing the last one with the production of $1,05 \times 10^8$ con g substrate⁻¹. The liquid and solid media that proportionated better results were afterwards combined in a two-phase system. In this system the conidia sporulation and viability and process income were evaluated. For JAB 02 the cultivation method did not influence the conidia production, maintaining it's self at 10^7 con g subtract⁻¹ on all treatments. For JAB

45 there was a significant production raising, comparing to direct production on solid media. Within the tested combinations, cheese whey (85%) with wheat bran and wheat grain (70:30%) distinguished them self's, with conidia production of $1,45 \times 10^9$ con g subtract⁻¹. The conidia viability, important aspect to be considered to guaranty the bioinsecticides efficiency, maintained over 97%, ether on the solid assay as on the two-phase assay. Aiming a commercial production scale, an economic analysis was made, considering the solid media that proportionated better results for the isolate JAB 45, on the two-phase system. The miner operational cost was obtained using the medium prepared of wheat barn and wheat grain (70:30%), with the value of R\$ 10,12/kg of product.

Key-words: biological control, two-phase system, fungi production

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1- INTRODUÇÃO

O conceito de controle de pragas com o uso exclusivo de pesticidas químicos vem mudando ao longo dos anos; métodos de controle menos agressivos ao ambiente e à saúde humana são cada vez mais exigidos, principalmente pela forte opinião pública e por agências ambientalistas (DE NARDO & CAPALBO, 1998).

O controle microbiano de insetos, ou seja, a utilização de microrganismos entomopatogênicos para o controle de pragas, representa uma das alternativas mais eficientes e seguras ao uso de pesticidas químicos. Segundo ALVES (1998), os fungos foram os primeiros patógenos a serem utilizados no controle biológico de insetos e destacam-se por apresentarem grande variabilidade genética, largo espectro de ação, possibilidade do cultivo "*in vitro*", entre outros.

Entretanto, para serem potencialmente utilizados como bioinseticidas, as formas infectivas (conídios, micélio, blastósporos) dos fungos entomopatogênicos precisam estar disponíveis em grandes quantidades. A busca de novas metodologias de produção e a seleção de meios de cultura de baixo custo e de fácil obtenção, são aspectos importantes a serem considerados em uma produção industrial, de modo a tornar o controle microbiano economicamente viável para ser utilizado em grandes áreas (LOUREIRO et al., 2003).

Dependendo da espécie a ser produzida e da forma infectiva desejada, os fungos podem ser produzidos em meios artificiais ou naturais utilizando-se cultura líquida, cultura sólida e cultivo bifásico, na qual são utilizados os meios líquidos para promover o crescimento vegetativo e em seguida substratos sólidos para esporulação (ALVES & PEREIRA, 1998).

Entre as principais espécies de fungos entomopatogênicos, ***Lecanicillium*** (= ***Verticillium***) ***lecanii*** é considerado um dos agentes com maiores possibilidades no controle microbiano, por exercer intenso efeito parasitário sobre vários insetos-praga de importância agrícola. Produtos comerciais formulados a partir deste patógeno estão disponíveis na Europa para o controle de aleirodídeos e tripes (Mycotal[®]) e afídeos (Vertalec[®]) (LOUREIRO et al., 2004). No Brasil este fungo ainda não foi formulado para comercialização.

Para viabilizar o uso de ***L. lecanii*** no controle de pragas no Brasil, é imprescindível determinar meios e métodos de cultivo que possibilitem a produção do fungo em larga escala. Entretanto, estudos a este respeito ainda são escassos na literatura, justificando-se novas investigações. O presente trabalho teve por objetivos, avaliar a produção de ***L. lecanii*** em diversos substratos líquidos obtidos de resíduos e subprodutos da agroindústria, além da produção em meios sólidos compostos por misturas de grãos e/ou derivados em diferentes proporções. Em seguida, na expectativa de incrementar a produção do fungo, os substratos líquidos e sólidos que proporcionaram os melhores resultados foram combinados, constituindo o sistema bifásico.

2- REVISÃO DE LITERATURA

Apesar de ser uma área de conhecimento relativamente antiga, o controle microbiano de insetos tomou grande impulso principalmente após a proibição do uso de inseticidas organoclorados e em decorrência do estabelecimento do Manejo Integrado de Pragas (MIP) como prática racional no controle de insetos prejudiciais em sistemas agrícolas e florestais (MOINO JUNIOR, 2003).

O controle microbiano trata, portanto, da utilização de patógenos visando a manutenção da população de pragas em níveis não econômicos de danos (ALVES, 1998). Entre os agentes passíveis de utilização no controle de pragas, os

fungos entomopatogênicos destacam-se por constituírem 80% das enfermidades responsáveis pelos surtos epizooticos dos ecossistemas e agrossistemas, o que os tornam uma excelente alternativa com amplo potencial de utilização (PADIN et al. 1995; ALVES, 1998).

Segundo ALVES (1998), a grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das principais vantagens no controle microbiano de insetos. A capacidade de penetração via tegumento, altamente especializada, também representa uma característica que coloca os fungos em vantagem quando comparados a outros agentes patogênicos.

Lecanicillium lecanii (Zimmermann) Zare & Gams é um dos agentes fúngicos mais efetivos e com potencial de utilização no controle biológico, apresentando uma ampla gama de hospedeiros. É um importante patógeno de homópteros, como afídeos, coccídeos e aleirodídeos (GRAJEK, 1994), além de causar doenças em alguns ácaros e hiperparasitar fungos patógenos de plantas, tais como várias ferrugens (VERHAAR & HIJWEGEN, 1993; CASTALDI & NICOLI, 1993).

Trata-se de um Deuteromiceto, de aspecto cotonoso e coloração branca-amarelada tênue. O micélio origina o conidióforo que caracteriza-se por apresentar fiálides pontiagudas, com uma disposição verticiliada na maioria das vezes. Quanto aos conídios, geralmente elípticos, encontram-se envoltos por uma massa gelatinosa na extremidade da fiálide e apresentam aspecto liso e de tamanho variado dependendo do isolado (ALVES, 1998; CASTALDI & NICOLI, 1993). Por não apresentarem mobilidade própria, os conídios do fungo são, involuntariamente, colhidos pela movimentação de insetos, graças à substância mucilaginosa com a qual são recobertos e que permite tal adesão (CASTALDI & NICOLI, 1993).

Segundo, HALL (1984), as condições favoráveis para o desenvolvimento de ***L. lecanii*** são alta umidade (acima de 85%) e temperatura entre 20 e 25°C. O

fungo parece ser inócuo ao homem e outros vertebrados, devido a sua baixa capacidade de crescimento sob temperaturas acima de 37°C. Além disso, não tem sido observado colonizando insetos úteis ou de importância no controle biológico (ALVES, et al., 1998). *L. lecanii* pode ainda ser associado a determinados inseticidas e fungicidas para intensificar a eficiência no controle de pragas (HALL, 1983). Recentemente, metabólitos secundários com propriedades inseticidas, extraídos de *L. lecanii*, têm sido utilizados no controle de mosca branca e afídeos em laboratório e em campo (WANG et al., 2006).

A produção de fungos entomopatogênicos representa uma fase importante no processo de desenvolvimento de um bioinseticida, uma vez que esses patógenos precisam estar disponíveis em grandes quantidades, devido a necessidade de haver um elevado potencial de inóculo para que o processo de doença se inicie em determinada população de insetos e o controle seja estabelecido (MOINO JUNIOR, 2003; ALVES & PEREIRA, 1998). Segundo KHALIL et al. (1985), a seleção de meios de cultura para produção de um isolado específico e o conhecimento das condições adequadas de cultivo são aspectos a serem levados em consideração na produção massal de um agente de biocontrole.

Neste sentido, alguns trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de estabelecer as condições de cultivo, sejam nutricionais ou ambientais, de isolados de *L. lecanii*. BARBOSA et al. (2002) avaliaram a produção dos isolados JAB 02 e JAB 45 submetidos a diferentes fontes de carbono (C), fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio (N). Para JAB 02, os autores observaram que a lactose utilizada como fonte de C, casitona e nitrato de sódio como fonte orgânica e inorgânica de N, respectivamente, proporcionaram melhores resultados, enquanto que glicose (fonte de C), peptona e extrato de carne (fontes orgânicas de N) e fosfato bi-básico (fonte inorgânica de N) favoreceram a produção de JAB 45. MONTEIRO et al. (2004), avaliaram o desempenho dos mesmos isolados de *L.*

lecanii citados anteriormente sob diferentes temperaturas, fotoperíodo e valores de pH inicial do meio de cultura, sendo que este foi um aspecto que não influenciou o desenvolvimento do fungo. Ausência de iluminação e temperatura variando entre 19 e 25 °C foram consideradas como as condições mais favoráveis ao cultivo destes isolados. A suplementação de meios de cultura com vitaminas e extrato de levedura, na expectativa de incrementar a produção de *L. lecanii*, foram avaliados por WENZEL et al. (2007). Os autores verificaram que a concentração de 1,0% de extrato de levedura e as vitaminas riboflavina, biotina e piridoxina para JAB 02 e ácido nicotínico para JAB 45, favoreceram a esporulação do fungo.

Além do conhecimento das condições de cultivo, trabalhos têm sido realizados no intuito de selecionar substratos para compor meios de cultura que favoreçam o crescimento e esporulação dos fungos e, principalmente, viabilizem economicamente o processo de produção. Apesar do arroz ainda ser o substrato mais utilizado na produção de fungos no Brasil, desde a década de 80 esforços vêm sendo feitos para a utilização de substratos alternativos, justamente visando à redução de custos. Desta forma, foram testados os mais variados tipos de substratos, tais como sorgo, caupi, fava, feijão, bagaço de mandioca, farinha de centeio, farinha de mandioca, além de resíduos como batatas sem valor comercial, bagaço de cana-de-açúcar enriquecido com xarope, casca de café, entre outros (BURTET et al., 1997; SOCCOL, et al. 1997; VILAS BOAS et al., 1996; CALDERON et al. 1995, SANTA et al., 2005).

Para a produção de *L. lecanii* foram avaliados, como substratos alternativos, o mesocarpo de amêndoa (LOPEZ & CARBONELL, 1998), folhas e sementes de palmeira (LOPEZ et al, 1999), farelo e casca de arroz (FENG et al., 2000; FENG et al. 2002), além de farelo de trigo e polpa de beterraba como suplementação ao meio de cultura Saboraud (GRAJEK, 1994). WENZEL et al. (2006) avaliaram diferentes grãos e derivados como meios de cultura líquidos e sólidos para a produção de isolados brasileiros de *L. lecanii*. Os autores

verificaram que extratos de feijão branco e carioca, soja em grão, farelo de trigo e lentilha foram os substratos líquidos que proporcionaram melhores resultados quanto à esporulação dos isolados testados, enquanto que farelos de trigo e soja e trigo moído foram os substratos sólidos mais favoráveis.

Segundo ALVES & PEREIRA (1998), a produção de fungos entomopatogênicos *in vitro*, ou seja, utilizando meios adequados de cultivo, têm como principais vantagens a obtenção econômica de grandes quantidades de propágulos em curtos intervalos de tempo, comparando-se à produção *in vivo*. O processo a ser utilizado para a produção de fungos está diretamente relacionado à estrutura desejada do patógeno em questão, podendo ser utilizados os meios líquidos, sólidos e o sistema bifásico.

A produção em meios líquidos caracteriza-se pela obtenção de elevada quantidade de biomassa em pequeno espaço físico e em pouco tempo, porém há dificuldades na obtenção de meios adequados, determinação das condições ideais de desenvolvimento e esporulação do fungo, e na prevenção de contaminações secundárias (ALVES & PEREIRA, 1998; MOINO JUNIOR, 2003). São poucos os fungos entomopatogênicos que produzem propágulos infectivos através deste método, havendo a necessidade de uma fase seguinte para a formação destas. Os produtos Mycotal® e Vertalec®, comercializados no Reino Unido para o controle de pulgões e mosca branca, são constituídos por blastósporos do fungo *L. lecanii* produzido por fermentação líquida em meio à base de dextrose e extrato de levedura (LEITE et al., 2003). Entretanto, este sistema de produção é mais utilizado no método bifásico, onde blastósporos e micélio são produzidos nos substratos líquidos e então transferidos para a produção de esporos sobre superfície sólida (ROBERTS & YENDOL, 1981).

A produção de fungos sobre meios sólidos é a forma mais comum de uso, por não necessitar de tecnologia sofisticada e permitir a produção direta de unidades infectivas (ALVES & PEREIRA, 1998). Esse processo tem sido usado

para manutenção rotineira de isolados e produção em pequena escala de conídios visando estudos de laboratório, bem como para a produção em média e grande escala visando testes de campo e comercialização. O fungo é produzido na superfície do substrato, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala de produção (LEITE et al., 2003).

Na produção bifásica, as condições para esporulação se dão sobre um substrato sólido, numa segunda fase do processo. Na fase inicial da produção obtém-se principalmente uma massa micelial em meio líquido apropriado, sendo esta posteriormente transferida para os substratos sólidos (ALVES & PEREIRA, 1998). Este método combina o benefício da alta produção de biomassa obtida no cultivo em meios líquidos, com a produção de conídios estáveis em meios sólidos (JENKINS & GOETTEL, 1997). Esse processo de produção vem sendo utilizado com sucesso por algumas empresas do exterior, como por exemplo, na Rússia, Austrália e Estados Unidos (MOINO, JUNIOR, 2003)

3 - REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In:_____. ALVES, S.B.(Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: Esalq, 1998 p 289-382

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B.(Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Esalq, 1998 p. 845-869.

