



## AVALIAÇÃO DE SUBSTRATOS BRUTOS ALTERNATIVOS PARA PRODUÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS) VUILLEMIN (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES)

Adna Cristina Barbosa de Sousa<sup>1</sup>, Ana Gabriella Lucena de Paiva Guimarães<sup>2</sup>, Nathália Souza Bezerra<sup>3</sup>, Andréa Farias de Almeida<sup>4</sup>.

1. Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: adnasousa@cbiotec.ufpb.br
2. Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: anag.paiva@hotmail.com
3. Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: nathaliasouza\_13@hotmail.com
4. Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: andreaafalm@cbiotec.ufpb.br

### RESUMO

*Beauveria bassiana* é um fungo promissor no controle biológico de insetos-praga. As crescentes despesas na produção de conídios levantam a necessidade de averiguar a eficiência de alguns substratos de baixo custo. O objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de utilização de diferentes substratos brutos para a conidiogênese, visando à redução nos custos de produção. A produção e viabilidade dos conídios foram realizadas utilizando 30 g do substrato e 0,3 µL da suspensão de conídios ( $1 \times 10^6$  conídios/mL). Após 10 dias de incubação (umidade  $70 \pm 10$  % e temperatura  $T = 29 \pm 1$  °C), o arroz ( $2.00 \times 10^6$  conídios/g de substrato), algaroba ( $2.36 \times 10^6$  conídios/g), malte A ( $1.22 \times 10^6$  conídios/g) e B ( $1.75 \times 10^6$  conídios/g), apresentaram maior produção de conídios. Os conídios produzidos mostraram atividade inseticida sobre o cupim do coqueiro acima de 80 % de mortalidade. Estes novos substratos brutos podem representar uma alternativa viável para produção de fungos entomopatogênicos, para uso no controle biológico de vários insetos praga.

**Palavras chave:** Controle biológico; Substratos naturais; Fungo filamentososo.

### EVALUATION OF ALTERNATIVE GROSS SUBSTRATES FOR THE PRODUCTION OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS) VUILLEMIN (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES)

### ABSTRACT



*Beauveria bassiana* is a promising fungus for the biological control of insect pests. The growing costs of conidia production have raised the need to ascertain the efficiency of some low cost substrates. The aim of this study was to analyze the potential use of different raw substrates for conidiogenesis in an effort to reduce production costs. The production and viability of the conidia were evaluated using 30 g of substrate and 0.3  $\mu\text{L}$  of a conidia suspension ( $1 \times 10^6$  conidia/mL). After 10 days of incubation ( $70 \pm 10\%$  humidity and temperature  $(T) = 29 \pm 1$  °C), rice ( $2.00 \times 10^6$  conidia/g substrate), algaroba ( $2.36 \times 10^6$  conidia/g), malt A ( $1.22 \times 10^6$  conidia/g) and malt B ( $1.75 \times 10^6$  conidia/g) showed higher levels of conidia production. The resulting conidia showed greater than 80% insecticidal activity on coconut termites. These new raw substrates may represent viable alternatives for the production of entomopathogenic fungi for use in the biological control of various insect pests.

**Keywords:** Biological control; Natural substrates; Filamentous fungus.

## INTRODUÇÃO

O controle de pragas em sua maioria tem sido realizado por meio de agrotóxicos, gerando problemas de intoxicação humana e da fauna silvestre, resíduos nos alimentos, na água e no solo, aparecimento de novas pragas e de populações resistentes a esses produtos (6).

Em busca de técnicas e soluções ecologicamente corretas, devido em grande parte, à conscientização em relação ao mau uso de agrotóxicos, o controle biológico de pragas por intermédio de agentes microbianos é considerado muito promissor e dentre os agentes de controle microbiano de pragas de importância econômica, destacam-se os fungos, devido à abundância de gêneros e espécies (2, 3, 9, 49).

Dentre os fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin se destaca como um importante agente no controle biológico de pragas. É comumente encontrado parasitando insetos e possui especificidade em mais de 200 espécies de insetos-praga (4). As estruturas produzidas e comercializadas das diferentes espécies de fungos entomopatogênicos são os conídios e o meio padrão utilizado é arroz branco, devido a sua capacidade de conservar a umidade e ser rico em carboidratos (5, 47).

Porém, dependendo do objetivo, da escala de produção sobre meio de cultura sólido e do tempo de conservação até a utilização dos mesmos, torna-se caro e inviável. Um dos principais fatores para o sucesso do controle biológico utilizando *B. bassiana* é a produção de grande quantidade de conídios por um preço competitivo. Assim, o processo de produção deve ser barato e ao mesmo tempo produzir conídios viáveis e virulentos (34).



Visando à redução dos custos e obtenção de grandes quantidades de propágulos viáveis, substratos naturais, tais como painço, quirela de milho, trigo em grão (14), farinha de tapioca, batata doce, extratos de abóbora e mamão (17), mistura de farelo e casca de arroz, cevada (12, 19, 29), entre outros, vêm sendo utilizados, apresentando resultados promissores para produção de *B. bassiana*. Tendo em vista esses aspectos, estudos básicos de avaliação e seleção de novos substratos como fibra da algaroba, resíduo de malte, acerola (sementes e fibras) e bagaço da cana-de-açúcar, além de propriedades nutricionais importantes para o crescimento do fungo, possuem grande disponibilidade e baixo custo.

