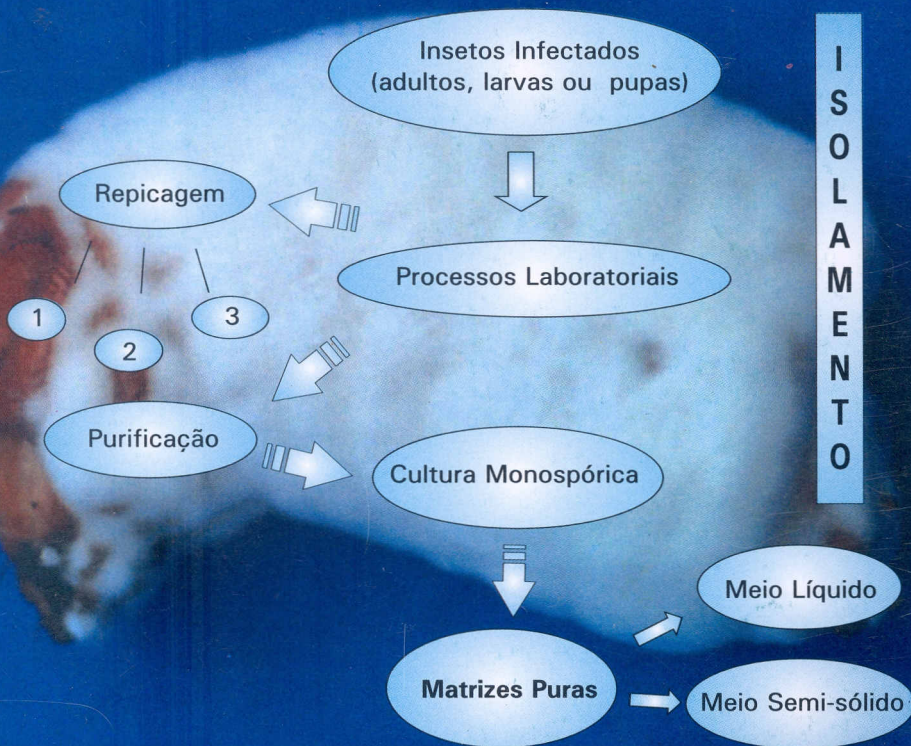


FL913
2004
ex. 1
FL-PP-FL913a

Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos I - *Beauveria bassiana* (Vuill.)



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Luís Fernando Rigato Vasconcellos

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Herbert Cavalcante de Lima

Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Edmar Ramos de Siqueira

Chefe-Geral

Tereza Cristina de Oliveira

Chefe-Adjunto de Administração

Maria de Lourdes da Silva Leal

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

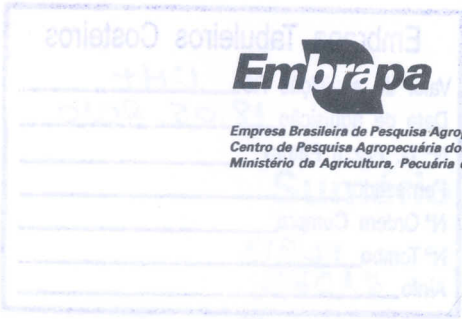
Édson Luis Bolfe

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

FL 913

ISSN 1678-0175

Março, 2004



Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 03

Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos I - *Beauveria bassiana* (Vuill.)

Joana Maria Santos Ferreira

Aracaju, SE
2004



Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250
Aracaju, SE
CEP: 49025-040
Fone: **79-2261300
Fax: **79-2261369
www.cpatc.embrapa.br
E-mail: sac@cpatc.embrapa.br

Embrapa Tabuleiros Costeiros	
Valor de aquisição R\$	UM+
Data de aquisição	18.05.2010
Nº N. Fiscal Fatura	
Fornecedor	
Nº Ordem Compra	
Nº Tombo	FL913
Ainfo	21582

Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria de Lourdes da Silva Leal
Secretária-Executiva: Maria Ester Gonçalves Moura
Membros: Emanuel Richard Carvalho Donald
Ederlon Ribeiro de Oliveira
Marcondes Maurício de Albuquerque
Denis Medeiros dos Santos
Jefferson Luis da Silva Costa
Hélio Wilson Lemos de Carvalho

Normalização bibliográfica: Josete Cunha Melo
Tratamento de ilustrações: Maria Ester Gonçalves Moura
Foto da capa: Ricardo Póvoa C. de Araújo
Editoração eletrônica: Maria Ester Gonçalves Moura

1ª edição

1ª impressão (2004): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Ferreira, Joana Maria Santos

Protocolo para produção massal de fungos entomopatogênicos 1: *Beauveria bassiana* (Vuill.) / Joana Maria Santos Ferreira. - Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004.

Em Tabuleiros Cost. B. de Pesq. e Desenv., 3)

30 p. : il. Color. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-0175; 3)

Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br>

1. Fungo. 2. Fungo - *Beauveria bassiana* (Vuill). 3. Fungo - Controle de praga.
4. Fungo - Produção Massal. I. Ferreira, Joana Maria Santos. II. Título. III. Série.

CDD-632.4

© Embrapa 2004

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Técnicas de Produção	8
1. Isolamento e purificação do fungo em laboratório	8
2. Caracterização e conservação do isolado puro	8
3. Preparação de matrizes em meio semi-sólido	9
4. Preparação de matrizes em meio líquido	10
5. Produção massal em substratos semi-sólidos	11
6. Secagem e peneira	12
7. Formulação do fungo	13
8. Controle de qualidade	14
9. Custo da produção massal	16
10. Rendimento semanal de conídios de <i>B. bassiana</i> na Embrapa Tabuleiros Costeiros (produção e rendimento de campo)	16
Agradecimentos	19
Referências Bibliográficas	21
Anexos	23

Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos I - *Beauveria bassiana* (Vuill.)

Joana Maria Santos Ferreira¹

Resumo

Um protocolo para a produção massal do fungo *Beauveria bassiana* Vuill. é descrito nesse documento objetivando garantir seu uso em programas de controle de pragas agrícolas. Todos os procedimentos laboratoriais iniciais necessários para a obtenção de culturas puras e culturas provenientes de isolamento monospóricas são detalhados, bem como, os utilizados na preparação das culturas matrizes. O objetivo principal é fornecer informações sobre as etapas que são fundamentais no processo de multiplicação e obtenção dos conídios do fungo em larga escala, e àqueles relativos as condições de armazenamento e de conservação da cultura e do controle de qualidade da produção. O custo da produção massal por quilograma de material produzido (substrato úmido e seco) e por litro de fungo formulado em óleo vegetal emulsionável foi estimado em R\$4,00, R\$4,24 e R\$15,22, respectivamente. O rendimento da produção no campo (custo/benefício) foi calculado tendo como base a produção semanal de conídios obtida no laboratório da Embrapa Tabuleiros Costeiros, o custo por quilograma/litro de fungo produzido, o tipo de formulação usada e os dados de controle da lagarta-das-folhas-do-coqueiro *Brassolis sophorae*.