BARBOSA, C. C; MONTEIRO A. C.; CORREIA, A. C. B.;PEREIRA, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 821-829, 2002.

BURTET, M. J. G.; SILVA, M. E. AND DIEHL-FLEIG, E. Produção de conídios e micélio seco de ***Beauveria bassiana*** (Bals.) Vuill. para controle de formigas cortadeiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16, 1997, Anais, Salvador, p. 124.

CALDERON, A.; FRAGA, M.; CARRERAS, B. Production of ***Beauveria bassiana*** by solid-state fermentation. **Revista de Protección Vegetal**, Havana, v. 10, n. 3, p. 269-273, 1995

CASTALDI, R.; NICOLI, G. ***Verticillium lecanii***. **Informatore Fitopatologico**, Bologna, v. 43, n. 10, p. 20-24, 1993.

De NARDO, E.A.B.; CAPALBO, D.M.F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentação. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**, Jaguariúna, SP: Embrapa, 1998, v. 1, p. 231-260.

GRAJEK, W. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus ***Verticillium lecanii*** in solid-state cultures. **Folia Microbiologica**, Prague, v.39, n.1, p.29-32, 1994.

HALL, R.A. Synergistic inhibitory action of preparations of iprodione and carbaryl on germination of conidia of ***Verticillium lecanii***. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 42, p. 384–386, 1983.

HALL, R.A. Epizootic potencial for aphids of different isolates of the fungus, ***Verticillium lecanii***. **Entomophaga**, Paris, v. 29, p. 311-321, 1984.

JENKINS, N.E.; GOETTEL, M.S. Methods for mass-production of microbial control agents for grasshoppers and locusts. In: GOETTEL, M.S; JOHNSON, L (Eds.).

Microbial control of grasshoppers and locusts, Ottawa (Memoris of the Entomological Society of Canada), 1997, p.37-48.

KHALIL, S.K.; SHAN, M.A; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus ***Verticillium lecanii*** with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 13, n. 3/4 , p. 329-334, 1985.

LEITE,L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M. de; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003, 92 p.

LOPEZ, L.V.; CARBONELL, T. Use of almond mesocarp for production of the entomopathogenic fungus ***Verticillium lecanii***. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 9, p.886-895, 1998.

LOPEZ, L.V.; CARBONELL, T; SALINAS, J. Colonization of plante waste substrates by entomopathogenic and micoparasite fungi. **Micron**, New York, v. 30, n. 4, p.325-333, 1999.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; ALMEIDA, J.E.M. Subsídios para a produção de ***Sporothrix insectorum*** (HOOG & EVANS). **Bioikos**, Campinas, v. 17, n. 1/2, p.81-86, 2003.

LOUREIRO, E.S. OLIVEIRA, N.C.; WILCKEN, C.F.; BATISTA FILHO, A. Patogenicidade de ***Verticillium lecanii*** ao pulgão-do-pinus. **Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p.765-770, 2004.

MOINO JÚNIOR, A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: BUENO, V.H.P. **Controle Biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2003, p.175-185.

MONTEIRO, A.C.; BARBOSA, C.C.; CORREIA, A.C.B.; PEREIRA, G.T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.6, p.561-565, jun. 2004

PADIN, S.B.; DAL BELLO, G.M.; VASICEK, A.L. Potencial bioinsecticida de hongos entomopatógenos de plagas en granos almacenados. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v.15, n.1, p. 1-7, 1995

ROBERTS, D.W.; YENDOL, W. Use of fungi for microbial control of insects. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. **Microbial control of insects and mites**, New York: Academic Press, 1981. p. 125-149

SANTA, H.S.D.; SANTA, O.R.D.; BRAND, D.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n esp., p. 51-60, 2005.

SOCCOL, C.R.; AYALA, L.A.; SOCCOL, V.T.; KRUEGER, N.; SANTOS, H. R. Spore production by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from declassified potato by solid-state fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 34-42, 1997

VERHAAR, M.A. & HIJWEGEN, T. Efficient production of phialoconidia of ***Verticillium lecanii*** for biocontrol of cucumber powdery mildew, ***Sphaeroteca fuliginea***. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.99, n.2, p.101-103, 1993.

VILAS BOAS, A.M.; ANDRADE, R.M.; OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 39, n. 1, p.123-128, 1996.

WANG, L.; HUANG, J.; LIU, B. Assessment of the control effectiveness of insecticidal toxins from ***Verticillium lecanii*** on the population of ***Bemisia tabaci*** (Gennadius) in greenhouse. **Acta Ecologica Sinica**, v. 26, p.391–398 2006.

WENZEL, I.M., MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Produção de conídios de ***Lecanicillium lecanii*** em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.7-17, 2006.

WENZEL, I.M.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Desempenho de ***Lecanicillium lecanii*** em meios de cultura contendo vitaminas e concentrações de extrato de levedura. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 413-421, 2007.

CAPÍTULO 2- RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E GRÃOS COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE *Lecanicillium lecanii*

RESUMO - *Lecanicillium lecanii* é um fungo promissor no controle biológico de pragas e para utilização em campo é necessária a produção de conídios em grande quantidade. Este trabalho objetivou selecionar meios de cultura líquidos feitos com resíduos ou subprodutos agroindustriais e meios sólidos pela combinação de grãos e derivados, visando a produção dos isolados JAB 02 e JAB 45 do fungo. Como substratos líquidos utilizaram-se, em diferentes concentrações, água do cozimento do arroz e da prensa da mandioca, soro de queijo, milhocina[®], melaço, vinhaça e leite de levedura da indústria da cana-de-açúcar, avaliando-se a esporulação e biomassa. Como substratos sólidos, combinaram-se, em diferentes proporções, trigo grosso, farelos de trigo e de soja com quirela de milho, lentilha e sorgo para JAB 02, e com painço, trigo em grão e lentilha para JAB 45, avaliando-se a produção e viabilidade de conídios. O meio contendo 4% de milhocina[®] favoreceu a produção de ambos os isolados. Para JAB 02, proporcionaram melhores resultados os meios com 85% de água da prensa da mandioca, 5,5% de melaço e 100% de soro de queijo, além de misturas de trigo grosso e farelo de trigo com lentilha (70:30%) e trigo grosso e farelo de trigo com sorgo (85:15%). Os meios com 100% da água da prensa da mandioca e 85% de soro de queijo, e as combinações entre farelo de trigo e painço (85:15%), trigo grosso e lentilha (55:45%) e farelo de trigo com trigo em grão e com lentilha (70:30%) favoreceram a produção de JAB 45.

Palavras-chave: controle biológico, produção massal, substratos líquidos, substratos sólidos.

CHAPTER 2 - AGROINDUSTRIAL RESIDUES AND BY-PRODUCTS AND GRAINS FOR THE PRODUCTION OF *Lecanicillium lecanii*.

ABSTRACT - On biological control of pests, *Lecanicillium lecanii* is a promising fungus and to be used in the fields, it is necessary the production of large quantities of conidia. The present work had the objective of selecting liquid media obtained of agroindustrial residues or by-products and solid media obtained by the combination of grains and derivates, aiming the production of isolate of the fungus JAB 02 and JAB 45 of the fungus. For liquid media it was used, in different concentrations, water of cooked rice and of cassava bran, cheese whey, milhocina[®], sugarcane molasses, vinasse and years cream, evaluating sporulation and biomass. For solid substratum's there were combined in different proportions with ground wheat, soybean and wheat brans with cracked corn, lentil and sorghum grain for the isolate JAB 02 and with italian millet, wheat and lentil grain for the isolate JAB 45, evaluating the production and viability of conidia. The liquid media containing 4% of milhocina[®] was favorable for both isolates. For JAB 02 the media that proportionated the best results were: 85% of water from cassava bran production, 5,5% of molasses and 100% of cheese whey, as also the mixtures of ground wheat and wheat bran with lentil grain (70:30%) and ground wheat and wheat bran with sorghum grain (85:15%). The media with 100% of water from cassava bran production and 85% of cheese whey and the combinations of wheat bran with italian millet (85:15%), ground wheat and lentil grain (55:45%) and wheat bran with wheat grain and lentil (70:30%) distinguished the production of JAB 45.

Keywords: biological control, massive production, liquid media, solid media

1. INTRODUÇÃO

O controle microbiano de insetos vem ganhando cada vez mais importância por tratar da utilização racional dos patógenos visando a manutenção da população de pragas em níveis não econômicos de danos (ALVES, 1998). Além disso, torna-se cada vez mais oportuno sua adoção uma vez que o uso indiscriminado de inseticidas químicos gera como conseqüências a resistência de insetos, a ressurgência e o ataque de pragas antes tidas como secundárias, desequilíbrios biológicos e efeitos prejudiciais ao homem, insetos úteis e outros organismos, além de resíduos nos alimentos, água e solo (PARRA et al., 2002).

Neste contexto, os fungos entomopatogênicos têm progressivamente despertado a atenção, como no caso da espécie ***Lecanicillium lecanii*** considerado um dos mais promissores no controle biológico de pragas na agricultura (LECUONA e RIBA, 1991), por possuir uma ampla gama de hospedeiros, que incluem insetos, ácaros e fungos fitopatogênicos (HALL, 1981). No entanto, para serem utilizados como bioinseticidas, os fungos precisam estar disponíveis em grandes quantidades (ALVES e PEREIRA, 1998; OLIVEIRA, 2000).

Novas metodologias de produção, seleção de substratos abundantes de simples composição e baixo custo, além do conhecimento das condições adequadas de cultivo, como temperatura, pH, luminosidade entre outros, são fatores que devem ser levados em consideração para a utilização de fungos, em larga escala, no controle de pragas.

Visando a redução de custos e obtenção de grandes quantidades de propágulos viáveis, substratos naturais, como painço, quirela de milho, trigo em grão (EL DAMIR, 2006), farinha de tapioca, batata doce, extratos de abóbora e mamão (IBRAHIM e LOW, 1993), mistura de farelo e casca de arroz, cevada (DORTA et al, 1990; NELSON, et al, 1996), entre outros, vêm apresentando

resultados promissores para produção de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Para produção de *L. lecanii*, meios de cultura compostos de arroz e farelo de arroz (FENG et al., 2002), além de farelo de trigo, polpa de beterraba e a mistura de ambos como suplementação ao meio de Sabouraud, foram utilizados na expectativa de incrementar a esporulação (GRAJEK, 1994). WENZEL et al (2006) avaliaram diversos substratos líquidos e sólidos obtidos de grãos, verificando que farelo de soja, farelo de trigo, trigo moído e lentilha, como substratos sólidos e extratos líquidos de feijão-carioca, feijão-branco, trigo e soja, proporcionaram, entre os substratos avaliados, as maiores produções de conídios.

Entretanto, estudos sobre a produção de *L. lecanii* ainda são escassos no Brasil, justificando-se novas investigações para estabelecer os meios e métodos adequados visando a produção do fungo nas condições locais. Entre os métodos de produção destaca-se o cultivo bifásico, que combina o benefício da alta produção de biomassa em meio líquido com a posterior produção de conídios em meios sólidos (JENKINS e GOETTEL, 1997).

O presente trabalho teve como objetivos testar diversos substratos líquidos elaborados com resíduos ou subprodutos da agroindústria, avaliar diferentes combinações de substratos sólidos obtidos de grãos, buscando otimizar o crescimento do fungo com adequada produção e viabilidade de conídios, e ainda, selecionar meios visando a produção bifásica do fungo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungo

Foram utilizados os isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii*, escolhidos baseando-se em estudos prévios de caracterização fisiológica e de produção. Os isolados de *L. lecanii*, pertencentes à coleção do Laboratório de

Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/Unesp, Jaboticabal, SP foram originalmente obtidos da cochonilha verde ***Coccus viridis*** Green (Hemiptera: Coccidae) coletados em pomares de laranja nos municípios de Ubirajara e São Carlos, SP, respectivamente (BARBOSA et al., 2002).

Os isolados permaneceram estocados em tubos de ensaio contendo meio de batata, dextrose e ágar (BDA) e acondicionados a 4°C em geladeira. Para utilização nos ensaios foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, incubados em estufa a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 15 dias, com ausência de iluminação.

2.2 Preparo dos meios líquidos

Utilizaram-se substratos considerados resíduos ou subprodutos da agroindústria em diferentes concentrações e obtidas pela diluição destes em água destilada, como segue: água do cozimento do arroz (55, 70, 85 e 100%), melaço de cana-de-açúcar (1, 2,5, 4 e 5,5%), vinhaça de cana-de-açúcar (55, 70, 85 e 100%), leite de levedura da indústria da cana-de-açúcar (10, 25, 40 e 55%), água de prensa da mandioca (55, 70, 85 e 100%), soro obtido na fabricação de queijo fresco (55, 70, 85 e 100%), milhocina[®] (0,5; 1; 2,5; 4%). A água do cozimento do arroz foi considerada um resíduo produzido por biofábricas destinadas a produção massal de ***M. anisopliae*** e ***B. bassiana*** no Brasil. Como padrão de comparação utilizou-se os meios obtidos a partir de soja em grão e farelo de trigo, conforme WENZEL et al. (2006).

Os meios feitos a partir de arroz e farelo de trigo foram preparados cozinhando-se em fogão, 100 g de arroz e 50 g de farelo de trigo em 1.000 mL de água destilada fervente, por 5 e 20 minutos, respectivamente. O meio obtido da soja em grão foi preparado cozinhando-se, em autoclave a 121°C, 100 g do grão em 1.000 mL de água destilada, por 20 minutos, segundo metodologia proposta por WENZEL et al. (2006). Após cozimento, a soja foi triturada em liquidificador e

assim como para os outros substratos descritos anteriormente, foram filtrados em panos de algodão para retirada das partes grosseiras.

