**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico
Metarhizium anisopliae (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)**

Polyane de Sá Santos

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2017**

Polyane de Sá Santos
Licenciada em Ciências Biológicas

**Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*
(Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)**

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr-6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JUNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Santos, Polyane de Sá

Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) / Polyane de Sá Santos. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2017.

76 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Controle biológico 2. Fermentação líquida 3. Fermentação bifásica 4. Produção massal L. . I. Título

Aos meus pais, **Lourival** e **Avaneide** e ao meu
irmão **Fabiano** pela compreensão e incentivo
durante toda a jornada deste trabalho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde concedida, força e motivação para superar todas as dificuldades, dando-me a oportunidade de realizar mais um sonho. Obrigada Senhor!

Aos meus pais Lourival e Avaneide e ao meu irmão Fabiano pela presença, compreensão e incentivo necessários para que eu pudesse cumprir todas as etapas deste trabalho com confiança e esperança.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ / USP pelo apoio concedido no decorrer do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF pela concessão de bolsa de incentivo à qualificação.

Ao Prof. Dr. Ítalo Delalibera Júnior, pela orientação e apoio nos trabalhos e a todos os professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP que me deram a oportunidade do conhecimento e aprendizado em mais uma etapa da Pós-Graduação.

À prof. Sonia Maria de Stefano Piedade e à aluna de doutorado Natalie Rondinel pela consultoria e auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Alberto Soares Correa e aos alunos de pós-doutorado, Oderley Bernardi e Mirela Coelho pela participação e contribuições ao trabalho na banca examinadora de qualificação.

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos – ESALQ / USP pelas lições de vida e pelas experiências de trabalho vivenciadas.

Aos meus queridos amigos Kauana Abati, Víctor Manuel Rojas, Ana Carolina Oliveira e Luiz Henrique Mota, pela acolhida, carinho e amizade. Vocês foram demais!!!!

Aos técnicos de laboratório Pedro e Solange pela dedicação e disposição a me ajudar, vocês foram muito importantes no desenvolvimento deste trabalho.

Em especial aos estagiários, Natalia de Paula e Vitor Isaías, pela contribuição e entusiasmo! O trabalho e o aprendizado junto a vocês foram fundamentais.

À aluna de doutorado Juliana Sartori e o professor Dr. Claudio Lima de Aguiar do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ESALQ / USP, pela disponibilidade e parceria durante o desenvolvimento das atividades neste departamento.

Aos meus amigos de pós graduação: Alexandre Cancilieri, Márcia, Natália Guevara, Naiara Célida, Yuri Ramos, Alice Cruz, Mônica dos Santos, Renata Machado, Ariadne Sá, Viviana Camelo, Aline Franco, Aline Rocha, Nancy Farfan, Leandro Ribeiro, Izaías Lisboa, Joaquim Frazão, Elízio Frade Júnior e todos os colegas da universidade que contribuíram para tornar meus dias mais leves e felizes com a convivência, compartilhando da realização deste sonho.

E a todos que direta ou indiretamente participaram da realização de mais uma conquista na minha vida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS.....	15
2. NOVAS ABORDAGENS PARA PRODUÇÃO MASSAL DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (METCH.) SOROKIN (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) POR SISTEMA BIFÁSICO DE FERMENTAÇÃO....	
RESUMO.....	19
ABSTRACT	19
2.1 INTRODUÇÃO.....	20
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.2.1 Obtenção e preparo do inóculo.....	22
2.2.2 Preparo da pré-cultura.....	23
2.2.3 Seleção do meio líquido da cultura.....	24
2.2.3.1 Produção de <i>M. anisopliae</i> sob condição de fermentação líquida com meios a base de caseína ácido hidrolisada e glicose	24
2.2.3.2 Produção de <i>M. anisopliae</i> sob condição de fermentação líquida com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose e sacarose) e nitrogênio (peptona de carne, peptona de soja e Extrato de levedura)	25
2.2.3.3 Produção de <i>M. anisopliae</i> por fermentação líquida com meios à base de extrato de levedura com glicose ou sacarose.....	26
2.2.4 Preparação do meio líquido para inoculação nos sistemas bifásicos.....	26
2.2.5 Uso de arroz na fermentação bifásica de <i>M. anisopliae</i>	27
2.2.6 Uso de farelos na fermentação bifásica de <i>M. anisopliae</i>	27
2.2.7 Uso de suportes inertes para crescimento e esporulação na fermentação bifásica de <i>M. anisopliae</i>	28
2.2.8 Contagem do número de conídios.....	28
2.2.9 Análise estatística.....	29
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	42
3. ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO MASSAL DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (METCH.) SOROKIN (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA.....	
RESUMO.....	45
ABSTRACT	45
3.1 INTRODUÇÃO.....	46
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.2.1 Obtenção e preparo do inóculo.....	48
3.2.2 Efeito da adição de diferentes materiais ao arroz para incremento da aeração na produção massal do fungo <i>M. anisopliae</i>	48
3.2.3 Efeito da fervura na esterilização de arroz para produção de <i>M. anisopliae</i>	50
3.2.4 Produção de conídios de <i>M. anisopliae</i> por fermentação sólida em farelos.....	50
3.2.5 Produção de conídios de <i>M. anisopliae</i> por fermentação sólida em misturas de farelos.....	51
3.2.6 Determinação da melhor concentração de farelos de trigo e arroz para produção de conídios de <i>M. anisopliae</i>	52
3.2.6.1 Contagem do número de conídios produzidos	52
3.2.7 Extração de conídios de <i>M. anisopliae</i> do arroz por peneiramento e lavagem em água.....	53
3.2.7.1 Viabilidade dos conídios extraídos	54
3.2.8 Análise estatística.....	54
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75

RESUMO

Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)

O método empregado na produção de fungos entomopatogênicos teve poucas alterações em mais de 40 anos de utilização no Brasil. A produção adotada nas biofábricas em larga escala é basicamente através da fermentação sólida em arroz com elevado uso de mão de obra e longo tempo de produção. Assim, o presente estudo consistiu em desenvolver estratégias que possam ser implementadas nas diferentes etapas do sistema de produção de *Metarhizium anisopliae* ESALQ1037, como adição ao arroz de materiais inertes (bagaço de cana-de-açúcar, maravalha, esponja vegetal e palha de arroz) e outros substratos (milheto, flocos de arroz e sagu) para separação dos grãos de arroz e aumento da aeração, uso de blastosporos como inóculo em sistemas bifásicos tendo como substrato sólido o arroz ou mistura de farelos (trigo, milho, aveia, arroz, soja e algodão) ou suportes de crescimento e esporulação (bagaço de cana-de-açúcar, vermiculita, tecido de lã, palha de arroz e maravalha). Foi testado o uso da esterilização por fervura em substituição à autoclavagem e recuperação de conídios por extração em água como substituto ao peneiramento, além de armazenamento em condições de alta e baixa temperatura e umidade: 97%UR e 22°C; 97%UR e 4°C; 0%UR e 22°C; 0%UR e 4°C. O meio líquido M11 (a base de 45g L⁻¹ glicose e 36g L⁻¹ extrato de levedura) foi o mais adequado para produção de blastosporos (3,0 x 10⁸ blastosporos/mL) e biomassa. A inoculação de blastosporos em arroz resultou em produção maior e mais rápida de conídios (4,51 x 10⁸ conídios/g) em 7 dias de crescimento fúngico. O farelo de trigo inoculado com blastosporos produzidos em meio M11 resultou em maior produção de conídios (1,2 x 10⁹ conídios/g) quando comparado aos farelos e arroz inoculados com suspensão de conídios (máximo de 7,8 x 10⁸ conídios/g). O bagaço de cana-de-açúcar autoclavado seco foi o suporte que resultou em maior produção do fungo quando associado ao meio líquido. A adição ao arroz de bagaço de cana-de-açúcar umedecido, maravalha e esponja vegetal não umedecidas promoveu incremento na produção de conídios (> 3,3 x 10⁹ conídios/g) quando comparado ao arroz somente (1,00 x 10⁹ conídios/g). A exposição do arroz à fervura por 10 e 15 minutos resultou em produção de conídios semelhante à produção em arroz autoclavado, sem a presença de contaminantes. Farelo de trigo foi o substrato mais promissor para produção do fungo especialmente quando misturado ao farelo de arroz (1,75 x 10⁹ conídios/g) na fermentação sólida. Conídios extraídos do arroz por peneiramento ou lavagem em água e recuperados com ou sem a adição de argilas, terra de diatomácea e caulim apresentaram viabilidade superior a 92% após armazenamento por 60 dias a 22°C e 97% UR. A 22°C e 0% UR, somente os conídios extraídos do arroz por peneiramento e os extraídos em água e recuperados com a adição de argila preta e caulim apresentaram viabilidade superior a 92% após armazenamento por 60 dias. Estratégias testadas neste estudo para produção e extração de conídios de *M. anisopliae* são alternativas viáveis para serem incorporadas na produção em larga escala e reduzir o tempo de fermentação e mão de obra, aumentando a eficiência de conversão de substrato em conídios.

Palavras-chave: Controle biológico; Fungo entomopatogênico; Produção de blastosporos; Produção de conídios; Fermentação sólida; Fermentação líquida; Fermentação bifásica

ABSTRACT

Adaptations in the production system of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)

The method used in the production of entomopathogenic fungi had few changes in more than 40 years of use in Brasil. The production of large-scale biofactories is basically through solid fermentation in rice with high labor and long production time. Thus, the present study consisted in developing strategies that could be implemented in the different stages of the production system of *Metarhizium anisopliae* ESALQ1037, as addition to rice of inert materials (sugarcane bagasse, shavings, vegetable sponge, rice straw) and other substrates (millet, rice flakes and sago) for separation of rice grains and increased aeration, use of blastospores as inoculum in biphasic systems having as a solid substrate the rice or mixture of bran (wheat, corn, oats, rice, soybean and cotton) or growth and sporulation supports (sugarcane bagasse, vermiculite, wool, rice straw and shavings). The use of boiling sterilization to replace autoclaving and recovery of conidia by water extraction as a substitute for sieving was tested, as well as storage under high and low temperature and humidity conditions: 97% RH and 22 °C; 97% RH and 4°C; 0% RH and 22°C; 0% RH and 4°C. The M11 liquid medium (the base of 45g L⁻¹ glucose and 36g L⁻¹ yeast extract) was the most suitable for the production of blastospores (3.0 x 10⁸ blastospores / mL) and biomass. The inoculation of blastospores in rice resulted in larger and faster production of conidia (4.51 x 10⁸ conidia / g) in 7 days of fungal growth. The wheat bran inoculated with blastospores produced in M11 medium resulted in higher conidia production (1.2 x 10⁹ conidia / g) when compared to the bran and rice inoculated with conidial suspension (maximum of 7.8 x 10⁸ conidia / g). The dried autoclaved sugarcane bagasse was the carrier that resulted in higher fungus production when associated with the liquid medium. The addition of moistened sugarcane bagasse and non-moistened shavings and vegetable sponges promoted increase in the production of conidia (> 3.3 x 10⁹ conidia / g) when compared to rice only (1.0 x 10⁹ conidia / g). Exposure of the boil rice for 10 and 15 minutes resulted in conidial production similar to the production in autoclaved rice without the presence of contaminants. Wheat bran was the most promising substrate for the fungus production especially when mixed with rice bran (1.75 x 10⁹ conidia / g) in solid fermentation. Conidia extracted from rice by sieving or washing in water and recovered with or without the addition of clays, diatomaceous earth and kaolin showed viability higher than 92% after storage for 60 days at 22 °C and 97% RH. At 22 °C and 0% RH, only the conidia extracted from the rice by sieving and those extracted in water and recovered with the addition of black clays and kaolin had viability higher than 92% after storage for 60 days. Strategies tested in this study for the production and extraction of conidia of *M. anisopliae* are viable alternatives to be incorporated in the large scale production and to reduce the time of fermentation and manpower, to increasing the efficiency of conversion of substrate in conidia.

Keywords: Biological control; Entomopathogenic fungi; Production of blastospores; Conidia production; Solid fermentation; Liquid fermentation; Biphasic fermentation

1. INTRODUÇÃO

O manejo de pragas e doenças em diversos segmentos da agricultura brasileira é feito predominantemente por agroquímicos, mas é cada vez maior o interesse por agentes microbianos de controle. O país está em primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos desde 2009 (SILVA, 2015). Segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva, 70% dos alimentos *in natura* consumidos contêm níveis de agrotóxicos, 28% contêm substâncias não autorizadas segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), e mais da metade dos agroquímicos utilizados no Brasil são banidos nos países da União Européia e Estados Unidos (ABRASCO, 2015; IBAMA 2013).

O controle biológico de pragas com microrganismos pode ser utilizado com eficácia no manejo integrado como medida para reduzir o uso exacerbado de inseticidas no campo a fim de se obter um agroecossistema ambientalmente equilibrado, produtos livres de resíduos químicos e minimizar a seleção de pragas e doenças resistentes (MOSCARDÍ & SOUZA, 2002; MARQUES et al., 2004; PARRA, 2014).

Aspectos como o alto custo e a atual dificuldade de se encontrar moléculas para desenvolvimento de inseticidas; exigências do mercado de exportação por produtos livres de resíduos e outras demandas fitossanitárias, estimulam ainda mais o mercado na busca de alternativas sustentáveis e ecologicamente viáveis (MACHADO et al., 2013; PARRA, 2014).

Agentes de biocontrole como vírus, bactérias e fungos são comercializados para controle de insetos e ácaros no campo em pequenas e grandes culturas, cultivos orgânicos, vetores de doenças, uso veterinário e doméstico (POLANCZYK et al., 2003; BERNADI et al., 2006; VALICENTE et al., 2010).

Dentre estes organismos é crescente o interesse pelos fungos entomopatogênicos, objeto de estudo deste trabalho, uma vez que podem ser produzidos em larga escala, além de possuírem amplo espectro de ação.

Os fungos mais utilizados no controle biológico de pragas pertencem à ordem Hypocreales (Ascomycota) e incluem *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* (anteriormente *Paecilomyces fumosoroseus*) e *Lecanicillium spp.* (anteriormente *Verticillium spp.*) (FARIA & WRAIGHT, 2007; SRIKANTH & SANTHALAKSHMI, 2012; JACKSON & JARONSKI, 2012; MASCARIN et al., 2014; UMMID & VADLAMANI, 2014).

A seleção de entomopatógenos virulentos, otimização da produção em larga escala visando a redução de custos de materiais e mão de obra e o desenvolvimento de novas

formulações são importantes passos para a viabilização destes agentes de biocontrole (SANTOS et al., 2011; FARIA & WRAIGHT, 2007; ORTIZ-URQUIZA et al., 2010; LIMA et al., 2010; MACHADO et al., 2013). Diversos trabalhos foram conduzidos no sentido de melhorar o processo de produção de fungos (MACHADO et al., 2010; JACKSON & JARONSKI, 2009; ORTIZ-URQUIZA et al., 2010; MACHADO et al., 2013).

A principal expansão na produção destes entomopatógenos no mundo ocorreu a partir da utilização de grãos de cereais, sendo o arroz e o trigo os mais utilizados na produção em escala industrial (KUMAR et al., 2007; WENZEL, 2006; MORANDI & BETTIOL, 2009). No Brasil, a utilização de fungos entomopatogênicos em programas de biocontrole aumentou significativamente, entretanto o método de produção empregado continua sendo o mesmo das primeiras biofábricas, em que a fermentação sólida em arroz é praticamente o único método usado comercialmente no país.

Várias pesquisas foram desenvolvidas no intuito de revelar a eficiência de outros substratos como farinha de arroz, soja, farelo de trigo, batata, sorgo, feijão, milho e outros visando a redução dos custos e manutenção da eficácia dos propágulos (WENZEL et al., 2006).

Além da fermentação em estado sólido, a produção massal de entomopatógenos pode ser por fermentação líquida submersa e fermentação bifásica. A fermentação sólida, consiste na produção de conídios aéreos em substratos sólidos composto em sua maioria por grãos, derivados de cereais e resíduos agro-industriais (PENARIOL et al., 2008), enquanto que na fermentação líquida submersa o fungo é produzido em meios ricos em nutrientes prontamente disponíveis tendo como resultado a produção de conídios submersos, blastosporos, aglomerados de micélios e por vezes estruturas conhecidas como microescleródios (JACKSON & JARONSKI, 2009; MASCARIN et al., 2015). Na fermentação bifásica, pode se utilizar a biomassa fúngica oriunda da fermentação líquida e inocular substratos sólidos ou material inerte para produção de conídios aéreos (MACHADO et al., 2013).

No processamento dos fungos, uma fase importante é a recuperação dos conídios para armazenamento e/ou formulação e o resultado depende diretamente do tipo de extração e de secagem utilizados. A secagem pode provocar danos por desidratação dos conídios, podendo afetar a manutenção da viabilidade dos fungos (MASCARIN et al., 2014; MACHADO et al., 2013). Os métodos de secagem frequentemente utilizados pelas biofábricas são uso de secadores industriais, salas com desumidificadores, spray dryer e leiteo fluidizado (JIN & CUSTIS, 2011). Alguns desses métodos embora sejam eficientes têm custo elevado e são pouco utilizados.

Na formulação de bioinseticidas, última fase de processamento dos fungos, o princípio é associar produtos técnicos (adjuvantes, surfactantes, óleos vegetais e minerais, fotoprotetores e materiais inertes) aos propágulos, a fim de se obter produtos que forneçam proteção quando estes fungos são expostos aos ambientes especialmente em condições adversas mantendo sua sobrevivência. Estes produtos também favorecem o molhamento e espalhamento do fungo no ambiente, contribuindo para maior eficácia do bioinseticida além da estabilidade dos propágulos fúngicos durante o armazenamento (HORACZEK & VIERNSTEIN, 2004; SILVA et al., 2006; JIN et al., 2008; REDDY et al., 2008; MASCARIN et al., 2014; SANTOS et al., 2012).

Poucas são as publicações sobre adaptações das técnicas de produção massal existentes, que aperfeiçoe e interfira diretamente em uma das fases do ciclo em larga escala para reduzir mão de obra e tempo de produção. Aspectos como: condições físicas dos substratos; esterilização de substratos e materiais; custo-benefício de produtos e serviços; demanda de mão de obra; também devem ser priorizados considerando que a maior parte da produção de fungos ainda se faz a partir de métodos tradicionais sem automatização (MORANDI & BETTIOL, 2009).

