



Fotos: Letícia Ribeiro Pimenta

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVELCOMUNICADO
TÉCNICO

225

Aracaju, SE
Dezembro, 2019

Técnicas para produção artesanal e utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no campo

Joana Maria Santos Ferreira
Francisco José dos Santos
Letícia Ribeiro Pimenta
Amanda Vieira Santana
Agnaldo José dos Santos
Viviane Talamini

Técnicas para produção artesanal e utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no campo¹

¹ Joana Maria Santos Ferreira, Engenheira-agrônoma, mestra em Entomologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Francisco José dos Santos, Químico, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Leticia Ribeiro Pimenta, graduanda em Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE. Amanda Vieira Santana, graduanda em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE. Agnaldo José dos Santos, graduando em Engenharia Agrônômica, Universidade Federal do Pará, Aracaju, SE. Viviane Talamini, Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

O controle biológico empregando fungos entomopatogênicos é um método de controle importante no manejo integrado de pragas por reduzir o uso dos agrotóxicos nas plantações, aumentar a proteção ambiental (Ahmed e Leather, 1994) e proteger a saúde, uma vez que não deixa resíduos nos alimentos, não contamina os mananciais de água e o solo, e nem os insetos polinizadores e os seres humanos (Strasser et al., 2000). Exemplos bem-sucedidos de controle biológico são amplamente relatados com os fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokine. Estes são entomopatógenos que podem ser facilmente multiplicados em meio artificial e usados como bio-pesticida no controle de diversas pragas (Alves, 1998). Técnicas de produção são desenvolvidas buscando aumentar a eficiência de uso desses patógenos no campo e a redução de custos. Para isso, devem ser utilizados produtos vegetais ricos em amido, como batata, arroz, aveia, milho e feijão, ser de baixo custo

e ao mesmo tempo produzir conídios viáveis e virulentos (Leite et al., 2003). Desses, o arroz é um dos substratos vegetais mais aplicados na produção de conídios em larga escala, pois fornece todos os nutrientes necessários ao crescimento e reprodução dos fungos (Alves, et al., 2008), principalmente, daqueles que produzem conídios aéreos como é o caso do *M. anisopliae* e do *B. bassiana*, em função das suas necessidades nutricionais e metabólicas. Além disso, os conídios podem ser separados facilmente do substrato e, geralmente, apresentam boa virulência para as pragas-alvo (Alves et al., 2008). A produção em massa com arroz cozido foi desenvolvida para o *Metarhizium anisopliae* na década de 70 (Aquino et al., 1974).

Embora existam no Brasil biofábricas para produção de fungos, essa tecnologia ainda apresenta certa limitação de uso por pequenos e médios produtores devido às dificuldades de adoção, como disponibilidade no mercado, condições

de preservação e armazenamento capazes de manter a patogenicidade e virulência dos fungos pelo menos por dois anos, e as técnicas de aplicações (Almeida; Batista Filho, 2006).

Entretanto, em vários países, a produção de fungos entomopatogênicos em meios sólidos é feita de forma artesanal e semi-industrial por não precisar de tecnologias aprimoradas e pela simplicidade no seu manuseio (Alves, 1998). Porém, esta técnica tem sido pouco difundida no meio rural e pouco utilizada pelo pequeno e médio produtor ou mesmo em sistemas de produção orgânica ou agroecológica.

Os objetivos do presente trabalho são apresentar uma técnica de produção artesanal de conídios do fungo *B. bassiana* em condição ambiente a fim de viabilizar a utilização dessa técnica diretamente na propriedade e indicar formas para utilização desse agente no campo, em especial, contra as principais pragas do coqueiro.

Técnica para produção artesanal de conídios do fungo *B. bassiana*: Passo a passo

Etapa 1

Obtenção da Cultura matriz do fungo

A cultura matriz é o coração da produção artesanal na fazenda. Precisa ser obtida de um laboratório especializado e conduzida em ambiente totalmente asséptico, por pessoa treinada, para assegurar a qualidade do fungo produzido e a ausência total de agentes contaminantes no produto comercializado.

Produção da Cultura matriz do fungo em laboratório

Advém, sempre, de um isolamento monospórico conduzido no laboratório, em ambiente asséptico, e preparado em meio Batata dextrose ágar (BDA) em tubos de ensaio. As culturas monospóricas com melhor desempenho, em termos de velocidade de crescimento, massa fúngica e pureza, são selecionadas e preparadas em suspensão (suspensão 1) para dar início as culturas matrizes que servirão de fonte de inóculo para a produção artesanal na fazenda.