Termos para indexação: Protocolo, *Beauveria* sp, Fungos entomopatogênicos, produção de fungos.

¹ Engenheira Agrônoma, M.Sc., Av. Beira Mar, 3250, Caixa postal 44, CEP 49001-970, Aracaju, SE, E-mail: joana@cpac.embrapa.br.

Mass Production Protocol for the Entomopathogenic Fungi: *I - Beauveria bassiana* (Vuill.)

Joana Maria Santos Ferreira¹

Abstract

A protocol for the fungus *Beauveria bassiana* Vuill. mass production is described, herein, in order to guarantee its use in the control programs of agricultural pests. The initial laboratory procedures needed to obtain the pure cultures and the cultures obtained from monospore isolation used to prepare the mother suspension, are well detailed. The main purpose is to provide information regards all the steps that plays an important role in the large scale spore's multiplication, as well as, the ones related to the fungus culture storage and conservation conditions and the production quality control. The mass production cost per kilogram of fungus substrate (humid or dry substrates) or per liters of fungus formulation in emulsified vegetable oil was estimated in R\$4,00, R\$4,24 and R\$15,22, respectively. The production yield (benefit/cost) at field level was calculated based on the weekly fungus production obtained in the biological control laboratory of Embrapa Coastal Tableland Research Center, the cost per kilogram/liters of fungus produced, the formulation used, and the control data for the coconut leaves caterpillar *Brassolis sophorae*.

Index terms: Protocol, *Beauveria* sp, entomopathogenic fungi, fungus production.

Introdução

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina:Hyphomycetes) tem um grande potencial para o controle biológico artificial de pragas. A potencialidade desse fungo como agente de controle microbiano vem sendo largamente investigada sobre inúmeras pragas agrícolas (Alves, 1992; Malagodi & Veiga, 1995; Ferron, 1978; Marcano et al., 1999). No campo, o sucesso de seu uso esta relacionado as condições climáticas da região, ao conhecimento do hábito de um determinado hospedeiro e da quantidade de inoculo a ser disperso na área.

Em Sergipe foram coletados isolados de *B. bassiana* parasitando adultos da broca-do-olho *Rhynchophorus palmarum*, da broca-do-tronco *Rhinostomus barbirostris*, da broca-do-pedúnculo *Homalinotus coriaceus*, da barata-do-coqueiro *Coraliomela brunnea*, e da lagarta-da-folha *Brassolis sophorae* (Ferreira et al., 2001), todos comprovadamente patogênicos e eficientes quando avaliados em laboratório e sobre três dessas espécies em testes realizados no campo. Entretanto, em condições naturais, o parasitismo é relativamente baixo, razão pela qual não é capaz de regular por si só a população dessas pragas para abaixo do nível de dano econômico.

Tecnologias para produção em massa de conídios de *B. bassiana* para uso como biopesticida tem sido desenvolvidas por vários autores (Alves & Pereira, 1989; Rombach, 1989; Jenkins, et al., 1998) e em alguns países, no intuito de aumentar a fonte de inoculo no campo e promover epizootias.

A produção de *B. bassiana*, isolado a partir de adultos da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum*, da broca do pedúnculo-floral-do-coqueiro *Homalinotus coriaceus* e da lagarta-das-folhas-do-coqueiro *Brassolis sophorae* vem sendo estabelecida nos últimos sete anos na Embrapa Tabuleiros Costeiros na base de 'tentativas e erros' visando a obtenção de um produto que formulado tivesse como principais características: pureza, abundancia em esporos, viabilidade após longo período de armazenamento, economia na sua produção, conveniência na sua utilização e transporte, facilidade de aplicação e eficiência no controle da praga-alvo. Todas as etapas envolvendo a produção massal do fungo (Figura 1a 5) encontram-se detalhadas no protocolo a seguir.

Técnicas de Produção

1. Isolamento e purificação do fungo em laboratório

- 1.1 Faz-se a coleta do fungo com o auxílio de uma alça de platina flambada, em adultos ou larvas encontrados parasitados no campo, transferindo-o para meio de cultura tipo 'BDA' distribuído em placas de Petri e contendo antibiótico para inibir qualquer contaminação bacteriana.
- 1.2 Os isolados são incubados por 5 a 10 dias em câmara B.O.D., em temperatura entre 26 o C e 30o C.
- 1.3 Neste período, observa-se o crescimento do fungo e a presença de qualquer contaminação na placa, com o auxílio do microscópio.
- 1.4 Em face da predominância de impurezas advindas do campo, é comum, nessa etapa, se fazer repicagens dos isolados em tubos e/ou placas com meio de cultura BDA, até a obtenção de isolados puros.
- 1.5 A pureza total é obtida mediante o cultivo do isolado em colônias, originadas de um único conídio (esporo), a chamada 'cultura monospórica'. O isolamento monospórico é obtido com o auxílio de bisturi, meio de cultura BDA e microscópio. Conídios são coletados de uma cultura pura e a seguir riscados com o auxílio de uma alça de platina na placa de Petri com meio de cultura Agar-água. Após esse procedimento as placas são guardadas na B.O.D. por 24 horas quando são avaliadas para coleta de conídios apresentando emissão de tubos germinativos e que se encontrem isolados. Através de pequenos cortes feitos com um bisturi ao redor dos conídios selecionados estes são transferidos para placas de Petri ou para tubos de ensaio com meio nutritivo para o desenvolvimento da cultura.

2. Caracterização e conservação do isolado puro

- 2.1 Dos isolados puros ou das culturas monospóricas, prepara-se lâmina para microcultura e caracteriza-se o fungo por análise microscópica, contando com o auxílio da chave de identificação de fungos, ou encaminha-se o material repicado para um especialista para identificação ao nível de espécie.