A algaroba é uma leguminosa não oleagionosa, pertencente ao gênero *Prosopis* L. O fruto da algaroba é do tipo legume e apresenta em sua composição elevados teores de proteínas e carboidratos. Essa espécie é utilizada para a produção de madeira, carvão vegetal, álcool, melação e na alimentação animal e humana. A algaroba é encontrada em abundância no Nordeste, o que permite a sua utilização para diversos fins (23, 25).

O resíduo úmido da produção de cerveja, também chamado de bagaço de malte, é oriundo do processo de mosturação. Pode ser descrito com uma massa resultante da aglutinação da casca com resíduos do processo de mosturação. O resíduo de malte possui altos índices de proteínas e açúcares resultantes das reações de hidrólise do conteúdo amiláceo do cereal, esses são os maiores atrativos para o seu reaproveitamento (10).

A acerola ou cereja-das-Antilhas, *Malpighia puniceifolia* L., pertence à família *Malpighiaceae* e gênero *Malpighia* L. (31, 32). É amplamente cultivada nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. A grande utilização desse fruto na indústria de polpas e sucos vem gerando o descarte inadequado dos resíduos (cascas e sementes). Durante o processamento de acerola para produção de suco ou de polpa congelada, a prensagem das frutas produz um resíduo altamente fibroso. Este resíduo é muitas vezes descartado, gerando um enorme volume de lixo orgânico durante a safra da acerola. Uma maior quantidade do mesmo, no meio ambiente, gera uma poluição que poderia ser minimizada com a sua utilização para o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos (8, 26).

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L., é uma planta semi-perene, de clima tropical e subtropical e pertence à família *Poaceae*. É considerada uma das principais culturas produzidas no Brasil. Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, estima-se que são gerados cerca de 250 kg de bagaço. Este montante aponta o bagaço da cana-de-



açúcar como o resíduo agroindustrial, de natureza lignocelulósica, mais abundante no Brasil (21, 44).

Nos últimos anos, tem se dado uma atenção especial para minimizar ou reaproveitar resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. Os resíduos originários da indústria de alimentos envolvem quantidades significativas de casca, caroço e outros. Esses resíduos, além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de carbono, energia e proteínas, passíveis de recuperação e aproveitamento. Também servem como substrato de baixo custo para a produção de enzimas de origem microbiológicas pelo processo de fermentação em estado sólido (11). Além disso, sua utilização permite a diminuição do volume de resíduos descartado no ambiente, gerando assim produtos com relevantes aplicações na indústria e na biotecnologia (33, 46).

A utilização de substratos brutos não convencionais e resíduos agroindustriais sem adição de suplemento nutricional para o crescimento fúngico, poderá trazer novas perspectivas para o estudo da produção de *B. bassiana*, promovendo avanços em direção aos estudos do controle biológico de pragas, avaliação do crescimento, viabilidade dos conídios e patogenicidade. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar o potencial de utilização de diferentes substratos para conidiogênese a partir do fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Linhagem fúngica:** foi utilizada uma linhagem de *B. bassiana* cedida pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (Tabela 1).

**Tabela 1.** Origem da linhagem de *Beauveria bassiana*.

<b><i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuillemin</b>	
<b>Número de acesso</b>	•URM 2915
<b>Substrato</b>	<i>Nezara viridula</i>
<b>Origem geográfica</b>	*CENARGEN/PR
<b>Ano de registro</b>	1987

•URM - University Recife Mycologia; \*CENARGEN - Centro Nacional Agropecuário de Recursos Genéticos. Fonte: Autor.



**Origem dos insetos:** os cupins (*Heterotermes* sp.) foram coletados do cultivo de coco, no município de Alhandra/PB.

**Origens dos substratos:** foram utilizados cinco substratos especificados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Origens dos substratos.

Substrato	Origem
Arroz polido (substrato padrão)	Produto comercializado
Resíduos de malte A e B	Laboratório de Química Orgânica Aplicada CBIotec - UFPB (João Pessoa - PB)
Bagaço da cana-de-açúcar	Barraca de caldo-de-cana (João Pessoa - PB)
Acerola - fibras e sementes	Indústria Polpas de Frutas Ideal (João Pessoa - PB)
Algaroba – fibras	Região do Semiárido (Japi - RN)

Fonte: Autor. Dentre os substratos citados na Tabela 2, destacam-se os resíduos de malte cervejeiro e a fibra de algaroba, pelo ineditismo da utilização desses substratos na produção de conídios. Os resíduos de malte cervejeiro foram coletados ao final da etapa de clarificação e lavagem do mosto do processo artesanal da produção cervejeira. O malte B foi coletado quando o mosto originário da etapa de lavagem atingiu a densidade específica de 1,010, enquanto que o malte A foi coletado quando a densidade específica do mosto alcançou 1,005. A densidade do mosto reflete a concentração de sólidos solúveis, principalmente de açúcares (fermentescíveis e dextrinas). Já para o substrato algaroba, utilizaram-se as suas fibras após um processo de prensagem das vagens. O fruto da algaroba foi prensado em prensa hidráulica manual a uma pressão de 50 kgf/cm<sup>2</sup>, conforme metodologia proposta por Silva et al. (38). O resíduo fibroso resultante da prensagem (fibra da algaroba) foi utilizado como substrato para crescimento e avaliação da esporulação de *B. bassiana*.

