

## Pequeno Manual sobre Fungos Entomopatogênicos



ISSN 1517-5111  
ISSN online 2176-5081  
Março, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Cerrados  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Documentos 286**

## Pequeno Manual sobre Fungos Entomopatogênicos

*Roberto Teixeira Alves  
Marcos Faria*

Embrapa Cerrados  
Planaltina, DF  
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados  
BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza  
Caixa Postal 08223  
CEP 73310-970 Planaltina, DF  
Fone: (61) 3388-9898  
Fax: (61) 3388-9879  
<http://www.cpac.embrapa.br>  
[sac@cpac.embrapa.br](mailto:sac@cpac.embrapa.br)

Comitê de Publicações da Unidade  
Presidente: *Fernando Antônio Macena da Silva*  
Secretária-Executiva: *Marina de Fátima Vilela*  
Secretária: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*  
Equipe de revisão: *Francisca Elijani do Nascimento*  
*Jussara Flores de Oliveira Arbués*  
Assistente de revisão: *Elizelva de Carvalho Menezes*  
Normalização bibliográfica: *Paloma Guimarães Correa de Oliveira*  
Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*  
Capa: *Leila Sandra Gomes Alencar*  
Foto(s) da capa: *Roberto Teixeira Alves*  
Impressão e acabamento: *Divino Batista de Sousa*  
*Alexandre Moreira Veloso*

1ª edição

1ª impressão (2010): tiragem 100 exemplares

Edição online (2010)

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Cerrados

---

A474p Alves, Roberto Teixeira  
Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos / Roberto  
Teixeira Alves, Marcos Faria – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados,  
2010.  
50 p. — (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111,  
ISSN online 2176-5081 ; 286).

1. Controle biológico. 2. Fungo. I. Título. II. Série.

---

632.96 - CDD 21

© Embrapa 2010

# Autores

Roberto Teixeira Alves  
Engenheiro Agrônomo, Ph.D.  
Pesquisador da Embrapa Cerrados  
ralves@cpac.embrapa.br

Marcos Faria  
Engenheiro Agrônomo, Ph.D.  
Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia  
Parque Estação Biológica, Av. W3 Norte (final),  
Brasília, DF, CEP 70770-900  
faria@cenargen.embrapa.br

# Agradecimentos

Os autores agradecem ao assistente de pesquisa, Sr. Jânio Fonseca Silva, pelos valiosos e bons serviços prestados ao longo de três décadas no Laboratório de Entomologia da Embrapa Cerrados, contribuindo sempre para o uso adequado e eficiente do controle biológico de insetos-praga no Brasil.

# Apresentação

Esta publicação é um produto científico do trabalho conjunto de pesquisadores da Embrapa Cerrados com pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, na área de controle biológico de insetos-praga por fungos entomopatogênicos.

São informações práticas, obtidas ao longo de vários anos de trabalho e experiência, que estão sendo oferecidas a todos os pesquisadores e técnicos de empresas públicas ou privadas, voltadas para a produção e utilização de micoinseticidas.

Espera-se que o leitor interessado nos diferentes assuntos abordados nesta publicação possa compreender um pouco mais sobre fungos entomopatogênicos e sobre as várias técnicas necessárias para os processos de produção e aplicação no campo.

Dessa forma, conforme palavras dos autores, estarão contribuindo para o aumento do uso adequado do controle biológico de pragas agrícolas, evitando-se assim resíduos químicos nos alimentos, contaminação dos recursos naturais e redução nas intoxicações dos trabalhadores rurais brasileiros.