- 2.2 Todos isolados, após serem caracterizados/identificados, são numerados e registrados no Banco de microorganismos entomopatogênicos da Embrapa Tabuleiros Costeiros, conservados em geladeira e repicados a cada seis meses.
- 2.3 Todos isolados, comprovadamente patogênicos para as pragas do coqueiro, são encaminhados para o Banco de microorganismos entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos - CENARGEN onde são numerados, registrados e conservados em Nitrogênio Líquido a 180oC.
- 2.4 Periodicamente, procede-se a revigoração das cepas de *B. bassiana* que se encontram em estudo (cepas de trabalho), mediante inoculação sistemática do fungo no hospedeiro para posterior reisolamento no laboratório, a fim de se manter a viabilidade e a virulência da cepa.

3. Preparação de matrizes em meio semi-sólido

- 3.1 Obtido o isolado puro e comprovadamente patogênico à espécie do qual foi isolado, dá-se início a produção massal do fungo para fins de liberação futura no campo.
- 3.2 As matrizes devem, obrigatoriamente, ser advindas de isolamento monospórico. Este procedimento é importante para assegurar a pureza e a virulência dos isolados.
- 3.3 Selecionadas as culturas com melhor desempenho em termos de velocidade de crescimento, massa fúngica e pureza estas são preparadas em suspensão (suspensão 1) para serem utilizadas, por sua vez, na preparação das culturas matrizes.
- 3.4 A suspensão 1 é preparada, em câmara asséptica, adicionando-se 5mL de água destilada/esterilizada com Tween 80 a 0,05% ao tubo com a cultura agitando-o bem com auxílio do agitador de tubos e/ou do bastão de vidro esterilizado, para soltar os conídios do meio.
- 3.5 As culturas matrizes são preparadas em frascos erlenmeyers de 250mL, utilizando-se como meio de cultura o arroz parbolizado na proporção de 50g de arroz para 20mL de água destilada, deixados a seguir, em

descanso por 30 minutos e com freqüente homogeneização para melhor absorção da água e autoclavados por 20 minutos a 1kgf de pressão e 121o C de temperatura.

3.6 Em câmara asséptica, inocula-se com o bico dosador 5mL da suspensão 1 a cada frasco-matriz.

3.7 O crescimento da cultura no frasco-matriz se completa entre 10 e 15 dias, com temperatura entre 26 oC e 30oC.

3.8 Selecionadas as matrizes com melhor desempenho em termos de velocidade de crescimento, massa fúngica e pureza estas são preparadas em suspensão (suspensão 2a) para serem utilizadas, por sua vez, na produção massal do fungo em substratos semi-sólidos.

3.9 A suspensão 2a é preparada, em câmara asséptica, adicionando-se 150mL de água destilada/esterilizada com Tween 80 a 0,05%, ao frasco com a cultura matriz agitando-o bem com o auxílio do bastão de vidro esterilizado, para soltar os conídios do respectivo meio.

4. Preparação de matrizes em meio líquido

4.1 Prepara-se o meio líquido misturando 20g de levedura, 20g de glucose ou dextrose e 0,5g do antibiótico cloranfenicol em 1L de água destilada.

4.2 Distribuir 75mL do meio em um frasco Erlenmeyer de 250mL e a seguir autoclar por 20 minutos a 1kgf de pressão e 121o C.

4.3 Após o meio líquido esfriar, em câmara asséptica, inocular 2-3mL da suspensão 1 ou 2a, contendo aproximadamente 6x10⁶ conídios/mL a cada frasco-matriz.

4.4 Deixar os frascos sob agitação orbital de 150rpm por três a cinco dias e temperatura entre 25 o C e 28o C.

4.5 Selecionar as matrizes com melhor desempenho em termos de crescimento micelial e pureza e prepará-las em suspensão (suspensão 2b) para serem utilizadas, por sua vez, na produção massal do fungo em

substratos semi-sólidos.

- 4.6 Esta suspensão deve ser preparada, em câmara asséptica, adicionando-se água destilada/esterilizada na proporção 1:1 ao frasco com a cultura agitando-o bem para homogeneização da massa micelial.

O uso de matrizes preparadas em meio líquido apresenta como vantagens a obtenção de um maior rendimento na produção e a eliminação dos riscos de contaminação.

5. Produção massal em substratos semi-sólidos

5.1 Preparação do substrato semi-sólido

- 5.1.1 Colocar em sacos autoclaváveis de 2kg (polietileno ou polipropileno) 100g de arroz e 40mL de água de torneira (água limpa) e deixar em repouso por 30 minutos para que o arroz absorva a água, mexendo com frequência para manter a homogeneização do substrato.
- 5.1.2 Arrumar o arroz no fundo do saco e dobrar várias vezes sobre si mesmo formando um tubo para melhor acomodação e rendimento na autoclave.
- 5.1.3 Proceder a esterilização do meio durante 20 minutos com a autoclave regulada para 1kgf de pressão e temperatura de 121oC.
- 5.1.4 Após serem resfriados, os sacos com arroz autoclavado são transferidos para a câmara de fluxo laminar esterilizada e então inoculados.

5.2 Produção do fungo

- 5.2.1 Fazer a assepsia da câmara de fluxo laminar vertical e posterior esterilização com a irradiação de uma lâmpada ultravioleta (UV), durante 30 minutos antes da inoculação.

- 5.2.2 No interior da câmara asséptica, abrir o saco de arroz autoclavado e proceder a inoculação do meio com 5mL da suspensão 2a ou 2b, contida em um frasco de 500mL acoplado a um bico dosador de 5mL, por saco.
- 5.2.3 Fechar o saco plástico e misturar bem a solução fúngica no arroz para se obter a maior homogeneidade possível.
- 5.2.4 Deixar um volume de ar no interior do saco plástico a fim de se obter uma aeração que favoreça ao desenvolvimento do fungo.
- 5.2.5 Transferir todo material inoculado para a sala de crescimento distribuindo os sacos, lado a lado e deitados nas prateleiras, até que sejam totalmente cobertos com micélios (três a cinco dias). Após esse período, proceder a cada dois dias a homogeneização do substrato, arrumando os sacos lado a lado e de pé, para permitir o crescimento uniforme do fungo em volta do grão de arroz e conseqüentemente, obter-se um maior rendimento de esporos, bem como proceder a oxigenação dos sacos.
- 5.2.6 O crescimento do fungo se completa entre 15 e 20 dias, com temperatura entre 26oC e 30oC, estando a cultura pronta para uso em bioensaios, testes de campo ou para ser usada como inóculo para subseqüentes inoculações em meio semi-sólido.