O ascomiceto *M. anisopliae* (ESALQ1037), será o fungo modelo utilizado neste estudo. É um fungo que apresenta amplo espectro de ação, infectando mais de 300 espécies, tendo como principal via de infecção o tegumento a partir dos conídios aéreos. Este fungo cosmopolita é produzido massalmente em biofábricas, principalmente para o controle de cigarrinhas em cana-de-açúcar e pastagens (BATISTA FILHO et al., 2003; PARRA, 2014), além de outras pragas (SILVA et al., 2008; CASTILHO et al., 2010).

Neste trabalho buscou-se estratégias para melhorar as etapas de produção de blastosporos e conídios aéreos de *M. anisopliae* (isolado ESALQ1037) por fermentação líquida, fermentação sólida e fermentação bifásica, para incrementar a produção e recuperação de propágulos viáveis. Dentre os objetivos específicos destaca-se:

- Avaliar a produção de blastosporos e biomassa fúngica pela fermentação líquida em meios de cultura com diferentes fontes de carbono e nitrogênio;
- Incrementar a produção de conídios aéreos produzidos por fermentação sólida a partir da associação de materiais inertes e não inertes ao arroz para aumentar a aeração no substrato, seleção e mistura de farelos e adoção de métodos de esterilização mais simples;
- Desenvolver métodos alternativos de produção do fungo por fermentação bifásica, sendo uma fase de produção de blastosporos e/ou biomassa fúngica em fermentação líquida e

outra fase para produção de conídios aéreos em substratos sólidos ou inertes como suporte para crescimento vegetativo e esporulação;

- Desenvolver métodos para recuperação de conídios aéreos do fungo obtidos por fermentação sólida.

Referências

- ABRASCO – Instituto Nacional de Câncer. Ações no dia de Internacional de luta contra os agrotóxicos (2015). Disponível em: <<https://www.abrasco.org.br/site/2015/12/dossie-abrasco-no-centro-dos-debates-e-acoes-no-dia-internacional-de-luta-contra-os-agrotoxicos/>> Acesso em: 25 mar. 2016.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; SANTOS, A. S.; MACHADO, L. A.; ALVES, S. B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raíz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 309 - 314, 2003.
- BERNARDI, E.; PINTO, D. M.; NASCIMENTO, J. S. do; RIBEIRO, P. B.; SILVA, C. I. da. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *musca domestica* L. (Diptera: muscidae) em laboratório. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 127 - 129, 2006.
- CASTILHO, A. M. C.; FRAGAII, M. E. F.; AGUIAR-MENEZES, E. DE L.; ROSAII, C. A. da R. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens* rubropilosa em condições de laboratório. Ciência Rural, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1243 - 1249, 2010.
- FARIA, M. R. de; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control, Orlando, v. 43, n. 3, p. 237 - 256, 2007.
- HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of areal conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. Biological Control, Orlando, v. 31, n. 1, p. 65 - 71, 2004.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatório de comercialização de agrotóxicos, 2013. Disponível em: <<https://ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>> Acesso em: 25 marc. 2016.
- JACKSON M. A. & JARONSKI S. T. Development of pilot-scale fermentation and stabilization processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. Biocontrol Science and Technology, Oxford, v. 22, n. 8, p. 915 -930. 2012.

- _____. JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, Cambridge, v. 113, n. 8, p. 842 - 850, 2009.
- JIN, X. & CUSTIS, D. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*, Orlando, v. 56, n. 2, p. 202 - 208, 2011.
- _____. STREETT, D. A.; DUNLAP, C. A.; LYN, M. E. Application of Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) Number to Optimize a Compatible Non-ionic Surfactant for Dried Aerial Conidia of *Beauveria bassiana*. *Biological Control*, Orlando, v. 46, n. 2, p. 226 - 233, 2008.
- KUMAR, M.; CHOUDARY, S.; SHAHI, S. K.; SHAHI, M. P. Standardization of different substrates for the mass production of conidial yield of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Plant Archives*, Heonra-Saifai, Etawah, v. 7, n. 2, p. 719 - 720, 2007.
- LIMA, B. V.; SOARES, D. J.; BARRETO, R. W. Inoculum density of *Plectosporium alismatis*, a potential mycoherbicide, in relation to control of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. *Tropical Plant Pathology*, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 239 - 240, 2010.
- MACHADO, A. C. R.; MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C. Crop optimization and pre-steps standardization to get a *Bipolaris euphorbiae*-based bioherbicide. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiás, v. 43, n. 4, p. 392 - 399, 2013.
- _____. MONTEIRO, A. C.; ALMEIDA, A. M. B.; MARTINS, M. I. E. G. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 45, n. 10, p. 1157 - 1163, 2010.
- MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1675 - 1680, 2004.
- MASCARIN, G. M.; JACKSON M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 127, p. 11 - 20, 2015.
- _____. KOBORI, N. N.; QUINTELA, E. D.; ARTHURS, S. P.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Toxicity of non-ionic surfactants and interactions with fungal entomopathogens toward *Bemisia tabaci* biotype B. *BioControl*, Dordrecht, v. 59, n. 1, p. 111 - 123, 2014.

- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas daninhas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, p. 7 - 14, 2009.
- MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. de. Baculovírus para o controle de pragas: Panacéia ou realidade? Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v. 4, n. 24, p. 22 - 29, 2002.
- ORTIZ-URQUIZA, A.; GARRIDO-JURADO, I.; BORREGO, A.; QUESADA-MORAGA, E. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae*(Ascomycota: Hypocreales). Pest Management Science, New York, v. 66, n. 7, p. 725 - 735, 2010.
- PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: An overview. Science Agricola, Piracicaba, v. 71, n. 5, p. 420 - 429, 2014.
- PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A.; PEREIRA, G. T. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. Bragantia, Campinas, v. 67, n. 4, p. 805 - 814, 2008.
- POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. Revista Saúde Pública, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 813 - 816, 2003.
- REDDY, N. P.; KHAN, P. A. A.; DEVI, K. U.; VICTOR, J. S.; SHARMA, H. C. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*(Bals.) Vuillemin. Pest Management Science, New York, v. 64, n. 9, p. 909 - 915, 2008.
- SANTOS, P. de S.; SILVA, M. A. Q. da; MONTEIRO, A. C.; GAVA, C. A. T. Improving photoprotection of *Beauveria bassiana* conidia for biological control of the cactus pest *Dactylopius opuntiae* in the semiarid region northeast of Brazil, Biocontrol Science and Technology, Oxford, v. 21, n. 8. p. 893 - 902, 2011.
- _____. Selection of surfactant compounds to enhance the dispersion of *Beauveria bassiana*. Biocontrol Science and Technology, Oxford, v. 22. n. 3, p. 281 - 292, 2012.
- SILVA, A. B. DA; BESERRA, E. B.; DANTAS, J. P. Utilização de *Metarhizium anisopliae* e extratos vegetais para o controle de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. Engenharia Ambiental. Espírito Santo do Pinhal, v. 5, n. 1, p. 77 - 85, 2008.
- SILVA, J. A. G. da. Posicionamento do Instituto Nacional de câncer acerca dos agrotóxicos, 2015.

<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf > Acesso em: 18 mai. 2016.

- SILVA, R. Z. da; NEVES, P. M. O. J.; SANTORO, P. H.; CAVAGUCHI, S. A. Efeito de agroquímicos à base de óleo mineral e vegetal sobre a viabilidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. BioAssay, Piracicaba, v. 1, n. 1, p.1 - 5, 2006.
- SRIKANTH, J. & SANTHALAKSHMI. Effect of Media Additives on the Production of *Beauveria brongniartii* an Entomopathogenic Fungus of *Holotrichia serrata* G. Sugar Tech, Berlin, v. 14, n. 3, p. 284 - 290, 2012.
- VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. de S.; BARROS, E. C. de. Processo de formulação de Baculovirus *Spodoptera* em pó molhável. Circular Técnica, 156. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 1 - 5, 2010.
- UMMID, V. R. S. & VADLAMANI, P. Preparation and use of oil formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Spodoptera frugiperda*. African Journal of Microbiology Research, Nairobi, v. 8, n. 15, p. 1638 - 1644, 2014
- WENZEL, I. M., MONTEIRO, A. C., PEREIRA, G. T. Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. Científica, Jaboticabal, v. 34, n. 1 p. 7 - 14, 2006.

2. NOVAS ABORDAGENS PARA PRODUÇÃO MASSAL DE *Metarhizium anisopliae* (METCH.) SOROKIN (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) POR SISTEMA BIFÁSICO DE FERMENTAÇÃO

Resumo

Objetivou-se com estes estudos propor alternativas para produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em sistemas bifásicos. Foram selecionados meios de cultivo líquido para produção de maior quantidade de propágulos para inoculação em substratos sólidos (arroz, farelos e suportes inertes de crescimento e esporulação). Primeiramente, foi selecionado o meio líquido mais adequado à maior produção de blastosporos a partir de meios com diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e frutose) e nitrogênio (caseína ácido hidrolisada, peptona de carne, peptona de soja e extrato de levedura). Foi comparada a eficácia dos propágulos (blastosporos + micélio) produzidos por fermentação líquida com a suspensão de conídios produzidos em meio sólido para inoculação dos substratos sólidos. Os substratos sólidos testados foram arroz em grãos, farelo de trigo, farelo de milho e as misturas de farelo de trigo + farelo de arroz e farelo de trigo + farelo de aveia nas proporções 75 : 25, e os suportes de crescimento e esporulação: bagaço da cana-de-açúcar autoclavado e seco em estufa por 48 horas e autoclavado sem secar, vermiculita, tecido de lã, palha de arroz e maravalha. O meio líquido a base de 45g L⁻¹ glicose e 36g L⁻¹ extrato de levedura proporcionou maior produção de blastosporos e biomassa. A inoculação de biomassa fúngica contendo alta concentração de blastosporos em arroz resultou em produção de conídios maior e mais rápida quando comparada à inoculação de suspensão de conídios. A produção de conídios em farelo de trigo (1,2 x 10⁹ conídios / g) foi superior à produção em farelo de milho e mistura de farelo de trigo e aveia (75:25) quando foi utilizado inóculo produzido por fermentação líquida. Bagaço de cana-de-açúcar autoclavado seco foi o suporte de crescimento e esporulação que resultou em maior produção de conídios (5,14 x 10⁸ conídios / g) no sistema bifásico de produção. Estes resultados revelam a viabilidade da produção bifásica com inoculação de biomassa fúngica contendo alta concentração de blastosporos em substituição a suspensão de conídios e utilização de farelo de trigo como substrato sólido em substituição ao arroz.

Palavras-chave: Controle biológico; Fungos entomopatogênicos; Produção de blastosporos; Produção de conídios; Fermentação líquida; Fermentação sólida

Abstract

The objective of these studies was to propose alternatives for the production of *Metarhizium anisopliae* in biphasic systems. Liquid culture media were selected for the production of higher concentrations of propagules for inoculation of the solid substrate (rice, bran and inert supports for growth and

sporulation). First, the liquid medium more suitable for higher production of blastospores was selected from media with different carbon (glucose, sucrose and fructose) and nitrogen (casein hydrolysate acid, meat peptone, soy peptone and yeast extract) sources. It was also compared the efficacy of propagules (blastospores + mycelia) produced by liquid fermentation with the conidial suspension produced in solid medium. The solid substrates tested were rice grains, wheat bran, corn bran and mixture wheat bran + rice bran and wheat bran + oat bran in the proportions of 75: 25, and the support for growth and sporulation: sugarcane bagasse autoclaved and dried in an oven for 48 hours and bagasse autoclaved without drying, vermiculite, woolen cloth, rice straw and wood shavings. The liquid medium containing primarily 45g L⁻¹ glucose and 36g L⁻¹ yeast extract caused increased production of biomass and blastospores. Inoculation of fungal biomass containing high concentration of blastospores on rice resulted in production of conidia higher and faster when compared to inoculation of conidial suspension. Conidia production in wheat bran (1.2 x 10⁹ conidia / g) was higher than in corn bran and mixture of wheat bran and oat bran (75:25) using inoculum produced by liquid fermentation. Sugarcane bagasse autoclaved dried was the support for growth and sporulation which resulted in higher production of conidia (5.14 x 10⁸ spores / g) in the biphasic production system. These results revealed the viability of the biphasic production using inoculation of fungal biomass containing high concentrations of blastospores to replace conidial suspension and the use of wheat bran as a solid substrate to replace rice.

Keywords: Biological control, Entomopathogenic fungi; Blastospore production; Conidia production; Liquid fermentation; Solid fermentation

2.1 Introdução

Metarhizium anisopliae é o principal agente de biocontrole no grupo dos fungos entomopatogênicos, conseguindo infectar mais de 300 hospedeiros via tegumento (ST. LEGER, 2008) através de conídios. No Brasil, principalmente na região do Sudeste, a sua utilização já é consolidada em Biofábricas para o controle de cigarrinhas que atacam a cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) e no controle de *Mahanarva posticata* (Stal, 1855) (Hemiptera: Cercopidae) (LOUREIRO et al., 2012; PARRA, 2014) nos estados do Nordeste. A produção deste fungo e outros relacionados ao controle microbiano de artrópodes ainda continua usando as mesmas técnicas utilizadas desde o começo dos programas de controle biológico a partir de fermentação sólida em arroz (WENZEL et al., 2006; KUMAR et al., 2007; MORANDI & BETTIOL, 2009). Os estudos mais recentes têm focado na fermentação líquida submersa e fermentação bifásica.

Para obtenção de um sistema de produção de entomopatógenos com menor tempo de processamento, e aumento da produção em escala exponencial, são necessários estudos de

novas adaptações nas técnicas de fermentação sólida, líquida submersa e bifásica. Na fermentação líquida são utilizados meios ricos em nutrientes prontamente disponíveis, resultando na produção de blastosporos, micélios e por vezes escleródios em sua biomassa fúngica (JACKSON & JARONSKI, 2009; MASCARIN et al., 2015a). A fermentação bifásica visa à produção de propágulos por fermentação líquida que servirá como inóculo para produção em série de conídios aéreos em substratos sólidos (MACHADO et al., 2013).

Quanto às condições nutricionais dos meios, cada tipo de fermentação apresenta suas características que devem ser consideradas ao se planejar uma estratégia de produção massal em larga escala. Assim, na fermentação líquida submersa, é possível o controle dos nutrientes envolvidos desde a concepção do meio. Estes nutrientes podem se concentrar na presença de sais, vitaminas, além das fontes de carbono e nitrogênio, relacionados diretamente à produção de blastosporos, incremento da biomassa fúngica e secreção de proteínas inseticidas (JACKSON, et al., 2010; ORTIZ-URQUIZA et al., 2010; MASCARIN et al., 2015b). Na fermentação sólida não ocorre o controle ou balanceamento dos componentes nutricionais, mas é possível a adição ou busca de substratos alternativos que promovam o incremento da produção neste tipo de fermentação (SRIKANTH & SANTHALAKSHMI, 2012). Já na fermentação bifásica outros aspectos como o tempo de produção da fonte de inóculo em meio líquido, quantidade da fonte de inóculo transferida ao meio sólido e compatibilidade dos substratos envolvidos podem determinar o incremento da produção (MACHADO et al., 2013; MORAES et al., 2014).

A fermentação líquida submersa de entomopatógenos vem obtendo destaque na literatura e interesse particular das empresas por propiciar maior concentração de propágulos fúngicos, principalmente blastosporos em curto espaço de tempo quando comparado aos conídios aéreos obtidos por fermentação sólida, possibilitando também a adaptação de equipamentos já existentes nas indústrias. Os principais gargalos na fermentação sólida são o custo dos substratos relativamente elevado, demanda de mão de obra permanente durante todo o processo de produção dos fungos, alta chance de contaminação e ausência de controle das condições nutricionais e ambientais durante a fase de incubação e conidiogênese, enquanto que na fermentação líquida, existe um melhor controle das condições nutricionais e ambientais e menor propensão à contaminação pelo controle habitual e permanente dos lotes produzidos (JACKSON & SCHISLER, 1995; MASCARIN et al., 2015a).

É visto que o custo-benefício de se implantar a produção massal de fungos deve considerar o valor agregado ao maquinário, espaço ambiental, tempo de produção, mão de obra e suplementos nutricionais para preparação dos meios. Em todas essas fases de produção, é fundamental dar atenção à manutenção da qualidade e eficácia dos propágulos produzidos (SANTOS et al., 2012; MACHADO et al., 2013). Este trabalho foca no estudo de novas abordagens quanto ao uso das fontes de inóculo, a escolha e substituição dos nutrientes na fermentação líquida e uso de substratos sólidos alternativos e materiais inertes em sistemas bifásicos de produção.

Estudos desenvolvidos no Brasil com fermentação bifásica de fungos visam, sobretudo a busca de substratos menos onerosos (MASCARIN et al., 2010; MACHADO et al., 2010; MORAES et al., 2014), entretanto não há estudos comparativos das fontes de inóculo utilizadas na fermentação bifásica, visando a velocidade de obtenção de conídios e maior incremento de produção em relação à fermentação em arroz. Desta forma existe a necessidade de estudos que busquem alternativas no sistema bifásico com a substituição de substratos sólidos por materiais inertes, que sirvam apenas para induzir a conidiogênese na segunda fase da fermentação e que são incipientes.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo propor alterações para produção de conídios do isolado ESALQ1037 de *Metarhizium anisopliae* em sistemas bifásicos, a partir do uso de blastosporos produzidos em meio líquido como fonte de inóculo em substituição aos conídios para fermentação sólida em arroz, farelos e suportes de crescimento para reduzir o tempo de produção e/ou incremento da produção de conídios.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Obtenção e preparo do inóculo

O fungo utilizado foi o isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* armazenado no banco de patógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Pragas, Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, obtido de *Solenopsis* sp. em Porto Alegre/RS. O inóculo se encontra conservado em glicerol a 10% em criotubos esterilizados à temperatura de -80 °C. Para os estudos, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo Batata Dextrose Agar ([BDA] DIFCO®, Detroit, MI, EUA), incubado em B.O.D. durante 10 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de

12:12 horas (L: E). Os conídios foram obtidos por raspagem das placas, armazenados em Eppendorf e em congelador para posterior utilização nos experimentos.

2.2.2 Preparo da pré-cultura

Para dar início à produção do isolado ESALQ 1037 de *M. anisopliae* por fermentação líquida com o intuito de se obter um aumento exponencial no número de propágulos antes de incorporá-lo nos demais meios, foi produzido uma pré-cultura utilizando o Meio 6 (M6) (Tabela 2.1) de JACKSON & JARONSKI (2009), com glicose (Glicose Anidra [Dextrose] PA, Dinâmica[®]) e caseína ácido hidrolisada (Casein acid hydrolysate – vitamin free, Fluka – Sigma[®], St. Louis, EUA) nas proporções de carbono e nitrogênio 50:1.