*José Robson Bezerra Sereno*  
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

# Sumário

Introdução.....	11
Coleta de Fungos .....	12
Isolamento de Fungos de Insetos.....	14
Cultivo de Fungo em Laboratório .....	15
Preparação de Meios de Cultura .....	17
Manutenção de Coleções de Fungos em Laboratório .....	19
Técnicas de Esterilização.....	21
Determinação da Viabilidade e Concentração dos Esporos (Preparo da Suspensão de Esporos para Contagens) .....	23
Produção de Fungos Entomopatogênicos.....	33
Formulação de Fungos Entomopatogênicos.....	38
Armazenamento de Fungos Entomopatogênicos .....	42
Aplicação de Fungos Entomopatogênicos .....	44
Comentário Final .....	47
Referências .....	48
Abstract.....	50

# Pequeno Manual sobre Fungos Entomopatogênicos

---

*Roberto Teixeira Alves*

*Marcos Faria*

## Introdução

Este manual foi elaborado com linguagem simples e metodologias de fácil adoção, para que o técnico interessado em desenvolver trabalhos com fungos entomopatogênicos possa ter seu trabalho facilitado, colaborando com o bom andamento de suas atividades de pesquisa ou de produção em larga escala.

A ênfase será dada aos fungos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Sporothrix*, os quais são bastante utilizados em diferentes programas de controle biológico de insetos-praga no Brasil.

É importante ressaltar que é preciso planejar bem o que se quer fazer, quais os objetivos a serem atingidos, quais os resultados esperados, bem como preparar a lista de materiais e suas quantidades necessárias para se coletar, isolar, cultivar, armazenar, produzir e formular o fungo a ser utilizado no controle biológico de algum inseto-praga. Enfim, é preciso planejar bem todas as atividades de laboratório e de campo, com a devida antecedência, para evitar imprevistos de última hora.

O ideal é que se possa ter outra pessoa com o mesmo nível de treinamento ao seu lado, que também aprenda e possa conduzir tudo sozinha em caso de necessidade, anotando os dados e atividades em

fichas previamente elaboradas. Isso porque os custos de uma pesquisa ou de uma produção, em larga escala, de um entomofungo, são elevados e essas atividades não devem ser interrompidas.

Espera-se que o técnico envolvido no assunto, após a leitura deste manual, possa compreender um pouco mais sobre fungos entomopatogênicos e sobre as várias técnicas necessárias para os processos de produção e aplicação no campo. Dessa forma, estará contribuindo para o aumento do uso adequado do controle biológico de pragas agrícolas, evitando assim resíduos químicos nos alimentos, contaminação dos recursos naturais e redução nas intoxicações dos trabalhadores rurais brasileiros.

## Coleta de Fungos

A descrição detalhada das diferentes espécies de fungos que abordamos nesse pequeno manual pode ser vista no livro sobre controle microbiano de insetos (ALVES, 1998).

Na natureza, os fungos são, comumente, coletados de insetos mortos e amostras de solo, e necessitam ser isolados e purificados em meio de cultura, para sua posterior identificação e possível multiplicação para uso em pesquisas. A coleta em áreas de preservação permanente (reservas, áreas indígenas e outras) necessita de autorização do Ibama.

A realização de coleta de amostra de material biológico é regulamentada pela Medida Provisória n.º 2.186-16, de 23/8/2001, e normas infralegais expedidas pelo Conselho e pela Instrução Normativa n.º 154, de 01/3/2007, do Ibama. Essa Instrução Normativa n.º 154 de 2007 prevê a possibilidade de o pesquisador obter licença permanente para realização de coleta, captura e transporte de material biológico. Essa licença pode ser requerida por pesquisador com título de doutor ou equivalente e vínculo empregatício com instituição científica, junto à Superintendência do Ibama do Estado no qual a instituição a que está vinculado é sediada. A licença será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação da referida licença.

## Coleta de insetos mortos com fungo

Insetos mortos no campo podem indicar que a morte foi causada por fungos entomopatogênicos. Devem ser procurados insetos pendurados nas plantas, aderidos às folhas, debaixo de árvores, arbustos e folhagens. Os insetos mortos devem ser removidos do campo rapidamente devido à ação predadora das formigas, aranhas e de outros animais (Figura 1).



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 1. Cigarrinha-das-pastagens morta por fungo no campo.