**Prensagem da algaroba:** os legumes da algaroba foram devidamente selecionados e descartados os atacados por fungos e insetos. Pesados em uma balança eletrônica (Gural - modelo Esse - 15), carga máxima de 15 kg e mínima de 0,005 Kg. Em seguida, foram sanitizadas imergindo-as em uma solução de hipoclorito de sódio a 3 % durante 5 minutos. A remoção dos resíduos sanitizantes foi promovida pelo enxágue em água corrente. Após esse procedimento, foram hidratadas em água destilada aquecida a 65 ± 2 °C, na proporção de 1:1 m/v (1 kg de vagem para 1 L de água) durante 3 horas. Ao final desse processo, os legumes hidratados foram submetidas à prensagem em prensa hidráulica manual a uma pressão de 50 Kgf/cm<sup>2</sup> (37).



**Meio de manutenção da linhagem fúngica:** Ágar-Sabouraud-dextrose: 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. pH 5.6. As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, onde a cultura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração à 4 °C.

**Produção de conídios:** o fungo foi inoculado em meio de cultura para conidiogênese (esporulação) (Meio Completo - MC) (5). Em seguida, as placas foram incubadas a 25 °C por um período de 7 a 10 dias para crescimento e conidiogênese do fungo. Após esse período, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio de cultura e transferidos para tubos de ensaio fechados com filme PVC e armazenados sob refrigeração a 4 °C por um período não superior a 10 dias. Para o preparo da suspensão, foram adicionados aos conídios água destilada + “tween” 80 a 0,01 %. Em seguida, foi estimada a concentração dos conídios em câmaras de Neubauer e as suspensões foram padronizadas para  $1 \times 10^6$  conídios/mL.

**Teste preliminar para ajustar a umidade dos meios de cultura para 70 %:** o teste foi realizado para medir o volume de água destilada em 30 g de cada substrato, contidos em erlenmeyer de 250 mL. Os erlenmeyers foram autoclavados e, após resfriamento, foram feitas as pesagens. Em seguida, os erlenmeyers foram levados à estufa (80 °C) para secagem dos materiais até o peso constante. Posteriormente, foi realizada uma nova pesagem e, após a subtração da massa seca, foi calculado o volume de água adicionado a cada substrato de forma a resultar numa umidade em torno de 70 % após a autoclavagem. O volume de líquido adicionado ao meio foi baseado na equação especificada abaixo:

$$m_{H2O} = \frac{m_s(x_2 - x_1)}{1 - x_2}$$

Sabendo que:  $m_s$  = massa de substrato;  $x_1$  = umidade inicial do substrato e  $x_2$  = umidade desejada.

**Avaliação da produção de *Beauveria bassiana* em diferentes substratos:** foram utilizados cinco diferentes substratos ricos em carboidratos (Tabela 2). O experimento foi realizado em erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 g do substrato com umidade em torno de 70 %. Foram preparados três frascos para cada substrato. Foram inoculados  $1 \times 10^6$



conídios/mL e em seguida os frascos foram incubados ( $T = 29 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) e analisados durante 10 dias. Após esse período, foi adicionado 0,9 de água destilada + “tween” 80 a 0,01 % para se obter uma diluição final de 1:10 e coletado uma alíquota de 0.1 mL para realização da contagem dos conídios em câmara de Neubauer ao microscópio óptico (36).

**Avaliação da viabilidade dos conídios:** amostras dos conídios produzidos nos diferentes substratos foram tomadas e submetidas a diluições seriadas, até se obter uma concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL. Desta suspensão, inoculou-se, em triplicata, 100 mL em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Ágar-Dextrose), que em seguida foram incubadas por 18 horas ( $T = 29 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ). Após esse período, foram realizadas as contagens em cada placa, de 200 a 300 conídios viáveis ou não, sob microscópio de luz (aumento de 400x) (36).

**Bioensaio - avaliação da atividade inseticida:** foram utilizados 45 cupins. Foi realizado um experimento com três repetições de 15 cupins para cada tratamento. Os cupins foram imersos por 10 segundos em água destilada autoclavada + “tween” (0,01 %) contendo uma suspensão de conídios ( $1 \times 10^6$  conídios/mL<sup>-1</sup>). Posteriormente, os cupins foram transferidos individualmente para placa de Petri contendo uma dieta artificial (folha seca e pedaços do caule do coqueiro). As placas foram mantidas em temperatura ambiente e avaliadas a cada 24 horas durante 10 dias. O controle negativo foi realizado imergindo os insetos em água destilada autoclavada + “tween” (0,01 %) e mantendo-os nas mesmas condições citadas anteriormente (5).

**Análise estatística:** os experimentos foram realizados segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os dados obtidos analisados estatisticamente quanto à variância (teste *F*) e as médias comparadas entre si (Teste de Tukey), ambos ao nível de 5,0 % de probabilidade, utilizando-se o programa computacional Sisvar (15).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Avaliação do crescimento de *Beauveria bassiana***

O crescimento micelial de *B. bassiana* foi avaliado durante 10 dias no arroz polido (substrato padrão), fibra da algaroba, resíduo de malte (malte A e malte B), semente de acerola, fibra de acerola e bagaço de cana-de-açúcar. O crescimento de *B. bassiana* exibiu variação quanto ao crescimento e esporulação.