Ao meio foi adicionado 0,1% de anti-espumante (Antifoam 204 - Sigma[®], St. Louis, EUA) antes da autoclavagem à 121°C por 20 minutos. Após o resfriamento foi suplementado com soluções a base de KH₂PO₄, 4,0 g; CaCl₂. 2H₂O, 0,8 g; MgSO₄. 7H₂O, 0,6 g; FeSO₄.7H₂O, 0,1 g; COCl₂. 6H₂O, 37 mg; MnSO₄. H₂O, 16 mg; ZnSO₄.7H₂O, 14 mg e uma mistura vitamínica de tiamina; riboflavina; pantotenato; niacina; piridoxamina; ácido tiotico (500 mg cada), e ácido fólico; biotina; vitamina B12 (50 mg cada) por litro de água destilada (Todos os reagentes foram obtidos da Sigma[®], St. Louis, EUA).

No meio de cultivo houve a adição de 500 mg L⁻¹ de pentabiótico (Pentabiótico de uso veterinário – Zoetis) para evitar contaminação por bactérias e o pH ajustado para 5,5 utilizando soluções de NaOH (1N) ou HCl(1N). Frascos Erlenmeyers de 250 mL (baffled flasks - Belco) contendo 90 mL do meio para pré-cultura foram inoculados inicialmente com 10 mL de uma suspensão fúngica de 5,0 x 10⁶ conídios / mL do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* obtidos de placa de Petri com solução aquosa estéril a 0,05 % de polioxietileno mono-oleato de sorbitano (Tween 80, Sigma[®], St. Louis, EUA). Estes frascos foram mantidos à 28 °C em mesa agitadora orbital (Modelo: MA140 CFT) a 325 rpm e homogeneizados a mão durante o período de crescimento fúngico para evitar formação de anel lateral e esporulação nas paredes do frasco. Após o tempo de incubação de 3 dias, esta pré-cultura foi então inoculada nos tratamentos compostos por meios “novos” descritos em três experimentos realizados neste estudo para seleção do meio líquido.

2.2.3 Seleção do meio líquido da cultura

Para seleção do meio líquido mais adequado para produção da maior densidade de blastosporos e biomassa do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae*, a ser escolhido para as investigações de fermentação bifásica, foram realizados três experimentos.

2.2.3.1 Produção de *M. anisopliae* sob condição de fermentação líquida com meios a base de caseína ácido hidrolisada e glicose

Inicialmente os meios utilizados para o primeiro experimento foram descritos por JACKSON e JARONSKI (2009) em que se utilizaram diferentes balanços de carbono e nitrogênio a partir de substratos de glicose e caseína ácido hidrolisada (Tabela 2.1) para obtenção de blastosporos e biomassa do fungo. Os procedimentos de pesagem, preparação dos meios, uso de antibiótico e ajuste do pH foram os mesmos adotados para a preparação da pré-cultura.

Após 3 dias de pré-cultura, 10 mL foram inoculados em frascos Erlenmeyers de 250 mL (baffled flasks) contendo 90 mL dos meios a serem testados para obter uma suspensão fúngica final de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ blastosporos / mL. A cultura foi mantida por 4 dias a 28 °C em mesa agitadora orbital a 325 rpm e homogeneizado diariamente à mão para evitar crescimento micelial e esporulação nas paredes dos frascos. A densidade de blastosporos foi determinada no 2º e 4º dia após a inoculação da pré-cultura, e no 4º dia, foi avaliado peso da biomassa fúngica.

Para contagem da concentração de blastosporos foi utilizado o método descrito por (JACKSON e JARONSKI, 2009), em que consiste na retirada de 1 mL do meio + propágulos de cada amostra para contagem microscópica em câmara de Newbauer (aumento 400x), em microscópio de contraste de fase (Axioscop 20 – Zeiss). A biomassa fúngica restante nos Erlenmeyer foi separada a partir de filtração em kitassato sob vácuo (compressor Prismatec - CO4OX0000300750 - Motor: ¼ cavalos, velocidade da pressão: $2,2 \text{ m}^3 / \text{h}$) em discos de papel filtro quantitativo Faixa Azul ø 11 cm poro médio 8 µm (J. Prolab) e pesado para obtenção do peso úmido. Em seguida os discos contendo as amostras foram acondicionados em estufa a 40 °C até peso constante para determinação da massa seca. O experimento foi repetido três vezes no tempo com dois frascos de cada tratamento por ciclo de fermentação.

Tabela 2.1. Meios líquidos com diferentes balanços de carbono e nitrogênio, utilizando glicose e caseína ácido hidrolisada segundo método descrito por (JACKSON e JARONSKI, 2009)

MEIOS	Relação C:N	Carbono g L ⁻¹	Glicose g L ⁻¹	Caseína g L ⁻¹
M1	10:1	8,0	10,0	10,0
M2	30:1	8,0	16,6	3,4
M3	50:1	8,0	18,0	2,0
M4	10:1	36,0	45,0	45,0
M5	30:1	36,0	75,0	15,0
M6*	50:1	36,0	81,0	9,0

Cálculos baseados em 40% de carbono em glicose e, 53% de carbono e 8% de nitrogênio em caseína ácido hidrolisada.

*M6- Meio usado como pré-cultura.

2.2.3.2 Produção de *M. anisopliae* sob condição de fermentação líquida com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose e sacarose) e nitrogênio (peptona de carne, peptona de soja e Extrato de levedura)

Com o intuito de selecionar ingredientes de baixo custo e ampliar as opções de substratos potenciais para uso na fermentação líquida, um segundo experimento foi realizado considerando metodologia descrita por JACKSON e JARONSKI (2009) com a substituição da glicose e caseína ácido hidrolisada por outros substratos. Assim, o meio M4 mais adequado para produção do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* no primeiro experimento foi utilizado como referência, substituindo-se a glicose por frutose e sacarose (Synth[®], São Paulo, Brasil) e a caseína ácido hidrolisada substituída por peptona de soja, peptona de carne e extrato de levedura (todos da HiMedia Laboratories[®], Mumbai, Índia) (Tabela 2.2).

Este experimento foi realizado de acordo com metodologia empregada no primeiro experimento, com alteração do período de avaliação, após inoculação da pré-cultura na cultura, que passou a ser diária para a concentração de blastosporos a partir do segundo dia (2º, 3º, 4º dia), finalizando com a extração da biomassa no último dia. O experimento foi repetido três vezes no tempo com dois frascos de cada tratamento por ciclo de fermentação.

Tabela 2.2. Meios líquidos testados contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio em substituição à glicose e caseína ácido hidrolisada utilizada por JACKSON e JARONSKI (2009).

MEIOS	Fonte de Carbono g L ⁻¹	Fonte de Nitrogênio g L ⁻¹
M4 glicose: caseína*	45,00	45,00
M6 glicose: caseína**	81,00	9,00
M7 sacarose: caseína	42,75	45,00
M8 frutose: caseína	45,00	45,00
M9 glicose: peptona soja	45,00	37,89
M10 glicose: peptona carne	45,00	30,50
M11 glicose: extrato de levedura	45,00	36,00

Cálculos baseados em:

Carbono: 40% em glicose; 40% em frutose; 42,11% em sacarose; 53% em caseína ácido hidrolisada

Nitrogênio: 8% em caseína ácido hidrolisada; 10% em extrato de levedura; 9,5% em peptona de soja; 11,8% em peptona de carne

*M4 - Meio referência selecionado no primeiro experimento de seleção de meio líquido

**M6 - Meio usado como pré-cultura.

2.2.3.3 Produção de *M. anisopliae* por fermentação líquida com meios à base de extrato de levedura com glicose ou sacarose

Neste terceiro experimento foram utilizados os meios M4, M6 e M11, selecionados do experimento anterior (Tabela 2.2) além do meio caracterizado como M12 apresentando 42,75 g L⁻¹ de sacarose e 36,0 g L⁻¹ de extrato de levedura. Este experimento foi realizado de acordo com mesma metodologia empregada no segundo experimento, por meio de avaliação diária da concentração de blastosporos a partir do segundo dia (2º, 3º, 4º dia) após inoculação da pré-cultura na cultura, finalizando com extração da biomassa no 4º dia. O experimento foi repetido três vezes no tempo com dois frascos de cada tratamento por ciclo de fermentação.

2.2.4 Preparação do meio líquido para inoculação nos sistemas bifásicos

O meio líquido M11 (Glicose : Extrato de levedura) que proporcionou maior produção dos blastosporos e de biomassa, foi selecionado para ser utilizado em um sistema bifásico de produção. Dez mL de suspensão fúngica a $5,0 \times 10^6$ conídios / mL de *M. anisopliae* ESALQ1037 com 0,05% de Tween® 80 foi inoculado em 90 mL de meio M11 em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Estes frascos foram acondicionados à 28 °C em mesa agitadora orbital a 325 rpm e homogeneizados manualmente e diariamente para evitar crescimento

micelial e esporulação nas paredes do frasco. Após incubação de 3 dias, este meio com $> 1,0 \times 10^8$ blastosporos / mL foi inoculado em substratos sólido (arroz e farelos) e materiais inertes (suportes de esporulação e crescimento).

2.2.5 Uso de arroz na fermentação bifásica de *M. anisopliae*

Após três dias de crescimento fúngico em meio líquido 3 mL da suspensão de *M. anisopliae* ESALQ1037 na concentração de 10^8 blastosporos / mL foi inoculado em sacos plásticos contendo 100g de arroz. Este tratamento foi comparado com inoculação de uma suspensão fúngica de 10^8 conídios / mL do mesmo isolado, sendo os conídios obtidos por raspagem de placas de Petri em meio BDA (Difco).

Após inoculação, os sacos foram lacrados com auxílio de um grampeador e incubados a 25 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 10 dias. Após incubação, os conídios foram extraídos do substrato por lavagem em água e quantificados através de contagem em câmara de Neubauer (aumento 400x), em microscópio de contraste de fase após 4, 7 e 10 dias. Foram utilizados nove sacos por tratamento sendo que após cada data de avaliação 3 sacos eram retirados para quantificação. O experimento foi repetido três vezes no tempo.

2.2.6 Uso de farelos na fermentação bifásica de *M. anisopliae*

Farelos selecionados em ensaios anteriores quanto ao aspecto e crescimento do fungo foram inoculados com blastosporos para o desenvolvimento de um sistema bifásico de produção. Estes foram comparados com inóculo à base de conídios e arroz como substrato. O meio M11 (a base de glicose e extrato de levedutra) foi preparado como descrito no segundo e terceiro experimentos de seleção do meio líquido (Tabela 2.2), enquanto que os substratos sólidos utilizados foram: Farelo de trigo (FT) 100%; Farelo de milho (FM) 100%; Farelo de Trigo (FT) 75% + Farelo de Arroz (FAR) 25%; Farelo de Trigo (FT) 75% + Farelo de Aveia (FAV) 25%. A fermentação em grãos de arroz foi utilizada como controle.

Três mL de suspensões de *M. anisopliae* ESALQ1037 a 10^8 blastosporos ou conídios / mL, foram inoculados em sacos plásticos contendo 100g de farelos e/ou suas misturas após autoclavagem. Os blastosporos foram obtidos após três dias de fermentação e os conídios obtidos por raspagem em placas de BDA após 10 dias de cultivo. Após a inoculação os sacos

foram grampeados e incubados a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 15 dias. Após crescimento fúngico, os conídios foram extraídos dos substratos e quantificados no último dia de incubação através de contagem microscópica em câmara de Newbauer (aumento 400x), em microscópio de contraste de fase. Foram utilizados três sacos por tratamento e o experimento foi repetido três vezes no tempo.

2.2.7 Uso de suportes inertes para crescimento e esporulação na fermentação bifásica de *M. anisopliae*

Neste estudo, avaliou-se a produção de conídios em substratos inertes de crescimento e esporulação inoculados com suspensões de blastosporos. Os suportes utilizados no experimento foram: bagaço da cana-de-açúcar autoclavado seco (após secagem em estufa por 48 horas) e autoclavado sem secar (sem secagem em estufa), vermiculita, tecido de lã, palha de arroz e maravalha.

Blastosporos de *M. anisopliae* ESALQ1037 foram produzidos em meio M11 (a base de glicose e extrato de levedura) preparado como descrito no segundo experimento de seleção de meio líquido (tabela 2.2). Suspensões de blastosporos foram então misturadas a meio completo (MC) líquido (PONTECORVO et al., 1953) na proporção de 1:3 para permitir o crescimento e a conidiogênese nos suportes inertes.

Cinquenta mL desta mistura na concentração de $2,5 \times 10^7$ blastosporos / mL foram adicionados a 11g de cada material inerte autoclavado (correspondente ao volume ocupado por 100g de arroz) por saco plástico. Após inoculação, as amostras foram acondicionadas em B. O. D e incubadas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E) durante 12 dias. Foram utilizados três sacos por tratamento e o experimento foi repetido três vezes no tempo.

2.2.8 Contagem do número de conídios

Após o período de incubação para crescimento fúngico, todas as amostras foram transferidas para frascos “Schotts” de 250 mL, com solução 0,1% Tween 80[®] e agitados vigorosamente em agitador orbital durante 30 minutos para remoção dos conídios. O material foi coado em peneira para separação dos conídios aéreos e quantificados em câmara de Newbauer (aumento 400x) no microscópio de contraste de fase (Axioscop 20 – Zeiss).

2.2.9 Análise estatística

Na seleção de meio líquido nos três experimentos de cada etapa, foi utilizada uma análise estatística clássica em que os dados foram transformados utilizando-se o verdadeiro valor de Lambda (λ) que em alguns casos assumiu-se valor de zero (0) para o qual foi utilizado a função logaritmo $Z(\lambda)=\lg[\sqrt{y}]$ e para valores diferentes de zero foi utilizada a função $\lambda=1/2$ ($z(\lambda)=y$) da transformação de Box Cox. Para realizar a análise de variância (ANOVA) foi necessário fazer cumprir as pressuposições do teste de normalidade de Shapiro wilk e do teste de homogeneidade de variância de Breush-Pagan. Na seleção do meio líquido, a variável “produção de blastosporos” utilizou-se uma análise conjunta, considerando o experimento num esquema de parcelas subdivididas em que o fator data era a subparcela. Para a análise da variável “biomassa fúngica”, nos experimentos da seleção do meio líquido não houve transformações dos dados, sendo utilizada uma análise conjunta quando necessária e cada experimento foi considerado um bloco casualizado.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado nos sistemas bifásicos montados em arroz, em farelos e suporte de crescimento com os tratamentos montados em triplicata, repetidos três vezes no tempo.

Nestes experimentos, para a variável “produção de conídios”, foi utilizada uma análise estatística clássica sem sofrer transformação dos dados, e utilizada uma análise conjunta dos experimentos quando era o caso, assumindo cada experimento como um bloco casualizado.

Em todos os experimentos, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey (HSD), descrito por Banzatto & Kronka (1989) dentre outros, que testa todos os possíveis contrastes entre duas médias ao nível de significância de 0,05. Todas as análises deste estudo foram realizadas no programa R Development Core team (versão: 2015).

2.3 Resultados e Discussão

Produção de *M. anisopliae* sob condição de fermentação líquida com meios a base de caseína ácido hidrolisada e glicose

A concentração máxima de blastosporos no meio M4 foi obtida após quatro dias de fermentação com transferência da pré-cultura atingindo $1,2 \times 10^8$ blastosporos / mL ($F=34,72$; $p<0,001$). A produção de blastosporos neste meio não diferiu estatisticamente da produção nos meios M5 e M6, mas foi superior à produção nos demais meios (M1, M2, M3) (Figura 2.1).

Figura 2.1. Produção de blastosporos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação líquida em substratos à base de caseína ácido hidrolisada e glicose com diferentes balanços de C:N durante 4 dias de cultivo, temperatura: $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitação: 325 rpm. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Descrição quantitativa das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas nos meios: (M1- C:N 10:1; [C=8 g L⁻¹] glicose: 10,0 g L⁻¹, caseína: 10,0 g L⁻¹); (M2- C:N 30:1; [C=8 g L⁻¹] glicose: 16,6 g L⁻¹, caseína: 3,4 g L⁻¹); (M3- C:N 50:1; [C=8 g L⁻¹] glicose: 18,0 g L⁻¹, caseína: 2,0 g L⁻¹); (M4- C:N 10:1; [C=36 g L⁻¹] glicose: 45,0 g L⁻¹, caseína: 45,0 g L⁻¹); (M5- C:N 30:1; [C=36 g L⁻¹] glicose: 75,0 g L⁻¹, caseína: 15,0 g L⁻¹); (M6- C:N 50:1; [C=36 g L⁻¹] glicose: 81,0 g L⁻¹, caseína: 9,0 g L⁻¹).

A transferência da pré-cultura para os meios caracterizados pelos diferentes balanços de carbono e nitrogênio incrementou rapidamente a produção de blastosporos. No meio M4 a concentração no 2º dia após inoculação da pré-cultura já era quase 100 vezes maior que o número inicial de blastosporos ($1,0 \times 10^6$ blastosporos / mL). Estes resultados concordam com trabalho de MASCARIN et al. (2015a) que observaram uma concentração de blastosporos de $1,0 \times 10^9$ blastosporos / mL em 2 a 3 dias de fermentação em meios líquidos com isolados de *Isaria fumosoroseus* e *Beauveria bassiana*. Jackson & Jaronski, (2009) utilizando os mesmos meios de cultivo para o isolado MA1200 de *M. anisopliae* obtiveram concentrações de blastosporos em torno de $1,6$ e $4,8 \times 10^8$ blastosporos / mL em 4 e 8 dias respectivamente. Fargues, (2002) estudando a produção de *Metarhizium flavoviride* por fermentação líquida, verificaram que o meio proposto por JACKSON et al. (1997), possuindo 80 g L^{-1} glucose e $13,2\text{ g L}^{-1}$ caseína ácido hidrolisada, resultou na produção de $1,4 \times 10^8$ e $1,4 \times 10^7$ blastosporos

/ mL dos isolados Mf189 e Mf324, respectivamente após 3 dias de cultivo. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo utilizando o meio M4 (45g L⁻¹ glicose e 45g L⁻¹ caseína ácido hidrolisada) para o mesmo período de incubação.