6. Secagem e peneiração

- 6.1 Após o desenvolvimento da cultura do fungo transfere-se o material produzido para bandejas plásticas brancas (60cmx40cmx10cm) na proporção de 2kg de substrato por bandeja deixando secar em ambiente climatizado a 18oC durante 15 a 20 dias ou em estufa à 35oC a 40oC, por três dias. Nessas condições, obtêm-se substratos com umidades que variam de 8% a 12% e 3% a 5%, respectivamente.
- 6.2 Umidades baixas auxiliam na separação dos conídios do substrato e oferecem condições adequadas para que o produto obtido seja formulado. A aferição da umidade da cultura é feita tanto pelo método gravimétrico por diferença, quanto diretamente, utilizando-se uma

balança de infravermelho.

- 6.3 Após o processo de secagem o substrato é peneirado, a fim de separar os conídios do arroz. O peneiramento pode ser manual ou mecânico. No processo manual coloca-se 200g do substrato em uma peneira de latão (500m), acoplada a um coletor e a uma tampa de material resistente de mesmo diâmetro, procedendo-se a peneiração por cerca de 40 minutos com três turnos de 10 minutos e dois intervalos de 5 minutos. No processo mecânico utiliza-se uma máquina vibratória com seis peneiras de latão, sendo, cinco com malha de 1000m e uma acoplada ao coletor com malha de 500m que trabalha a uma rotação de 1500rpm, durante 30 minutos.
- 6.4 Embora grande parte dos conídios seja coletada durante o processo de peneiramento, parte deles fica aderida à superfície do arroz. Para a avaliação do rendimento da produção é possível resgatar esses conídios fazendo-se a lavagem do arroz peneirado com querosene e a filtração com o auxílio de papel de filtro, procedimento que não afeta a viabilidade dos conídios de *B. bassiana*. Os conídios retidos no papel são deixados secar em ambiente a 18°C até a obtenção da umidade desejada para formulação.
- 6.5 Conídios obtidos com 8 a 12% de umidade, após o processo de secagem são colocados no dissecador com sílica gel não indicadora, por 2 a 3 dias, para baixar a umidade para o mais próximo de 5%.

7. Formulação do fungo

- 7.1 A cultura de *Beauveria*, após atingir sua fase de maturação (15 a 20 dias), pode ser imediatamente utilizada em bioensaios ou em testes de campo. A forma de utilização mais comum desse material é em 'suspensão aquosa'. No preparo da suspensão adiciona-se para cada 200g da cultura crescida no arroz, um litro de água e 0,5mL de detergente neutro, obtendo-se em média, uma suspensão com a concentração de 1×10^9 conídios/mL.
- 7.2 Para aumentar o tempo de uso de uma cultura de *Beauveria* faz-se necessário proceder a secagem do fungo (processo já descrito), sua distribuição em sacos de polietileno ou polipropileno de 1kg e o

armazenamento em baixas temperaturas (freezer). Nesse tipo de armazenamento é importante retirar o máximo de ar possível do interior dos sacos para melhor acomodá-los uns sobre os outros. A utilização do fungo após o período de armazenamento no freezer é também em 'suspensão aquosa' preparada da forma acima mencionada. O efeito de temperaturas baixas na vida útil dos conídios de *Beauveria* sob armazenamento está sendo estudado no laboratório de controle biológico da Embrapa Tabuleiros Costeiros onde se tem obtido uma variação média de 5% na viabilidade dos conídios em relação a inicial, quando mantidos com 5% de umidade e em freezer por 12 meses.

7.3 Conídios de *Beauveria* podem também ser formulados em óleo vegetal emulsionável com o objetivo de assegurar a viabilidade e aumentar a vida útil dos mesmos, e conseqüentemente seu uso e disponibilização no mercado.

7.4 A formulação de fungos em óleo vegetal emulsionável requer a obtenção de conídios com teor de umidade, o mais próximo possível, de 5%. Lotes de conídios, apresentando umidades superiores a esse valor, são colocados em dissecadores contendo sílica gel não indicadora (20% do peso total). A sílica, antes de ser colocada no dissecador, deve ser aquecida a 120°C por 2 horas e regenerada a cada lote.

7.5 Obtida a umidade ideal, os conídios são então formulados, misturando-os ao óleo, na proporção de 10% de conídios do fungo para o volume requerido. A vida de prateleira desse formulado, em condições ambientes, encontra-se em estudo no laboratório de controle biológico da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Variações de 5% a 20% na viabilidade dos conídios estão sendo obtidas após 6 meses de armazenamento em diferentes óleos.

8. Controle de qualidade

8.1 Durante o período de armazenamento da cultura fazem-se análises periódicas nos lotes em estoque para acompanhar o rendimento do material produzido (conídios/g de arroz ou conídios/mL), a viabilidade dos conídios e o aparecimento de agentes contaminantes. Esse procedimento serve para avaliar a qualidade da produção ao final do

processo.

8.2 Para estimar o rendimento da produção fazer uma amostragem equivalente a 2% do lote a ser avaliado. A seleção da amostra é feita, aleatoriamente, dentro do lote. Uma suspensão é preparada com 10 g da cultura (arroz com fungo), 200 ml de água destilada/esterilizada e 0,05% de Tween 80, para estimativa da densidade de conídios (concentração). A seguir procede-se a diluição serial da suspensão até a concentração 10⁻³ e com o auxílio de um microscópio estereoscópio e de uma câmara de contagem é feita a leitura do número de conídios, seguindo a metodologia proposta por Alves (1998) para a obtenção do número de conídios/mL e de conídios/grama do substrato.

8.3 Para estimar o rendimento da produção a partir dos produtos formulados em óleo adotam-se os mesmos procedimentos da avaliação anterior. A única diferença diz respeito ao uso de querosene na diluição da amostra, em substituição à água destilada/esterilizada e ao Tween. A diluição em água não é recomendável por formar inúmeras bolhas que se confundem com os conídios durante a leitura na câmara de contagem. Para cada amostra prepara-se uma suspensão com 1mL do formulado e 9mL de querosene prosseguindo-se com a diluição serial até a concentração 10⁻⁴ para a realização das leituras.

8.4 Utilizar as mesmas amostras para estimar a viabilidade dos conídios armazenados. Nesse caso, espalhar na placa de Petri uma a três gotas da suspensão sobre o meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalsk, e deixar em incubação por um período de 24 horas em ambiente a 27°C ± 2 oC. Decorrido esse tempo, fazer a contagem do número de conídios germinados e não-germinados em 15 campos do microscópio a fim de estimar a taxa de germinação do lote ao longo do período de armazenamento. A viabilidade do lote deve ser superior a 90% no momento do armazenamento.