A coleta dos insetos deve ser feita com pinças e vidros (diferentes tamanhos) esterilizados ou em recipientes plásticos com tampas rosqueáveis. Os insetos mortos podem ser colocados também em sacos ou envelopes de papel. Após a coleta, deixar os recipientes com os insetos abertos durante três a quatro dias para secagem. Não secar os cadáveres artificialmente e não deixá-los sob a ação do sol quente.

Podem-se armazenar esses insetos mortos e secos por poucas semanas em temperatura ambiente ou em um refrigerador a 5 °C por longos períodos de tempo. Nunca armazenar insetos infectados com patógenos em álcool.

Para limpeza, os cadáveres poderão ser lavados com hipoclorito de sódio (água sanitária), enxaguados três vezes em água esterilizada e,

em seguida, acondicionados em câmara úmida (placa de Petri com papel filtro e um pedaço de algodão úmido) até que ocorra a formação de esporos sobre a superfície do cadáver.

## Coleta de insetos vivos com fungo

Coletar os insetos vivos no campo e mantê-los em gaiolas com alimento. Observar se alguns indivíduos não estão se alimentando e se apresentam fraca coordenação de movimentos. Alguns tentam ficar na parte mais alta da gaiola e outros tentam se esconder. Os insetos devem ser observados diariamente. Logo após a morte, eles devem ser separados e colocados em um recipiente esterilizado para observação do aparecimento de sintomas e da presença de patógenos. Se o corpo do inseto estiver flácido e preto, indica a presença de infecção bacteriana ou viral. Se o corpo estiver rígido, poderá indicar uma infecção fúngica. Nesse caso, incubar o cadáver em câmara úmida e observar se haverá esporulação externa.

## Isolamento de Fungos de Insetos

Fungos entomopatogênicos geralmente esporulam externamente no corpo do inseto hospedeiro sob condições de alta umidade e, em alguns casos, esporulam no interior do organismo hospedeiro (abdômen), a exemplo dos gafanhotos, que vivem em ambientes secos.

### Insetos com esporulação externa recente

- Coletar os esporos do corpo do inseto com uma agulha fina e esterilizada.
- Colocar alguns desses esporos em uma lâmina para identificação preliminar no microscópio ótico. Outra parte desses esporos pode ser espalhada sobre diferentes meios de cultura contendo agar e antibiótico, em uma placa de Petri. Esses meios podem ser, por exemplo: batata + dextrose + agar (BDA); batata + cenoura + agar; extrato de malte e agar; ou Sauboraud + dextrose + agar.
- Incubar e manter essas placas a 25 °C-27 °C.

- Examinar diariamente as culturas de fungo com o auxílio de um microscópio estereoscópico para, posteriormente, preparar nova lâmina para identificação desse fungo em microscópio ótico.

### Insetos mortos sem esporulação externa

- Incubar os insetos mortos por alguns dias em câmara úmida (alta umidade).
- Observar o aparecimento da esporulação nas diferentes partes do inseto.
- Preparar lâminas com os esporos coletados após a esporulação, em água ou em corantes como cotton blue em lactoglicerol, para identificação preliminar da espécie de fungo.
- Colocar parte desses esporos sobre diferentes meios de cultura contendo agar e antibiótico, em uma placa de Petri. Os meios de cultura mencionados anteriormente poderão ser utilizados.
- Incubar e manter essas placas a 25 °C -27 °C.
- Examinar diariamente essas culturas de fungo com o auxílio de um microscópio estereoscópico.
- Se o inseto morto não estiver bem seco ou se morreu há vários dias, fungos e bactérias contaminantes podem suprimir ou prejudicar o desenvolvimento do patógeno causador da morte do inseto.

## Cultivo de Fungo em Laboratório

Os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Sporothrix* são relativamente fáceis de serem cultivados em diferentes meios de cultura artificiais como BDA (Figura 2), SDA, arroz, trigo ou cevada cozidos e autoclavados.

Ao se cultivar fungos em laboratório, a assepsia é uma condição essencial para um bom cultivo ou produção em larga escala. Sempre limpar bem o local (bancada, módulo de fluxo laminar, etc), material e equipamentos que irá utilizar com álcool 70%.