Observou-se menor incremento de blastosporos nos meios mais pobres em carbono (8g L⁻¹) como M1, M2 e M3 ao passo que nos meios que apresentavam maior quantidade de carbono (36g L⁻¹) a produção foi maior.

Na produção de biomassa, houve diferença significativa quanto aos meios testados (F=282.5; $p < 0,001$), sendo que o M4 foi o que apresentou maior produção de biomassa, numa média entre os dois experimentos de 27,5g L⁻¹, seguido de M5 com produção de 15,0g L⁻¹. Os meios M1, M2 e M3 apresentaram menor incremento da biomassa sem ao menos alcançar 10g L⁻¹ (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Peso seco da biomassa produzida pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação líquida em substratos à base de caseína ácido hidrolisada e glicose com diferentes balanços de C:N durante 4 dias, temperatura: $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitação: 325 rpm.

Experimentos	Meios Líquidos	Biomassa (g L ⁻¹)
1	M1 (10:1) [C:8g L ⁻¹]	9,3±1,1 CD
	M2 (30:1) [C:8g L ⁻¹]	5,6±0,5 DE
	M3 (50:1) [C:8g L ⁻¹]	2,5±0,04 E
	M4 (10:1) [C:36g L ⁻¹]	27,1±0,9 A
	M5 (30:1) [C:36g L ⁻¹]	16,7±2,8 B
	M6 (50:1) [C:36g L ⁻¹]	10,4±1,5 C
2	M1 (10:1) [C:8g L ⁻¹]	7,0±0,4 D
	M2 (30:1) [C:8g L ⁻¹]	2,4±0,4 E
	M3 (50:1) [C:8g L ⁻¹]	1,4±0,2 F
	M4 (10:1) [C:36g L ⁻¹]	27,5±0,03 A
	M5 (30:1) [C:36g L ⁻¹]	13,4±0,3 B
	M6 (50:1) [C:36g L ⁻¹]	8,2±0,7 C

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A produção de biomassa em meios líquidos para inoculação nos meios sólidos é de grande importância para o resultado final na fermentação bifásica. A produção de biomassa neste estudo foi semelhante aos resultados de JACKSON & JARONSKI (2009) em que os meios com menor concentração de carbono (8g L⁻¹) também apresentaram menor acúmulo da biomassa quando comparado aos meios com maior concentração de carbono (36g L⁻¹).

Também foi observado um ligeiro aumento de biomassa em meios com menor relação C: N pela maior quantidade de nitrogênio (tratamentos M1 e M6). As fontes de carbono são necessárias para a germinação desses fungos, entretanto as fontes de nitrogênio são as que favorecem o crescimento micelial, uma vez que a reserva de nitrogênio no interior do conídio é insuficiente para o desenvolvimento dos micélios (SANTORO et al., 2005).

Na análise visual dos seis meios observou-se que o aspecto e a textura foram bem distintos entre os meios. Nos meios M1, M2, M3 e M6 houve pouca formação de micélios durante todo período de incubação, já o meio M4 e M5 ocorreu formação considerável de micélios sendo que o M4 apresentou maior formação de blastosporos em relação a micélios do que o meio M5, enquanto este último se apresentou mais viscoso ao final do período de incubação.

Foi verificado neste estudo e também considerado por JACKSON & JARONSKI (2009), baixa produção comercial de blastosporos quando considerado o tipo de fermentação e o isolado. A produção de blastosporos pode ter sido limitada pelas próprias condições nutricionais dos meios, volume de meio disponível e apropriado à área superficial do frasco, além da agitação que leva à disponibilidade de oxigênio dissolvido nas amostras aliado à concentração de carbono (JACKSON, 2012). MASCARIN et al. (2015b), estudando o efeito do oxigênio dissolvido com o aumento da agitação dos meios e alta concentração de glicose (140g L^{-1}), observaram o aumento significativo da concentração de blastosporos para dois isolados de *Beauveria bassiana* ($2,9 \times 10^9$ blastosporos / mL), além da obtenção de propágulos em apenas 3 dias de fermentação. Para estes autores, o aumento da concentração de carbono aliado a altos níveis de oxigênio dissolvido, e volume baixo de meio em maior área superficial para difusão de oxigênio nos frascos é responsável pela baixa produção de hifas, menor viscosidade do meio, rápida obtenção de blastosporos e maior incremento da biomassa. Ottati-de-Lima et al. (2014) também confirmaram melhores resultados na produção de blastosporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* diminuindo a concentração de nitrogênio e elevando os níveis de carbono.

Produção de *M. anisopliae* sob condição de fermentação líquida com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose e sacarose) e nitrogênio (peptona de carne, peptona de soja e Extrato de levedura)

Na seleção de meios líquidos com diferentes fontes de carbono e nitrogênio houve diferença significativa entre os meios testados ($F=1.706$; $p=0.0866$), sendo que o meio M11 (Glicose : Extrato de levedura) foi o que resultou em maior incremento da produção de

blastosporos em relação aos demais meios ($3,5 \times 10^8$ blastosporos / mL) (Figura 2.2). Os meios enriquecidos com outras fontes de carbono (sacarose e frutose) e nitrogênio (peptona de carne e peptona de soja) também apresentaram rápido aumento na concentração de blastosporos a partir do 2º dia de incubação, entretanto não ultrapassaram $1,5 \times 10^8$ blastosporos / mL. O M4 a base de glicose e caseína ($45: 45 \text{ g L}^{-1}$) alcançou produção de $2,3 \times 10^8$ blastosporos / mL e o meio M6 também a base de glicose e caseína ($81: 9 \text{ g L}^{-1}$) foi o que apresentou menor produção de blastosporos quando comparado aos demais meios.

Figura 2.2. Produção de blastosporos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação líquida em diferentes substratos fontes de carbono e nitrogênio durante 4 dias, temperatura: $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitação: 325 rpm. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Descrição quantitativa das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas nos meios: (M4- Glicose: $45,0 \text{ g L}^{-1}$, Caseína: $45,0 \text{ g L}^{-1}$); (M6- Glicose: $81,0 \text{ g L}^{-1}$, Caseína: $9,0 \text{ g L}^{-1}$); (M7- Sacarose: $42,75 \text{ g L}^{-1}$, Caseína: $45,0 \text{ g L}^{-1}$); (M8- Frutose: $45,0 \text{ g L}^{-1}$, Caseína: $45,0 \text{ g L}^{-1}$); (M9- Glicose: $45,0 \text{ g L}^{-1}$, Peptona de Soja: $37,89 \text{ g L}^{-1}$); (M10- Glicose: $45,0 \text{ g L}^{-1}$, Peptona de Carne: $30,50 \text{ g L}^{-1}$); (M11- Glicose: $45,0 \text{ g L}^{-1}$, Extrato de Levedura: $36,0 \text{ g L}^{-1}$).

Foi observado que o meio M11 (Glicose : Extrato de levedura) permitiu produção de blastosporos três vezes maior do que o meio M4 já no 2º dia de incubação. O extrato de levedura, fonte de proteína do meio M11, é composto por concentração de componentes

celulares solúveis, proteínas, fibras e minerais (BEHALOVÁ et al., 1991), e que ainda foram misturados a vitaminas que foram descritas na metodologia do presente estudo.

Ortiz-Urquiza et al. (2010) também utilizaram diferentes fontes de carbono e nitrogênio para a produção de *M. anisopliae*, e observaram que o meio Adamek e boa parte dos meios compostos por extrato de levedura como fonte de nitrogênio foram os mais adequados para produção de blastosporos num grupo de meios composto por Frutose:extrato de levedura e glicose:extrato de levedura, além dos meios com peptona micológica combinada à glicose e à frutose.

O meio M11 (Glicose : Extrato de Levedura) também foi o meio que resultou em maior produção de biomassa ($34,6\text{g L}^{-1}$) dentre os meios testados ($F=100.3$; $p<0,001$), seguido por M9 (Glicose : Peptona soja) com $31,2\text{g L}^{-1}$ e diferenciando significativamente do meio referência M4 que teve produção de $27,7\text{g L}^{-1}$. O M6 foi o que apresentou menor incremento na produção de biomassa (Tabela 2.4).

Os meios enriquecidos com glicose como fonte de carbono e peptonas de carne, soja e extrato de levedura como fontes de nitrogênio foram os que resultaram em maiores produções de biomassa, sendo ainda superiores ao meio M4 utilizado como referência.

Tabela 2.4. Peso seco da biomassa produzida pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação líquida com diferentes fontes de carbono e nitrogênio após 4 dias, temperatura: $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitação: 325 rpm.

Meios Líquidos	Biomassa (g L^{-1})
M4 Glicose:Caseína	$27,7 \pm 2,9$ C
M6 Glicose:Caseína	$11,6 \pm 1,0$ D
M7 Sacarose:Caseína	$27,9 \pm 3,4$ C
M8 Frutose:Caseína	$26,6 \pm 3,8$ C
M9 Glicose:Peptona Soja	$31,2 \pm 1,2$ AB
M10 Glicose:Peptona Carne	$29,1 \pm 2,8$ BC
M11 Glicose:Extrato de Levedura	$34,6 \pm 2,6$ A

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A busca por fontes de carbono e nitrogênio mais acessíveis economicamente podem potencializar o processo de fermentação. As fontes de nitrogênio são um dos constituintes desses meios mais caros, principalmente caseína, hidrolisados de soja ou proteínas de carne,

podendo ser substituído por farinha de algodão ou soja, que são alternativas mais rentáveis na produção massal desses agentes microbianos (MASCARIN et al., 2014; MASCARIN et al., 2015a). Nos trabalhos de Fargues et al. (2002) e Ortiz-Urquiza et al. (2010), os autores sugeriram meios de cultivo como Adamek, Jenkins-Prior e Catroux como meios de composição simples e baixo custo podendo ser feitas algumas adaptações para produção massal de *M. anisopliae* em cultivos submersos.

Produção de *M. anisopliae* por fermentação líquida com meios à base de extrato de levedura com glicose ou sacarose

O meio de cultivo M11 (Glicose : Extrato de levedura) foi o que apresentou melhor produção desde o segundo dia de incubação, atingindo $2,98 \times 10^8$ blastosporos / mL no 4º dia ($F=9.92e-08$; $p= 0,001$), seguido de M12 (Sacarose : Extrato de levedura) com produção de $2,52 \times 10^8$ blastosporos / mL. O meio referência M4 apresentou produção de $1,34 \times 10^8$ blastosporos / mL e M6 alcançou $4,95 \times 10^7$ blastosporos / mL (Figura 2.3).

Figura 2.3. Produção de blastosporos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação líquida submersa em diferentes substratos fontes de carbono e nitrogênio durante 4 dias, temperatura: $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitação: 325 rpm. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Descrição quantitativa das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas nos meios: (M4- Glicose: $45,0 \text{ g L}^{-1}$, Caseína: $45,0 \text{ g L}^{-1}$); (M6- Glicose: $81,0 \text{ g L}^{-1}$, Caseína: $9,0 \text{ g L}^{-1}$); (M11- Glicose: $45,0 \text{ g L}^{-1}$, Extrato de levedura: $36,0 \text{ g L}^{-1}$); (M12- Sacarose: $42,75 \text{ g L}^{-1}$, Extrato de levedura: $36,0 \text{ g L}^{-1}$).

Com o objetivo de otimizar a produção de blastosporos e biomassa com a substituição de fontes de carbono e nitrogênio inicialmente proposto por Jackson & Jaronsky (2009), utilizando componentes de menor custo, este experimento demonstrou que o uso de novos substratos, especialmente Glicose : Extrato de levedura foram promissores para o cultivo do isolado de *M. anisopliae*. Neste meio foi possível a obtenção de mais que o dobro de blastosporos já no 3º dia de incubação quando comparado ao M4, meio proposto por Jackson & Jaronsky (2009), mostrando a importância de se investigar os diferentes componentes nutricionais que incrementam a produção de propágulos de diferentes isolados via fermentação líquida.

Mascarin et al. (2015a) ao optar por novas fontes de nutrientes para *B. bassiana* e *I. fumosorosea* observaram que o meio composto por glicose e farinha de semente de algodão, caracterizou-se como um meio de baixo custo, com produção rápida de alta concentração de blastosporos ($> 1,0 \times 10^9$ blastosporos / mL) e biomassa em relação aos meios suplementados com caseína ácido hidrolisada para os isolados destes fungos, sendo considerado pelos autores como um meio de cultivo menos dispendioso e que promoveu resultados ainda melhores na produção dos fungos quando comparado à caseína, que é um substrato considerado mais refinado e de custo mais elevado.

É importante destacar que a concentração de blastosporos obtida do isolado estudado ainda é menor do que a produção de blastosporos de outros fungos com *I. fumosorosea* e *B. bassiana*, entretanto o uso alternativo dos blastosporos resultantes destes meios em sistemas de produção bifásica pode ser fundamental para aumentar o rendimento e velocidade de produção de conídios em meios sólidos.

Quanto ao incremento da biomassa, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($F= 91,5817$; $p= 0,0001$), com exceção do M6, que desde a primeira fase de seleção dos meios, não se apresentou como bom meio para produção de biomassa. Os meios M11 (Glicose : Extrato de levedura) e o M12 (Sacarose : Extrato de levedura) resultaram na produção de mais de 28g L^{-1} de biomassa (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Peso seco da biomassa produzida pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação líquida em diferentes fontes de carbono e nitrogênio após 4 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e 325 rpm.

Meios Líquidos	Biomassa (g L^{-1})
M4 Glicose:Caseína	$25,6 \pm 1,8$ A
M6 Glicose:Caseína	$12,5 \pm 1,7$ B
M11 Glicose:Extrato de levedura	$29,0 \pm 1,2$ A
M12 Sacarose:Extrato de levedura	$28,6 \pm 2,0$ A

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Uso de arroz na fermentação bifásica de *M. anisopliae*

Na produção de *M. anisopliae* por fermentação em arroz, foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos inoculados com blastosporos ($F = 22.457$; $p = 0.00669$) e com conídios ($F = 22.436$; $p = 0.0067$), sendo que as amostras inoculadas com blastosporos apresentaram maior esporulação do fungo em todas as avaliações (Figura 2.4). A produção do fungo foi mais rápida quando inoculado com blastosporos não sendo observado aumentos significativos entre 7 e 10 dias de fermentação. Quando inoculados com conídios a esporulação continuou aumentando de 7 para 10 dias, mas ainda foi menor do que nas amostras inoculadas com blastosporos.

Figura 2.4. Produção de conídios aéreos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* em arroz inoculado com 3 mL de suspensão de 10^8 conídios ou blastosporos / mL em 100 g de substrato, e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 10 dias. Letras maiúsculas referem-se à comparações entre conídios ou blastosporos, enquanto letras minúsculas referem-se à comparações entre dias de

incubação. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A produção mais rápida nas amostras inoculadas com blastosporos se deve provavelmente pela germinação mais rápida destes propágulos em relação aos conídios (MASCARIN et al., 2015b). Foi possível demonstrar a viabilidade do uso de blastosporos de *M. anisopliae* para inoculação em arroz, encurtando o tempo de incubação do substrato sólido, proporcionando maior produção de conídios que só poderiam ser obtidos num período de incubação de até 12 dias para arroz e 15 dias para substratos como farelos. A possibilidade de redução do período de incubação favorece o aumento dos ciclos de produção já que tanto o tempo de incubação diminui como aumenta também a disponibilidade de espaço para gestão do produto final nas biofábricas.

Uso de farelos na fermentação bifásica de *M. anisopliae*

Na fermentação em farelo de trigo inoculado com blastosporos a produção foi superior a outros tratamentos como 100% farelo de milho e 75% farelo de trigo + 25% farelo aveia chegando a uma produção de $1,2 \times 10^9$ conídios / g farelos. Quando os substratos foram inoculados com conídios não se observou diferenças entre os tratamentos atingindo $7,8 \times 10^8$ conídios / g farelos no tratamento FT (75%) + FAR (25%). Em nenhum dos substratos observou-se diferença significativa entre blastosporos e conídios ($F=0.321$; $p=0.856$). A menor produção de conídios nas duas formas de inoculação foi observada em farelo de milho (Figura 2.5).

Figura 2.5. Produção de conídios aéreos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* em arroz e farelos quando inoculado com 3 mL de suspensão com 10^8 conídios ou blastosporos / mL em 100 g de substratos, e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 15 dias. Letras minúsculas referem-se à comparações entre substratos para cada tipo de inóculo, enquanto letras maiúsculas referem-se à comparações entre blastosporos e conídios para cada substrato utilizado. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Neste estudo não foi possível observar maior concentração de conídios nos tratamentos inoculados com blastosporos comparados aqueles inoculados com conídios, incluindo o arroz em grãos. Isto provavelmente se deve ao fato que a quantificação foi conduzida após 15 dias de fermentação e embora a produção nos substratos tenha sido mais rápida nos tratamentos inoculados com blastosporos após certo tempo a produção é igualada nos dois tipos de inóculo.

Machado et al. (2010), estudando a combinação de meios líquidos obtidos de resíduos agro-industriais a meios sólidos à base de grãos e seus derivados para a produção de *Lecanicillium lecanii*, obteve aumento na produção dos conídios na ordem de 10^9 conídios / g em combinações feitas a partir do soro de queijo + farelo de trigo (70%) + trigo em grão (30%).

Ao pensar em montar um sistema bifásico é importante considerar todas as etapas envolvidas no processo de produção, uma vez que, alguns substratos podem exigir maior mão de obra. Assim, é necessário considerar o valor do substrato e o manuseio envolvido na preparação de um único substrato ou suas misturas.

Uso de suportes inertes para crescimento e esporulação na fermentação bifásica de *M. anisopliae*

Na produção de *M. anisopliae* em meio líquido e posterior transferência para suportes inertes de crescimento e esporulação, foi observado que o melhor substrato foi o bagaço de cana-de-açúcar autoclavado seco que resultou na produção de $5,80 \times 10^8$ conídios / g de substrato ($F=117.884$; $p=0.00841$) (Tabela 2.6). A vermiculita e o tecido de lã permitiram esporulação bem menos expressiva, $2,12$ e $0,58 \times 10^8$ conídios / g, respectivamente. Nos tratamentos compostos por bagaço de cana-de-açúcar autoclavado sem secar, palha de arroz e maravalha foi possível observar crescimento micelial do fungo 3 dias após inoculação do meio líquido, entretanto, não resultou em produção de conídios.

Tabela 2.6. Produção de conídios aéreos pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* em 50 mL de meio contendo $2,5 \times 10^7$ blastosporos / mL colocados em 11g de material utilizados como suportes de crescimento e esporulação e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L: E), durante 10 dias.