8.5 Para realizar o teste de viabilidade dos conídios que foram armazenados de forma pura e seca (pó), é importante colocá-los durante 2 horas em um ambiente com umidade relativa do ar saturada (acima de 80%), para que se recuperem do déficit hídrico a que foram submetidos e germinem normalmente.

8.6 Proceder também, a cada quatro sub-culturas (culturas produzidas seguidamente em substratos artificiais), e como etapa obrigatória na produção de fungos entomopatogênicos, a revigoração da cepa de trabalho, mediante aplicação sistemática do fungo no inseto hospedeiro e posterior reisolamento do mesmo no laboratório, a fim de manter a viabilidade e a virulência da cepa.

8.7 Verificar sempre a presença de contaminantes nas unidades dos lotes armazenados, como por exemplo, os fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, bem como, as bactérias descartando-se todos àqueles com sinal de contaminação.

9. Custo da produção massal

9.1 O custo de produção do fungo *Beauveria* por quilograma de material produzido é de R\$4,00 para o substrato úmido, de R\$4,24 para o substrato seco e de R\$15,22 para o produto formulado em óleo (Tabela 1).

10. Rendimento semanal de conídios de *B. bassiana* na Embrapa Tabuleiros Costeiros (produção e rendimento de campo)

10.1 A cultura de *Beauveria*, após atingir sua fase de maturação (15 a 20 dias) pesa, em média, por saco, 145g antes da secagem e 95g ou 85g após a secagem (ambiente a 18oC ou em estufa entre 35-40oC, respectivamente).

10.2 A quantidade de conídios, obtida por grama de substrato seco, utilizando os dois processos de separação dos conídios (peneiração e lavagem com querosene) é de 0,04g de conídios puros. Isto equivale a uma concentração de conídios (densidade) de $6,0 \times 10^9$ conídios/g de arroz, calculada a partir de uma densidade média de conídios puros estimada em $1,5 \times 10^{11}$ conídios/g.

10.3 A densidade média de conídios puros/g foi calculada preparando-se uma suspensão com 0,5g de conídios puros e secos em 200 ml de água destilada/esterilizada com 0,05% de Tween 80. Através da diluição serial da suspensão até a concentração 10-3 foi feita a leitura

na câmara de contagem e estimado o número de conídios presentes em um grama de conídios puros.

- 10.4 Para o cálculo da capacidade de produção do laboratório em relação a aplicação dos formulados no campo, tomou-se como exemplo o controle da lagarta-da-folha *Brassolis sophorae*. A concentração eficiente estimada para controle dessa praga é de $1,65 \times 10^7$ conídios/mL e o volume de calda utilizada é de um litro por planta.
- 10.5 No preparo da suspensão aquosa utiliza-se, em média, 200g da cultura do fungo para 1 litro de água obtendo-se uma concentração de conídios equivalente a 1×10^9 conídios/mL. Logo, para obtenção da concentração letal desejada, são necessárias 676g, 528g e 469g da cultura do fungo (substrato colonizado) o que equivale um custo de R\$2,88, R\$2,25 e R\$1,99 para o tratamento de um hectare de coqueiro-anão (205plantas), de coqueiro-híbrido (160plantas), e de coqueiro-gigante (142plantas), respectivamente (Tabela 2).
- 10.6 Com a produção do laboratório de 45kg semanais é possível pulverizar 13.636 plantas o que corresponde a 66,5ha de coqueiro-anão, 85,2ha de coqueiro-híbrido e 96ha de coqueiro-gigante (Tabela 3).
- 10.7 No preparo da suspensão oleosa formulada a 10% (m.v.) utiliza-se 100g de conídios puros para um litro de óleo vegetal emulsionável obtendo-se uma concentração de conídios equivalente a $1,5 \times 10^{10}$ conídios/mL. Para se trabalhar com a concentração letal desejada de $1,65 \times 10^7$ conídios/mL para *B. sophorae* é necessário adicionar 908 litros de água para 1 litro do formulado. Logo, para o tratamento de um hectare de coqueiro-anão, de coqueiro-híbrido, e de coqueiro-gigante são necessários 225,5mL, 176mL e 156,2mL do formulado o que equivale a um custo de R\$3,43, R\$2,68, e R\$2,38, respectivamente (Tabela 4).
- 10.8 Com a produção semanal do laboratório de 1800g semanais de conídios (pó) ou 18 litros de formulado será possível atender 16.364 plantas, o que corresponde a 79,8ha do coqueiro-anão; 102,2ha do coqueiro-híbrido e 115,2ha do coqueiro-gigante (Tabela 5).

Agradecimentos

Nossos mais sinceros agradecimentos são dirigidos ao Dr. Roberto Teixeira Alves, pesquisador da Embrapa Cerrados que ao prestar Consultoria à Embrapa Tabuleiros Costeiros no período de 27/10 a 02/11/2000 transferiu com clareza e sabedoria uma riqueza de informações técnico-científicas que muito contribuiu para o aprimoramento da produção de fungos local, principalmente, no que se refere ao uso de matrizes em meio-líquido e a formulação do fungo *B. bassiana* em óleos vegetais emulsionáveis. Ao colega Francisco José dos Santos pela conduta exemplar e profissional com que executa tarefas que são essenciais ao processo de multiplicação de fungos entomopatogênicos; e sempre atento a processos de mudanças que impliquem no aprimoramento das atividades que lhes são confiadas. Ao colega Joel Lamoglia pela responsabilidade e dedicação com que assumiu as tarefas que lhe foram confiadas. Ao estagiário Janisson Santos da Silva pela sua dedicação ao trabalho e seu empenho em aprender. Aos agentes financeiros BN, FAP-SE e CNPq através de seus programas de incentivo à pesquisa PADFIN e FINEP, pelo aporte de recursos financeiros concedidos, o que tem permitido, ao longo dos anos, a aquisição de equipamentos extremamente necessários à rotina do laboratório. E, em especial a todas as Chefias da Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo incentivo à equipe e pelo apoio ao programa de controle biológico.