Aos meios preparados com água de cozimento do arroz, vinhaça e leite de levedura foram adicionados de 0,5% de dextrose, os de milhocina® e soja receberam 1% de dextrose e o meio preparado a partir de farelo de trigo recebeu 1% de sacarose. Todos os meios líquidos foram acrescidos de 250 mg L⁻¹ de cloranfenicol para evitar contaminação bacteriana durante o período de incubação.

O pH de cada meio foi ajustado para 6,5 (MONTEIRO, et. al, 2004) utilizando soluções de NaOH (3N) ou HCl (1N). Os meios, em quantidades de 100 mL, foram distribuídos em 6 frascos erlenmeyers com capacidade de 250 mL, vedados com tampão de algodão e papel alumínio e posteriormente autoclavados a 121°C e 1Kgf cm⁻² por 20 minutos.

2.3 Preparo dos meios sólidos

A escolha dos substratos foi baseada nos resultados obtidos por WENZEL et al. (2006) que utilizaram os mesmos isolados do fungo. Utilizaram-se os substratos que proporcionaram os melhores resultados de esporulação para ambos os isolados, ou seja, trigo grosso (moído), farelo de trigo e farelo de soja, e aqueles que favoreceram a viabilidade, os quais foram sorgo em grão, quirela de milho e lentilha para JAB 02 e trigo em grão, painço e lentilha para JAB 45. Os substratos que promoveram melhor esporulação e melhor viabilidade de conídios de cada isolado, foram misturados nas proporções de 85:15%, 70:30%, 55:45%, usando o substrato que favoreceu a esporulação sempre em maior proporção. Tais misturas, nas diferentes proporções, constituíram os tratamentos do ensaio e cada substrato foi também utilizado individualmente como controle para comparação.

Os substratos foram preparados separadamente segundo metodologia descrita por PENARIOL (2006). Trigo grosso, farelo de trigo, farelo de soja e quirela de milho foram embebidos em água destilada na proporção de 3:1 (v p⁻¹), durante 15 minutos. Os grãos de sorgo, lentilha, painço e trigo foram cozidos em água destilada fervente (3:1, v p⁻¹) por 5 minutos em fogo brando. Em seguida, todos os substratos foram coados para remoção do excesso de água, e preparadas as devidas combinações, em peso úmido (g g⁻¹).

Os meios foram colocados em frascos erlenmeyers com capacidade para 250 mL, vedados com tampão de algodão e recobertos com papel alumínio. O volume do frasco ocupado pelas combinações foi arbitrariamente padronizado, em função da natureza e características dos substratos utilizados (Tabelas 1 e 2), sendo, posteriormente, vedados e autoclavados a 121°C e 1Kgf cm⁻² por 40 minutos.

2.4 Inoculação do fungo

A inoculação foi realizada em fluxo laminar transferindo-se, com auxílio de agulha de níquel-cromo, 3 e 4 discos de 8 mm de diâmetro retirados de colônias do fungo crescidas em BDA por 15 dias, para os meios líquidos e sólidos, respectivamente. Os frascos foram mantidos em estufa a 25°C ± 0,5°C por 20 dias no ensaio com meios líquidos e 15 dias no ensaio com meios sólidos, em ausência de iluminação.

2.5 Avaliação

Em ambos os ensaios foi avaliada a produção de conídios, além da biomassa micelial no líquido e a viabilidade de conídios no sólido.

Para determinação da produção de conídios, a massa micelial formada nos meios líquidos foi triturada em **mixer** vertical SB 40 marca Black & Decker® por 3 segundos para desagregação do micélio. Em seguida o meio foi vigorosamente

agitado por 3 minutos utilizando-se 20 g de pérolas de vidro para remoção dos conídios. O material foi então coado em peneira com malha de 1mm e 1mL do meio líquido foi transferido para tubo contendo 9 mL de uma mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89% p v⁻¹) e solução Tween 80[®] (0,1% v v⁻¹).

No ensaio com meios sólidos, foram coletadas nos erlenmeyers 10 amostras do substrato com o fungo crescido de modo a totalizar 1 g. Este material foi suspenso em 9 mL de solução salina + Tween (1:1) e vigorosamente agitado em agitador elétrico de tubos, durante 20 segundos, para remoção dos conídios, sendo em seguida coado em tecido **voile** para a retirada da parte sólida. As suspensões preparadas, em ambos os ensaios, foram agitadas vigorosamente e o número de conídios determinado com auxílio de câmara de Neubauer. Tais suspensões foram também usadas para avaliação da viabilidade dos conídios conforme MARQUES et al. (2004).

Para determinação da biomassa fúngica formada nos meios líquidos, a massa micelial foi filtrada em funil de Büchner sob vácuo, em seguida mantida em estufa a 60°C até peso constante, obtido em 24 horas, e então pesada em balança analítica para determinação da massa seca do micélio.

Ambos os ensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, a 1% de probabilidade, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Na análise de variância dos dados obtidos no ensaio líquido, analisou-se o efeito de dois fatores: meios e concentração dentro de meios. Para o ensaio com meios sólidos os dados foram analisados no esquema fatorial composto por três substratos usados em maior proporção, três usados em menor proporção e cinco proporções.

Tabela 1- Substratos e respectivas quantidades e proporções utilizadas no ensaio com meios sólido: para o isolado JAB 02 de *Lecanicillium lecanii*

Substratos (misturas)	Quantidade	Proporções
Trigo Grosso (TG) + Sorgo (S)	50 g	85% TG + 15% S
		70% TG + 30% S
		55% TG + 45% S
Trigo Grosso (TG) + Quirela de milho (Q)	60 g	85% TG + 15% Q
		70% TG + 30% Q
		55% TG + 45% Q
Trigo Grosso (TG) + Lentilha (L)	47 g	85% TG + 15% L
		70% TG + 30% L
		55% TG + 45% L
Farelo de Trigo (FT) + Sorgo (S)	20 g	85% FT + 15% S
		70% FT + 30% S
		55% FT + 45% S
Farelo de Trigo (FT) + Quirela de milho (Q)	20 g	85% FT + 15% Q
		70% FT + 30% Q
		55% FT + 45% Q
Farelo de Trigo (FT) + Lentilha (L)	20 g	85% FT + 15% L
		70% FT+ 30% L
		55% FT + 45% L
Farelo de Soja (FS) + Sorgo em grão (S)	40 g	85% FS + 15% S
		70% FS + 30% S
		55% FS + 45% S
Farelo de Soja (FS) + Quirela de milho (Q)	40 g	85% FS + 15% Q
		70% FS + 30% Q
		55% FS + 45% Q
Farelo de Soja (FS) + Lentilha (L)	40 g	85% FS + 15% L
		70% FS+ 30% L
		55% FS + 45% L
Trigo Grosso (TG)	50 g	100% TG
Farelo de Trigo (FT)	20 g	100% FT
Farelo de Soja (FS)	35 g	100% FS
Sorgo (S)	70 g	100% S
Quirela de milho (Q)	60 g	100% Q
Lentilha (L)	50 g	100% L

Tabela 2- Substratos e respectivas quantidades e proporções utilizadas no ensaio com meios sólido: para o isolado JAB 45 de *Lecanicillium lecanii*

Substratos (misturas)	Quantidade	Proporções
Trigo Grosso (TG) + Trigo grão (Tg)	47 g	85% TG + 15% Tg
		70% TG + 30% Tg
		55% TG + 45% Tg
Trigo Grosso (TG) + Painço (P)	53 g	85% TG + 15% P
		70% TG + 30% P
		55% TG + 45% P
Trigo Grosso (TG) + Lentilha (L)	47 g	85% TG + 15% L
		70% TG + 30% L
		55% TG + 45% L
Farelo de Trigo (FT) + Trigo grão (Tg)	28 g	85% FT + 15% Tg
		70% FT + 30% Tg
		55% FT + 45% Tg
Farelo de Trigo (FT) + Painço (P)	20 g	85% FT + 15% P
		70% FT + 30% P
		55% FT + 45% P
Farelo de Trigo (FT) + Lentilha (L)	20 g	85% FT + 15% L
		70% FT+ 30% L
		55% FT + 45% L
Farelo de Soja (FS) + Trigo grão (Tg)	30 g	85% FS + 15% Tg
		70% FS + 30% Tg
		55% FS + 45% Tg
Farelo de Soja (FS) + Painço (P)	38 g	85% FS + 15% P
		70% FS + 30% P
		55% FS + 45% P
Farelo de Soja (FS) + Lentilha (L)	40 g	85% FS + 15% L
		70% FS+ 30% L
		55% FS + 45% L
Trigo Grosso (TG)	50 g	100% TG
Farelo de Trigo (FT)	20 g	100% FT
Farelo de Soja (FS)	35 g	100% FS
Trigo grão (Tg)	65 g	100% S
Painço (P)	75 g	100% Q
Lentilha (L)	50 g	100% L

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de *Lecanicillium lecanii* em meios líquidos

A Tabela 3 mostra os resultados de produção de conídios e biomassa dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *L. lecanii* crescidos em diferentes meios líquidos. Para JAB 02, não houve diferença estatística ($P < 0,05$) na produção de conídios quando se comparou o conjunto dos meios líquidos com o controle (meio preparado a partir de soja em grão), embora, individualmente alguns meios tenham apresentado média com maior valor numérico.

Entre estes, a maior produção de conídios foi obtida utilizando-se água da prensa da mandioca, não havendo diferença significativa entre as concentrações testadas deste substrato. Nos meios preparados com melaço de cana-de-açúcar e milhocina[®], a produção foi, em média, menor que a obtida com o substrato anterior, mas o meio preparado à base de 5,5% de melaço foi o que apresentou maior valor ($2,8 \times 10^6$ con. mL⁻¹) referente à produção de conídios pelo isolado JAB 02, não diferindo estatisticamente do obtido na concentração de 4,0%. O meio preparado com 4,0% de milhocina[®] também proporcionou resultado promissor para este parâmetro.

A biomassa formada por este mesmo isolado no conjunto dos meios testados foi maior ($P > 0,01$) que a obtida no controle, destacando-se os meios preparados com água da prensa da mandioca e soro de queijo, nos quais a biomassa produzida foi 5 e 4,7 vezes maior que a obtida no controle, respectivamente. A maior produção de biomassa foi obtida no meio preparado com 85% de água da prensa da mandioca (2,13 g 100 mL de meio⁻¹), não diferindo da concentração de 100% (1,66 g 100 mL de meio⁻¹). Entre as concentrações testadas de soro de queijo, as que proporcionaram maior produção de biomassa foram de 70, 85 e 100%.

Tabela 3- Produção de conídios e biomassa micelial formada pelos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* em meios líquidos preparados a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais usados em diversas concentrações, após 20 dias de cultivo a 25°C e ausência de iluminação.

Tratamentos	JAB 02		JAB 45	
	(x10 ⁵ con. mL ⁻¹)	(g 100 mL ⁻¹)	(x10 ⁵ con. mL ⁻¹)	(g 100 mL ⁻¹)
Controle ^{1, 2}	3,60 a	0,31 b	116,66 a	0,81 a
Meios líquidos	5,84 a	0,58 a	17,03 b	0,86 a
Teste F	1,24 ^{NS}	33,06**	58,65**	0,26 ^{NS}
Meios líquidos				
Água do cozimento do arroz	0,00 d	0,18 d	0,91 d	0,23 c
Vinhaça	0,00 d	0,29 d	2,00 cd	0,57 bc
Leite de levedura	1,00 c	0,30 d	7,33 b	0,70 b
Soro de queijo	2,00 c	1,46 b	4,33 bc	1,55 a
Água da prensa da mandioca	18,08 a	1,55 a	41,16 a	1,49 a
Melaço de cana-de-açúcar	11,77 b	0,64 c	4,58 bcd	0,83 b
Milhocina	8,07 b	0,56 c	55,90 a	0,67 b
Teste F	83,84**	146,43**	42,47**	90,09**
Concentração dentro de meio				
Água do cozimento do arroz	55%	0,00 a	0,10 a	0,33 a
	70%	0,00 a	0,10 a	0,00 a
	85%	0,00 a	0,18 a	0,66 a
	100%	0,00 a	0,32 a	2,66 a
Vinhaça	55%	0,00 a	0,47 a	1,33 a
	70%	0,00 a	0,25 a	0,33 a
	85%	0,00 a	0,30 a	2,66 a
	100%	0,00 a	0,14 a	3,66 a
Leite de levedura	10%	1,00 a	0,15 a	1,33 a
	25%	1,33 a	0,27 a	5,33 a
	40%	1,00 a	0,29 a	9,33 a
	55%	0,66 a	0,51 a	13,33 a
Soro de queijo	55%	2,00 a	1,08 b	3,33 a
	70%	1,00 a	1,69 a	3,00 a
	85%	2,33 a	1,54 ab	5,33 a
	100%	2,66 a	1,54 ab	5,66 a
Água da prensa da mandioca	55%	13,83 a	1,04 c	26,33 a
	70%	17,66 a	1,40 bc	42,00 a
	85%	21,00 a	2,13 a	34,66 a
	100%	19,83 a	1,66 ab	73,66 a
Melaço de cana-de-açúcar	1,0%	2,72 c	0,47 a	0,23 a
	2,5%	4,80 bc	0,59 a	2,63 a
	4,0%	10,87 ab	0,65 a	4,13 a
	5,5%	28,73 a	0,84 a	11,33 a
Milhocina [®]	0,5%	0,90 c	0,35 a	3,10 b
	1,0%	2,83 bc	0,42 a	35,23 ab
	2,0%	7,44ab	0,67 a	70,96 a
	4,0%	21,13 a	0,82 a	114,33 a
Teste F	5,97**	6,58**	4,13**	8,74**
C.V. (%)	34,41	22,05	35,55	20,50

¹ Meio líquido preparado a partir de soja em grão, para JAB 02. ² Meio preparado a partir de farelo de trigo, para JAB 45

Médias originais, mas análise de variância realizada com dados transformados em log (x+1); médias seguidas por pelo menos uma letra em comum na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05). NS não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade

Pelo resultado das análises referentes ao isolado JAB 45 (Tabela 3), verificou-se que a produção de conídios obtida no controle (meio preparado a partir de farelo de trigo) foi 6,85 vezes maior do que a média obtida nos meios líquidos em conjunto. No entanto, comparando-se o controle com a média individual obtida nos meios preparados com água da prensa da mandioca e milhocina[®], principalmente em algumas concentrações testadas, observa-se que esta diferença na produção de conídios foi menor, sendo de apenas 1,58 e 1,02 vezes para os meios contendo 100% de água da prensa da mandioca e 4,0% de milhocina[®], respectivamente. Entre as concentrações testadas de água da prensa da mandioca, não houve diferença significativa quanto à produção de conídios, e entre os meios a base de milhocina[®] apenas na concentração de 0,5% se observou resultado menor.