Suporte de crescimento e esporulação	Conídios/mL de meio ($\times 10^7$)	Conídios/g material inerte ($\times 10^8$)
Vermiculita	$4,62 \pm 0,03$	$2,12 \pm 0,5$ B
Bagaço de cana-de-açúcar autoclavado seco	$8,04 \pm 0,3$	$5,14 \pm 0,8$ A
Tecido de Lã	$1,44 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,1$ C

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Considerando a média convencional de produção de ESALQ1037 de *M. anisopliae* de $5,0 \times 10^8$ conídios / g arroz, foi possível obter neste experimento com bagaço de cana concentração de conídios aéreos por grama de substrato superior, já que a produção foi de 8×10^7 conídios / mL de meio, mas o meio de cultura líquido utilizado contém aproximadamente 9% de peso de ingredientes em volume de água. Assim foi possível obter concentração expressiva de propágulos fúngicos em um material “leve” e de pouco valor agregado em relação ao arroz.

A concentração de conídios obtida em relação à concentração inicial de blastosporos no meio líquido inoculado em vermiculita e bagaço de cana-de-açúcar autoclavado seco aumentaram 1,84x e 3,22x respectivamente, após o período de incubação, enquanto que no tecido de lã não houve aumento do número de conídios em relação ao inóculo inicial.

Os suportes de crescimento apresentam características específicas que determinaram a produção de conídios. O bagaço de cana-de-açúcar autoclavado seco promoveu a maior produção de conídios enquanto que o bagaço de cana-de-açúcar autoclavado sem secar não permitiu a conidiogênese do fungo. No tecido de Lã houve esporulação apenas no lado do tecido que oferecia uma maior área para esporulação, enquanto que a parte do forro do tecido é mais compacta e o fungo não se desenvolveu, provavelmente pela melhor difusão de ar e trocas gasosas na região mais porosa do tecido. A vermiculita, que é um material leve e poroso, poderia favorecer a conidiogênese, no entanto apresentou elevada e rápida absorção do meio líquido quando inoculado, e o meio sendo retido internamente nas partículas do material inerte provavelmente não permitiu o crescimento significativo e esporulação do fungo. É importante o estudo específico da adequabilidade dos suportes de crescimento e

esporulação aos isolados tanto em relação à estrutura física quanto a composição de cada material considerado “inerte”, uma vez que o próprio material pode liberar substâncias tóxicas que podem ser deletérias para o fungo.

Todos os suportes receberam a mesma quantidade de inóculo, por isso as diferenças observadas no crescimento fúngico devem estar diretamente ligadas aos inertes. A quantidade de inóculo não seria o único parâmetro que permitiria a maior esporulação em sistema bifásico, principalmente neste estudo em que o único recurso que o fungo utilizou foi os nutrientes disponíveis no meio líquido, diferente dos sistemas em que a semeadura ocorre em substratos sólidos. Já nos sistemas bifásicos envolvendo substratos líquidos e sólidos, a reduzida esporulação dos fungos pode estar relacionada ao tempo de incubação não apropriado ao sistema de fermentação, período inadequado para cultivo do meio líquido antes da semeadura em meio sólido e quantidade de inóculo líquido não suficiente para semear o substrato sólido (MACHADO et al., 2013; e MORAES et al., 2014).

O estudo dos custos de produção em meio líquido e inoculação em suportes de crescimento é necessário, para verificar a viabilidade deste sistema de fermentação quando comparado aos insumos empregados na fermentação sólida. Foi possível demonstrar neste estudo que o bagaço de cana, resíduo agroindustrial prontamente disponível pode ser mais uma alternativa na produção em larga escala deste agente de biocontrole.

Referências

- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S.N. Experimentação agrícola. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 247p.
- BÉHALOVÁ, B.; BLÁHOVÁ, M.; SILLINGER, V.; MACHEK, F. Comparison of various ways if extraction of nucleic acids and of preparation of yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. **Acta Biotechnologica**, United Kingdom, v. 11, n. 6, p. 547-552, 1991.
- FARGUES, J.; SMITS, N.; VIDAL, C.; VEY, A.; VEGA, F.; MERCADIER, G.; QUIMBY, P. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 154, n.3, p. 127–138, 2002.
- JACKSON M. A; MCGUIRE M. R; LACEY L. A; WRAIGHT S. P. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 35 – 41, 1997.
- _____. DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S.T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 129–145, 2010.
- _____. JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, n. 8, p. 842 – 850, 2009.
- _____. SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. **Mycology Research**. Cambridge, v. 99, n. 7, p. 879-884, 1995.
- _____. JARONSKI S. T. Development of pilot-scale fermentation and stabilization processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. *Biocontrol Science and Technology*, Oxford, v. 22, n. 8, p. 915 -930. 2012.
- KUMAR, M.; CHOUDARY, S.; SHAHI, S. K.; SHAHI, M. P. Standartization of different substrates for the mass production of conidial yield of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Plant Archives**, Heonra-Saifai, Etawah, v. 7, n. 2, p. 719-720, 2007.
- LOUREIRO E. S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; MENDES, J. M.; PESSOA, L. G. A. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da

- cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), em condições de campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n. 1, p.47-53, 2012.
- MACHADO, A. C. R.; MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C. Crop optimization and pre-steps standardization to get a *Bipolaris euphorbiae*-based bioherbicide. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 392-399, 2013.
- _____. MONTEIRO, A. C.; ALMEIDA, A. M. B.; MARTINS, M. I. E. G. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 10, p. 1157-1163, 2010.
- MASCARIN, G. M.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Culture Media Selection for Mass Production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinose*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n. 4: p.753-761, 2010.
- _____. JACKSON M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 127, n. 1, p.11-20, 2015a.
- _____. JACKSON, M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DUNLAP C. A.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied Microbiololy and Biotechnology**, Berlin, v. 99, n. 16, p. 6653-6665, 2015b.
- _____. KOBORI, N. N.; QUINTELA, E. D.; • ARTHURS , S. P.; • DELALIBERA JÚNIOR, I. Toxicity of non-ionic surfactants and interactions with fungal entomopathogens toward *Bemisia tabaci* biotype B. **BioControl**, Dordrecht, v. 59, p.111–123, 2014.
- MORAES, C.;MONTEIRO, A. C.; MACHADO, A. C. R.; BARBOSA, J. C.; MOCHI, D. A. Production of a bioherbicide agent in liquid and solid medium and in a bifhasic cultivation system. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 255-264, 2014.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas daninhas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p. 7-14, 2009.
- ORTIZ-URQUIZA, A.; GARRIDO-JURADO, I.; BORREGO, A.; QUESADA-MORAGA, E. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of

- fungus secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). *Pest Management Science*, New York, v. 66, n. 7, p. 725 – 735, 2010.
- OTTATI-DE-LIMA, E. L.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. de; GASSEN, M. H., WENZEL, I. M.; ALMEIDA, A. M. B. de; ZAPPELLINI, L. O. Liquid production of entomopathogenic fungi and ultraviolet radiation and temperature effects on produced propagules. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 4, p. 342-350, 2014.
- PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: An overview. **Science Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 5, p. 420-429, 2014.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MacDONALD K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances Genetics**. New York, v. 5. p. 141-238. 1953.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2015. Disponível em: < <https://www.R-project.org/> >. Acesso em: 20 Outubro 2015.
- SANTORO, P.H.; NEVES, P.M. de O.J.; SILVA, R. Z. da; Akimi, S.; Zorzetti, J. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. num Processo bifásico utilizando Diferentes Meios Líquidos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n. 3, p.313-320, 2005.
- SANTOS, P de S.; SILVA, M. A. Q. da; MONTEIRO, A. C.; GAVA, C.A.T. Selection of surfactant compounds to enhance the dispersion of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 22. n. 3, p. 281-292, 2012.
- SRIKANTH, J. & SANTHALAKSHMI. Effect of Media Additives on the Production of *Beauveria brongniartii* an Entomopathogenic Fungus of *Holotrichia serrata* G. **Sugar Tech**, Berlin, v. 14, n. 3, p. 284–290, 2012.
- ST. LEGER, R. J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, n. 3, p. 271–276, 2008.
- WENZEL, I. M., MONTEIRO, A. C., PEREIRA, G. T. Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, Jaboticabal, v.34, n. 1, p.7-14, 2006.

3. ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO MASSAL DE *Metarhizium anisopliae* (METCH.) SOROKIN (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA

Resumo

O objetivo do presente estudo foi desenvolver alternativas a serem implementadas no sistema de produção de *Metarhizium anisopliae* por fermentação sólida visando o incremento da produção de conídios por volume de substrato com redução do tempo de fermentação e da mão de obra. Foi avaliada a esterilização dos substratos por aquecimento a 100°C como substituto à autoclavagem, uso de farelos como substituto ao arroz em grãos, adição de materiais inertes e não-inertes para separação dos grãos de arroz e aeração e lavagem do arroz em água como substituto à extração dos conídios por peneiramento. A adição ao arroz de bagaço de cana-de-açúcar e esponja vegetal umedecidos antes de autoclavar ou de maravalha sem umedecer autoclavada separadamente do arroz, resultou em aumento na produção de conídios. O aquecimento do arroz a 100°C por 10 e 15 minutos promoveu a produção de conídios semelhante à autoclavagem e sem contaminação. O farelo de trigo foi o substrato mais promissor para a produção do fungo, especialmente quando misturado ao farelo de arroz. Conídios extraídos do arroz por lavagem em água e recuperados com ou sem a adição de inertes (argilas, terra de diatomácea e caulim) apresentaram viabilidade semelhante ou superior aos conídios extraídos por peneiramento antes do armazenamento. Na maioria dos tratamentos, os conídios recuperados com inertes apresentaram maiores valores de viabilidade após 60 dias do que os recuperados sem inertes. Exceto a extração por lavagem sem inertes, em todos os outros métodos de extração os conídios não apresentaram redução da viabilidade (>92%) após armazenamento por 60 dias a 22°C e 97% UR. Os conídios extraídos por peneiramento e os recuperados com terra de diatomácea, caulim ou argila preta apresentaram viabilidade >91% após 60 dias a 22°C e 97% UR e 4°C e 0% UR. As estratégias testadas neste estudo podem ser adaptáveis à produção em larga escala de *M. anisopliae* por fermentação sólida.

Palavras-chave: Controle microbiano; Fungos entomopatogênicos; Produção de conídios; Viabilidade; Armazenamento

Abstract

The aim of this study was to develop alternatives to be implemented in *Metarhizium anisopliae* production system by solid fermentation for increased yield of conidia per substrate volume with reduced fermentation time and labor. It was evaluated the sterilization of substrates by heating at 100 °C as a substitute for autoclaving, the use of bran as a substitute for rice grains, addition of inert and non-inert materials for separating the rice grains for aeration, rice washing in

water as a substitute the extraction of conidia by sieving. The addition to rice of sugarcane bagasse and loofah wet before autoclaving or wood shavings autoclaved separately of the rice without moisture resulted in increased production of conidia. Heating the rice at 100 °C for 10 and 15 minutes promoted the production of conidia similar to autoclaving and without contamination. The wheat bran was the most promising substrate for producing the fungus, especially when mixed with rice bran. Conidia extracted from rice by washing in water and recovered with or without the addition of inert materials (clays, diatomaceous earth and kaolin) showed similar or greater viability than the conidia extracted by sieving before storage. In most treatments, the conidia recovered with inert show greater viability values after 60 days than the ones recovered without inert. Except for the extraction by washing without inert in all other extraction methods conidia presented no decrease in viability (> 92%) after storage for 60 days at 22 °C and 97% RH. The conidia extracted by sieving and recovered with diatomaceous earth, kaolin and black clay showed viability > 91% after 60 days at 22°C and 97% RH and at 4°C and 0% RH. The strategies tested in this study can be adapted to the large scale production of *M. anisopliae* by solid fermentation.

Keywords: Microbial control; Entomopathogenic fungi; Conidia production; Viability; Storage

3.1 Introdução

No cenário atual, o Brasil é o maior consumidor mundial de pesticidas químicos agrícolas (MILHORANCE, 2015; SILVA, 2015). O mercado de pesticidas microbianos encontra-se em franca expansão, mas ainda representa uma fração muito pequena do mercado global de pesticidas. Dentre os agentes de biocontrole, a utilização de fungos entomopatogênicos apresenta vantagens como o amplo espectro de ação podendo ser usado para diversas pragas, entretanto a produção em larga escala, formulação e período de prateleira ainda apresentam grandes desafios.

O método usado na produção no Brasil basicamente consiste na fermentação estática usando o arroz como substrato (WENZEL et al., 2006; KUMAR et al., 2007). O arroz apresenta várias vantagens sobre outros grãos como o balanço nutricional adequado, ampla disponibilidade, retenção de umidade e manutenção da estrutura dos grãos após autoclavagem e colonização dos fungos, além de facilidade na extração dos conídios (MORANDI & BETTIOL, 2009; SENE et al., 2010).

Poucos estudos com o objetivo de automatizar etapas da produção por fermentação sólida, redução da mão de obra e aumento da eficiência na conversão de substrato em conídios foram publicados. Neste contexto, o estudo de metodologias para otimização da produção é necessário. As etapas da produção que podem ser melhoradas são: i) substituição

do método de autoclavagem por estratégias de esterilização mais rápidas, baratas e fáceis, ii) substituição do arroz por substratos que permitam aumento do volume de fermentação por unidade de produção, iii) utilização de estratégias para aumentar o espaço de esporulação permitindo maior aeração do substrato, iv) desenvolvimento de técnicas de recuperação dos propágulos fúngicos.

A busca pela substituição do arroz como substrato seja por outros cereais em grão ou na forma de farelos assim como resíduos agroindustriais tem sido uma constante (MACHADO et al., 2009; SENE et al., 2010; LATIFIAN et al., 2013). A utilização de farelos pode ser uma alternativa viável, uma vez que apresenta custo relativamente menor em relação ao arroz. Esse produto por ser mais leve pode permitir um aumento da produção de conídios por peso de substrato, apresentando maior área de superfície para crescimento fúngico e maiores áreas para trocas gasosas quando comparado ao arroz.

O método de esterilização dos substratos convencionalmente empregado é a autoclavagem, entretanto, esta técnica em larga escala requer maior investimento na compra e manutenção dos equipamentos para suprir os inúmeros ciclos de produção. A adoção de técnicas como a esterilização por calor úmido sem pressão e ozonização pode reduzir custos e o tempo de processamento, além de ser uma técnica que pode ser escalonada de forma mais rápida com o uso de equipamentos menos onerosos.

A produção de conídios no arroz está limitada à área de superfície dos grãos para esporulação, sendo que a maior parte dos nutrientes da parte interna destes grãos não é utilizada durante o crescimento fúngico. A liberação de amido entre os grãos limita o espaço para esporulação e para trocas gasosas acumulando CO₂. Isto torna difícil o aumento do volume de arroz por unidade de produção. Uma possibilidade seria a adição de materiais inertes, que permitem o aumento da área de superfície do substrato e cria interstícios para troca gasosa no microambiente da amostra, impedindo a compactação de grandes volumes de substratos (LIU et al., 2007; SENE et al., 2010).

A recuperação de conídios é uma etapa crucial sendo realizada comumente por peneiramento após secagem prévia do arroz+fungo em ambiente com desumidificadores. A secagem dos conídios pode também ser realizada por processos mais caros como liofilização, “spray dryer” e leiteo fluidizado (LARENA et al., 2003; JIN & CUSTIS, 2011), entretanto poucos estudos foram realizados para comparar a eficiência dos equipamentos e as metodologias empregadas na qualidade do produto final (LARENA et al., 2003; HORACZEK & VIERNSTEIN, 2004; LANGRISH et al., 2007; MACHADO et al., 2013). No presente

trabalho serão comparadas alternativas de extração do fungo por peneiramento e extração por lavagem em água para avaliar os efeitos na sobrevivência dos conídios ao longo do tempo.

O fungo utilizado neste estudo é o ascomiceto *Metarhizium anisopliae*, mais utilizado para o controle de pragas no país especialmente para cigarrinhas em cana-de-açúcar e pastagens (FARIA & WRAIGHT, 2007; FREITAS et al., 2012). O objetivo do presente estudo foi desenvolver alternativas para serem implementadas no sistema de produção de *M. anisopliae* por fermentação sólida, a partir da adequação de estratégias envolvendo a utilização de farelos, aumento da aeração, formas de esterilização dos substratos para verificar as possibilidades de redução do tempo de produção e mão de obra, incremento na produção de conídios por volume de substrato, além de avaliar estratégias de extração dos conídios.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Obtenção e preparo do inóculo

O fungo utilizado para produção em fermentação sólida foi o isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* armazenado no banco de patógenos no Laboratório de Controle Microbiano de Pragas, Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, obtido de formigas do gênero *Solenopsis* em Porto Alegre/RS. O inóculo se encontra conservado em glicerol a 10% em criotubos esterilizados, à temperatura de -80 °C. Para os estudos, o fungo foi recuperado em placas de Petri contendo Batata Dextrose Agar ([BDA] DIFCO®, Detroit, MI, EUA), incubado em B.O.D durante 10 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ com fotoperíodo de 12:12 (L:E). O inóculo obtido foi armazenado em tubos Eppendorfs de 1,5mL (Axygen, Tewksbury, MA, EUA) e armazenado em freezer vertical a -18°C para posterior repicagem e obtenção de placas com maior quantidade de conídios para utilização nos experimentos.

3.2.2 Efeito da adição de diferentes materiais ao arroz para incremento da aeração na produção massal do fungo *M. anisopliae*

Dois experimentos foram realizados com o objetivo de incrementar a aeração durante a fermentação sólida de *M. anisopliae* em substrato de arroz. No primeiro experimento foram utilizados diferentes materiais considerados inertes (material de baixo valor nutricional que não suporta o crescimento do fungo isoladamente): esponja vegetal, maravalha e bagaço de

cana-de-açúcar, já no segundo experimento foram utilizados materiais inertes e não inertes como: palha de arroz (material inerte) e sagu, milho e flocos de arroz (materiais não inertes). A esponja vegetal foi moída em micro moinho tipo ciclone (Modelo: MA 020 - Marconi). O bagaço de cana-de-açúcar não hidratado foi seco em estufa por 48 horas e o bagaço de cana-de-açúcar hidratado foi mantido com as mesmas características vinda do campo sendo que as amostras foram moídas em desfibrador de cana-de-açúcar (modelo não identificado).