Referências Bibliográficas

- ALVES, S.B., PEREIRA, R.M. Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. In plastic trays. *Ecosistema*, São Paulo, n. 14, p. 188-192, 1989.
- ALVES, S.B. Perspectiva para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, n. 27, p. 77-86, 1992.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. p. 289-381.
- FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Anual Review of Entomology**, New York, n. 23, p. 409-42, 1978.
- FERREIRA, J.M.S.; ARAÚJO, R.P.C. de.; SARRO, F.B. **Perspectivas para o uso de fungos entomopatogênicos no controle microbiano das pragas do coqueiro**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. 24 p (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 26).
- JENKINS, N.E.; HEVIEFO, G.; GEWALD, J.; CHERRY, A.J.; LOMER, C.J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, Berkshire, UK, v. 19, n. 1, p. 21N-31N, 1998.
- MALAGODI, M.; VEIGA, A.F.S.L. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metschn) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals. Vuill sobre o cupim *Nasutitermes* (Dudley) (Isoptera:Termitidae) em laboratório. Anais... **Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 315-22, 1995.
- MARCANO, D.A. de; MARCANO, A.J.; MORALES, M. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* to adults of sweet potato weevil *Cylas formicarius elegantulus* Summers (Curculionidae). **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, Venezuela, Universidad del Zulia, v. 16, p. 52-63, 1999.
- ROMBACH, M.C. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. **Entomophaga**, Paris, n. 34, p. 45-52, 1989.

Table 1. Estimativa de custos de produção de *B. bassiana* em meio de cultivo líquido em escala piloto de 100 litros. Os custos são estimados com base nos preços praticados em 1982.

Item	Quantidade (kg)	Preço unitário (R\$)	Custo total (R\$)
Material de Consumo			
200 Litros de água	200	0,15	30,00
Levedura em pó	0,01	0,01	0,01
Dextrose	0,03	0,03	0,09
Amor pastoso	0,05	0,05	0,25
Ácido polilático 25%	0,05	0,05	0,25
Glutamate 500	0,03	0,03	0,09
Tween 80	0,01	0,01	0,03
Outros			0,00
Total			30,62

Anexos

Item	Quantidade (kg)	Preço unitário (R\$)	Custo total (R\$)
Proprio do material	0,15	0,15	0,23
Preparação do meio	0,10	0,10	0,10
Preparação do cultivo	0,50	0,50	0,25
Indicação do fungo	0,50	0,50	0,25
Gerenciamento	0,25	0,25	0,13
Formulação	0,10	0,10	0,05
Total			1,41

Table 2. Quantidade de cultura de *B. bassiana* necessária por hectare de cultivo (larvas, hiberna e giganta) para controle de lagarta B. assosa.

Variedades	Quantidade (kg/ha)	Preço unitário (R\$)	Custo total (R\$)
Força-ano	300	0,30	90,00
Cultura-ano	100	0,30	30,00
Cultura-giganta	100	0,30	30,00

Tabela 1. Custo estimado da produção de 1kg de substrato(úmido e seco) e de 1 litro do formulado em óleo de *Beauveria bassiana* produzido na Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Ítems	Custos de produção		
	Substrato úmido	Substrato seco	Formulado em óleo
Material de Consumo			
BDA Reagente	0,15	0,15	0,38
Levedo em pó	0,01	0,01	0,02
Dextrose	0,02	0,02	0,05
Arroz parbolizado	2,00	2,00	5,00
Sacos polietileno(bd) 2kg	0,50	0,50	1,25
Cloranfenicol 500	0,02	0,02	0,05
Tween 80	0,01	0,01	0,02
Óleo veg. emulsionável	-	-	4,00
Sub-Total	2,71	2,71	10,77
Mão-de-Obra			
Preparo do material	0,19	0,19	0,48
Isolamento/repicagem	0,10	0,10	0,25
Preparo do substrato	0,50	0,50	1,25
Inoculação do fungo	0,50	0,50	1,25
Secagem/peneiramento	-	0,24	0,61
Formulação	-	-	0,61
Sub-Total	1,29	1,53	4,45
Custo Total (R\$)	4,00	4,24	15,22

Tabela 2. Quantidade de cultura de *Beauveria bassiana* necessária por hectare de coqueiro (anão, híbrido e gigante) para controle da lagarta *Brassolis sophorae* usada em suspensão aquosa e custo do tratamento/hectare.

Variedades	Planta/ha (No.)	Substrato (Kg/ha)	Custo (R\$/ha)
Coqueiro-anão	205	0,68	2,88
Coqueiro-híbrido	160	0,53	2,25
Coqueiro-gigante	142	0,47	1,99

Concentração da suspensão 1,65 x 10⁷ con./mL (3,3 g do produto/litro/planta).

Custo médio de R\$ 4,24 por kg do produto seco.

Tabela 3. Produção de *Beauveria bassiana* na Embrapa Tabuleiros Costeiros e rendimento no campo.

Plantas tratadas (No.)	Coqueiro-anão (ha)	Coqueiro-híbrido (ha)	Coqueiro-gigante (ha)	Custo (R\$)
13.636	66,5	85,2	96,0	190,80

Produção média/semana de 45kg de substrato seco.

Tabela 4. Quantidade do formulado a óleo de *Beauveria bassiana* necessária por hectare de coqueiro (anão, híbrido e gigante) para controle da lagarta *Brassolis sophorae* usada em suspensão aquosa e custo por hectare tratado.

Variedades	Planta/ha (No.)	Formulado (mL/ha)	Custo (R\$/ha)
Coqueiro-anão	205	225,5	3,43
Coqueiro-híbrido	160	176,0	2,68
Coqueiro-gigante	142	156,2	2,38

Concentração da suspensão 1,65 x 10⁷ con./mL (1,10mL do formulado/litro/planta).

Custo médio de R\$ 15,22 por litro do formulado.

Tabela 5. Projeção da produção do formulado a óleo de *Beauveria bassiana* na Embrapa Tabuleiros Costeiros e rendimento no campo.

Produção (L/semana)	Plantas tratadas (No.)	Coqueiro-anão (ha)	Coqueiro-híbrido (ha)	Coqueiro-gigante (ha)	Custo (R\$)
18	16.364	79,8	102,2	115,2	273,96

Produção média/semana de 18L do formulado.