Para produção de biomassa micelial, observou-se que apesar de não ter havido diferença significativa entre a média do controle e dos meios líquidos em conjunto, os meios preparados com soro de queijo e água da prensa da mandioca destacaram-se, individualmente, por apresentarem em média, valores 1,9 e 1,8 vezes maiores que o controle, respectivamente. Entre as concentrações testadas do meio feito com soro de queijo, não se observou diferença significativa quanto à produção de biomassa, mas a concentração de 85% pode ser destacada como a mais promissora, fato que também pode ser considerado para o meio preparado com 100% de água da prensa da mandioca

Para seleção dos substratos e respectivas concentrações adequadas à produção do fungo em um sistema bifásico (Capítulo 3), foi levado em consideração a análise conjunta dos dois parâmetros avaliados: produção de conídios e biomassa. Quando a análise estatística não identificou diferença significativa entre os tratamentos, considerou-se o maior valor numérico das médias.

Assim, para o isolado JAB 02, optou-se por escolher os meios líquidos a base de 85% de água da prensa da mandioca, 5,5% de melaço de cana-de-açúcar e 4% de milhocina[®]. Em relação ao meio preparado com soro de queijo, as concentrações de 70 e 100% foram as que proporcionaram maiores valores de produção de biomassa e de conídios, respectivamente. Contudo, observa-se que no meio contendo 70% de soro de queijo, a produção de biomassa foi 1,1 vez maior que no meio contendo 100% deste, mas a produção de conídios foi 2,6 vezes menor, o que motivou a escolha da concentração de 100% como a mais adequada. Para JAB 45, os meios a base de 85% de soro de queijo, 100% de água da prensa da mandioca e 4,0% de milhocina[®], foram escolhidos para a produção do isolado.

Os resultados de produção dos isolados JAB 02 e JAB 45 de ***L. lecanii*** obtidos em cultura líquida estacionária utilizando resíduos ou subprodutos agroindustriais neste trabalho, estão congruentes com as afirmações de ROBERTS e HUMBER (1981) e ALVES e PEREIRA (1998), que relatam o fato de que a maioria dos hifomicetos entomopatogênicos não esporulam rapidamente em cultura líquida, obtendo-se uma grande massa micelial.

Entretanto, a produção de conídios pode ser incrementada através do uso de substratos sintéticos e agitação constante. Utilizando meio líquido composto por maltose, extrato de levedura e peptona FENG et al. (2002) verificaram que o isolado F091 de ***Verticillium lecanii*** (= ***L. lecanii***) produziu de $1,2 \times 10^{10}$ conídios mL⁻¹ em cultura agitada a 150 rpm por sete dias. Em outro trabalho, estes autores avaliaram o efeito da aeração superficial, verificando que nesta condição o isolado cresceu abundantemente, mas ressaltaram que o efeito deste processo no crescimento é bastante complexo (FENG et al, 2000). A esporulação do fungo ***M. anisopliae*** em meios líquidos de arroz parboilizado, extrato de levedura e extrato do percevejo da soja suplementados com diferentes concentrações de açúcar, somente ocorreu quando a biomassa foi submetida a aeração direta, atingindo 10^7

conídios por grama de substrato (PEREIRA e EIRA, 1999). Formas mais facilmente assimiláveis de nutrientes e disponibilidade de oxigênio podem explicar a grande produção de conídios obtida nestes trabalhos.

WENZEL et al. (2006) avaliaram a esporulação de *L. lecanii* em meios líquidos feitos a partir de grãos. Os melhores resultados foram obtidos nos meios preparados com feijão-branco, feijão-carioca e soja para o isolado JAB 02 e lentilha, feijão-carioca e farelo de trigo, para JAB 45. Comparando-se com os resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que a produção de conídios pelos isolados JAB 45 e JAB 02 no meio preparado com 4% de milhocina® foi, respectivamente, em média, 2,3 e 1,5 vezes maior que os melhores resultados obtidos por estes últimos autores.

Os meios líquidos compostos por vinhaça e água do cozimento do arroz foram os que proporcionaram os piores resultados para a produção de conídios e biomassa pelos isolados JAB 02 e JAB 45 (Tabela 3), resultado semelhante ao obtido para *Bipolaris euphorbiae* em meio líquido preparado à base de vinhaça (PENARIOL, 2006) e para os mesmos isolados de *L. lecanii* cultivados em meios líquidos obtidos de farelo de arroz e arroz agulhinha (WENZEL et al., 2006). PENARIOL (2006) testou como substrato líquido, a água da prensa da mandioca para produção de *B. euphorbiae*, mas diferentemente do ocorrido para *L. lecanii* neste trabalho, não obteve bom resultado. Contudo, o autor optou por manter o pH original do meio, sem ajuste, o que pode ter contribuído para o resultado.

WENZEL et al. (2005) verificaram que o isolado JAB 02 de *L. lecanii* produziu maior biomassa micelial em meio líquido contendo 60 g de dextrose e 40 g de extrato de levedura, atingindo valor de 0,15 g 30 mL de meio⁻¹ em 6 dias (média de 0,03 g/dia), enquanto neste trabalho o mesmo isolado cultivado por 20 dias no meio contendo 85% de água da prensa da mandioca produziu 2,13 g 100 mL⁻¹ (média de 0,11 g/dia).

3.2 Produção de *Lecanicillium lecanii* em meios sólidos

Examinando-se os dados contidos na Tabela 4, verificou-se que farelo de trigo e lentilha, usados em maior e menor proporção, respectivamente, foram os substratos que mais favoreceram a produção de conídios para ambos os isolados, além de trigo grosso (usado em maior proporção) e sorgo (usado em menor proporção) para JAB 02. Além disso, observou-se que o tipo de substrato não influenciou a viabilidade dos conídios produzidos pelos isolados, exceto farelo de trigo para JAB 45 (98,75%).

Determinar as misturas mais eficientes entre os substratos e suas respectivas proporções foram os objetivos deste ensaio. O desdobramento da interação substratos usados em maior proporção (A) **versus** substratos usados em menor proporção (B), significativo para produção de conídios de ambos os isolados de *L. lecanii*, está apresentada na Tabela 5. Para JAB 02 as misturas de substratos que mais promoveram a esporulação foram entre trigo grosso e sorgo, trigo grosso e lentilha, farelo de trigo e sorgo e farelo de trigo e lentilha; enquanto que para JAB 45 foram trigo grosso e lentilha, farelo de trigo misturado com todos os substratos utilizados em menor proporção. Definidas as misturas mais eficientes, foi realizada uma análise destinada a determinar as proporções mais adequadas para promover a esporulação dos isolados (Tabelas 6 e 7).

Para JAB 02, apesar de não ter havido diferença significativa na produção de conídios obtida nas três proporções (85:15%, 70:30% e 55:45%), optou-se por escolher as que apresentaram maior valor numérico. Assim, 85% de trigo grosso e 15% de sorgo, 70% de trigo grosso e 30% de lentilha, 85% de farelo de trigo e 15% de sorgo e 70% de farelo de trigo e 30% de lentilha, podem ser indicadas para a produção do isolado JAB 02 (Tabela 6).

Analisando a produção de conídios pelo isolado JAB 45, verificou-se que, exceto na mistura entre farelo de trigo e painço, não houve diferença significativa entre as três proporções testadas, e entre estas e o tratamento contendo o substrato usado em maior proporção (100%-0) (Tabela 7). Destacaram-se, portanto, as

misturas compostas por 55% de trigo grosso e 45% de lentilha, 70% de farelo de trigo e 30% de trigo em grão, 85% de farelo de trigo e 15% de painço e 70% de farelo de trigo e 30% de lentilha.

Tabela 4 - Produção e viabilidade de conídios dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* cultivados em meios sólidos elaborados com misturas de substratos, em diversas proporções, após 15 dias de cultivo em temperatura de 25°C e ausência de iluminação

Substratos usados em maior proporção (A)	Produção (nº de conídios x10 ⁷ g ⁻¹)		Viabilidade (%)	
	JAB 02	JAB 45	JAB 02	JAB 45
Trigo grosso	1,42 A	3,07 B	99,18 A	99,51 A
Farelo de Trigo	1,36 A	4,45 A	98,99 A	98,75 B
Farelo de Soja	0,38 B	0,96 C	99,00 A	99,49 A
Teste F	100,27**	142,01**	0,95 ^{NS}	22,90**
DMS	0,1135	0,0951	0,6620	0,7236
Substratos usados em menor proporção (B)				
Trigo em grão	-	3,13 C	-	99,26 A
Painço	-	2,37 B	-	99,22 A
Sorgo	1,12 A	-	99,16 A	-
Quirela de milho	0,89 B	-	99,08 A	-
Lentilha	1,16 A	2,98 A	98,93 A	99,27 A
Teste F	27,77 **	25,48**	2,58 ^{NS}	0,58 ^{NS}
DMS	0,1135	0,0951	0,6620	0,7236
Proporções entre os substratos (C)				
100% - 0%	0,87 A	2,51 B	99,11 B	98,25 C
85% - 15%	1,34 A	3,47 AB	98,94 B	99,56 AB
70% - 30%	1,37 A	4,12 A	99,15 AB	99,50 AB
55% - 45%	1,28 A	3,06 AB	99,43 A	99,59 A
0% - 100%	0,43 B	0,98 C	98,66 C	99,35 B
Teste F	43,94 **	41,86**	14,19**	21,56**
DMS	0,1709	0,1432	0,9970	1,0898
Interações				
A x B	2,92 *	8,22**	7,53**	0,42 ^{NS}
A x C	11,09 **	9,55**	4,11**	16,80**
B x C	15,18 **	11,44**	4,03**	1,73 ^{NS}
A x B x C	3,20 **	2,23**	3,41**	0,49 ^{NS}
C.V. (%)	3,87	3,03	1,80	1,94

Médias com valores originais, mas análise estatística da produção de conídios e viabilidade realizadas com dados transformados em log (x) e arc sen x/100, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade; C.V coeficiente de variação

Tabela 5 - Desdobramento da interação substratos usados em maior proporção **versus** substratos usados em menor proporção para produção de conídios dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* em meios sólidos

Substratos em maior proporção	Produção (nº de conídios x 10 ⁷ g ⁻¹)			Teste F
	Substratos em menor proporção			
JAB 02	Sorgo	Quirela de milho	Lentilha	
Trigo Grosso	1,25 Aa	1,15 Ba	1,87 Aa	9,99**
Farelo de Trigo	1,71 Aa	1,27 Ba	1,12 ABa	5,97**
Farelo de Soja	0,40 Ab	0,27 Bb	0,48 Ab	17,65**
Teste F	34,50**	47,44**	24,18**	
JAB 45	Trigo em grão	Painço	Lentilha	
Trigo Grosso	2,74 Bb	2,69 Ba	3,78 Aa	10,25**
Farelo de Trigo	6,27 Aa	3,38 Aa	3,72 Aa	0,55 ^{NS}
Farelo de Soja	0,39 Cc	1,03 Bb	1,45 Ab	31,16**
Teste F	99,16**	33,91**	25,40**	

Médias com valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05). NS não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 6 - Produção de conídios pelo isolado JAB 02 de *Lecanicillium lecanii* em função das proporções usadas os tratamentos mais eficientes, após 15 dias de cultivo a 25°C e na ausência de iluminação.

Substratos (misturas)	Proporção	Produção de conídios (nº de conídios x 10 ⁷ g ⁻¹)
Trigo Grosso (TG) e Sorgo (S)	100% TG + 0% S	1,01 AB
	85% TG + 15% S	2,03 A
	70% TG + 30% S	1,30 A
	55% TG + 30% S	1,55 A
	0% TG + 100% S	0,39 B
Teste F		8,26**
C.V. (%)		2,84
Trigo Grosso (TG) e Lentilha (L)	100% TG + 0% L	1,01 B
	85% TG + 15% L	1,67 AB
	70% TG + 30% L	4,21 A
	55% TG + 45% L	1,60 AB
	0% TG + 100% L	0,85 B
Teste F		5,16**
C.V. (%)		4,22
Farelo de Trigo (FT) e Sorgo (S)	100% FT + 0% S	1,25 AB
	85% FT + 15% S	2,62 A
	70% FT + 30% S	1,79 A
	55% FT + 45% S	2,50 A
	0% FT + 100% S	0,39 B
Teste F		9,70**
C.V. (%)		3,14
Farelo de Trigo (FT) e Lentilha (L)	100% FT + 0% L	1,25 A
	85% FT + 15% L	1,27 A
	70% FT + 30% L	1,42 A
	55% FT + 45% L	0,82 A
	0% FT + 100% L	0,82 A
Teste F		0,90 ^{NS}
C.V. (%)		4,76

Médias com valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05). ** significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 7 - Produção de conídios pelo isolado JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* em função das proporções usadas os tratamentos mais eficientes, após 15 dias de cultivo a 25°C e na ausência de iluminação.