Esses materiais foram submetidos a duas condições: (1) os materiais inertes foram umedecidos juntamente ao arroz, permanecendo imerso substrato+inerte em água durante 50 minutos, antes que fossem esterilizados em autoclave e (2) os materiais inertes que não foram umedecidos, foram autoclavados separados do arroz e somente combinados ao substrato no momento de inoculação da suspensão fúngica. O milho, considerado suporte de aeração e substrato, também foi imerso em água durante igual período dos demais tratamentos umedecidos. Antes da etapa de esterilização, as amostras controle (arroz) também foram submetidas à imersão em água destilada por igual período que os demais tratamentos para hidratação dos grãos. Em seguida o arroz e materiais inertes e não inertes foram transferidos para sacos de polipropileno, vedados e autoclavados a 121°C por 20 minutos. Após autoclavagem e arrefecimento das amostras, 3 mL da suspensão fúngica de $1,0 \times 10^6$ conídios / mL foi preparada a partir de colônias do fungo crescida em meio BDA por 10 dias e inoculada em cada saco correspondente às repetições de cada tratamento em fluxo laminar sob condições asséptica. As amostras foram mantidas em B.O.D a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$, com fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 10 dias. Em cada saco foi utilizado 150g de arroz + material inerte correspondente a aproximadamente 1:1 v/v, além do controle com 150 e 300g de arroz no primeiro experimento e 100g de arroz + material inerte ou não inerte correspondente a 1:1 v/v e controle com 100g arroz para o segundo experimento, além do tratamento utilizando apenas milho com 100g do substrato. A quantidade de materiais utilizados para aeração do arroz é apresentado na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Quantidade de material utilizado em associação ao arroz com o intuito de aumentar a aeração do substrato para produção de conídios aéreos do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação sólida.

Material para aeração	Peso (g)
Bagago de cana-de-açúcar	30,0
Maravalha	20,0
Esponja vegetal	6,0
Palha de arroz	15,0
Milheto	80,0
Flocos arroz	25,0
Sagu	45,0

3.2.3 Efeito da fervura na esterilização de arroz para produção de *M. anisopliae*

Neste experimento foi avaliada a eficiência de esterilização do arroz por fervura em água (100 °C) para produção do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae*. Para isso o experimento consistiu dos seguintes tratamentos: Sacos plásticos contendo arroz submetido à fervura por 5, 10 e 15 minutos. Foram utilizados dois controles: controle 1 (arroz autoclavado em sacos plásticos grampeados); controle 2 (arroz autoclavado em sacos plásticos fechados hermeticamente em seladora).

Os tratamentos consistiram de 100g de arroz por saco de polipropileno (25 cm x 35 cm). Os tratamentos controle e fervura passaram pelo processo de imersão do arroz por 50 minutos para hidratação dos grãos, em seguida a água era retirada e as amostras acondicionadas em sacos para o processo de esterilização. Os tratamentos controle foram autoclavados à 121°C por 20 minutos. Nos tratamentos esterilizados por fervura, as amostras foram imersas na água em ebulição (100 °C) em fogão doméstico por período de 5, 10 e 15 minutos, para isso os sacos de polipropileno eram previamente lacradas em máquina seladora portátil de mesa. Após preparação das amostras, estas foram inoculadas em fluxo laminar sob condições asséptica com 3 mL de uma suspensão fúngica de $1,0 \times 10^6$ conídios / mL do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae*. Os tratamentos foram acondicionados em B.O.D a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ com fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 10 dias.

3.2.4 Produção de conídios de *M. anisopliae* por fermentação sólida em farelos

Na produção do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação sólida foram utilizados seis farelos como substrato e a forma de produção e avaliação da concentração de conídios foi realizada segundo metodologia adaptada de PENARIOL et al. (2008). Os tratamentos foram compostos pelos seguintes farelos: milho, soja, trigo, algodão, aveia e arroz (farelos obtidos a granel no mercado municipal de Piracicaba-SP e agropecuária da cidade de Rio Claro-SP). O Tratamento controle foi arroz (grãos) por representar a produção convencional por fermentação sólida. Antes da esterilização as amostras do controle foram submetidas à imersão em água destilada por 50 minutos para hidratação dos grãos. A quantidade de água destilada utilizada para hidratação das amostras de 100 g de farelos variou em função da capacidade de absorção de água de cada farelo evitando-se excesso de água nas amostras. Testes preliminares foram realizados para obtenção das alíquotas de água necessária para umedecer o farelo de trigo (90mL), enquanto que os farelos de milho, aveia, arroz, soja e algodão foram utilizados 70, 50, 60, 80 e 60 mL, respectivamente. Em seguida os substratos foram transferidos para sacos de polipropileno, que foram grampeados e autoclavados a 121°C por 20 minutos. Após autoclavagem e arrefecimento das amostras, 3 mL da suspensão fúngica de $1,0 \times 10^8$ conídios / mL foi inoculada em cada saco correspondente às repetições de cada tratamento em fluxo laminar. As amostras foram mantidas em B.O.D a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$, com fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 15 dias.

3.2.5 Produção de conídios de *M. anisopliae* por fermentação sólida em misturas de farelos

Este experimento teve o objetivo de testar a combinação de substratos, considerando que alguns farelos embora sejam nutricionalmente apropriados para o crescimento do fungo (farelo de aveia e arroz) após a hidratação apresentam consistência inadequada (característica pastosa ou com formação de grânulos grandes) prejudicando a produção de conídios. Em cada tratamento foi utilizado a combinação de dois farelos nos percentuais de 25, 50, 75%, totalizando 100 g de substrato para cada amostra. Foram quatro os farelos selecionados: milho (FM), trigo (FT), aveia (FAV) e arroz (FAR), tendo o arroz em grãos como controle, cujo tratamento foi submetido à imersão em água destilada por 50 minutos para hidratação. A quantidade de água destilada utilizada para umedecer as combinações de farelo de trigo e farelo de aveia nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 foram de 80, 70 e 60 mL, respectivamente. Para as combinações nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 de farelo de

trigo e farelo de arroz, farelo de milho e farelo de aveia, farelo de milho e farelo de arroz a quantidade de água adicionada foi de 83, 75, 68, 65, 60, 55, 68, 65 e 63 mL respectivamente. Para a mistura de farelos de milho e trigo e de farelos de aveia e arroz nas proporções de 50:50 foram necessários 80 e 55mL, respectivamente. Em seguida as amostras foram transferidas para sacos de polipropileno para serem autoclavadas à 121°C por 20 minutos. Após autoclavagem e arrefecimento, as amostras foram inoculadas com 3 mL de uma suspensão $1,0 \times 10^8$ conídios / mL do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* em cada saco correspondente às repetições de cada tratamento. Em seguida as amostras foram mantidas em B.O.D a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 15 dias.

3.2.6 Determinação da melhor concentração de farelos de trigo e arroz para produção de conídios de *M. anisopliae*

Baseado nos resultados dos experimentos anteriores que identificaram os farelos de trigo e arroz como os mais promissores, foram realizados novos estudos para comparar a mistura de farelo de trigo (FT) e o farelo de arroz (FAR), nas proporções de 90:10 com 75:25 e 100:1. Novamente utilizou-se o arroz em grãos como controle. Foram utilizados 100g de substrato para cada amostra. No tratamento controle, os grãos de arroz foram submetidos à imersão em água destilada por 50 minutos para hidratação antes da esterilização das amostras. Já as amostras de farelos de trigo e arroz nas proporções de 100:1, 75:25 e 90:10 foram previamente umedecidas com 90, 82 e 87 mL de água destilada, respectivamente. Em seguida foram transferidos para sacos de polipropileno grampeados e autoclavados a 121°C por 20 minutos. Após autoclavagem e arrefecimento das amostras, 3 mL da suspensão fúngica de $1,0 \times 10^8$ conídios / mL foi inoculada em cada saco correspondente às repetições de cada tratamento em fluxo laminar. As amostras foram mantidas em B. O. D. a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$, com fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 15 dias.

3.2.6.1 Contagem do número de conídios produzidos

Em todos os experimentos descritos acima foi realizada a quantificação da concentração de conídios produzidos por contagem em Câmara de Newbauer. Para isso, após o período de incubação para crescimento fúngico nas diferentes estratégias de produção do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae*, todas as amostras foram transferidas para frascos

“Schotts” de 250mL e adicionado 100 mL de solução Tween 80[®] 0,1%, e os frascos vigorosamente agitados em mesa agitadora orbital (Modelo: MA140 CFT) durante 30 minutos para remoção dos conídios dos substratos. O material foi coado em peneira para separação do substrato e o número de conídios aéreos produzidos foi quantificado em câmara de Newbauer, no aumento de 400x em microscópio de contraste de fase (Axioscop 20 – Zeiss). Os experimentos de produção de conídios foram executados em triplicata e repetidos três vezes no tempo.

3.2.7 Extração de conídios de *M. anisopliae* do arroz por peneiramento e lavagem em água

Neste estudo foram avaliados diferentes métodos para recuperação de conídios do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* a partir de duas técnicas de extração: Peneiramento (técnica mais conhecida e comumente utilizada), e extração por lavagem com solução aquosa estéril a 0,05 % de polioxietileno mono-oleato de sorbitano (Tween[®] 80, Sigma[®], St. Louis, EUA) com ou sem adição de materiais inertes como argilas, caulim e terra de Diatomácea para recuperação dos conídios, além de dessecante como sílica gel e desumidificador (Westinghouse-Custom 20) para auxiliar o armazenamento do fungo durante dois meses de observação. Para armazenamento dos conídios após extração e preparação dos tratamentos, foram utilizadas duas temperaturas e duas condições de umidade distribuídas em quatro condições de armazenamento: (1) 4 °C e 97% UR; (2) 4 °C e 0% UR; (3) 22 °C e 97% UR; (4) 22 °C e 0% UR. Para obtenção destas condições de armazenamento, potes plásticos redondo (20 cm x 17 cm x 10 cm) (Sanremo[®]) foram mantidos em sala climatizada com temperatura controlada a 22 ± 2 °C ou mantidos à temperatura de 4°C em geladeira. Para obtenção da umidade relativa de 97%, foi utilizada solução salina de Sulfato de Potássio Anidro P. A. a 2% no interior dos potes e para obtenção de 0% de umidade relativa, 90% do volume dos potes foram preenchidas com sílica gel. A medição da umidade nas bandejas era feita periodicamente (por semana) com termo-higrômetro (Instrutherm HT-300).

A extração dos conídios por peneiramento foi feita em peneira de malha 32 mesh (abertura 0,5 mm). Antes da extração, 100 g de arroz + fungo foi espalhado em bandejas que foram expostas em sala com desumidificador a temperatura de 22 ± 2 °C e 33 ± 2 % UR durante 6h. Na extração por lavagem, 100g de arroz + fungo foi colocado em 300 mL de Tween 80 à 0,05%. Em seguida a suspensão foi combinada ou não a caulim, argila rosa, argila preta (produtos obtidos na Inducal, Caçapava, RS) e terra de Diatomácea na proporção 1:1, ou

seja, para aproximadamente 1g de conídios obtidos na suspensão fúngica extraída foi adicionado 1g de material inerte. A suspensão resultante foi acondicionada em tubos cônico Tipo Falcon capacidade de 50 mL e transferidos para centrífuga para separação do pellet à 2500 RPM durante 5 minutos. Após centrifugação, o material foi transferido para papel filtro em placas de Petri e foram expostos em sala com desumidificador a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e $33 \pm 2\%$ UR durante 6h.

Os tratamentos tiveram a atividade de água medida (LabMaster-aw, Novasina, Suíça), em seguida, amostras de aproximadamente 1g, foram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL para serem mantidas armazenadas nas diferentes condições de temperatura e umidade relativa propostas pelo estudo. Essas amostras foram mantidas no escuro durante todo período de armazenamento com invólucro plástico de cor preta colocado nos potes. As avaliações de atividade de água foram realizadas antes da extração dos conídios, após e depois de 2 meses de armazenamento para observação do impacto da perda de umidade neste período, já a viabilidade foi medida antes dos tratamentos de extração e armazenado após 0, 7, 30 e 60 dias.

3.2.7.1 Viabilidade dos conídios extraídos

A avaliação da viabilidade foi realizada a partir de metodologia descrita por (OLIVEIRA et al., 2015) em que foram utilizadas placas de Petri tipo RODAC® (Replicate Organism Detection and Counting) medindo 60 x 10mm, contendo 5mL de meio de cultura Batata Dextrose Agar com 1% do fungicida (Derosal 500sc – Bayer CropScience) para limitar o crescimento do tubo germinativo. As placas foram inoculadas com 150 μL de uma suspensão de 1×10^6 conídios / mL do fungo recuperado nos tratamentos e incubadas em B. O. D. a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ durante 24 horas. A viabilidade foi medida a partir da contagem direta dos conídios viáveis e inviáveis em microscópio óptico (Bell Photonics®) no aumento de 400x. O experimento foi executado com 4 repetições subdivididas em 8 subamostras para cada tratamento.

3.2.8 Análise estatística

Os experimentos de aeração, esterilização, fermentação sólida em farelos e combinação de farelos, foram realizados em um delineamento casualizado em blocos, onde os

tratamentos foram executados em triplicata e os experimentos repetidos três vezes no tempo. Esses experimentos foram considerados como blocos com exceção do experimento para recuperação dos conídios que foi executado apenas uma vez no tempo, com 4 amostras por tratamento que subdividia em 8 subamostras para leitura da viabilidade.

Em todos os experimentos, com exceção do experimento envolvendo a recuperação de conídios, a variável “concentração de conídios” foi obtida a partir da análise conjunta do grupo de experimentos realizados no tempo, sendo que cada experimento foi tratado como bloco. No experimento de recuperação de conídios foi realizada uma análise num esquema fatorial (tratamento x tempo x condições de armazenamento) com delineamento inteiramente casualizado, para cada tipo de armazenamento.

Os dados de concentração de conídios e viabilidade de conídios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sem transformação. Em todos os experimentos, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey (HSD), descrito por Banzatto & Kronka (1989) dentre outros, que testa todos os possíveis contrastes entre duas médias com um nível de significância de 0,05.

As análises deste estudo foram realizadas no programa R Development Core team (versão: 2015).

3.3 Resultados e Discussão

Efeito da adição de diferentes materiais ao arroz para incremento da aeração na produção massal do fungo *M. anisopliae*

No primeiro experimento onde se utilizou apenas materiais inertes para aumentar a aeração houve diferença significativa entre os tratamentos ($F= 5.1676$, $p=0,00001645$) e os melhores resultados foram nos tratamentos com bagaço de cana-de-açúcar umedecido, maravalha e esponja vegetal não umedecida (Figura 3.1), com produção acima de $3,30 \times 10^9$ conídios / g arroz. Estes valores foram bem superiores aos controles com 150 e 300g. arroz / saco que resultaram em $1,85 \times 10^9$ e $1,18 \times 10^9$ conídios / g arroz, respectivamente.

Figura 3.1. Produção de conídios aéreos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* em arroz associado a materiais inertes utilizados como estratégia de aeração e as amostras inoculadas com 3 mL de suspensão fúngica de $1,0 \times 10^6$ conídios / mL em 150g de substrato, incubados a 25 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 10 dias. Médias seguidas pela mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Já no segundo experimento envolvendo materiais inertes e não inertes, ($F= 4.764$; $p=0.01046$), o arroz + milho umedecido diferiu significativamente de arroz + milho não umedecido com $9,63 \times 10^8$ e $4,55 \times 10^8$ conídios / g arroz, respectivamente. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças entre si e em relação ao controle. A produção em milho umedecido ($8,32 \times 10^8$ conídios / g) foi semelhante à produção em arroz ($7,20 \times 10^8$ conídios / g) (Figura 3.2).

Figura 3.2. Produção de conídios aéreos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* em arroz associado a materiais inertes e não inertes utilizados como estratégia de aeração em 100 g de substrato, incubados a 25 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 10 dias. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O uso de materiais inertes entre os grãos de arroz pode ser uma alternativa para aumentar a área de superfície para esporulação e criar maior espaço para trocas gasosas no microambiente da amostra durante o período de crescimento fúngico. A influência desses materiais no ambiente físico do substrato em que os fungos são cultivados pode desempenhar importante papel na produção dos seus metabólitos e na produção de conídios, além da aeração também influenciar no crescimento das células microbianas, atuando na dissipação de calor e oxigênio nos substratos utilizados (LIU et al., 2007). De acordo com esses mesmos autores, o sucesso da aeração nas fermentações de fungos tem como requisito a disponibilidade de oxigênio dissolvido suficiente para evitar desequilíbrios nas atividades respiratórias.

Outro fator a ser considerado são os tipos de materiais e a forma como serão dispostos nos substratos para promover a aeração, uma vez que alguns materiais podem liberar substâncias que podem ser deletérias aos fungos. No primeiro experimento foi observado que a maravalha e a esponja vegetal quando umedecida e autoclavada juntamente com o arroz resultou em produção de conídios inferior em relação ao material que não foi umedecido e autoclavado separadamente, sendo que em algumas amostras dos tratamentos umedecidos não houve crescimento e/ou esporulação durante o período de incubação. É possível que tenha ocorrido liberação de substâncias tóxicas dos suportes de aeração quando estes materiais foram autoclavados juntamente com o arroz.

O teor de umidade ao final do processamento das amostras é extremamente importante e está diretamente relacionado à produção dos fungos. A condição de umedecer ou não os materiais associados ao substrato foi relevante para observar o teor de umidade do arroz que precisava ser preservado, pois alguns materiais associados ao substrato pode causar o sequestro ou retenção de alta umidade, podendo prejudicar o desenvolvimento e conidiogênese dos fungos. Uma das características do substrato de arroz que o torna um dos mais utilizados na produção de entomopatógenos é a retenção de umidade que faz com que os microrganismos consigam se desenvolver durante o período de incubação (SENE et al., 2010). No primeiro experimento, foi possível observar que o bagaço de cana-de-açúcar umedecido promoveu o maior incremento na produção dos conídios, em contrapartida o bagaço de cana-de-açúcar não umedecido apresentou uma das menores produções o que pode ser atribuído a um possível desequilíbrio na retenção de umidade do arroz quando associado ao bagaço de cana não umedecido. No segundo experimento, o uso de sagu e flocos de arroz também podem ter interferido na umidade do substrato e prejudicado a aeração, uma vez que esses materiais quando em contato com o arroz úmido tornou-se aglutinado além de ter

ocorrido um possível “sequestro” da umidade do arroz tornando este substrato com aspecto bem desidratado.