Todas as fases de produção da cultura matriz são realizadas, em câmara asséptica. No preparo da suspensão 1, adiciona-se 5 mL de uma solução aquosa de polisorbato 80 a 0,05%, ao tubo com a cultura monospórica agitando-o bem com o auxílio de um agitador de tubos, para soltar os conídios do meio de cultura. Para o preparo da cultura matriz coloca-se uma quantidade de 50 g de arroz parboilizado e 20 mL de água destilada em Erlenmeyer de 250 mL, deixa por 30 minutos em repouso, mistura duas a três vezes para uma melhor absorção de água, depois se leva à autoclave por um período de 20 minutos a uma temperatura de 121 °C e 1 kgf de pressão. O meio de cultura ao esfriar é então inoculado, com o auxílio de uma pipeta automática, com 5 mL da suspensão 1 por erlenmeyer, e estes fechados com um tampão de algodão envolvido por uma gaze. Em seguida os erlenmeyers são mantidos em estufa incubadora (DBO), a uma temperatura de 26 ± 2 °C por 15 dias.

Os frascos erlenmeyers podem ser substituídos por sacos plásticos autoclaváveis de 1kg no preparo das culturas matrizes destinadas à produção artesanal, no intuito de facilitar a operação de inoculação do fungo. Em sacos de 1 kg colocar 100 g de arroz parboilizado e 40 mL de água destilada; deixar em repouso por 30 minutos; homogeneizar a mistura frequentemente, para uma melhor absorção da água; e, esterilizar em autoclave por um período de 20 minutos à 121 °C de temperatura e 1 kgf de pressão. Após o resfriamento

do meio de cultura, dentro da câmara asséptica, se faz a inoculação do fungo utilizando 5 mL da suspensão 1 por saco, com o auxílio de uma pipeta automática. Em seguida, o material inoculado será mantido em estufa incubadora (DBO), em temperatura média de $26 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ por 15 dias. O tamanho e a pureza da cultura formada e a ausência de contaminantes são fatores determinantes para assegurar a qualidade da cultura matriz o que irá garantir com isso o melhor desempenho da produção artesanal.

A cada quatro ciclo de produção do fungo no substrato de arroz será obrigatório a aquisição de nova cultura matriz para aumentar a virulência do fungo e assegurar a qualidade das novas produções.

Etapa 2

Produção artesanal do fungo em garrafas plásticas

Material necessário – cuscuzeiro com capacidade de 2 litros ou mais, garrafas plásticas de 2 litros, arroz parbolizado, fogão a gás, tampões de algodão, papel alumínio, dosadores plásticos de medidas, luvas plásticas descartáveis, prateleiras (Figura 1).



Foto: Joana M. S. Ferreira

Figura 1. Material necessário para a produção artesanal do fungo *Beauveria bassiana*.

Esterilização artesanal dos vasilhames – Antes da inoculação do fungo é necessário que se faça a assepsia das garrafas plásticas, do funil e do recipiente plástico dosador, evitando dessa forma a ação dos agentes contaminantes. Para isso são realizados dois processos de lavagens: i) lavagem desse material com detergente neutro e enxágue com água limpa; e, ii) lavagem com água pré-fervida e morna. Em seguida deixar o material lavado escorrer e secar naturalmente em ambiente limpo. Os tampões de algodão são esterilizados no cuscuzeiro e devem ser envolvidos em papel alumínio para não absorver umidade.

Esterilização e preparo artesanal do meio de cultura – O arroz parboilizado é colocado dentro do cuscuzeiro (≥ 2 kg) envolvido por uma tela plástica ou um saco de pano (Figura 2) para evitar que os grãos passem pelo ralo vaporizador do cuscuzeiro e caiam na água. O tempo previsto para a esterilização e pré-cozimento no vapor é de aproximadamente 1h15m a uma temperatura média de 100 °C. Para cada 10 garrafas plásticas de dois litros é necessário esterilizar 2 kg de arroz parboilizado. Decorrido esse tempo, quando o arroz e a água estiverem menos quentes transferi-los, com o auxílio do funil e do recipiente plástico dosador, para as garrafas plásticas (Figura 3).

A quantidade utilizada por garrafa é de 200 g do arroz pré-cozido e 60 mL da água pré-fervida no cuscuzeiro. Nessa

fase do trabalho é imprescindível o uso de luvas plásticas descartáveis.



Fotos: Letícia R. Pimenta

Figura 2. Preparo do arroz para o pré-cozimento a vapor, em cuscuzeiro doméstico. Aracaju, 2018.