Substratos (misturas)	Proporção	Produção de conídios (nº de conídios x 10 ⁷ g ⁻¹)
Trigo Grosso (TG) e Lentilha (L)	100% TG + 0% L	3,28 A
	85% TG + 15% L	3,70 A
	70% TG + 30% L	4,95 A
	55% TG + 45% L	5,07 A
	0% TG + 100% L	1,91 A
Teste F		3,21*
C.V. (%)		2,65
Farelo de Trigo (FT) e Trigo em grão (Tg)	100% FT + 0% Tg	3,66 A
	85% FT + 15% Tg	9,08 A
	70% FT + 30% Tg	10,52 A
	55% FT + 45% Tg	7,70 A
	0% FT + 100% Tg	0,21 B
Teste F		24,45**
C.V. (%)		3,75
Farelo de Trigo (FT) e Painço (P)	100% FT + 0% P	3,66 AB
	85% FT + 15% P	5,62 A
	70% FT + 30% P	4,13 AB
	55% FT + 45% P	2,65 B
	0% FT + 100% P	0,82 C
Teste F		24,25**
C.V. (%)		1,76
Farelo de Trigo (FT) e Lentilha (L)	100% FT + 0% L	3,66 A
	85% FT + 15% L	3,50 A
	70% FT + 30% L	5,47 A
	55% FT + 45% L	4,81 A
	0% FT + 100% L	1,91 A
Teste F		1,66 ^{NS}
C.V. (%)		3,04

Médias com valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05). ** significativo a 1% de probabilidade.

Segundo ALVES e PEREIRA (1998), o uso de meios sólidos representa a forma mais comum de produção de fungos entomopatogênicos, uma vez que não necessita de tecnologia aprimorada e permite a produção direta de unidades infectivas. Ainda, EL DAMIR (2006) destaca que o tipo de substrato utilizado meio de cultivo representa um aspecto importante para produção massal de fungos.

Trabalhos demonstrando a produção de conídios por isolados de *L. lecanii* em meio sólido composto por arroz em grão, mostram resultados divergentes variando desde $6,8 \times 10^6$ con. g^{-1} (RIVERA et al., 1998), a $0,80$ e $2,10 \times 10^7$ con. g^{-1} (WENZEL et al., 2006) chegando até $1,5 \times 10^9$ con. g^{-1} de substrato (FENG et al., 2002). Possivelmente as diferenças verificadas sejam em consequência dos isolados utilizados, das metodologias empregadas e até mesmo da procedência dos substratos.

Apesar do arroz ainda ser o substrato mais utilizado na produção de fungos, outros grãos e seus derivados vêm sendo testados, na expectativa de otimizar o processo. Avaliando a produção de *M. anisopliae*, DORTA et al. (1990) verificaram que em meio contendo uma mistura de farelo e casca de arroz, o fungo produziu de 5 a 15 vezes mais conídios do que em meio contendo apenas arroz. PUZARI et al. (1997), obtiveram o rendimento de $3,93 \times 10^8$ conídios mL^{-1} de água usada para avaliar a produção de *B. bassiana* em meio contendo uma mistura de casca de arroz, serragem e arroz, na razão de 75:21:100. É possível que em meios preparados a partir da combinação de diferentes substratos, possa haver uma complementação de nutrientes exigidos pelos fungos e maior espaço inter-partículas permitindo maior aeração.

PENARIOL (2006) avaliou diferentes substratos sólidos para produção de *B. euphorbiae* obtendo melhores resultados em meios contendo casca de soja ($4,72 \times 10^8$ con. g^{-1}) e sorgo em grão ($4,74 \times 10^8$ con g^{-1}). Para os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, substratos como quirela de milho, trigo em grão e painço, em diferentes volumes de água, proporcionaram, de modo geral, grande

produção de conídios (EL DAMIR, 2006). Avaliando a influência de diferentes substratos naturais sólidos na esporulação de isolados de ***B. bassiana*** e ***P. fumosoroseus***, IBRAHIM e LOW (1993) verificaram que os melhores resultados foram obtidos nos meios a base de farinha de tapioca e batata doce.

Na busca de substratos alternativos, WENZEL et al. (2006) obtiveram resultados satisfatórios para a produção de conídios de ***L. lecanii*** utilizando trigo moído e farelos de trigo e de soja. No presente trabalho, a mistura destes substratos com lentilha, sorgo, trigo em grão e painço em diferentes proporções, não ocasionou um incremento na produção de conídios, quando comparada com a produção obtida no trabalho de WENZEL et al. (2006). Entretanto, a viabilidade dos conídios produzidos pelos isolados JAB 02 e JAB 45, cultivados nos substratos em mistura, sofreu um incremento médio de 21,94 e 23,30%, respectivamente, quando comparada com o obtido por estes autores.

Do ponto de vista de uma produção comercial para utilização no controle biológico, a produção abundante de conídios e viabilidade destes são aspectos importantes a serem considerados na seleção dos meios. Possivelmente tais misturas entre substratos proporcionaram uma composição de nutrientes qualitativa e quantitativamente melhor equilibrada para permitir a conidiogênese.

4- CONCLUSÕES

1. Entre os meios líquidos, água da prensa da mandioca, soro de queijo, melaço de cana-de-açúcar e milhocina[®] foram os substratos que proporcionaram maior produção de conídios e biomassa para ***L. lecanii***.
2. A concentração dos substratos usada para elaborar os meios líquidos influenciou a produção de conídios e biomassa do fungo.

3. Os meios sólidos foram mais eficientes do que os meios líquidos para a produção de conídios pelos isolados JAB 02 e JAB 45 de ***L. lecanii***.

4. A mistura entre os substratos sólidos não proporcionou um incremento na produção de conídios, mas favoreceu a viabilidade destes.

5- REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. ALVES, S.B.(Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: Esalq, 1998 p 289-382

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B.(Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Esalq, 1998 p. 845-869.

BARBOSA, C. C; MONTEIRO A. C.; CORREIA, A. C. B.;PEREIRA, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de ***Verticillium lecanii*** sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 821-829, 2002.

DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, J.A.; ERTOLA, R.J. High level of sporulation of ***Metarhizium anisopliae*** in a medium containing by products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, 33 (6), p.712-715, 1990.

EL DAMIR, M. Effect of growing media and water volume on conidial production of ***Beauveria bassiana*** and ***Metarhizium anisopliae***. **Journal of Biological Sciences**, Bombay, v. 6, n. 2, p.269-274, 2006.

FENG, K.C.; LIU, B.L.; TZENG, Y.M. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. **Bioprocess Engineering**, Heidelberg, v. 23, n. 1, p.25-29, 2000.

FENG, K.C.; LIU, B.L.; TZENG, Y.M. Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 18, n. 3, p.217-224, 2002.

GRAJEK, W. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. **Folia Microbiologica**, Prague, v.39, n.1, p.29-32, 1994.

HALL, R. A. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: BURGESS, H. D. (Ed.) **Microbial control of pests and plant diseases 1970- 1980**. London: Academic Press, 1981. p.483–498.

IBRAHIM, Y.B.; LOW, W. Potencial of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. **International Journal of Pest Management**, London, v. 39, n. 3, p.288-292, 1993

JENKINS, N.E.; GOETTEL, M.S. Methods for mass-production of microbial control agents for grasshoppers and locusts. In: GOETTEL, M.S; JOHNSON, L (Eds.). **Microbial control of grasshoppers and locusts**, Ottawa (Memoris of the Entomological Society of Canada), 1997, p.37-48.

LECUONA, R.E.; RIBA, G. Primeras etapas del ciclo de desarrollo de hongos entomopatógenos. **Boletín de Divulgación Tecnológica**, Buenos Aires, v. 87, p. 1-30, 1991.

MARQUES, R.P.; MONTEIRO, A.C; PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.6, p.1675-1680, 2004.

MONTEIRO, A. C.; BARBOSA, C. C.; CORREIA, A. C. B.; PEREIRA, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 6, p. 561-565, 2004.

NELSON, T.L.; LOW, L.; GLARE, T.R. Large scale production of New Zealand strain of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium sp*. In: 49th Conference Proceeding. The New Zealand Plant Protection Society Incorporated, p.257-261, 1996.

OLIVEIRA, S.M.C. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos**. 2000. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle biológico: terminologia. In:_____. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p.1- 16.

PENARIOL, M. C. **Requisitos nutricionais e produção massal de *Bipolaris euphorbiae***. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de

Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

PEREIRA, S.R.M.; EIRA, A.F. Metodologia para produção de ***Metarhizium anisopliae*** (Metsch.) Sorokin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.389-394, 1999.

PUZARI, K.C., SARMAH, D.K.; HAZARIKA, L.K. Medium for mass production of ***Beauveria bassiana*** (Balsamo) Vuillemin. **Journal of Biological Control**, Coimbatore, v. 11, n. 1-2, p.97-100, 1997.

RIVERA, F.; VALDÉS, M.; MIER, T. Estudio preliminar sobre la obtención y conservación de propágulos de ***Verticillium lecanii*** (Zimmermann) Viégas. **Revista Mexicana de Micología**, México, v. 14, p. 33-36, 1998

ROBERTS, D. W.; HUMBER, R. A. Entomogenous fungi. In: COLE, G.T & KENDRICK, B (Eds.) **Biology of conidial fungi**. New York: Academic Press, 1981. v. 2, p.201-236.

WENZEL, I.M.; ALMEIDA, J.E.M.; CARDOSO, E.R. Efeito de diferentes concentrações de dextrose e extrato de levedura no desenvolvimento do fungo entomopatogênico ***Lecanicillium lecanii*** em fermentação líquida. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.127-131, jan./mar., 2005.

WENZEL, I.M., MONTEIRO, A.C., PEREIRA, G.T. Produção de conídios de ***Lecanicillium lecanii*** em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.7-17, 2006.

CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE *Lecanicillium lecanii* PELO SISTEMA BIFÁSICO DE CULTIVO.

RESUMO – O sistema bifásico vem se mostrando como um método bastante interessante para a produção de fungos, uma vez que combina os benefícios da grande produção de biomassa em meios líquidos com a efetiva esporulação nos meios sólidos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar combinações de meios líquidos obtidos de resíduos e subprodutos agroindustriais, com meios sólidos obtidos de misturas de grãos e derivados, para a produção dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* pelo sistema bifásico. A escolha dos meios líquidos e sólidos foi feita com base em resultados de investigação anterior. Como meios líquidos foram usados água da prensa da mandioca, soro de queijo e milhocina® para ambos os isolados e ainda melaço de cana-de-açúcar para JAB 02. Os meios sólidos foram compostos por misturas de trigo grosso e de farelo de trigo com lentilha e com sorgo para JAB 02 e de farelo de trigo com painço, com lentilha e com trigo em grão, além de trigo grosso e lentilha para o isolado JAB 45. Avaliou-se a esporulação, a viabilidade de conídios e o rendimento do processo de produção. Além disso, foi feita uma análise de custos visando a produção em larga escala do isolado JAB 45, considerando os meios que proporcionaram melhores resultados. O cultivo do fungo em sistema bifásico não promoveu um aumento significativo na produção de conídios pelo isolado JAB 02 mantendo-se da ordem de 10^7 con. g substrato⁻¹. Entre os meios testados, farelo de trigo com lentilha (70:30%), combinado com água da prensa da mandioca, proporcionou o melhor resultado para este isolado ($3,58 \times 10^7$ con. g substrato⁻¹). Para JAB 45, algumas combinações bifásicas proporcionaram um incremento significativo na produção de conídios. Destacou-se a combinação de soro de queijo com farelo de trigo e trigo em grão (70:30%), no qual a produção foi de $1,45 \times 10^9$ con g⁻¹ substrato, além de apresentar um menor custo final (R\$

10,12/Kg). A viabilidade, para ambos os isolados, não foi influenciada pelo método de produção e o rendimento do processo não acusou diferenças expressivas entre os meios, especialmente para JAB 02. O método bifásico mostrou-se adequado à produção de ***L. lecanii*** sendo indicado como uma tecnologia promissora a ser utilizada por biofábricas para a produção deste entomopatógeno, com vistas a sua utilização em campo.

Palavras-chave: sistema bifásico, fungos entomopatogênicos, produção massal.

CHAPTER 3 - PRODUCTION OF *Lecanicillium lecanii* BY TWO-PHASE SYSTEM

ABSTRACT – The two-phase system has demonstrated to be quite interesting method for fungi production, once that it combines the benefits of a high biomass production in liquid media and the effective sporulation in solid media. The present work had the objective of evaluating the combinations of liquid media obtained from agroindustrial residuals and byproducts, with solid media obtained from mixtures of grains and its derivatives, for the production of the isolates JAB 02 and JAB 45 of *Lecanicillium lecanii*, by a two-phase system. The choice of the liquid and solid media was done based in the results of the previous investigation. The liquid media, for both isolates, were prepared from water from cassava bran, cheese whey and milhocina®, and just for the isolate JAB 02, from sugar cane molasses. The solid media was composed, for the isolate JAB 02, by the mixtures of ground wheat and wheat bran with lentil and with sorghum, and for the isolate JAB 45, by the combination of wheat bran with Italian millet, with lentil and with wheat grain, and ground wheat with lentil. Sporulation, conidia viability and the income of the process was evaluated. Furthermore, was done an economic analysis of a large scale production process for the isolate JAB 45, considering the media that proportionated better results. The fungi production on the two-phase system did not influence a higher production of conidia for the isolate JAB 02, maintaining it self in order of 10^7 con g^{-1} substrate. Within the tested media, wheat bran with lentil (70:30%) combined with cassava bran proportionated the best results for this isolate ($3,58 \times 10^7$ con g^{-1} substrate). For JAB 45, some of the two-phase combination proportionated a significant increase of conidia production. The combination of cheese whey with wheat bran and wheat grain (70:30%) was emphasized, with a conidia production of $1,45 \times 10^9$ con g^{-1} substrate and a lower final product cost (R\$ 10,12/kg). The viability for both isolates was not influenced

by the production method and the income of the process did not show significant differences between the media, specially for JAB 02. The two-phase system showed it self adequate for the production of ***L. lecanii***, being indicated as a promising technology in biofactories, for the production of this entomopathogenic fungus and further filed application.