Nos tratamentos com milho, tanto associado ao arroz como isoladamente, foi possível destacar a produção de conídios superior à produção no controle, considerando que este material apresenta menor volume, maior superfície de aeração do substrato e fácil manuseio quando relacionado ao arroz o que poderia torná-lo um substrato competitivo em relação ao arroz.

Quanto aos custos relacionados ao uso de suportes de aeração associados ao substrato, alguns pontos devem ser elencados, como custo dos materiais e mão de obra envolvida. No caso do primeiro experimento, a produção de conídios no arroz associado ao bagaço cana-de-açúcar e à maravalha foi quase três vezes mais do que no arroz (controle), considerando que o bagaço precisou passar pelo processo de imersão em água juntamente ao arroz, o que demanda gastos com mão de obra para alocar os insumos na preparação dos meios, entretanto a preparação se assemelha à convencional, já a maravalha foi apenas autoclavada separadamente e associada ao substrato, neste caso algumas etapas da produção seriam excluídas e encurtadas. Outro fator importante, é a aquisição desses materiais, o bagaço de cana-de-açúcar por ser um resíduo agroindustrial de amplo espectro apresentaria maior alcance de obtenção quando relacionado à maravalha, entretanto essa afirmação deveria ser melhor investigada. No segundo experimento, a maioria dos tratamentos teve produção semelhante ao controle, com exceção do tratamento em que se utilizou apenas o milho e o milho + arroz. O volume tomado pelos suportes de aeração em associação aos substratos também deve ser observado, uma vez que o peso e o volume pode determinar os custos relativos no momento de se definir o material mais adequado como estratégia de aeração. SENE et al. (2010) considerando o custo dos substratos e a produção final de conídios do isolado E9 de *M. anisopliae* não verificou diferença em utilizar arroz puro ($11,3 \times 10^8$ conídios / g) e arroz+resíduo de cervejaria (1:1) ($9,6 \times 10^8$ conídios / g), entretanto, conseguiu obter 50% de redução no custo da produção de conídios, tendo em vista que o resíduo de cervejaria apresenta custo mais de 60 vezes inferior ao arroz, além do uso *in natura* do material, reduzindo custos de processamento e mão de obra para preparação.

Diante dos fatores identificados neste estudo é possível considerar a importância dos aspectos físicos dos substratos e suas associações a outros materiais e suas interferências nos aspectos biológicos dos entomopatógenos, podendo-se inferir que a presença destes materiais pode aumentar a produção de conídios por fermentação sólida por evitar a compactação do

arroz, principal fator limitante na produção de fungos em quantidades elevadas neste substrato.

Efeito da fervura na esterilização de arroz para produção de *M. anisopliae*

A esterilização por fervura por apenas 5 minutos resultou em produção de conídios menor do que a autoclavagem e fervura por 10 e 15 minutos ($F = 5.861$; $p = 0.0167$) (Figura 3.3). Quando o arroz foi fervido por apenas 5 minutos, a produção de conídios foi a metade da produção obtida pelo método convencional (controle com arroz autoclavado em sacos grampeados). A esterilização do arroz por fervura em sacos selados resultou em produção de conídios semelhante ao arroz autoclavado em sacolas grampeadas ($5,31 \times 10^8$ conídios / g), obtendo-se $4,02 \times 10^8$ conídios / g em arroz fervido por 15 minutos. Além disso, a produção em sacos selados e grampeados foi semelhante, indicando que o consumo de O_2 e acúmulo de CO_2 não foram limitantes.

Figura 3.3. Produção de conídios aéreos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação sólida em amostras com 100g arroz esterilizado por fervura e autoclavagem, incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo 12:12 (L:E), durante 10 dias. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir dos resultados, a produção de conídios em arroz foi semelhante nos tratamentos com autoclavagem e fervura, podendo-se afirmar que os tempos de fervura (10 e 15 minutos), mostrou-se satisfatório para produção do fungo preservando as características físicas e umidade dos grãos. A esterilização dos substratos é um dos gargalos na produção dos

entomopatógenos em larga escala nas biofábricas, pois as autoclaves que além de ser um equipamento de custo oneroso e tamanho limitante para produção, demanda uso intensivo de mão de obra e gasto com eletricidade.

A fervura e a autoclavagem são técnicas de esterilização por calor úmido mais empregadas para destruição de microrganismos a partir da termocoagulação e desnaturação irreversível de proteínas celulares, sendo de baixo custo e fácil aplicação, eficácia e praticidade (KALIL & COSTA, 1994; BRITO et al., 2002; ARCHANJO et al., 2012). A técnica de fervura a 100 °C durante 10 - 15 minutos é considerada menos eficiente em relação à autoclavagem por apresentar características desinfetantes, pois a temperatura máxima que pode atingir é 100°C ao nível do mar, não eliminando alguns vírus e formas esporuladas, entretanto consegue suprir a esterilização de alimentos em geral (MORIYA & MÓDENA, 2008), já a autoclavagem a vapor de água sob pressão, a 121 °C durante 15 - 30 minutos, apresenta efeito esterilizante pela ação combinada de temperatura, umidade e pressão, sendo a técnica mais empregada para esterilização em geral que suportem altas temperaturas e umidade como alimentos enlatados, utensílios cirúrgicos, materiais diversos e meios de cultivo, considerando-se o método físico mais eficaz e seguro de esterilização (BRITO et al., 2002; MORIYA & MÓDENA, 2008; ARCHANJO et al., 2012). Assim a escolha mais segura e econômica do tipo de esterilização estará atrelada ao tipo de material e as características da esterilização. A partir deste contexto, considerando a produção em larga escala dos entomopatógenos em arroz, verifica-se a partir deste estudo que a fervura se adequa ao tipo de substrato, uma vez que o arroz utilizado é o parboilizado, que pela caracterização do seu pré-tratamento, apresenta-se como um substrato livre de sujeiras, sendo a técnica de fervura suficiente para suprir as necessidades de produção de conídios em larga escala, o que seria mais vantajoso em relação à técnica de autoclavagem que conta com equipamentos de tamanho limitado para esse tipo de produção.

Em estudo preliminar, utilizando o cozimento do arroz por períodos iguais ou superiores a 20 minutos não foram adequados, apresentando consistência mole e excesso de umidade, com poucos espaços entre os grãos para esporulação e dificuldade na extração dos conídios do arroz (dados não apresentados). Em trabalho de Kumar et al. (2007), estudando a produção de *M. anisopliae* em diferentes substratos, verificaram que a melhor esporulação de conídios ($4,22 \times 10^8$ conídios / g) foi obtida em grãos de arroz, entretanto a melhor produção massal foi obtida em sorgo ($3,97 \times 10^8$ conídios / g), devido às dificuldades de produção observada no arroz atribuído ao aquecimento do substrato, que converteu os grãos a uma massa compacta durante a esterilização e prejudicou a extração dos conídios.

É importante destacar que estudos de esterilização de substrato para produção de entomopatógenos não foram encontrados na literatura, mas se torna necessário investigar quando se trata da produção comercial desses fungos por requerer altos custos em equipamentos, tempo de processamento e quantidades de substrato utilizado por ciclo de produção. A técnica de fervura também abre possibilidades para se utilizar recursos industriais já existentes ou planejar protótipos de equipamentos simplificados que exponha maiores quantidades de substratos à esterilização por ciclo de produção.

Produção de conídios de *M. anisopliae* por fermentação sólida em farelos

O farelo de trigo foi o substrato que resultou em maior produção de conídios em relação aos demais farelos ($7,68 \times 10^8$ conídios / g farelo) e quase duas vezes mais que o controle ($4,19 \times 10^8$ conídios / g arroz) ($F=8.946$, $p= 0.0283$). Já os farelos de aveia e arroz resultaram em produção de $3,02 \times 10^8$ e $6,25 \times 10^7$ conídios / g farelos, respectivamente (Figura 3.4). Os tratamentos com farelo de soja e algodão não permitiram o crescimento e esporulação satisfatória do fungo.

Figura 3.4. Produção de conídios aéreos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação sólida em diferentes farelos em 100g de substrato, incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 15 dias. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O farelo de trigo apresenta características desejáveis e talvez isso possa ter favorecido no incremento da produção de conídios, apresentando-se como material menos denso, maior área superficial permitindo maior aeração entre as partículas do farelo, além de fácil manuseio

do material. Já o farelo de milho apresentou características semelhantes ao farelo de trigo, entretanto outros fatores possivelmente relacionados a características nutricionais deste substrato pode ter limitado a conidiogênese, mas ainda apresentando produção semelhante ao controle. Já os farelos de aveia e arroz foram os que apresentaram menores valores de produção, talvez pela conformação desses farelos durante o período de incubação do substrato + fungo, uma vez que estes dois farelos formaram grânulos de massa compacta que apenas permitia o desenvolvimento fúngico na parte superficial dos grânulos. Além disso, no decorrer do período de incubação, esses farelos perderam umidade rapidamente tornando os grânulos bem endurecidos, o que prejudicou o manuseio do substrato nos sacos em dias alternados, dificultando a dispersão dos conídios e consequentemente o incremento na produção dos conídios.

Na preparação dos farelos, o passo que foi primordial para o crescimento fúngico nesses substratos teve a ver com o teor de umidade, sendo considerado essencial para a preparação das amostras e em todo o período de crescimento fúngico, uma vez que o conteúdo de umidade provoca as reações e interações necessárias entre os microrganismos e os substratos. Quando o substrato se encontra com umidade elevada isso pode interferir na porosidade, obstruindo os interstícios e impedindo a difusão de gases, principalmente oxigênio, em contrapartida, o baixo teor de umidade pode tornar a disponibilidade de nutrientes deficiente, podendo limitar o crescimento fúngico (SENE et al., 2010). Em estudos de EL DAMIR (2006) envolvendo a produção de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, com quirela de milho, trigo em grão e painço, utilizando o peso do substrato e o volume de água nas proporções (1:0,5), (1:1) e (1:1,5), verificaram que para *B. bassiana* não houve uma relação entre a quantidade de água e substrato e a produção de conídios, entretanto para *M. anisopliae* houve aumento na produção dos conídios à medida que aumentou a proporção de água nos substratos.

Em alguns casos, a ineficiência do farelo em produzir conídios não está atrelada unicamente à composição nutricional e teor de umidade, mas à conformação física do substrato. A estrutura do substrato é tão importante quanto os nutrientes disponíveis, uma vez que o substrato ideal é aquele que promove alta taxa de área de superfície e volume, onde as partículas individuais permanecem separadas com espaço para aeração e formação dos conídios (MACHADO et al., 2010). Em estudos realizados por SENE et al. (2010), eles concluíram que, mesmo farelos ricos em nutriente na sua composição e baixa perda de umidade durante a incubação, não apresentavam incremento na produção de conídios de *M. anisopliae*, é o caso do farelo de mandioca, mas o que podia está comprometendo o

crescimento do fungo era a condição física desse substrato. Esse evento também foi observado no presente estudo nos tratamentos com farelos de aveia e arroz, farelos estes que inicialmente se mostravam bastante promissores na conidiogênese mas se limitavam no incremento da produção pela perda rápida de umidade dos substratos com formação de grânulos de tamanho expressivo e massa compacta.

Na seleção de meio de cultivo para fermentação sólida de entomopatógenos, é importante considerar a dificuldade em se medir a composição desses nutrientes e, em alguns casos é necessário até mesmo a associação de outros componentes nutricionais para o sucesso do crescimento fúngico e conidiogênese (SRIKANTH & SANTHALAKSHMI, 2012). No caso dos farelos, esses substratos são menos onerosos pela sua natureza de obtenção, sendo subproduto dos grãos de cereais e que são extraídos durante o processo de industrialização.

Considerando os custos envolvidos no processo de fermentação sólida em farelos, quanto aos valores relativos do substrato, demandas laborais e tempo de processamento, foi possível observar que a mão de obra se assemelha à produção convencional do arroz, sendo que o período de preparação é encurtado, pois para os farelos as alíquotas de água são previamente estabelecidas e não torna necessário o tempo de hidratação do substrato em água como ocorre para o arroz, em contrapartida o tempo de incubação do farelo aumenta para 15 dias enquanto que a incubação do arroz se encerra por volta de 10 dias, isso porque a conidiogênese nos farelos acontece mais tardiamente, podendo comprometer e alongar o ciclo de produção. Quanto aos valores relativos ao substrato, observa-se que o custo do farelo de trigo (substrato que resultou em maior incremento na produção de conídios), apresenta custo 3 vezes inferior em relação ao valor atual do arroz, tendo em vista que este farelo está sendo vendido nos principais mercados brasileiros como Paraná, Espírito Santo, Minas gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, e Goiás numa média aproximada de R\$ 24,00/saco de 40kg, ou 0,60/kg (Mercado Físico Rural - MF Rural). Neste contexto, a utilização do farelo seria uma alternativa, com preparação e uso de mão de obra semelhante à produção convencional em arroz, entretanto a produção em farelos demanda maior tempo no ciclo de produção, sendo importante o estudo para se averiguar as vantagens e desvantagens na implementação desse substrato em linhas de produção de larga escala.

Produção de conídios de *M. anisopliae* por fermentação sólida em misturas de farelos

No estudo das misturas em diferentes concentrações dos cinco tipos de farelos, foi observado diferenças significativas entre os tratamentos ($F= 2.6564$, $p= 0.0002642$). Dentre as combinações que resultaram em maiores produções de conídios estão a mistura de 75% farelo

de trigo + 25% de farelo de arroz ($1,04 \times 10^9$ conídios / g) seguido pela mistura de 50% farelo de trigo + 50% de farelo de arroz ($9,72 \times 10^8$ conídios / g) que foram estatisticamente diferentes de seis tratamentos (Figura 3.5). Em geral, as melhores combinações foram obtidas quando se misturou farelo de trigo seja com aveia ou com arroz. A adição de farelo de milho que havia sido superior ao farelo de arroz isoladamente, não se mostrou promissora, mesmo quando misturado a farelo de trigo. Nestes experimentos a produção em grãos de arroz (controle) foi de $6,65 \times 10^8$ conídios / g, que não diferenciou significativamente de nenhum tratamento.

Figura 3.5. Produção de conídios aéreos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação sólida em combinações de farelos de Trigo (FT), milho (FM), aveia (FAV) e arroz (FAR) comparado a arroz em 100 g de substrato, incubados a 25 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 15 dias. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se que as melhores combinações contêm o farelo de trigo na sua composição, confirmando os resultados do experimento anterior onde este havia sido o farelo que isoladamente resultou na maior produção de conídios. O farelo de arroz e o farelo de aveia quando combinado ao farelo de trigo resultaram em produções de conídios 16x, 3x e 1,4x maiores do que a produção em farelo de arroz, aveia e trigo isoladamente. Nas misturas de farelo de trigo + farelo de arroz embora não estatisticamente diferentes observa-se numericamente uma tendência de decréscimo na produção com o aumento da proporção do farelo de arroz na mistura. O farelo de arroz, assim como o farelo de aveia, quando utilizados isoladamente apresentam formação de grânulos que não são desejáveis para produção do

fungo, mas ao misturar com o trigo não se observou a formação destes grânulos e ainda aumentou a produção em relação ao trigo isoladamente.

A produção de conídios em diferentes proporções de uma determinada mistura de farelos é influenciada pelas condições nutricionais, conformação física dos substratos combinados que está intimamente relacionado à aeração e umidade no interior do substrato. MACHADO et al. (2010) verificaram que as combinações de trigo moído grosso + farelo de trigo + sorgo + lentilha; trigo moído grosso + farelo de trigo + milho + grão de trigo, foram mais promissoras na produção de conídios de *L. lecanii*, atribuindo os resultados à textura final dos substratos quando combinados.

Ao se pensar na nutrição dos substratos e considerando as misturas de farelos proposta, é possível informar que houve produção substancial de conídios em alguns tratamentos em relação ao controle, entretanto, quando se combinou dois farelos com característica de produção de grânulos, prejudicando a produção de conídios e dois farelos que não apresentam esta característica, a produção de conídios chegou a ser semelhante ao arroz por grama de substrato mas bem inferior aos tratamentos promissores, foi o caso da mistura dos farelos de trigo + farelo de milho e farelo de arroz + farelo de aveia. O sucesso da produção em algumas combinações pode remeter a uma possível interação entre farelos ricos em nutrientes e farelos com boa conformação física que permitiu na combinação aliar as duas características que são fundamentais aos fungos na sua fase de crescimento, além do teor de umidade que pode ser determinante no desenvolvimento e conidiogênese. Os resultados observados neste estudo se assemelham aos obtidos por MACHADO et al. (2009), com a produção de dois isolados de *Lecanicillium lecanii*, que teve as maiores produções de conídios observadas em combinações de trigo grosso (70%)+farelo de trigo com lentilha (30%), trigo grosso (85%) + farelo de trigo com sorgo (15%), farelo de trigo (85%) +painço (15%) e farelo de trigo (70%)+trigo em grão e lentilha (30%), observando que o farelo de trigo combinado a outros grãos ou farelos apresenta resultados bastante promissores.

Determinação da melhor concentração de farelo de trigo e farelo de arroz para produção de conídios de *M. anisopliae*

A produção de conídios nas combinações de 75% de farelo de trigo + 25% de farelo de arroz ($1,75 \times 10^9$ conídios / g) foi superior às combinações onde o farelo de trigo entrou nas proporções de 90% e 100% (máximo de $1,19 \times 10^9$ conídios / g), assim como a produção em arroz em grãos ($8,22 \times 10^8$ conídios / g) ($F= 16.824$, $p= 0.00252$). Estes três últimos tratamentos não diferiram entre si. Estes resultados corroboram os estudos descritos acima

que indicam ser o farelo de trigo um substrato favorável à produção de conídios de *M. anisopliae* ESALQ1037 com aumentos significativos na produção quando este farelo é misturado com o farelo de arroz na proporção 75:25 (Figura 3.6). Esta mistura de substratos resultou em produções de conídios superiores ao arroz em grãos utilizado comercialmente nas biofábricas brasileiras.

Figura 3.6. Produção de conídios aéreos (média $\pm$ EP) pelo isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* por fermentação sólida a partir da combinação de farelos: trigo (FT) e arroz (FAR), em 100 g de substrato, incubados a 25 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E), durante 15 dias. Médias seguidas por mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diferentemente do arroz ou trigo em grãos que requerem um tempo de imersão em água para hidratação dos grãos antes da autoclavagem, os farelos podem ser autoclavados diretamente após a mistura com a quantidade de água previamente estabelecida para hidratação. Além disto, o custo dos farelos é menor do que o dos grãos. Entretanto, uma desvantagem é o tempo de fermentação que nos farelos é maior e há necessidade de misturar o substrato pelo menos uma vez durante a fermentação para homogeneização e aeração.