Fotos: Letícia R. Pimenta

Figura 3. Transferência do arroz pré-cozido e de água morna para garrafas previamente secas e esterilizadas. Aracaju, 2018.

Inoculação artesanal do substrato sólido – Finalizado os procedimentos acima, se fará então, em temperatura e condições ambiente, a inoculação do meio de cultura (Figura 4A) com o fungo proveniente da cultura matriz, como indicado a seguir: Transferir cerca de 25 g da cultura matriz para cada garrafa, misturando bem para promover a homogeneização do fungo inoculante ao substrato de arroz (Figura 4B) e garantir maior uniformidade

de crescimento do *B. bassiana* sobre o meio. Em seguida, fechar as garrafas com tampões de algodão (Figura 4C) o que evita a entrada de contaminantes, mas, permite a entrada do oxigênio. Nessa fase é imprescindível além do uso de luvas plásticas, também o uso de máscara descartável ou de máscara descartável com proteção respiratória para não aspirar esporos do fungo, capa de proteção da roupa, touca e luvas plásticas descartáveis.



Fotos: Letícia R. Pimenta

Figura 4. Fases da produção de *Bauveria bassiana* em condições ambiente: inoculação do meio de cultura (A); homogeneização do fungo no substrato (B); e fechamento das garrafas com tampões de algodão (C). Aracaju, 2018.

Crescimento das culturas de *B. bassiana* – As garrafas, uma vez inoculadas e fechadas, são mantidas em temperatura ambiente (26 °C a 30 °C) e acondicionadas em mesas ou prateleiras, deitadas uma ao lado da outra (Figura 5A), para facilitar o crescimento do fungo. Nessa fase, a garrafa deve ser deixada em repouso por três a cinco dias, até que o substrato fique totalmente coberto por micélios do fungo. Decorrido esse período de incubação, é necessário fazer a cada três dias a oxigenação da cultura e a homogeneização do substrato. Completada a fase de crescimento do fungo (10 a 15 dias), o material estará pronto para ser usado em campo (Figura 5B). A cada ciclo completo de produção são selecionadas garrafas com melhor desempenho de crescimento (massa fúngica branca) e pureza (Figura 6) para servirem como culturas matrizes inoculantes nos próximos 2º, 3º

e 4º ciclos de produção. Ao final do 4º ciclo de produção no substrato de arroz, deve-se adquirir novamente uma cultura matriz do fungo mais virulenta, ou seja, de 1ª geração de forma a dar início ao próximo processo serial de produção. É importante que ao final de cada série de produção, todo o lote de fungo seja de imediato utilizado no campo. Entretanto, se houver excedente de produção, o material produzido poderá ser armazenado/conservado em freezer ou geladeira por um período de até 12 meses e 30 dias, respectivamente, bastando para isso ser transferido das garrafas para bolsas plásticas de 1 kg. Nessa fase do crescimento do fungo é imprescindível a utilização de máscara descartável com proteção respiratória ou máscara descartável simples para não aspirar esporos do fungo durante a oxigenação do fungo, capa de proteção da roupa, touca e luvas plásticas descartáveis.



Fotos: Joana M. S. Ferreira

Figura 5. Garrafas acondicionadas em prateleira, logo após a inoculação do fungo, para crescimento da cultura em condição ambiente (A); e cultura do fungo com 15 dias de crescimento e pronta para uso em campo (B). Aracaju, 2018.



Foto: Joana M. S. Ferreira

Figura 6. Cultura do fungo selecionada a cada ciclo, para servir de cultura inoculante (matriz), no processo serial de produção do fungo *Beauveria bassiana*. Aracaju, 2018.

Rendimento obtido na produção artesanal do fungo

Produção de conídios – A produção média de conídios obtida por garrafa foi de $6,5 \times 10^9$ conídios g^{-1} ou $1,3 \times 10^9$ conídios mL^{-1} de suspensão.

Viabilidade de conídios – A taxa de germinação dos conídios foi de $\geq 90\% \pm 5\%$.