Key-words: two-phase system, entomopathogenic fungi, massive production.

1. INTRODUÇÃO

O controle microbiano vem sendo considerado uma importante ferramenta do Manejo Integrado de Pragas (MIP) e representa uma estratégia ecologicamente favorável em comparação com o controle químico convencional (FLORIDO et al., 2002). Dentro desta abordagem, os fungos entomopatogênicos têm despertado a atenção como agentes de biocontrole, reduzindo populações de insetos-praga e, conseqüentemente, os prejuízos causados nos diferentes agrossistemas (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; INGLIS, et al., 2001)

Segundo LECUONA & RIBA (1991), o fungo ***Lecanicillium lecanii*** [= ***Verticillium lecanii***] é considerado um dos mais promissores agentes no biocontrole de pragas agrícolas, sendo capaz de causar doenças em diversas espécies de insetos, como pulgões, cochonilhas, tripes, mosca branca, entre outros (WENZEL et al. 2006), além de ácaros e fungos fitopatogênicos (HALL, 1981).

A possibilidade de utilização de fungos no controle de importantes pragas agrícolas depende de inúmeros fatores, incluindo a capacidade de produção de alta concentração de propágulos estáveis a custos razoáveis (JARONSKI, 1986; LATGÉ, et al., 1986). Sistemas de produção industrial de alguns fungos entomopatogênicos e outros sistemas que dispõem de tecnologia aprimorada utilizam o método bifásico no qual o inóculo do fungo (micélio ou corpos hifais) é produzido em cultura líquida, e posteriormente transferido para substratos sólidos visando incrementar a produção de conídios (GUILLON, 1997).

As vantagens do sistema bifásico de produção, que utiliza meios líquidos adequados para produção do inóculo, são: a cultura líquida pode atuar como barreira para contaminações que poderiam estar presentes na cultura estoque original; maior competitividade do fungo, reduzindo assim riscos de colonização do substrato sólido por microrganismos contaminantes; assegura a colonização

uniforme do substrato sólido, resultando num crescimento homogêneo do fungo e por fim, a colonização e produção de conídios são mais rápidas, reduzindo o tempo de incubação e economizando espaço físico (JENKINS et al., 1998).

Apesar do grande número de trabalhos envolvendo a produção de fungos entomopatogênicos, a maioria enfoca a produção direta em meios sólidos, sendo poucos os trabalhos que tratam do sistema bifásico de cultivo. ACEVEDO et al. (1995) avaliaram a produção de *Hirsutella thompsonii* e *H. nodulosa* para o controle de algumas espécies de ácaros. Extrato de farinha de soja suplementada com dextrose foi utilizado como meio líquido de cultivo e arroz, quirela de milho, cevada, sorgo, aveia, trigo e fibra de coco, como substratos sólidos, proporcionando produção da ordem de 10^9 conídios g^{-1} de substrato. Para a produção de *Paecilomyces fumosoroseus* e *P. farinosus*, MASCARIN & ALVES (2005), avaliaram substratos líquidos naturais e substratos sólidos de origem vegetal, atingindo produção máxima de 2×10^7 con. g substrato $^{-1}$ para ambos os isolados. SANTORO, et al (2005), avaliando a produção de *Beauveria bassiana* pelo sistema bifásico, obtiveram produção de conídios da ordem de 10^{12} con. g^{-1} substrato utilizando diferentes substratos líquidos sintéticos para a produção de biomassa e arroz como substrato sólido.

Lecanicillium lecanii é um potencial agente de controle de pragas agrícolas. Entretanto para viabilizar o uso deste entomopatógeno em programas de controle biológico de pragas em campo, é necessário obter a produção de grandes quantidades de conídios do fungo. Apesar do potencial de uso, não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando a produção deste fungo combinando o uso de meios líquidos e sólidos. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo, avaliar a produção de *L. lecanii* pelo sistema bifásico de cultivo, utilizando como meios líquidos, resíduos ou subprodutos da agroindústria e meios sólidos obtidos de composições entre grãos e derivados, na expectativa de obter um incremento na produção deste entomopatógeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungo

Foram utilizados os isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii*, escolhidos baseando-se em estudos prévios de caracterização fisiológica e de produção. Os isolados de *L. lecanii*, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/Unesp, Jaboticabal, SP foram originalmente obtidos da cochonilha verde *Coccus viridis* Green (Hemiptera: Coccidae) coletados em pomares de laranja nos municípios de Ubirajara e São Carlos, SP, respectivamente (BARBOSA et al., 2002).

Os isolados permaneceram estocados em tubos de ensaio contendo meio de batata, dextrose e ágar (BDA) e acondicionados a 4°C em geladeira. Para utilização nos ensaios foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, incubados em estufa a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 15 dias, com ausência de iluminação.

2.2 Meios líquidos e sólidos utilizados para combinação bifásica

A determinação dos meios líquidos e sólidos utilizados para a produção de *L. lecanii* pelo sistema bifásico de cultivo, foi realizada baseando-se em investigações anteriores, considerando-se os meios que proporcionaram melhores resultados (Capítulo 2).

Para JAB 02, os meios líquidos utilizados foram: 85% de água da prensa da mandioca, 5,5% de melaço de cana-de-açúcar, 4,0% de milhocina[®] e 100% de soro obtido da fabricação de queijo fresco e os meios sólidos foram os compostos misturas de trigo grosso e sorgo (85:15%), trigo grosso e lentilha (70:30%), farelo de trigo e sorgo (85:15%) e farelo de trigo e lentilha (70:30%).

Água da prensa da mandioca, milhocina[®] e soro de queijo, nas concentrações de 100%, 4,0% e 85%, respectivamente, foram os meios líquidos usados para o cultivo do isolado JAB 45 de *L. lecanii* e os meios sólidos foram

misturas de farelo de trigo e lentilha (70:30%), farelo de trigo e painço (85:15%), farelo de trigo e trigo em grão (70:30%) e trigo grosso e lentilha (55:45%).

No cultivo bifásico combinou-se cada um dos meios líquidos com cada meio sólido, compondo 16 tratamentos para o isolado JAB 02 e 12 tratamentos para o isolado JAB 45.

2.3 Preparo dos meios líquidos e sólidos

As concentrações dos meios líquidos foram obtidas pela diluição dos substratos em água destilada e ainda, ao meio composto por 4,0% de milhocina[®] foi adicionado 1% de dextrose.

Em ambos os ensaios, o pH dos meios foi ajustado para 6,5 (MONTEIRO et. al, 2004) utilizando soluções de NaOH (3N) ou HCl (1N) e adicionado 250 mg L⁻¹ de cloranfenicol para evitar a contaminação bacteriana. Os meios, em quantidades de 100 mL, foram distribuídos em erlenmeyers com capacidade para 250 mL, vedados e autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1Kgf cm⁻².

Os substratos sólidos foram preparados separadamente segundo metodologia descrita por PENARIOL (2006). Trigo grosso, farelo de trigo e farelo de soja foram embebidos em água destilada na proporção de 3:1 (v p⁻¹), durante 15 minutos. Os grãos de sorgo, lentilha, painço e trigo foram cozidos em água destilada fervente (3:1, v p⁻¹) por 5 minutos em fogo brando. Em seguida, todos os substratos foram coados para remoção do excesso de água, e preparadas as devidas misturas, em peso úmido (g g⁻¹). Os meios sólidos foram colocados em sacos de polipropileno nas quantidades de 100 g para os tratamentos que continham farelo de trigo como substrato em maior proporção e 200 g para os tratamentos que continham trigo grosso. A definição das quantidades utilizadas foi baseada nas características dos substratos, de modo que a mistura entre estes ocupasse um volume de 50% dos sacos de polipropileno. Após a pesagem das

misturas, os sacos foram vedados e autoclavados durante 50 minutos a 121°C e 1 Kgf cm⁻².

2.4 Inoculação e cultivo no sistema bifásico

Após a autoclavação e resfriamento dos meios líquidos, foram inoculados 3 discos de 8 mm de diâmetro retirados de colônias jovens do fungo crescidas em BDA. Os erlenmeyers foram mantidos em estufa a 25°C ± 0,5°C por 7 dias na ausência de iluminação, quando então a massa micelial formada e os conídios produzidos, foram utilizados como inóculo para os meios sólidos.

Em câmara asséptica, a massa micelial, juntamente com o meio líquido, foi transferida para um béquer com capacidade de 250 mL e triturada, com auxílio de um **mixer** vertical SB 40 marca Black & Decker®, por 5 segundos para desagregação do micélio. O material foi coado em peneira com malha de 1 mm, de modo a padronizar o tamanho dos fragmentos de micélio. Tanto o **mixer** quanto a peneira foram desinfetados em álcool 96 GL. Esta suspensão foi então utilizada para inocular os meios sólidos.

Com auxílio de uma tesoura esterilizada, em câmara de fluxo laminar, foi feito um corte de aproximadamente 3 cm em uma das extremidades dos sacos de polipropileno contendo os meios sólidos, por onde foram inoculados, com pipetador automático, 3 mL da suspensão obtida do cultivo em meios líquidos descrita anteriormente. A extremidade cortada foi vedada e em seguida os sacos de polipropileno foram acondicionados em estufa a 25°C ± 0,5°C por 15 dias e na ausência de iluminação, quando então foram avaliadas a produção e viabilidade de conídios, e o rendimento de processo.

2.5 Avaliação

Após o período determinado de incubação, foram coletadas, aleatoriamente, do saco de polipropileno, 10 amostras do substrato com o fungo

crescido de modo a totalizar 1 g. O material foi suspenso em 9 mL de uma mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89% p v⁻¹) e solução de Tween 80[®] (0,1% v v⁻¹), sendo vigorosamente agitado em agitador elétrico de tubos, para liberação dos conídios, e coado em tecido **voile** para remoção da parte sólida. A partir das suspensões preparadas foram determinados o número de conídios produzidos, com auxílio de câmara de Neubauer e a viabilidade destes, segundo metodologia descrita por MARQUES et al. (2004).

Para avaliação do rendimento do processo, foram coletadas de diferentes pontos do saco de polipropileno, 5 amostras do substrato com o fungo crescido de modo a totalizar 10 g. Este material foi suspenso em 50 mL de solução Tween-salina (1:1) contida em erlenmeyers com capacidade de 125 mL, agitados manualmente e mantidos em repouso por 24 horas. Após o período determinado, o material foi novamente agitado e coado em peneira com malha de 1 mm. A parte sólida retida foi levada para secagem em estufa a 60°C até peso constante, determinado em balança analítica e a suspensão líquida foi centrifugada a 3.000 rpm durante 6 minutos e em seguida desprezado, cuidadosamente, o sobrenadante. A massa de conídios retida no fundo do tubo da centrífuga também foi levada à estufa a 60°C, até a obtenção de peso constante, quando então foi determinada, em porcentagem, a relação entre a massa seca de conídios e a matéria seca do substrato.

Para execução das análises foi utilizado o programa ESTAT- Sistema para Análise Estatística – versão 2.0. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado e os dados, obtidos através de quatro repetições, foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

2.6 Análise Econômica

Baseando-se nos meios que proporcionaram os melhores resultados para a produção dos isolados de *L. lecanii*, foi feita uma análise econômica simulando a produção de 50 kg/dia de um produto não formulado à base do isolado JAB 45 por uma biofábrica de pequeno porte, considerando 22 dias úteis por mês. A estrutura do custo de produção utilizada foi o do custo operacional proposta por MATSUNAGA (1976) e usado pelo Instituto de Economia Agrícola - IEA. Esta estrutura leva em consideração os desembolsos efetivos com mão-de-obra e matéria-prima utilizadas para compor os meios de cultura, além de despesas administrativas (telefone, energia, aluguel, entre outros) (Anexos 1 e 2 do Apêndice). Além do custo operacional efetivo, considerou-se o valor da depreciação dos equipamentos e materiais de laboratório adquiridos (Anexo 3 do Apêndice). Essa depreciação foi calculada com base no método linear, em que o bem adquirido é desvalorizado durante sua vida útil a uma cota constante. O imposto considerado foi o simples nacional (5,97%) e as taxas municipais e da vigilância sanitária.

Apenas o parâmetro matéria-prima sofreu alteração, uma vez que utilizou-se os meios que proporcionaram os melhores resultados na combinação bifásica para o isolado JAB 45. Os meios líquidos não foram incluídos na análise uma vez que são considerados resíduos e subprodutos da agroindústria e foram utilizados em pequenas quantidades comparativamente aos meios sólidos.