O arroz polido foi utilizado como padrão porque atualmente é o substrato mais empregado na produção para comercialização de conídios, devido a uma combinação de fatores como: características nutricionais, conservação da umidade, preço, ampla disponibilidade mundial e características físicas como tamanho e forma do grão (20).

Após 10 dias de incubação os substratos arroz polido ( $2,00 \times 10^6$  conídios/g de substrato), malte A ( $1,22 \times 10^6$  conídios/g de substrato), malte B ( $1,75 \times 10^6$  conídios/g de substrato) e fibra da algaroba ( $2,36 \times 10^6$  conídios/g de substrato), proporcionaram maior produção de conídios. Os substratos bagaço da cana-de-açúcar ( $0,85 \times 10^6$  conídios/g de substrato), semente de acerola ( $0,56 \times 10^6$  conídios/g de substrato) e fibra de acerola ( $0,54 \times 10^6$  conídios/g de substrato) proporcionaram uma conidiogênese menor (Tabela 3).

**Tabela 3.** Produção média e viabilidade dos conídios (conídios/g) em diferentes substratos de *Beauveria bassiana* ( $T = 29 \pm 1$  °C).

Substratos	Umidade (Volume de água destilada) <sup>0</sup>	Produção de conídios ( $\times 10^6$ ) <sup>1,2</sup> ( $\pm$ EP) <sup>3</sup>	Viabilidade (%) <sup>1</sup> ( $\pm$ EP) <sup>3</sup>
Arroz polido (meio padrão)	30 mL	$2,00 \pm 0,27$ a	$99,96 \pm 0,16$ a
Malte A	30 mL	$1,22 \pm 0,20$ ab	$90,04 \pm 0,23$ a
Malte B	30 mL	$1,75 \pm 0,28$ ab	$93,17 \pm 0,25$ a
Fibra de algaroba	30 mL	$2,36 \pm 0,31$ a	$98,21 \pm 0,27$ a
Bagaço da cana-de-açúcar	60 mL	$0,85 \pm 0,08$ b	$55,10 \pm 2,83$ b
Semente de acerola	30 mL	$0,56 \pm 0,04$ b	$68,29 \pm 2,03$ b
Fibra de acerola	20 mL	$0,54 \pm 0,02$ b	$71,11 \pm 1,09$ b
<b>CV%<sup>4</sup></b>		<b>21,68</b>	<b>7,48</b>

<sup>0</sup>Volume de água destilada necessária para se obter  $70 \pm 10$  % de umidade em 30 g de substrato bruto; <sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo Teste de *Tukey*; <sup>2</sup>Dados transformados por  $\sqrt{x + 0,5}$ ; <sup>3</sup>Erro padrão da média; <sup>4</sup>coeficiente de variação. Fonte: Autor.

Esses diferentes resultados podem ser justificados pela textura e suporte nutricional de cada substrato. A fibra da algaroba apresentou considerável crescimento e produção de conídios por ser uma leguminosa rica em nutrientes, apresentando composição química



variável, favorecendo o crescimento microbiano e produção de conídios (39). O malte B durante o processo de produção da cerveja foi submetido a poucas lavagens, por isso obteve maior produção de conídios que o malte A (mais lavagens), devido à presença de maior teor de açúcares fermentescíveis. A densidade específica do mosto ao final da etapa de recirculação/lavagem do malte B foi de 1,010 e do malte A foi de 1,005. Essa condição de coleta do malte justifica o melhor crescimento de *B. bassiana* no malte B.

O bagaço de cana-de-açúcar apesar de ser um substrato rico em polissacarídeos, e apresentar característica fibrosa que favorece a aeração e crescimento durante o cultivo, teve uma perda de umidade ao longo dos 10 dias de incubação. A perda de umidade levou à baixa disponibilidade de nutrientes, afetando o crescimento do fungo e esporulação (Tabela 4).

**Tabela 4.** Variação da umidade nos diferentes substratos utilizados para o cultivo de *Beauveria bassiana* após 10 dias de incubação ( $T = 29 \pm 1$  °C).

Substratos	Umidade inicial (%)	Umidade final (%)
Arroz polido (meio padrão)	71,50	67,56
Malte A	76,67	68,99
Malte B	74,49	66,28
Fibra de algaroba	76,98	69,03
Bagaço da cana-de-açúcar	66,87	55,98
Semente de acerola	71,78	61,17
Fibra de acerola	72,25	63,61
<b>CV%</b>	<b>6,89</b>	<b>5,63</b>

Fonte: Autor.

As sementes e as fibras da acerola também apresentaram baixa conidiogênese em relação aos outros substratos utilizados (arroz, fibra da algaroba, malte A e B). Isso pode ter sido ocasionado também, devido as diferentes concentrações de lignina presentes na composição das espécies vegetais.

Devido à grande rigidez e impermeabilidade conferida pela lignina, a maioria dos fungos não conseguem quebrar esse composto químico. Lousada Júnior et al. (24) encontrou em subprodutos da acerola, em média 18,4 % de lignina. Essa concentração é consideravelmente alta e pode está relacionada à diminuição da germinação e do crescimento de *B. bassiana* nestes substratos. As espécies vegetais apresentam



concentrações variáveis de lignina. Dessa forma, a presença da lignina na parede celular dificulta a hidrólise enzimática dos carboidratos.

