

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor ,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir de
07/12/2019.

SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO

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

Botucatu

2018

SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO

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

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

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

Botucatu

2018

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

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

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

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

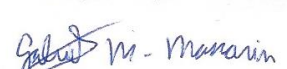
Título: "DESENVOLVIMENTO DE MICOINSETICIDAS: UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DO PERCEVEJO BRONZEADO DO EUCALIPTO *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)"

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

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



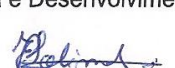
Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas



Dr. GABRIEL MOURA MASCARIN
Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente



Dra. INAJÁ MARCHIZELI WENZEL
Pesquisa e Desenvolvimento / Koppert Sistemas Biológicos



Prof. Dr. ÉVERTON PIRES SOLIMAN
Tecnologia Florestal / Suzano Papel e Celulose



Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO MARCONDES DE ALMEIDA
Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico

Botucatu, 07 de dezembro de 2018.

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

Dedico

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

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

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

A todos meus familiares e grandes amigos

Dedico.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito obrigada!

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

(Isaias 55:8,9)

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

CAPÍTULO 4 - AVANÇOS TECNOLÓGICOS NA COLHEITA DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae* PARA BIOPESTICIDAS VISANDO O CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)

	Resumo	78
	Abstract.....	78
4.1	Introdução.....	79
4.2	Material e métodos	79
4.3	Resultados	82
4.4	Discussão	82
4.5	Conclusão.....	83
	Referências.....	83

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

	Resumo	92
	Abstract.....	92
5.1	Introdução.....	93
5.2	Resultados	93
5.3	Discussão	95
5.4	Material e métodos	99
	Referências.....	102

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

		114
--	--	-----

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

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

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

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

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

Revista: Florida Entomologist

Resumo

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

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

Abstract

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

1.5 Conclusão

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

Referências

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2

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

Revista: Biocontrol Science and Technology

Resumo

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

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

Abstract

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

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

2.5 Conclusão

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

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

Referências

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

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

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

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

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

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

Revista: Applied Microbiology and Biotechnology

Resumo

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

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

Abstract

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

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

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

3.5 Conclusão

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

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Revista: Royal Society Open Science

Resumo

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

4.5 Conclusão

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Revista: Scientific Reports

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

Revista: Journal of Insect Science

Resumo

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

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

Abstract

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

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

6.5 Conclusão

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 7

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

Revista: World Journal of Microbiology and Biotechnology

Resumo

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

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

Abstract

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

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

7.5 Conclusão

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

Referências

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

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

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

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

Revista: Biocontrol Science and Technology

Resumo

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

8.5 Conclusão

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

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

Referências

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

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

CAPÍTULO 9

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

Revista: Biocontrol Science and Technology

Resumo

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

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

Abstract

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

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

9.5 Conclusão

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

Referências

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

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

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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