Extração de conídios de *M. anisopliae* do arroz por lavagem em água

Os conídios de *M. anisopliae* extraídos por lavagem em água e submetidos a todas as condições de armazenamento mantiveram valores de viabilidade aceitáveis ($>80\%$) durante 60 dias, com exceção dos tratamentos: lavado sem adição de inertes (conídios puros) e com associação de argila rosa, que apresentaram aproximadamente 70% da viabilidade após armazenamento a 4 °C e 97% UR (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado ESALQ1037 extraídos por peneiramento ou lavagem do arroz e armazenados em diferentes condições de temperatura e umidade durante dois meses. Os conídios lavados foram recuperados por centrifugação sem (conídios puros) ou com a adição de inertes.

Condições de armazenamento	Extração	Tempo de armazenamento (dias)								(F ; <i>p</i> -valor)	CV(%)
		0		7		30		60			
97% UR_ 22°C	peneirado	93,00	c A b	99,03	ab A a	99,91	a A a	99,73	a A a		
	lavado (conídios puros)	96,17	b A a	92,92	c A b	96,60	a A a	92,48	c A b		
	lavado + argila rosa	92,98	c A b	89,83	d A c	96,84	a D a	94,71	bc A b		
	lavado + terra de diatomacea	97,71	a A b	99,50	a A ab	99,79	a A a	99,91	a A a		
	lavado + caulim	97,70	a A ab	96,64	b A b	99,26	a A a	99,61	a A a		
	lavado + argila preta	93,03	c A b	93,42	c AB b	98,68	a A a	98,26	ab A a	13,613; <0,001	1,56
97% UR_ 4°C	peneirado	92,97	c A c	99,04	a A a	97,93	a AB ab	94,49	a B bc		
	lavado (conídios puros)	96,15	b A a	90,37	c B b	84,98	c B c	70,25	c D d		
	lavado + argila rosa	93,00	c A a	87,43	d B b	78,31	d A c	71,47	c C d		
	lavado + terra de diatomacea	97,70	a A a	97,66	a AB a	97,28	a AB ab	93,35	a BC b		
	lavado + caulim	97,67	a A a	97,01	ab A a	94,52	a B a	87,02	b C b		
	lavado + argila preta	92,98	c A ab	94,47	b A a	89,83	b B b	82,82	b C c	18,073; <0,001	3,27
0% UR_ 22°C	peneirado	92,94	c A b	98,39	a A a	96,28	a B ab	96,95	a AB a		
	lavado (conídios puros)	96,14	b A a	88,90	c B b	86,95	b B b	85,59	cd B b		
	lavado + argila rosa	92,93	c A a	83,70	d C c	88,61	b B b	81,24	d B c		
	lavado + terra de diatomacea	97,66	a A a	97,38	a AB a	94,76	a B a	89,97	bc C b		
	lavado + caulim	97,66	a A a	94,74	b A ab	96,34	a AB ab	93,43	ab B b		
	lavado + argila preta	92,90	c A a	92,62	b AB a	95,51	a A a	92,60	ab B a	10,577; < 0,001	2,86
0% UR_ 4°C	peneirado	92,95	c A b	98,74	a A a	97,07	a AB a	97,85	a AB a		
	lavado (conídios puros)	96,16	b A a	86,38	d C b	85,02	c B b	78,09	d C c		
	lavado + argila rosa	92,95	c A a	84,88	d C b	83,66	c C b	83,64	c B c		
	lavado + terra de diatomacea	97,67	a A a	95,57	b B a	95,56	a B a	94,91	ab B a		
	lavado + caulim	97,69	a A a	96,61	ab A a	95,28	a B a	91,97	b B b		
	lavado + argila preta	92,95	c A a	91,82	c B a	91,49	b B a	92,77	b B a	16,542 <0,000	2,64

Letras minúsculas correspondem à comparação das médias (na coluna) dentro de cada condição de armazenamento, letras maiúsculas correspondem à comparação das médias de cada método de extração (na coluna) em diferentes condições de armazenamento e letras minúsculas em itálico referem-se às comparações das médias na linha. Letras distintas na linha e na coluna são diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Viabilidade inicial dos lotes de fungo, antes da extração dos conídios $\geq 95\%$.

A viabilidade dos conídios foi mantida ao longo do período de armazenamento em condições extremas de umidade relativa (0% e 97%) a temperatura de 22°C, indicando a viabilidade de armazenamento em temperaturas próximas às condições ambientais sem refrigeração o que poderia minimizar custos de estocagem em larga escala. No armazenamento e estocagem em larga escala, deve-se priorizar métodos simplificados, equipamentos e mão de obra com custos reduzidos. Em geral, na maioria dos tratamentos, os conídios mantidos a 22°C apresentaram melhor sobrevivência em alta umidade enquanto que os conídios mantidos em refrigerador (4°C) apresentaram melhor sobrevivência em baixa umidade.

Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade dos conídios extraídos por lavagem e recuperados por centrifugação após adição de materiais inertes em relação a conídios extraídos sem adição de inertes e em relação à extração por peneiramento. A adição dos inertes tem a finalidade de separar os conídios durante a centrifugação, evitando a formação de pellets de difícil desagregação após a mistura em tanque de pulverização. Como os inertes não afetaram a sobrevivência dos conídios durante o armazenamento estes tem potencial para serem utilizados no processo de recuperação e constituírem parte da formulação final. Na maioria dos tratamentos, os conídios recuperados com inertes apresentaram maiores valores de viabilidade após 60 dias do que os recuperados sem inertes. Dauost *et. al*, (1983b), estudando o efeito da formulação na viabilidade de *M. anisopliae*, verificaram que os conídios puros misturados com argila e sílica gel sobreviveram mais tempo do que os conídios sem argila misturados ou não a sílica gel.

Um dos maiores desafios da comercialização é oferecer um bioinseticida semelhante aos fungos recém-produzidos, com manutenção da sua integridade e eficiência (MACHADO et al., 2013). Os estudos que envolvem a adição de inertes para aumentar a eficiência da extração de conídios utilizaram métodos de peneiramento e spray dryer. LANGRISH et al. (2007) relataram que o uso de maltodextrina como adjuvante reduziu a deposição de formulados nas paredes dos equipamentos de secagem spray dryer. Em estudo realizado por Almeida et al. (2007) com extração por peneiramento de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* de grãos de arroz a partir da associação de caulim, filito, argila, diatomita e leucita, observaram que a diatomita foi o mais abrasivo para extração de *M. anisoplie* enquanto que o peneiramento foi mais eficaz para *B. bassiana*. Este mesmo autor atribuiu a diferença entre os dois isolados à aderência dos conídios ao arroz, sendo que *M. anisopliae*, se desprende com maior facilidade, enquanto que *B. bassiana* precisa de maior agitação e serrilhamento para melhorar a extração dos conídios. O método a ser empregado na extração dos conídios

depende da espécie em questão especialmente a coesão dos conídios no substrato, precisando de métodos físicos rentável economicamente que melhorem a extração sem causar danos à estrutura dos conídios.

O recurso mais utilizado para redução da taxa metabólica de conídios é a desidratação que permite a diminuição da água “livre” nos conídios, o que também minimiza as perdas das reservas dos fungos e neste caso a velocidade e a temperatura de dessecação devem ser considerados (LARENA et al., 2003; GUIJARRO et al, 2006; HORACZEK & VIERNSTEIN, 2004; JACKSON. et al., 2010). Entretanto, obteve-se neste estudo armazenamento satisfatório mesmo em condições de alta umidade do ar sem refrigeração. Isto já havia sido observado por Dauost & Roberts (1983a) que avaliaram a viabilidade e virulência a larvas de mosquitos *Culex pipiens* (Lineus, 1758) do isolado E₉ de *M. anisopliae* e constataram maior sobrevivência dos conídios armazenados nas condições de 19 °C a 97% UR e 4 °C a 0% UR, mantendo viabilidade dos conídios e virulência aos mosquitos mesmo após armazenados por 1 ano.

A atividade de água (aw) dos conídios antes de serem armazenados era de 0,982 e após os 2 meses de armazenamento das amostras a aw se manteve praticamente constante nos tratamentos a 97% UR independentemente da temperatura. Em contrapartida, a 0% de umidade a perda de água de todas as amostras foi substancial nas duas condições de temperaturas. Entretanto, as diferenças relacionadas à atividade de água não podem ser correlacionadas com a viabilidade dos conídios nas diferentes condições de armazenamento (Figura 3.7).

Figura 3.7. Atividade de água do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae* extraídos do arroz por peneiramento e lavagem, e mantidos sob diferentes condições de armazenamento por 2 meses.

Tanto as amostras com alta ou baixa atividade de água após os dois meses mantiveram a viabilidade elevada dos conídios. A redução da atividade de água dos conídios durante o armazenamento a um determinado nível impede a germinação, sendo a manutenção da água ao menos a nível celular necessária, por transmitir sinais químicos aos esporos que são importantes no processo germinativo, integridade e longevidade dos fungos. (ALVES et al., 2001; HORACZEK & VIERNSTEIN, 2004; AZEREDO et al., 2004; JACKSON et al., 2010). A partir deste parâmetro é possível prever possíveis efeitos da umidade existente que pode provocar alterações indesejáveis na estocagem dos lotes de microrganismos. Alguns autores afirmam que o teor ideal de umidade para os conídios seria em torno de 5 a 10%, para então extraí-los dos substratos (SILVA & MELLO 2007).

Clerk & Madelin, (1965), avaliando a estabilidade de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. farinosa* verificaram redução da viabilidade dos conídios quando expostos à luz contínua e elevação de temperatura de 8 a 25°C. Conídios de *B. bassiana* e *I. farinosa* não sobreviveram à umidade elevada enquanto que *M. anisopliae* apresentou maior longevidade em condição extrema de umidade (0% UR), afirmando ainda que a viabilidade deste fungo pode ser drasticamente afetada em umidades intermediárias entre 45 e 75% UR. No entanto, a viabilidade de *M. anisopliae* a 8 °C e 75% UR foi de 92% após 252 dias. Os autores atribuíram este resultado aos níveis elevados de dióxido de carbono ou ausência de oxigênio no ambiente de armazenamento que reduziu o efeito desfavorável da umidade intermediária sobre os conídios do fungo, isso porque a taxa metabólica dos conídios pode ter sido reduzida.

A eliminação ou redução de oxigênio, ausência de luz, além do controle da temperatura e umidade são requisitos fundamentais para o armazenamento de conídios de fungos entomopatogênicos. Segundo JACKSON et al. (2010) o controle destes fatores no ambiente de armazenamento são o maior desafio para aumentar a vida de prateleira dos micopesticidas microbianos.

Referências

- ALMEIDA, J. E. M.; T.C. ROCHA, T. C.; BATISTA FILHO, A. Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.4, p.369-371, 2007.
- ALVES, L. F. A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; AUGUSTO, N. T. Estabilidade de uma formulação de *Bacillus sphaericus* armazenada sob diferentes temperaturas. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.21-26, 2001.
- ARCHANJO, A. B.; TONETO, D. S.; SANTILIANO, F. C.; PEREIRA JUNIOR, O. DOS S.; ALMEIDA, B. R. de. Métodos de esterilização utilizados na indústria farmacêutica, farmácias, laboratórios e clínicas veterinárias. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 36, p. 1478 - 1483, 2012.
- AZEREDO, H. M. C.; BRITO, E. S.; BRUNO, L. M.; PINTO, G. A. S. Métodos de conservação de alimentos. In: AZEREDO, H. M. C. (Ed.). **Fundamentos de Estabilidade de Alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.97-128, 2004.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 247p. 1989.
- BRITO, M. DE F. P.; GALVÃO, C. M.; FRANÇOLIN, L.; ROTTA, C. S. G. Validação do processo de esterilização de artigos médico-hospitalares segundo diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 55, n. 4, p. 414-419, 2002.
- CLERK, G. C.; MADELIN, M. F. The longevity if conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. **Transactions British Mycological Society**, Cambridge, v.48, n.2, p.193-209, 1965.
- DAOUST, R. A and ROBERTS D. W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.41, n. 2, p.161-170, 1983a.
- _____. Ward M. G; ROBERTS D. W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.41, n. 2, p.151-160, 1983b.
- EL DAMIR, M. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Biological Sciences**, Bombay, v.6, n.2, p.269-274, 2006.

- FARIA, M. R. de; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, p. 237 - 256, 2007.
- FREITAS, A. F.; LOUREIRO. E. S.: ALMEIDA, M. E. B. DE; PESSOA, L. G. A. Seleção de isolados de *Metarhizium Anisopliae* (Metsch.) Sorok (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para o controle de *Mahanarva Fimbriolata* (Stal, 1854) Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.2, p.247-254, 2012.
- 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*. **Biological Control**, Orlando, v.31, p.65-71, 2004.
- JACKSON, M. A; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, Dordrecht, Orlando, v. 55. p. 129-145, 2010.
- JIN, X. & CUSTIS, D. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. **Biological Control**, Orlando, v. 56, n. 2, p. 202-208, 2011.
- KALIL, E. M.; COSTA, A. J. F. Desinfecção e Esterilização. **Acta Ortopedia Brasileira**, v. 4, 1994.
- KUMAR, M.; CHOUDARY, S.; SHAHI, S. K.; SHAHI, M. P. Standartization of different substrates for the mass production of conidial yield of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Plant Archives**, Heonra-Saifai, Etawah, v. 7, n. 2, p. 719-720, 2007.
- LANGRISH, T. A. G.; CHAN, W. C.; KOTA, K. Comparison of maltodextrin and skim milkwall deposition rates in pilot-scale spray dryer. **Powder Technology**, Lousanne, v.179, p.84-89, 2007.
- LARENA, I.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P.: Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p.600-606, 2003.
- LATIFIAN, M.; RAD, B.; AMANI, M.; RAHKHODAEI, E. Mass production of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) by using agricultural products based on liquid- solid diphasic method for date palm pest control. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, London, v. 5, n.19, p. 2337-2341, 2013.

- LIU, B.; ROU, T.; RAO, Y. K.; TZENG., Y. Effect of pH and Aeration Rate on the Production of Destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 5, n. 1, p. 17-26, 2007.
- MACHADO, A. C. R.; MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C. Crop optimization and pre-steps standardization to get a *Bipolaris euphorbiae*-based bioherbicide. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 392-399, 2013.
- _____. MONTEIRO, A. C.; ALMEIDA, A. M. B.; MARTINS, M. I. E. G. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.10, p. 1157 - 1163, 2010.
- _____. MONTEIRO, A. C.; MOCHI, D. A.; YOSHIDA, L. Resíduos e subprodutos agroindustriais e grãos como substratos para produção do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii*. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, pp. 703-714, 2009.
- MILHORANCE, F. Brasil lidera o ranking de consumo de agrotóxicos, 2015. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/brasil-lidera-ranking-de-consumo-de-agrotoxicos-15811346#ixzz49D97YU55>> Acesso em: 20 mai. 2016.
- MORANDI, M. A. B. & BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas daninhas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.
- MORIYA, T., MÓDENA, J. L. P. Assepsia e antissepsia: Técnicas de esterilização. In Simpósio: Fundamentos em clínica cirúrgica - 1ª Parte. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 265-73, 2008.
- OLIVEIRA, D. G. P.; PAULI, G.; MASCARIN, G. M.; DELALIBERA, I. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 119, p. 44–52, 2015.
- PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A.; PEREIRA, G. T. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. **Bragantia**, Campinas, v.67, n. 4, p.805-814, 2008.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2015. Disponível em:< <https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 Outubro 2015.
- SENE, L.; ALVES, L. F. A.; LOBRIGATTE, M. F. P.; THOMAZONI, D. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.449-456, 2010.

- SILVA, J. A. G. da. Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer a cerca dos agrotóxicos, 2015. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2016.
- SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M. Utilização de Trichoderma no controle de fungos fitopatogênicos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
- SRIKANTH, J. & SANTHALAKSHMI. Effect of Media Additives on the Production of *Beauveria brongniartii* an Entomopathogenic Fungus of *Holotrichia serrata* G. **Sugar Tech**, Berlin, v. 14, n. 3, p. 284–290, 2012.
- WENZEL, I. M., MONTEIRO, A. C., PEREIRA, G. T. Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, Jaboticabal v.34, n. 1 p.7-14, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O meio líquido a base de 45g L⁻¹ glicose e 36g L⁻¹ extrato de levedura foi o que resultou em maior produção de blastosporos e de biomassa do isolado ESALQ1037 de *M. anisopliae*.
- A inoculação de blastosporos apresentou maior velocidade e maior incremento na produção de conídios quando comparada à inoculação direta do arroz com conídios puros.
- No sistema bifásico em que farelos foram inoculados com blastosporos, o farelo de trigo isoladamente, promoveu maior incremento da produção de conídios do fungo quando comparada a inoculação dos farelos com conídios puros.
- Bagaço de cana-de-açúcar autoclavado seco foi o suporte de crescimento que permitiu maior produção de conídios de *M. anisopliae* quando inoculado com o fungo crescido em meio líquido a base de 45g L⁻¹ glicose e 36 g L⁻¹ extrato de levedura.
- A adição de materiais ao arroz para incremento da aeração do substrato como bagaço de cana-de-açúcar umedecido, maravalha não umedecida e espoja vegetal não umedecida promoveram aumento da produção de conídios de *M. anisopliae*.
- A esterilização por fervura por 10 e 15 minutos se mostrou satisfatória para produção do fungo *M. anisopliae*, sem a presença de contaminantes.
- Farelo de trigo isoladamente ou misturado ao farelo de arroz no percentual (75:25) resultou na maior produção em farelos de *M. anisopliae*.
- Conídios de *M. anisopliae* extraídos por lavagem em água com 0,05% Tween 80 apresentaram alta viabilidade (>80%) após dois meses de armazenamento a 97% UR e 22°C e 0% UR e 4°C.
- Conídios recuperados com inertes apresentaram maiores valores de viabilidade após 60 dias do que os recuperados sem inertes. Com exceção da extração por lavagem sem inertes,

em todos os outros métodos de extração os conídios não apresentaram redução da viabilidade ($>92\%$) após armazenamento por 60 dias a 22°C e 97% UR.

- Os conídios extraídos por peneiramento e os recuperados por lavagem com adição de terra de diatomácea, caulim ou argila preta apresentaram viabilidade $>91\%$ após 60 dias.