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 2. Placa de Petri com BDA e colônias do fungo *Metarhizium anisopliae*.

Com o passar do tempo, os fungos cultivados em meios de cultura artificiais em laboratório podem reduzir sua virulência após repicagens sucessivas. Alguns experimentos desenvolvidos na Esalq/USP mostraram um decréscimo na virulência de *M. anisopliae*, além de modificações na morfologia do fungo, após oito repicagens em meio de arroz cozido (ALVES, 1998).

O ideal é que se inocule o fungo sobre o inseto hospedeiro, que é a praga visada no controle biológico, após seis repicagens em meio de cultura para aumentar ou, pelo menos, manter a virulência de um isolado específico de um fungo.

Normalmente se utilizam tubos de ensaio ou placas de Petri com meio de cultura para cultivar, armazenar por períodos curtos ou transportar fungos de um local para outro.

Diferentes meios de cultura para utilização em laboratórios são descritos no tópico seguinte.

## Preparação de Meios de Cultura

Em geral, as espécies dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Sporothrix* são facilmente cultivadas em meios de cultura.

Deve-se lembrar que a preparação desses meios envolve assepsia rigorosa para se evitar a perda de todo o trabalho por causa de contaminações indesejáveis.

Os principais passos, segundo Alves (1998), para se preparar um meio de cultura com o devido cuidado e eficiência, são os seguintes:

- Pesar todos os ingredientes e embalá-los separadamente.
- Adicionar o agar a uma parte da água necessária para o preparo do meio e essa água deve estar fria para se evitar a formação de grumos.
- Aquecer a mistura agitando levemente até o ponto de fervura.
- Acrescentar e homogeneizar os demais componentes do meio, exceto aqueles que são termolábeis (antibióticos, certos açúcares e aminoácidos), a fim de evitar sua degradação por calor.
- Distribuir em frascos apropriados para esterilização em autoclave, ocupando no máximo a metade do volume do frasco.
- Acondicionar os frascos fechados com algodão hidrófobo coberto com papel-alumínio na autoclave, evitando que fiquem inclinados.
- O tempo de autoclavagem é de 20 minutos a 125 °C e 1 atmosfera de pressão.
- Os componentes termolábeis devem ser acrescentados ao meio, quando for utilizado, após o aquecimento, até se solubilizarem.
- Após o resfriamento, os frascos contendo meio de cultura devem ser guardados ao abrigo da luz, temperatura e umidade elevadas.

Os principais meios de cultura para fungos entomopatogênicos são os seguintes:

**Batata Dextrose Agar (BDA) é um meio geral que serve para o cultivo de fungos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Sporothrix***

Batata cozida sem casca para extração de amido	200,00 g
Dextrose	20,00 g
Agar	15,00 g
Água destilada	1000,00 ml

**Sabouraud Dextrose Agar (SDA) é um meio mais rico e também serve para fins gerais (*Metarhizium*, *Beauveria* e *Sporothrix*)**

Neopeptona	10,00 g
Dextrose	40,00 g
Agar	15,00 g
Água destilada	1000,00 ml

**Meio para produção de esporos de *Beauveria* spp. e *Nomuraea rileyi***

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,36 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,60 g
KCl	1,00 g
Glucose	10,00 g
$\text{NaNO}_3$	1,58 g
Extrato de levedura	5,00 g
Agar	20,00 g
Água destilada	1000,00 ml

**Meio seletivo para isolar *Metarhizium* spp.**

Agar	35,00 g
Glucose	6,00 g
Peptona	10,00 g
Bilis bovina	15,00 g
Ciclohemidina	10,00 mg
Clorafenicol	500,00 mg

Depois, completa-se o volume para 1.000 ml com água destilada. Após autoclavar, adicionar a 55 °C:

Cicloheximida	200,00 mg
Clorafenicol	200,00 mg
Estreptomicina	100,00 mg
Eritrocina	80,00 mg

Meio seletivo para isolamento de *Beauveria* spp. e de outros fungos entomopatogênicos do solo

20,0 g de aveia + 1 litro de água deionizada. Autoclavar por 20 minutos a 125 °C e filtrar através de peneira fina.