No presente trabalho foram utilizados substratos brutos sem pré-tratamento ou suplementação para o desenvolvimento do fungo, e essa condição pode justificar o baixo crescimento do fungo nesses substratos.

Alguns fatores ambientais como temperatura e umidade podem influenciar o crescimento e o desenvolvimento do fungo. A variação da umidade nos diferentes substratos utilizados para o cultivo de *B. bassiana* após 10 dias de incubação em temperatura ambiente ( $T = 29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) está descrita na Tabela 4.

A umidade nos diferentes substratos utilizados variou ao longo dos 10 dias de cultivo. O malte A, malte B e a fibra de algaroba proporcionaram maior produção de conídios e foram os substratos que ao decorrer dos 10 dias tiveram as menores perdas de umidade, apresentando umidade final de 68,99 %; 66,28 % e 69,03 %, respectivamente.

Apesar da umidade final dos substratos utilizados ter variado de 55,98 % a 69,03 % e diferir da umidade relativa de 93 %, descrita por Webster e Gunnell (48) onde o desenvolvimento do micélio é favorecido, todos os substratos testados apresentaram crescimento e esporulação do fungo.

Vale ressaltar que a umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia a produção dos conídios. O substrato com a umidade adequada apresenta condições para que haja transferência de nutrientes e oxigênio. No entanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão e dissipação de oxigênio. Portanto, o controle da umidade é essencial para a otimização dos processos de cultivo em estado sólido. Quantidades excessivas de líquido na matriz sólida resultam na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam a respiração microbiana (35). Entretanto, o baixo nível de umidade leva a inibição do crescimento fúngico e, conseqüentemente, influenciará no produto final de interesse que são a produção e a viabilidade dos conídios (18).

### **Produção e viabilidade dos conídios**



A produção média e a viabilidade dos conídios (conídios/g) em diferentes substratos de *B. bassiana* esta apresentada na Tabela 3.

*B. bassiana* foi mais produtiva nos substratos arroz, malte A, malte B e fibra de algaroba, não diferindo estatisticamente entre si, com rendimentos de  $2,00 \times 10^6$ ;  $1,22 \times 10^6$ ;  $1,75 \times 10^6$  e  $2,36 \times 10^6$  conídios/grama, respectivamente. A esporulação variou estatisticamente nos substratos bagaço da cana-de-açúcar, sementes e fibras da acerola ( $0,85 \times 10^6$ ;  $0,56 \times 10^6$  e  $0,54 \times 10^6$ , respectivamente).

A viabilidade dos conídios produzidos nos substratos arroz, malte A, malte B e fibra de algaroba, após 72 horas da inoculação em temperatura ambiente, não diferiram estatisticamente entre si, com porcentagem de germinação de 99,96; 90,04; 93,17 e 98,21, respectivamente. O bagaço da cana-de-açúcar, a semente e a fibra da acerola diferiram estatisticamente, pois apresentaram menor capacidade de germinação (55,10 %; 68,29 % e 71,11 %, respectivamente) (Tabela 3).

As diferenças estatisticamente comprovadas na esporulação e na viabilidade dos conídios sugerem a carência de algum fator nutricional importante, associado à manutenção da umidade durante o processo de cultivo para a conidiogênese nos substratos bagaço da cana-de-açúcar, sementes e fibras da acerola. Essa deficiência pode ter sido ocasionada pela redução na diferenciação morfológica da parte vegetativa do fungo, em estruturas reprodutivas, com conseqüente redução da produção de conídios e germinação dos mesmos.

*B. bassiana* é considerado um fungo eucárpico (1). As estruturas reprodutivas surgem apenas em uma parte das estruturas somáticas, sendo a parte restante, a forma vegetativa. O comportamento (crescimento e esporulação) é uma resposta à composição e ao enriquecimento do meio de cultivo. No entanto, a variação na concentração de nutrientes como fonte de carbono e a redução da umidade, pode justificar as diferentes respostas no desenvolvimento vegetativo *in vitro* do fungo, nos diferentes substratos.

Em estudo de seleção de isolados de *B. bassiana* para o controle da broca do café, obtiveram produções de conídios/mL em torno de  $2,5 \times 10^6$  em cadáveres dos insetos da broca do café, mostrando semelhança com os resultados alcançados no presente estudo (30).