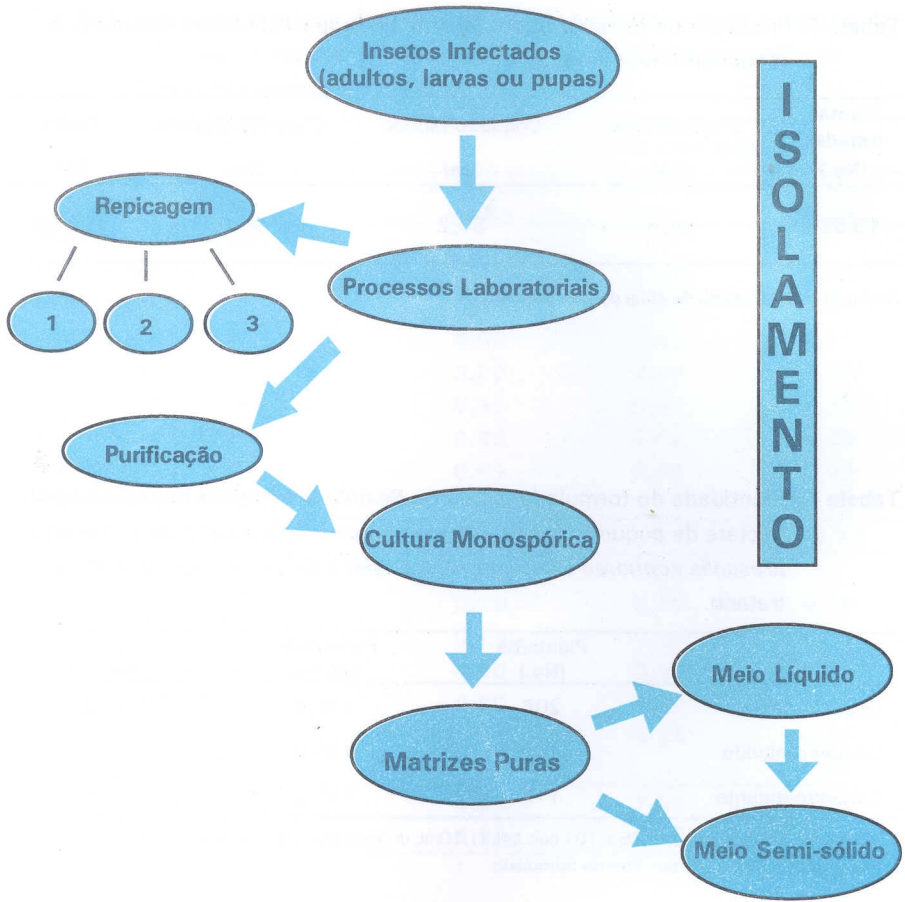


Fig. 1. Etapa 1 da produção massal do fungo *Beauveria bassiana*.

**P
R
O
D
U
Ç
Ã
O**

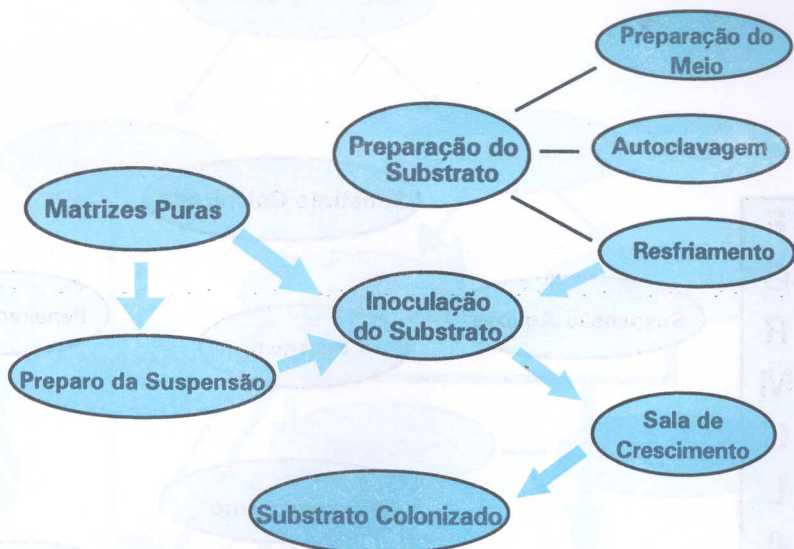


Fig. 2. Etapa 2 da produção massal do fungo *Beauveria bassiana*.

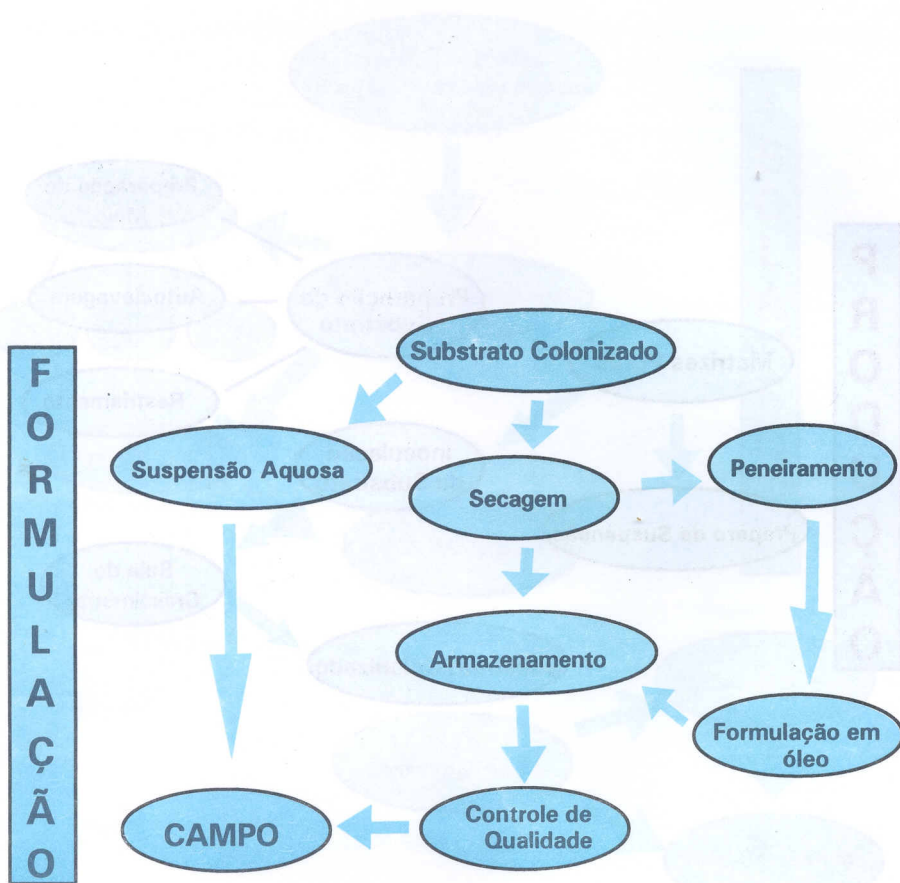


Fig. 3. Etapa 3 da produção massal do fungo *Beauveria bassiana*.