Qualidade da produção

Por ser conduzida em ambiente natural a maior preocupação na produção artesanal é a de garantir a pureza do

produto final e a segurança da pessoa envolvida nas etapas de produção. O nível de contaminação médio esperado na produção, seguindo as orientações deste Comunicado Técnico é de $10\% \pm 5\%$, nível este bastante aceitável, se for considerada a forma de esterilização do meio de cultura e de inoculação do fungo no substrato. As garrafas que apresentarem contaminação por fungos (pontos ou a colônia do fungo totalmente esverdeada ou enegrecida) ou bactérias (pontos ou áreas úmidas amareladas) devem ser descartadas dos lotes produzidos, tão logo sejam detectados os primeiros sinais de contaminação. A segurança da pessoa encarregada da produção artesanal à exposição de agentes contaminantes é assegurada retirando

e eliminando do lote de produção a garrafa contaminada, a qual deve ser fechada com sua respectiva tampa e nesta injetado cerca de 100 mL de uma solução de hipoclorito de sódio a 20%, com o auxílio de uma seringa de 20 mL e deixado em repouso por 30 minutos. Após esse procedimento, adicionar água limpa na garrafa três a quatro vezes, drenar o líquido a cada lavagem e ao final descartar o arroz ou oferecê-los aos animais. Na etapa de descarte de garrafas contaminadas é imprescindível o uso de luvas plásticas e máscaras descartáveis.

Utilização no campo

O fungo *B. bassiana* é, em geral, utilizado no campo em suspensão aquosa.

Procedimentos para o preparo da suspensão fúngica nas concentrações de uso no campo – Adicionar na garrafa com a cultura do fungo (200 g), um litro de água potável e 10 mL de detergente neutro, agitar bem a garrafa para soltar os conídios do arroz até formar uma suspensão homogênea e turva que deverá ser coada, com o auxílio de uma peneira fina (pré-mistura 1). A concentração de conídios obtida nessa diluição é de 1×10^9 conídios mL⁻¹. Dando continuidade ao processo de obtenção de concentrações mais diluídas deve-se, após obtenção da pré-mistura 1, retornar o arroz peneirado para um balde plástico, lavar em 9 litros de água limpa e misturar à pré-mistura 1, obtendo-se uma concentração de

conídios de 1×10^8 conídios mL⁻¹ (pré-mistura 2). Transferindo essa última pré-mistura (10L) para um recipiente plástico maior e completando, em seguida, com 90 litros de água obtém-se uma suspensão na concentração 1×10^7 conídios mL⁻¹ (pré-mistura 3). Misturando 10 litros da pré-mistura 3 em 90 litros de água se obtém uma suspensão na concentração 1×10^6 conídios mL⁻¹ e 1 litro em 99 litros de água a suspensão 1×10^5 conídios mL⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Número de garrafas com fungo *B. bassiana* necessárias para o preparo de suspensões em concentrações variando de 1×10^9 conídios mL⁻¹ a 1×10^5 conídios mL⁻¹.

Número de garrafas/100 litros de água (w/v)	Concentração
100 (pré-mistura 1)	1×10^9 conídios mL ⁻¹
10 (pré-mistura 2)	1×10^8 conídios mL ⁻¹
1 (pré-mistura 3)	1×10^7 conídios mL ⁻¹
10L da pré-mistura 3 em 90 litros de água	1×10^6 conídios mL ⁻¹
1L da pré-mistura 3 em 99 litros de água	1×10^5 conídios mL ⁻¹

Para facilitar o preparo de volumes maiores de suspensão fúngica é importante, transferir a cultura do fungo das garrafas para um recipiente plástico maior, para que o substrato seja lavado em um volume menor de água, por duas vezes. A suspensão fúngica é então coada e transferida para o tanque de pulverização, adicionando água até atingir o volume na concentração

desejada, variável essa, dependente da praga-alvo a ser combatida. A quantidade de garrafas necessárias para o preparo de 2000 litros de suspensão nas concentrações 1×10^7 conídios mL^{-1} e 1×10^8 conídios mL^{-1} será de 20 e 200 garrafas, respectivamente.

Para uso na cultura do coqueiro, são sugeridas suspensões do fungo *B. bassiana* em concentrações que variam entre 1×10^7 a 1×10^9 conídios mL^{-1} (Tabela 2), obedecendo os seguintes modos de aplicação: pulverizações foliares para as pragas *Brassolis sophorae*, *Raoiella indica*, *Aleurodicus pseudugessi*; pulverizações direcio-

nadas para a região axilar das folhas medianas e as mais velhas para as pragas *Homalinotus coriaceus* e *Rhinostomus barbirostris*, respectivamente; pulverizações direcionadas para os cachos novos para o ácaro *Aceria guerreronis*; e tratamento direto do substrato alimentar atrativo (cana-de-açúcar) das armadilhas de auto-contaminação utilizadas no controle da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum*.

Na etapa de manuseio do fungo no campo é imprescindível o uso de luvas plásticas e máscaras descartáveis.

Tabela 2. Quantidade de garrafas, concentração e dosagem da suspensão a ser aplicada para as principais pragas do coqueiro.