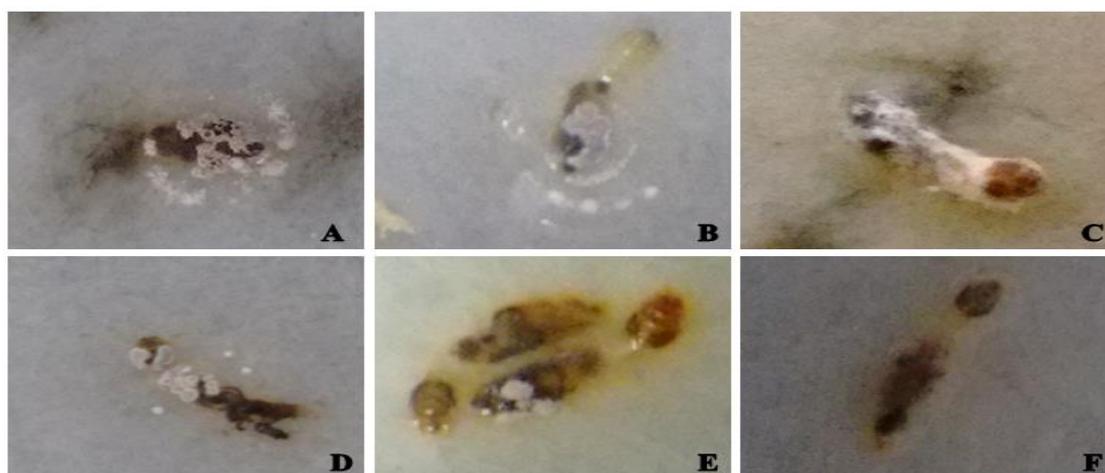
Em estudo realizado por Sene et al. (36), a porcentagem de germinação de conídios do fungo *M. anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin produzidos no arroz e na mistura de arroz + resíduo de cervejaria, apresentaram viabilidade média em torno de 85 %, bem próxima aos



valores encontrados no malte A (90,04 %) e B (93,17 %) e fibra da algaroba (98,21 %). Resultados similares também foram achados por Oliveira et al. (32) que verificaram que a viabilidade dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* cultivados em meio Batata-Dextrose-Ágar + antibiótico sulfato de estreptomicina e óleo Nujol esteve acima de 95 % e que apresentaram atividade patogênica sobre os insetos nos diferentes parâmetros avaliados sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* Fabr., 1794.

### Avaliação da patogenicidade de *Beauveria bassiana* sobre o cupim do coqueiro

Os conídios de *B. bassiana* produzidos no arroz polido, malte A, malte B, fibra da algaroba, bagaço da cana-de-açúcar, sementes e fibras da acerola mostraram efeito letal na concentração testada ( $10^6$  conídios/mL<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos evidenciaram mortalidade dos cupins às 72 horas após a infecção com conídios produzidos em todos os substratos. Após 96 horas da infecção, foram observadas hifas escassas projetando-se da superfície da cutícula dos cupins. A partir das 120 horas de infecção, foi observado a mumificação e o rompimento da cutícula do inseto, com exceção do grupo controle (Figura 1).



**Figura 1.** Infecção do cupim com *Beauveria bassiana*. Bioensaio realizado em água destilada autoclavada. Mumificação do inseto após 120 horas de infecção. A. Conídios produzidos na fibra de algaroba; B. Malte A; C. Malte B; D. Semente de acerola; E. Bagaço da cana-de-açúcar; F. Controle negativo – após 120 horas. Fonte: Autor.



Verificou-se que nos estágios iniciais, a infecção causou alterações fisiológicas como a diminuição dos movimentos, seguidos de paralisia. Esses dados confirmam os resultados obtidos por Vey et al. (45), onde os hospedeiros infectados [carrapato *Ixodes ricinus* L. (Linnaeus, 1758)] exibiam os primeiros sinais de colonização: inquietação, perda de coordenação motora, parada de ingestão de alimentos e morte.

Os distúrbios fisiológicos gerados nos hospedeiros, provavelmente foram provocados pela produção de micotoxinas. As dextruxinas, metabólitos secundários produzidos pelos fungos, são as principais toxinas que afetam os canais de transportes de íons, envolvidos nas respostas musculares e na integridade das membranas celulares. Portanto, estes fatores apontam que as micotoxinas estão envolvidas na sintomatologia exibida nos primeiros estágios de infecção (40).

A ação das micotoxinas produzidas por *B. bassiana* sob o cupim do coqueiro foi considerada aguda, devido à eliminação por completo e rapidamente do controle nervoso sobre as funções do corpo do inseto. Resultados semelhantes foram observados em saúvas (*Atta* sp.) e moscas domésticas infectadas com *B. bassiana*, onde foi observado diminuição momentânea dos movimentos (4).

A taxa de mortalidade dos cupins após infecção com os conídios produzidos nos diferentes substratos não diferiram estatisticamente superando 80 % de mortalidade (Tabela 5), com exceção do grupo controle. A virulência de *B. bassiana* não foi afetada devido ao seu crescimento nos diferentes substratos brutos após 10 dias de cultivo, sem nenhum suplemento nutricional. A capacidade de infecção, ocasionada inicialmente pela germinação dos conídios na cutícula do inseto, pode está associada a fatores como patogenicidade (dimensões dos conídios, taxa de crescimento e atividades enzimáticas), virulência, especificidade e tolerância ao hospedeiro (43).

**Tabela 5.** Atividade patogênica de *Beauveria bassiana* sobre o cupim adulto do coqueiro em condições de laboratório na concentração de  $10^6$  conídios/mL<sup>-1</sup>. Período de incubação - 10 dias.

Substratos	Taxa de mortalidade confirmada (%) ( $\pm$ EP) <sup>3</sup>
Arroz	91,6 $\pm$ 23,60
Malte A	83,4 $\pm$ 11,02
Malte B	87,9 $\pm$ 13,50
Fibra de algaroba	89,9 $\pm$ 10,98
Bagaço da cana-de-açúcar	93,02 $\pm$ 12,90



Semente de acerola	90,04 ± 9,56
Controle	1,22 ± 0,10
<b>CV%</b>	<b>11,8</b>

Fonte: Autor.