Assim, o custo operacional de produção foi composto por todos os itens variáveis mais a depreciação da estrutura de produção. Sendo a produção mensal da biofábrica em questão de 1.100 kg de produto (meio + fungo)/mês, o custo operacional total médio (R\$/kg) para produção do entomopatógeno é o resultado da divisão do custo operacional total pela produção mensal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o ensaio realizado com os meios considerados mais favoráveis à produção de *L. lecanii* determinados em ensaios anteriores (capítulo 2), o sistema bifásico de cultivo não influenciou a produção de conídios pelo isolado JAB 02 de *L. lecanii*, não havendo diferença significativa entre as combinações testadas (Tabela 1). As combinações do meio feito à base de água da prensa da mandioca, com os meios sólidos preparados a partir de trigo grosso e farelo de trigo, como substratos em maior proporção, resultaram nos maiores valores numéricos para este parâmetro. Valores expressivos também foram obtidos nas combinações de melaço com farelo de trigo e lentilha, e de soro de queijo com trigo grosso com sorgo e com lentilha. Entre estes meios, pode-se destacar a mistura de farelo de trigo com lentilha (70:30%) cuja produção de conídios, por este isolado, foi 2,48 vezes maior do que a obtida na produção sólida direta neste mesmo meio ($1,42 \times 10^7$ con. g substrato⁻¹) (Capítulo 2).

A análise de variância para a viabilidade dos conídios produzidos pelo isolado JAB 02 e para o rendimento do processo bifásico de produção foi significativa (Tabela 1). Entretanto, para a viabilidade verificou-se diferença estatística apenas quando se comparou a combinação de melaço com trigo grosso e sorgo, com as combinações deste mesmo meio sólido com soro de queijo e água da prensa da mandioca. Apesar da análise indicar diferença entre os tratamentos, do ponto de vista do controle de qualidade da produção de fungos, a porcentagem de conídios viáveis produzidos na combinação entre melaço com trigo grosso e sorgo é considerada plenamente satisfatória (97,53%). Para o rendimento do processo, verificou-se diferença estatística apenas entre a combinação de melaço com trigo grosso e lentilha com as combinações de melaço com farelo de trigo e sorgo e de milhocina com trigo grosso e sorgo.

Tabela 1 - Produção de conídios, viabilidade e rendimento do processo bifásico obtidos para o isolado JAB 02 de *Lecanicillium lecanii*, após 7 dias de cultivo nos meios líquidos e 15 nos meios sólidos, a 25°C e na ausência de iluminação.

Combinações bifásicas (meio líquido/meio sólido)	Produção de conídios (x 10 ⁷ g substrato ⁻¹)	Viabilidade (%)	Rendimento ¹ (%)
Melaço (5,5%) / Trigo grosso + Sorgo (85:15%)	0,77 A	97,53 B	1,42 AB
Melaço (5,5%) / Trigo grosso + Lentilha (70:30%)	0,71 A	99,28 AB	2,99 A
Melaço (5,5%) / Farelo de trigo + Sorgo (85:15%)	0,40 A	97,58 AB	0,46 B
Melaço (5,5%) / Farelo de trigo + Lentilha (70:30%)	1,29 A	99,11 AB	0,89 AB
Milhocina® (4,0%) / Trigo grosso + Sorgo (85:15%)	1,41 A	99,25 AB	0,40 B
Milhocina® (4,0%) / Trigo grosso + Lentilha (70:30%)	0,66 A	98,66 AB	1,97 AB
Milhocina® (4,0%) / Farelo de trigo + Sorgo (85:15%)	0,27 A	99,33 AB	1,17 AB
Milhocina® (4,0%) / Farelo de trigo + Lentilha (70:30%)	0,31 A	99,36 AB	0,75 AB
Soro de queijo (100%) / Trigo grosso + Sorgo (85:15%)	2,01 A	99,61 A	1,08 AB
Soro de queijo (100%) / Trigo grosso + Lentilha (70:30%)	1,13 A	99,39 AB	2,02 AB
Soro de queijo (100%) / Farelo de trigo + Sorgo (85:15%)	0,98 A	99,69 AB	0,52 AB
Soro de queijo (100%) / Farelo de trigo + Lentilha (70:30%)	0,25 A	99,64 AB	0,67 AB
Água da prensa da mandioca (85%) / Trigo grosso + Sorgo (85:15%)	1,16 A	99,78 A	0,63 AB
Água da prensa da mandioca (85%) / Trigo grosso + Lentilha (70:30%)	2,39 A	99,58 AB	1,14 AB
Água da prensa da mandioca (85%) / Farelo de trigo + Sorgo (85:15%)	1,26 A	99,39 AB	0,72 AB
Água da prensa da mandioca (85%) / Farelo de trigo + Lentilha (70:30%)	3,58 A	99,67 AB	1,24 AB
Teste F	1,49 ^{NS}	2,59**	2,03*
DMS	1,2135	5,8097	0,1551
C.V. (%)	7,01	2,66	7,77

¹ Obtido pela porcentagem entre matéria seca do substrato e matéria seca de conídios. Médias em valores originais, mas análise estatística da produção de conídios, viabilidade e rendimento realizada com dados transformados em log (x), arc sen x/100 e log x + 1, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade; ; DMS diferença mínima significativa; C.V coeficiente de variação

O sistema bifásico de cultivo propiciou, em algumas combinações, um incremento na produção de conídios do isolado JAB 45, sendo da ordem de 10^9 con. g substrato⁻¹ (Tabela 2), comparando-se ao cultivo direto (Capítulo 2) em que as produções foram da ordem de 10^8 con. g substrato⁻¹. Verificou-se que os melhores resultados foram obtidos nas combinações de soro de queijo (85%) com os meios contendo farelo de trigo, como substrato em maior proporção. Entre estes meios, a combinação com farelo de trigo e trigo em grão (70:30%) pode ser destacada como a mais favorável, pois, apesar de não ter diferido estatisticamente das demais, proporcionou uma produção de conídios 1,9 e 2,4 vezes maior do que a obtida nas misturas com lentilha (70:30%) e painço (85:15%), respectivamente. Além destes meios, a combinação de milhocina® (4,0%) com trigo grosso e lentilha (55:45%) também apresentou resultado satisfatório para este parâmetro, não diferindo significativamente das combinações anteriores.

As combinações tendo milhocina® e água da prensa da mandioca como meios líquidos apresentaram, na maioria dos casos, uma menor produção de conídios do que as obtidas com soro de queijo. O menor tempo de incubação nos meios líquidos no presente ensaio (7 dias), pode não ter sido suficiente para o fungo produzir, nos dois primeiros meios, biomassa ou estrutura de reprodução em quantidade adequada para colonizar rapidamente o meio sólido e promover a esporulação. No entanto, este aspecto precisa ser investigado.

Tabela 2 – Produção de conídios, viabilidade e rendimento do processo bifásico obtidos para o isolado JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* após 7 dias de cultivo nos meios líquidos e 15 nos meios sólidos, a 25°C e na ausência de iluminação.

Combinações bifásicas (meio líquido/meio sólido)	Produção de conídios	Viabilidade	Rendimento ¹
	(x 10 ⁸ g substrato ⁻¹)	(%)	(%)
Soro de queijo (85%) / Farelo de trigo + Lentilha (70:30%)	7,66 AB	99,36 A	1,74 BC
Soro de queijo (85%) / Farelo de trigo + Painço (85:15%)	5,94 AB	98,06 A	2,16 BC
Soro de queijo (85%) / Farelo de trigo + Trigo em grão (70:30%)	14,50 A	98,61 A	1,46 C
Soro de queijo (85%) / Trigo grosso + Lentilha (55:45%)	0,26 EF	98,86 A	2,44 ABC
Milhocina [®] (4,0%) / Farelo de trigo + Lentilha (70:30%)	0,17 EF	98,00 A	1,00 C
Milhocina [®] (4,0%) / Farelo de trigo + Painço (85:15%)	0,02 F	99,17 A	0,49 C
Milhocina [®] (4,0%) / Farelo de trigo + Trigo em grão (70:30%)	0,02 F	98,08 A	0,47 C
Milhocina [®] (4,0%) / Trigo grosso + Lentilha (55:45%)	3,26 ABC	98,92 A	7,20 A
Água da prensa da mandioca (100%) / Farelo de trigo + Lentilha (70:30%)	0,37 CDE	97,75 A	0,57 C
Água da prensa da mandioca (100%) / Farelo de trigo + Painço (85:15%)	0,25 DE	99,31 A	0,87 C
Água da prensa da mandioca (100%) / Farelo de trigo + Trigo em grão (70:30%)	1,56 BCD	98,78 A	0,70 C
Água da prensa da mandioca (100%) / Trigo grosso + Lentilha (55:45%)	0,07 EF	98,61 A	6,42 AB
Teste F	28,82**	0,86 ^{NS}	6,78**
DMS	0,9582	7,0684	0,2102
C.V. (%)	5,13	3,42	10,26

¹ Obtido pela porcentagem entre matéria seca do substrato e matéria seca de conídios

Médias em valores originais, mas análise estatística da produção de conídios, viabilidade e rendimento realizadas com dados transformados em log (x), arc sen x/100 e log x + 1, respectivamente. Medias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade; C.V coeficiente de variação

A análise de variância da viabilidade dos conídios do isolado JAB 45 não foi significativa (Tabela 2), indicando que a produção bifásica, assim como no cultivo direto em meios sólidos (Capítulo 2), não influenciou este parâmetro, mantendo-se maior que 97% para todos os tratamentos.

O meio preparado a partir de trigo grosso e lentilha, independente do meio líquido utilizado como inóculo, proporcionou os melhores resultados quanto ao rendimento do processo de produção (Tabela 2), apesar de ter favorecido a esporulação do isolado JAB 45 apenas quando combinado com milhocina®. Possivelmente, a agitação vigorosa do meio e as 24 horas de repouso, combinados com a estrutura física destes substratos, permitiram a liberação de componentes que, após a centrifugação, foram depositados juntamente com os conídios e não puderam ser removidos com a metodologia usada. A combinação de soro de queijo com farelo de trigo e trigo em grão (70:30%), embora tenha favorecido a esporulação do isolado JAB 45 resultou em um rendimento menor do que o obtido nas outras combinações deste meio líquido com farelo de trigo.

De acordo com LOMER & LOMER (2008), a estrutura do substrato pode ser tão importante quanto os nutrientes disponíveis. Segundo os autores, um substrato ideal deverá fornecer uma alta relação entre área superficial e volume, em que as partículas individuais permaneçam separadas de modo a formar espaço inter-partículas para aeração e formação de conídios.

Os meios sólidos à base de farelo de trigo e trigo grosso misturados com sorgo e lentilha ou ainda com painço e trigo em grão, que se mostraram mais adequados para a produção dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *L. lecanii*, provavelmente responderam bem a este requisito, devido a sua textura. Além disso, são substratos ricos em nutrientes e a disponibilidade destes também nos meios líquidos, certamente contribuíram para o incremento da produção de conídios obtida, especialmente, pelo isolado JAB 45.

Por meio da análise econômica (Tabela 3), considerando os meios que proporcionaram melhores resultados para a produção do isolado JAB 45, foi possível verificar que o custo de produção do fungo utilizando o meio composto por farelo de trigo (70%) e trigo em grão (30%) (R\$ 10,12), foi o menor entre todos os analisados, além de proporcionar maior produção de conídios por grama de

substrato. Estimando uma margem de lucro de 60% sobre a venda deste produto, o valor final seria de R\$ 16,29, valor este que o torna acessível ao produtor rural e condizente com alguns produtos biológicos disponíveis no mercado. Este é um aspecto importante a ser considerado, pois a disponibilidade de produtos de qualidade a preços competitivos de mercado, é um dos requisitos essenciais para a efetiva implementação do controle biológico com fungos entomopatogênicos na agricultura brasileira.

Tabela 3- Custo de produção de um bioinseticida à base do isolado JAB 45 de *Lecanicillium lecanii*, utilizando as combinações bifásicas mais favoráveis¹.

CUSTO OPERACIONAL	Meios de cultura sólidos ²			
	FT + Tg (70:30%) (R\$/mês)	FT + L (70:30%) (R\$/mês)	FT + P (85:15%) (R\$/mês)	TG + L (55:45%) (R\$/mês)
Matéria prima	935	1.826	1.199	2.794
Mão de obra contratada	5.250	5.250	5.250	5.250
Despesas gerais	3.875	3.875	3.875	3.875
Taxas e impostos	877,40	877,40	877,40	877,40
Custo Operacional Efetivo (R\$/mês)	10.937	11.828	11.201	12.796
Depreciação	198,95	198,95	198,95	198,95
Produção (Kg/mês)	1.100	1.100	1.100	1.100
Custo Operacional Total (R\$/mês)	11.136	12.027	11.400	12.995
Custo Operacional Médio (R\$/kg)	10,12	10,93	10,36	11,81
Preço de venda (COT + 60% de margem de lucro)	16,20	17,49	16,58	18,90
Quantidade de conídios/grama da substrato	14,50 x 10 ⁸	7,66 x 10 ⁸	5,64 x 10 ⁸	3,26 x 10 ⁸

¹ Considerando a produção de 1.100 kg/mês

² Meios sólidos contendo farelo de trigo foram combinados no sistema bifásico com soro de queijo e o meio contendo trigo grosso foi combinado com milhocina®

FT farelo de trigo; Tg trigo em grão; L lentilha; P painço e TG trigo grosso

Apesar do sistema bifásico de cultivo apresentar-se como uma técnica bastante vantajosa para a produção de fungos, poucos trabalhos encontrados na literatura abordaram este método de produção.