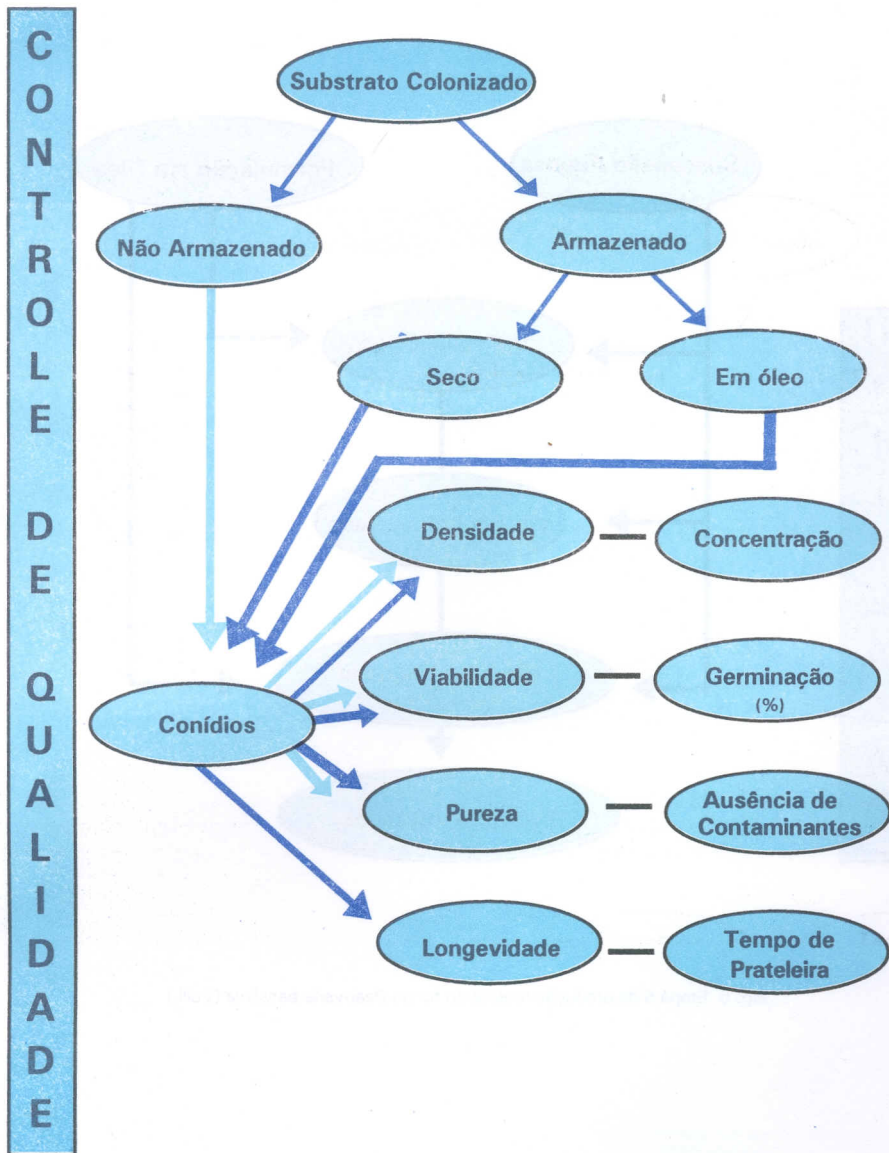


Fig. 4. Etapa 4 da produção massal do fungo *Beauveria bassiana*.

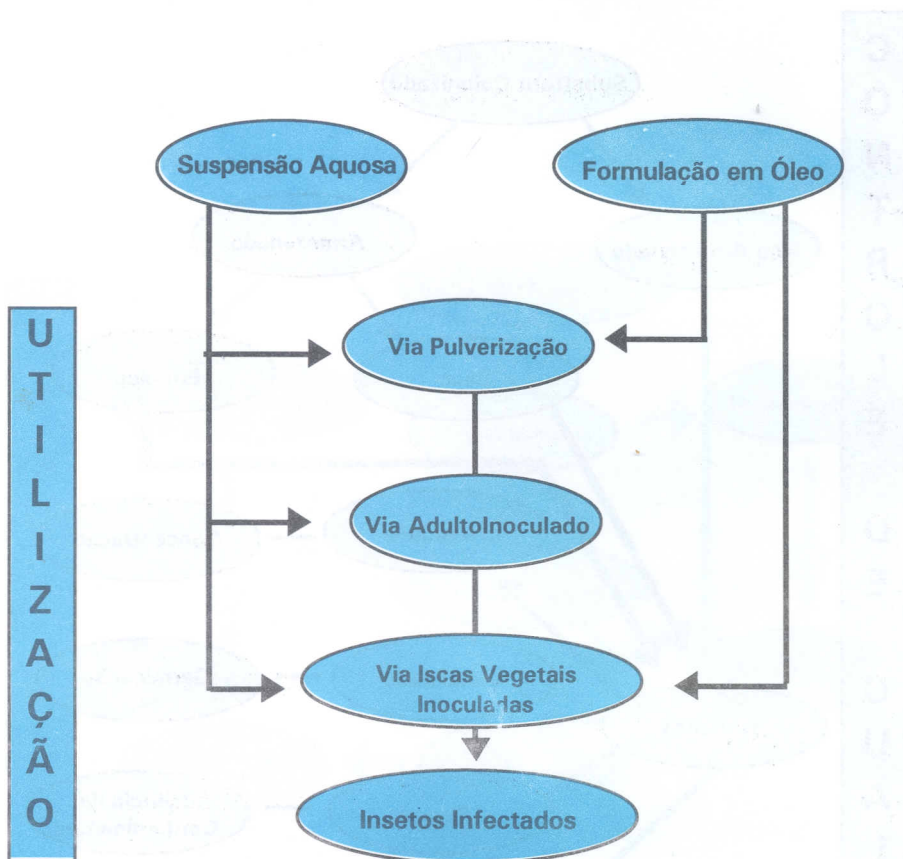


Fig. 5. Etapa 5 da produção massal do fungo *Beauveria bassiana* (Vuill.)

Embrapa

Tabuleiros Costeiros

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