Os cupins infectados foram colocados em placa de Petri contendo papel toalha umedecido com água destilada autoclavada e mantidos em temperatura ambiente ( $T = 29 \pm 1$  °C). Diante dos dados obtidos, notou-se que *B. bassiana* não depende de um meio externo bastante nutritivo para dar início ao processo de infecção, visto que o tratamento contendo papel toalha umedecido, mesmo sendo ausente em nutrientes, garantiu a germinação dos conídios e crescimento na cutícula do cupim. A maioria dos fungos entomopatogênicos requer, pelo menos, 95 % de umidade relativa na superfície do hospedeiro para iniciar o processo de germinação, extensão do tubo germinativo e infecção. A alta umidade relativa e a temperatura adequada são condições favoráveis para o crescimento do fungo e a ocorrência da doença, sendo que temperaturas altas e baixas retardam o crescimento e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença (16).

A patogenicidade de *B. bassiana* não está relacionada ao meio onde o conídio foi produzido, mas sim na concentração da suspensão de conídios, especificidade com o hospedeiro e fatores abióticos.

Os conídios de *B. bassiana* são envolvidos por uma substância transparente, mucilaginosa e aparentemente viscosa que, além de proteger contra a dessecação, facilita a adesão desses conídios à superfície do inseto. O muco que envolve os conídios possui altos níveis de aminopeptidases, que podem criar condições favoráveis para a atuação das enzimas extracelulares e garantir o processo de germinação e colonização do fungo sob a cutícula do inseto (1). Podemos destacar a ação de enzimas envolvidas na patogenicidade do fungo *B. bassiana*. As proteases extracelulares produzidas por *B. bassiana* desempenham um papel crucial na hidrólise da cutícula para penetração do fungo através do exoesqueleto (7). Uma vez na hemocele, o fungo poderá produzir metabólitos tóxicos capazes de causar paralisias (13), atuar nos hemócitos (28), destruir o balanço fisiológico normal do sistema hospedeiro (41, 42) até levá-lo a morte.

Considerando o elevado preço do arroz para produção de propágulos viáveis, e os custos e despesas que tem acarretado aos produtores de conídios, tem se dado uma atenção especial para o reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes



processos industriais, com o intuito de baratear esse método de controle e minimizar os custos da produção em grande escala dos conídios (27). Os substratos alternativos e resíduos agroindustriais além de serem fontes de nutrientes, possuem grande potencial e tem sido utilizado para o cultivo desse fungo.

Esses substratos podem conter muitas substâncias de alto valor nutritivo. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (22), podendo fornecer uma redução de aproximadamente 50 % nos custos de produção de conídios de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de vários insetos-praga.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a utilização de resíduos de malte, bagaço da cana-de-açúcar, fibra da algaroba, sementes e fibra da acerola na composição de meios de cultura sólidos para a produção de *B. bassiana* foi eficiente por concentrar umidade e garantir a esporulação; Os conídios produzidos a partir dos substratos não convencionais foram viáveis e apresentaram efeito letal na concentração testada; *B. bassiana* foi considerado patogênico para o cupim do coqueiro devido à especificidade ao hospedeiro, sugerindo que este isolado tem potencial para uso no controle biológico; A taxa de mortalidade dos cupins após infecção com os conídios produzidos nos diferentes substratos superaram 80 % de mortalidade. *B. bassiana* apresentou bom desenvolvimento e resposta aos experimentos realizados *in vitro*, apontando este isolado fúngico como um possível agente entomopatogênico a ser explorado para minimizar os danos ecotóxicos na produção animal e vegetal.

## REFERÊNCIAS

1. Alexopoulos CJ, Mims CJ. Blackwell M. Introductory mycology. 4<sup>a</sup> Ed. New York: Journal Wiley; 1996.
2. Alves SB. Fungos entomopatogênicos. In: Alves SB, editores. Controle microbiano de insetos. São Paulo; 1986. p. 73-126.
3. Alves SB. Perspectiva para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 1992. Disponível via <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/3822/1113>.
4. Alves SB. Fungos entomopatogênicos. In: Alves SB, editores. Controle microbiano de insetos. FEALQ, Piracicaba, 1998a. p. 145-174.
5. Alves SB. Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. 1<sup>a</sup> ed. Malone Ltda, Piracicaba; 1998b.