SANTORO et al (2005) avaliaram a produção de conídios de ***B. bassiana*** pelo cultivo bifásico utilizando como meios líquidos a farinha de crisálida (FC), batata e dextrose (BD) e a combinação destes substratos (FCBD), como inóculo para o meio sólido feito a partir de arroz. Os maiores valores para esporulação foram obtidos nas combinações entre os meios líquidos FC e FCBD com arroz, atingindo produção de $2,8$ e $2,7 \times 10^{12}$ con. g substrato⁻¹, respectivamente. Os autores concluíram que a fonte nutricional disponível nos meios líquidos influenciou a produção de conídios pelo fungo nos meios sólidos e, comparado a outros trabalhos de produção direta deste fungo em meios sólidos, houve um incremento na produtividade, entre 100 e 1000 vezes, e no tempo de produção.

O método bifásico também foi avaliado para produção de ***P. fumosoroseus*** e ***P. farinosus*** por MASCARIN e ALVES (2005). As combinações que proporcionaram melhores resultados quanto à produção de conídios foram entre o meio líquido feito com melaço + caldo de arroz e os meios sólidos quirela de milho e farelo de soja para ***P. farinosus*** e arroz inteiro para ***P. fumosoroseus***, atingindo produção da ordem de 10^7 con. g substrato⁻¹.

KASSA et al. (2008) avaliaram a produção de ***B. bassiana*** e ***M. anisopliae*** em meio líquido contendo diferentes concentrações de soro de queijo ($12,5$, 25 , 50 , $62,5$, 75 e $87,5$ g L⁻¹), e posteriormente uma alíquota deste meio foi transferida para placas de Petri, de modo a solidificarem e promoveram a esporulação em cultura estacionária. Sob tais condições, que os autores consideraram cultivo bifásico, o aumento da concentração de soro aumentou a esporulação de ambos os fungos, entretanto a produção de conídios por ***M. anisopliae*** foi significativamente menor do que ***B. bassiana***, que produziu 8×10^7 e 9×10^7 con. mL⁻¹ nas concentrações de $62,5$ e $87,5$ g L⁻¹, respectivamente. Os autores indicaram o soro de queijo como um ingrediente efetivo para a produção de conídios destes fungos, ressaltando também o aspecto ambiental, uma vez que é um resíduo poluente quando não tratado pela indústria de produção de queijo. De

modo semelhante, os resultados obtidos no presente trabalho indicam o soro de queijo como um potencial meio para a produção de ***L. lecanii*** no sistema bifásico de cultivo.

A combinação bifásica entre o meio líquido feito com farinha de soja e dextrose e os meios sólidos a base de quirela de milho, arroz, cevada, sorgo, aveia e fibra de coco, foram avaliados para a produção de sete isolados de ***Hirsutella thompsonii*** e um de ***H. nodulosa*** (ACEVEDO et al, 1995). Os maiores valores para a produção de conídios foram obtidos no meio feito com arroz, para a maioria dos isolados testados, sendo a produção máxima de $10,9$ e $8,6 \times 10^8$ con. g substrato⁻¹ para ***H. thompsonii*** (HtM2) e ***H. nodulosa***, respectivamente. O meio a base de cevada foi favorável à produção dos isolados HtM44-81 e HtC59 de ***H. thompsonii***, proporcionando a produção de $1,4$ e $1,17 \times 10^9$ con. g substrato⁻¹, respectivamente. Comparando com trabalhos que abordam outras técnicas de produção destes fungos, os autores concluíram que o método bifásico de cultivo proporcionou um incremento na capacidade de esporulação de ***H. thompsonii*** e ***H. nodulosa***.

Os fungos e os substratos utilizados pelos vários autores são bastante diversos, o que dificulta sobremaneira a comparação dos resultados. Entretanto, é válido observar que a maioria dos autores obteve um incremento na produção de conídios pelo sistema bifásico e se referem ao mesmo como um método adequado para promover a produção de fungos.

Não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo a produção de ***L. lecanii*** em sistema bifásico. Os resultados obtidos neste trabalho são promissores, mas novos estudos precisam ser conduzidos para encontrar meios adequados e determinar condições ideais para maximizar a produção de conídios deste entomopatógeno pelo sistema bifásico de cultivo.

4- CONCLUSÕES

1. O sistema bifásico incrementou a produção de conídios pelo isolado JAB 45 de *L. lecanii*.
2. A viabilidade dos conídios produzidos, por ambos os isolados, não foi influenciada pelo método de produção.
3. Soro de queijo (85%) com farelo de trigo e trigo em grão (70:30%) foi a combinação mais favorável à produção do isolado JAB 45 e para JAB 02 nenhuma das combinações testadas foi capaz de incrementar a produção de conídios.
4. A combinação bifásica que proporcionou melhor resultado para a produção do isolado JAB 45, proporcionou também a elaboração de um bioproduto com o menor custo de produção.

5- REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, J.L.R.; ROSAS, R.A.; ROSAS, L.S., CARRASCO, J.V. Esporulación de los hongos entomopatógenos *Hirsutella thompsonii* Fisher y *H. nodulosa* Petch em cultivo mixto. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, Mexico City, v. 37, p. 59-64, 1995.
- BARBOSA, C.C.; MONTEIRO, A.C.; CORREIA, A. do C.B.; PEREIRA, G.T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.6, p.821-829, 2002

CLARKSON J.; CHARNLEY K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v. 4, p.197–203, 1996.

FLORIDO, J.E.B.; ROSAS, R.A.; ROJAS, M.G.; GONZALÉZ, G.V.; CASTANEDA, G.S. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, Stoneham, v. 30, n. 7, p. 910-915, 2002.

GUILLON, M. Production of biopesticides: scale up and quality assurance. In: BRITISH CROP PRODUCTION COUNCIL SYMPOSIUM, 68, 1997. Farnham, U.K, **Proceedings**, p.151-162.

HALL, R. A. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: BURGESS, H. D. (Ed.) **Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970- 1980**, London: Academic Press, 1981. p.483–498.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, T.M.; STRASSER, B. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Eds). **Fungi as biocontrol agentes**. Wallingford: CAB International, 2001. p.23-69.

JARONSKI, S.T. Commercial development of deuteromycetous fungi of arthropods: a critical appraisal. In: SAMSON, R.A; VLAK, J.M.; PETERS, R. (eds.). **Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology**. Wageningen, 1986, p.653-656.

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 and Information**, v. 19, n. 1, p.21-31, 1998.

KASSA, A.; BROWNBIDGE, M.; PARKER, B.L.; SKINNER, M.; GOULI, V.; GOULI, S.; GUO, M.; LEE, F.; HATA, T. Whey for mass production of ***Beauveria bassiana*** and ***Metarhizium anisopliae***. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p.583-591, 2008.

LATGÉ, J.L.; HALL, R.A.; CABRERA, R.I.; KERWIN, J.C. Liquid fermentation of entomopathogenic fungi. In: SAMSON, R.A; VLAK, J.M.; PETERS, R. (Eds.). **Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology**. Wageningen, p.603-606, 1986.

LECUONA, R.E.; RIBA, G. Primeras etapas del ciclo de desarrollo de hongos entomopatógenos. **Boletín de Divulgación Tecnológica**, Buenos Aires, v. 87, 30 p., 1991.

LOMER, C.H.; LOMER, C.J. Mass production of fungal pathogens for insect control. In: LOMER, C.H.; LOMER, C.J (Eds.). **LUBILOSA Pathologie d' insectes**: manual 244 p. Disponível em <http://www.lubilosa.org>. Acesso em 20 de janeiro de 2008.

MARQUES, R.P.; MONTEIRO, A.C; PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de nim (***Azadirachta indica***). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.6, p.1675-1680, 2004.

MASCARIN, G.M.; ALVES, S.B. Produção bifásica de ***Paecilomyces fumosoroseus*** e ***Paecilomyces farinosus***. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 14, 2005, Piracicaba, Resumo, p. 120-120.

MATSUNAGA, M. Metodologia de custo de produção utilizada pelo IEA. **Agricultura**, São Paulo, v. 1, n. 1, p.123-140, 1976.

MONTEIRO, A. C.; BARBOSA, C. C.; CORREIA, A. C. B.; PEREIRA, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de ***Verticillium lecanii*** sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 6, p. 561-565, 2004.

PENARIOL, M. C. **Requisitos nutricionais e produção massal de *Bipolaris euphorbiae***. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J.; SILVA, R.Z.; AKIMI, S.; ZORZETTI, J. Produção de ***Beauveria bassiana*** (Bals.) Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 3, p. 313-320, 2005.

WENZEL, I.M., MONTEIRO, A.C., PEREIRA, G.T. Produção de conídios de ***Lecanicillium lecanii*** em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.7-17, 2006.

APÊNDICE

Anexo 1- Desembolso com mão-de-obra necessária para produção de ***Lecanicillium lecanii***, considerando o piso salarial e encargos sociais mensais.

Mão-de-obra	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Engenheiro agrônomo ou biólogo	1	2000	2000
Auxiliar de serviços gerais	1	600	600
Técnico de laboratório	1	700	700
Secretária	1	450	450
Subtotal			3750
Encargos sociais (40%)			1500
Total			5250

Anexo 2- Custo da matéria-prima utilizada para produção do isolado JAB 45 **de *Lecanicillium lecanii*** pelo sistema bifásico em quatro meios sólidos

Matéria-prima	Quantidade (kg/mês)	Valor (R\$/Kg)	Valor Total (R\$/kg)
Farelo de Trigo (70%)	770	1,00	770
Trigo em grão (30%)	330	0,50	165
Total			935
Farelo de Trigo (70%)	770	1,00	770
Lentilha (30%)	330	3,20	1056
Total			1.826
Farelo de Trigo (85%)	935	1,00	935
Painço (15%)	165	1,60	264
Total			1.199
Trigo Grosso (55%)	605	2,00	1210
Lentilha (45%)	495	3,20	1584
Total			2.794

Anexo 3- Desembolso com equipamentos (quantidade, valor unitário, vida útil e depreciação dos bens) e demais necessários para construção de uma biofábrica de pequeno porte para produção de *Lecanicilium lecanii* em sistema bifásico.

Descrição (Itens)	Quantidade	Preço (R\$)	Valor Total (R\$)	Vida Útil (anos)	Depreciação (R\$/ano)	Depreciação (R\$/mês)
Equipamentos de escritório						
Mesa de escritório	1	329,00	329,00	10	32,90	2,74
Cadeira secretária	2	49,00	98,00	10	9,80	0,82
Telefone	1	35,00	35,00	5	7,00	0,58
Computador	1	1299,00	1299,00	5	259,80	21,65
Equipamentos e materiais de laboratório						
Aparelho condicionador de ar	2	900,00	1800,00	10	180,00	15,00
Autoclave vertical (75 L)	1	4.910,00	4910,00	15	327,33	27,28
Incubadora B.O.D.	1	4700,00	4700,00	10	470,00	39,17
Balança eletrônica	1	694,00	694,00	10	69,40	5,78
Bancada	2	200,00	400,00	10	40,00	3,33
Destilador de água (cap. 2L/h)	1	998,00	998,00	10	99,80	8,32
Barrilete (2L)	1	154,00	154,00	10	15,40	1,28
Mesa de manipulação	2	200,00	400,00	10	40,00	3,33
Microscópio óptico binocular	1	1079,00	1079,00	15	71,93	5,99
Agitador elétrico industrial	1	1400,00	1400,00	10	140,00	11,67
Mixer Vertical	1	55,00	55,00	10	5,50	0,46
Potenciômetro	1	580,00	580,00	10	58,00	4,83
Estufa de esterilização	1	749,00	749,00	10	74,90	6,24
Fogão Industrial	1	500,00	500,00	10	50,00	4,17
Geladeira	1	650,00	650,00	15	43,33	3,61
Umidificador de ar	1	160,00	160,00	10	16,00	1,33
Seladora	1	340,00	340,00	10	34,00	2,83
Caldeirão de alumínio (18,3L)	3	53,21	159,63	10	15,96	1,33
Bandeja para meio sólido	200	6,30	1260,00	10	126,00	10,50
Prateleira	10	45,00	450,00	10	45,00	3,75
Armário de aço	2	299,00	598,00	10	59,80	4,98
Câmara de Neubauer	1	97,20	97,20	15	6,48	0,54
Termometro digital	1	69,00	69,00	10	6,90	0,58
Vídrarias e outros materiais						
Bequer 500 mL	5	5,00	25,00	10	2,50	0,21
Bequer 1000 mL	10	6,90	69,00	10	6,90	0,58
Bequer 2000 mL	5	14,90	74,50	10	7,45	0,62
Erlenmeyer 500 mL	30	9,00	270,00	10	27,00	2,25
Erlenmeyer 1000 mL	70	14,00	980,00	10	98,00	8,17
Placas de Petri (10x150mm)	50	2,23	111,50	15	7,43	0,62
Proveta 500mL	2	19,00	38,00	5	7,60	0,63
Proveta 1000mL	2	25,00	50,00	5	10,00	0,83
Pipeta 1 mL	5	6,00	30,00	5	6,00	0,50
Pipeta 5 mL	5	11,00	55,00	5	11,00	0,92
Pipeta 25 mL	3	21,00	63,00	5	12,60	1,05
Tubo de ensaio (16x160 mm)	50	0,80	40,00	3	13,33	1,11
Seringa (200mL)	50	0,50	25,00	10	2,50	0,21
Lâmina para microscopia (Cx. com 50)	1	2,30	2,30	10	0,23	0,02
Lamínulas (Cx. com 100)	1	2,18	2,18	10	0,22	0,02
Bico de Bunsen	1	30,00	30,00	10	3,00	0,25
Alça de níquel cromo	6	1,41	8,46	10	0,85	0,07
Utensílios gerais para laboratório	1	250,00	250,00	10	25,00	2,08
Construção						
Obras para adequação	1	1500,00	1500,00	10	150,00	12,50
TOTAL			27587,77		2696,85	198,95