Pragas-alvo	Quantidade (m/v)	Concentração	Dosagem
<i>Brassolis sophorae</i>	1garrafa 100 L ⁻¹ de água	1×10^7 conídios mL^{-1}	2,5 L da suspensão planta ⁻¹
<i>Aceria guerreronis</i>	1garrafa 100 L ⁻¹ de água	1×10^7 conídios mL^{-1}	2,0 L da suspensão planta ⁻¹
<i>Raoiella indica</i>	1garrafa 100 L ⁻¹ de água	1×10^7 conídios mL^{-1}	1,5 L a 2,5 L da suspensão planta ⁻¹
<i>Homalinotus coriaceus</i>	1garrafa 1 L ⁻¹ de água	1×10^9 conídios mL^{-1}	3,5 L da suspensão planta ⁻¹
<i>Rhinostomus barbirostris</i>	1garrafa 100 L ⁻¹ de água	1×10^7 conídios mL^{-1}	3,5 L da suspensão planta ⁻¹
<i>Aleurodicus pseudugessi</i>	1garrafa 100 L ⁻¹ de água	1×10^7 conídios mL^{-1}	1,5 L a 2,5 L da suspensão planta ⁻¹
<i>Rhynchophorus palmarum</i>	1garrafa 1 L ⁻¹ de água	1×10^9 conídios mL^{-1}	1,0 L 20 ⁻¹ armadilhas

Vantagens/ Desvantagens da produção artesanal no campo

Vantagens:

- Tecnologia “limpa” que considera a preservação da biodiversidade, a proteção do ambiente e a segurança do homem e dos animais.
- Tecnologia “social”, pois visa a inclusão do produtor rural na produção do próprio insumo
- O produto final pode ter utilização de imediato ao final de cada ciclo de produção.
- A produção pode ser programada para utilização no período propício da ocorrência da praga, principalmente, das sazonais.
- Lotes produzidos e não usados podem ser armazenados e ou conservados em locais e condições adequadas de temperatura, preservando dessa forma, a patogenicidade e a virulência do fungo por determinado período.

Desvantagens:

- Embora viável e simples, é um processo que depende da disponibilização da cultura matriz para garantir a qualidade do insumo produzido.
- A renovação da produção deve

ocorrer a cada quatro passagens do fungo no meio sólido para assegurar o desempenho e a viabilidade da produção.

Considerações finais

O uso de fungos entomopatogênicos no controle de pragas ainda é pouco utilizado no campo pelos produtores de coco e de outras culturas em comparação aos inseticidas químicos. A produção artesanal do *B. bassiana* é uma técnica simples e viável, que no processo de adoção na propriedade precisará de orientação técnica específica, planejamento e segurança na oferta continuada da cultura matriz, assegurando, dessa forma, o uso correto da tecnologia no campo. Com a produção artesanal o agricultor dispõe a cada ciclo de 15 dias de um produto pronto para uso que também pode ser armazenado no refrigerador (30 dias) ou no freezer (1 ano) para uso futuro, no período de ocorrência das pragas, especialmente, as sazonais.

Referências

- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Microorganismos no controle de pragas. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO SOUZA, D. T. (Ed.). **Controle biológico de pragas: na prática**. Piracicaba: CP2, 2006. 287p. p. 35-44.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de**

insetos (Ed.). Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. **Microbial control of pests in Latin America: advances and challenges**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414 p.

AHMED, S. I.; LEATHER, S. R. Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management – some points for consideration. **International Journal of Pest Management**. v. 40, p. 287-292, 1994.

AQUINO, M. L. N. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, no Estado de Pernambuco. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico**, v. 72, p. 1-26, 1974.

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

STRASSER, H.; VEY, A.; BUTT, T. M. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive

metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? **Biocontrol Science and Technology**. v. 10, n. 6, p. 717-735, 2000.

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Paulo Barreto de Menezes, nº 3.250,
Bairro Jardins, CEP: 49025-040, Aracaju, SE
Fone: +55 (79) 4009-1300
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
Publicação digitalizada (2019)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações da Unidade Responsável

Presidente
Ronaldo Souza Resende
Secretário-Executivo
Ubiratan Piovezan

Membros
Amaury da Silva dos Santos, Ana da Silva Léo, Anderson Carlos Marafon, Joézio Luiz dos Anjos, Julio Roberto Araújo de Amorim, Lizz Kezzy de Moraes, Luciana Marques de Carvalho, Tânia Valeska Medeiros Dantas, Viviane Talamini

Supervisão editorial
Flaviana Barbosa Sales

Normalização bibliográfica
Josete Cunha Melo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Aline Gonçalves Moura

Fotos da capa
Letícia Ribeiro Pimenta