6. Alves SB, Lopes RB. Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. 1ª ed. FEALQ, Piracicaba; 2008.
7. Bidochka MJ, Kachatourians GG. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1990; 56: 362-370.
8. Botella C, Diaz A, Ory I, Webb C. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 2007; 42: 98-101.
9. Burges HD. Techniques for testing microbials for control of arthropod pests in greenhouses. In: Lacey LA, Kaya HK, editors. *Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands; 2000. p. 505–526.
10. Clark JH, Murphy MR, Crooker BA. Supplying the protein needs of dairy Cattle by products feeds. *Journal of Dairy Science*. 1987; 70: 1092-1109.
11. Coelho MAZ, Leite SGF, Rosa MF, Furtado AAL. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde. B.CEPPA. 2001. Disponível via <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/414064>.
12. Dorta B, Bosch A, Arcas JA, Ertola RJ. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990; 33: 712-715.
13. Dresner E. The toxic effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on insects. *Journal of the New York Entomology Society*. 1950; 58: 269- 278.
14. El Damir M. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Biological Sciences*. 2006; 6: 269-274.
15. Ferreira DF. (Ed.). *Sisvar: versão 4.3*. Lavras: DEX/UFLA. 2003. Disponível via: <http://www.dex.ufla.br/~danielff/programas/sisvar.html>.
16. Hallsworth JE, Magan N. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1999; 74: 261-266.
17. Hepburn HR. Structure of the Integument. In: Kerkut GA, Gilbert L, editors. *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology*, Oxford; 1985. p.1-58.
18. Holker U, Hofer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004; 64: 175-186.
19. Ibrahim YB, Low W. Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. *International Journal of Pest Management*. 1993; 3: 288-292.
20. Jenkins NE, Heviofo G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*. 1998; 31: 21-31.
21. Lago AC, Bonimi A, Cavalett O, Cunha MP, Lima AP. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. *Biomass and Bioenergy*. 2012; 46: 5-12.
22. Laufenberg G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*. 2003; 87: 167-198.
23. Lima DF. et al. Avaliação nutricional da farinha de Algaroba (*Prosopis juliflora*): preparo, composição centesimal e toxidez. *Arq. Biol. Tecnol*. 1983. 3: 5-16.
24. Lousada Júnior JE, Costa JMC, Neiva JNM, Rodriguez NM. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. Universidade Federal do Ceará. *Revista Ciência*



- Agronômica. 2006. Disponível via <http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/225/220>.
25. Mahgoub O. et al. Evaluation of Meskit (*Prosopis juliflora*) pods as feed for goats. *Animal Feed Science and Technology*. 2005; 121: 319-327.
26. Marino Netto L. *Acerola, a cereja tropical*. 1ª ed. Nobel, São Paulo; 1986.
27. Mascarin GM, Quintela ED. Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico. *Documentos/Embrapa Arroz e Feijão*. 2013; 1: 1-17.
28. Mazet I, Huang SY, Boucias DG. Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. *Experientia*. 1994; 50: 142-147.
29. Nelson TL, Low L, Glare TR. Large scale production of New Zealand strain of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium* sp. In: *Conference Proceeding. The New Zealand Plant Protection Society Incorporated: New Zealand Plant Protection Society*; 1996. p. 257-261.
30. Neves PMOJ, Hirose E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) *Neotrop. Entomol.* 2005; 34: 77-88.
31. Oliveira JRP, Soares Filho WS, Kobayashi AK, Ritzinger R. Aspectos botânicos. In: Ritzinger R, Kobayashi AK, Oliveira JRP, editores. *A cultura da aceroleira: Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas*; 2003. p. 2-15.
32. Oliveira MAP, Marques EJ, Texeira VW, Barros R. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae) *Acta Sci. Biol. Sci.* 2008; 30: 220-224.
33. Roberto IC, Silva SS, Felipe MGA, Mancilha IM, Sato S. Bioconversion of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate for the Production of xylitol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1996; 57: 339-347.
34. Robl D, Sung LB, Novakovich JH, Marangoni PRD, Zawadneak MAC, Dalzoto PR, Gabardo J, Pimentel IC. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) samson strains on agro-industrial residues. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009; 40: 296-300.
35. Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advance*. 2009; 27: 185-194.
36. Sene L, Alves LFA, Lobrigatte MFP, Thomazoni D. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. *Arq. Inst. Biol.* 2010; 77: 449-456.
37. Silva SA. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. *Quim. Nova*. 2001; 24: 460-464.
38. Silva CG, Mata MERMC, Braga MED, Queiroz VS. Extração e fermentação do caldo de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) para obtenção de aguardente, *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2003. Disponível via <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev51/Art516.pdf>.
39. Silva CGM, Melo Filho AB, Pires EF, Stamford TLM. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2007; 27: 733-736.
40. Shah PA, Pell JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003; 61: 413-423.
41. Sharma S, Agarwal GP, Tajak RC. Pathophysiological alterations caused in *Heliothis armigera* by toxic metabolites of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1994; 32: 168-171.
42. Sturmer AT, Luangsa-Ard JJ, Roberts DW. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Científica, Ciências Biológicas*. 2003; 6: 85-88.



43. Vargas LRR, Rossato M, Ribeiro RTT, Barros NM. Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2003; 46: 13-18.
44. Vidal RA, Trezzi MM. Origem da cultura e sua importância. In: Ribas A. Vidal, editores. *Teoria e prática do manejo de infestantes na cultura da cana-de-açúcar no Brasil*. Porto Alegre; 2011. p. 45-57.
45. Vey A, Matha V, Dumas C. Effects of the peptide mycotoxin e on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2002; 7: 32-40.
46. Wanderley MD, Neves E, Andrade CJ. Aspectos da produção industrial de enzimas. *Revista Hestia Citino*. 2011; 1: 30-36.
47. Wraight SP, Jackson MA, Kock SL. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford; 2001. p.253–287.
48. Webster RY, Gunnell PS. *Compendium of rice diseases*. 1<sup>a</sup> ed. American Phytopathological Society; 1992.
49. Zimmermann G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1982; 40: 6-40.