Completar o volume para 1 litro e adicionar:

Agar	20,00 g
Dodine (acetato de N-dodecilguanidina)	550,00 mg
Tetraciclina	5,00 mg
Cristal Violeta	10,0 mg

## Manutenção de Coleções de Fungos em Laboratório

Existem diversos processos para armazenamento de fungos entomopatogênicos, que devem ser determinados de acordo com os equipamentos existentes no laboratório e também com base na manutenção da viabilidade e virulência do patógeno. A descrição de alguns métodos feita neste trabalho está baseada em Alves (1998).

O armazenamento de fungos em insetos mortos, preservados em baixa temperatura, e armazenamento do inseto em suspensão aquosa ou na forma de esfregaço não são eficientes e, por isso, devem ser evitados.

Tubos de cultura com o meio não inclinado contendo o fungo já desenvolvido e posteriormente coberto com óleo mineral Nujol® autoclavado, tampado com algodão e vedado com parafilme, são de simples utilização e podem ser armazenados em temperaturas entre 4 °C (geladeira) e -20 °C (freezer). Esse método exige repicagens a cada dois anos.

O armazenamento em água destilada é bastante utilizado e simples. Recorta-se uma parte da colônia do fungo na sua periferia com um pedaço do meio de cultura (BDA, SDA, etc) da placa de Petri, para coletar um pouco de micélio e esporos que se encontram no meio. Esses pedaços de meio de cultura com fungo são colocados em tubos com água esterilizada. Após vedação com parafilme, colocam-se os tubos na geladeira a 4 °C.

O armazenamento de fungos entomopatogênicos em cristais de sílica gel também é um método eficiente. Após a purificação do fungo, 0,001 g de esporos é suspensa em 1 ml de leite desnatado já esterilizado em autoclave por 10 minutos e diluído a 15% em água. Depois, transfere-se 1 ml de leite com esporos em suspensão para 4 g de sílica gel previamente esterilizada e desidratada a 100 °C por 3 horas. A transferência só pode ser feita após o resfriamento da sílica, já que a água com sílica gel resulta em ácido silícico e energia. Os tubos deverão ser fechados e vedados com parafilme e armazenados a 4 °C ou a -20 °C.

O armazenamento por liofilização é um processo eficiente de secagem rápida a frio que pode manter a viabilidade de alguns fungos entomopatogênicos por mais de 20 anos. Uma suspensão de esporos do fungo é transferida para frascos que são mergulhados em gelo seco e álcool a -78 °C, acoplados a uma bomba de vácuo. Após a dessecação, os tubos são fechados a vácuo e armazenados em geladeira ou freezer.

Outro método eficiente de armazenamento de fungos entomopatogênicos é em nitrogênio líquido, onde a temperatura no interior dos tambores com nitrogênio chega a -196 °C, garantindo condições estáveis por muitos anos pela redução das atividades física e química. A suspensão, ou um pedaço de meio de cultura com o fungo desenvolvido, deve ser acrescida de um crioprotetor como o glicerol a 10%, e distribuída em seguida em ampolas. O congelamento deve ser gradual, mantendo-se inicialmente as alíquotas por 1 hora a 4 °C, para permitir o envolvimento do microrganismo por glicerol. Em seguida, mantém-se o material por mais uma hora a -20 °C e, finalmente, mergulham-se as ampolas em botijão contendo nitrogênio.

## Técnicas de Esterilização

Em laboratórios em que se trabalham com fungos entomopatogênicos, necessita-se de uma boa organização, limpeza e equipamentos apropriados para se evitar contaminações. O ar, o material, a bancada e os meios de culturas devem passar por um processo de esterilização, desinfecção, desinfestação ou assepsia, dependendo do caso.

Primeiramente, é importante se entender bem o conceito de cada um desses termos (ALVES, 1998):

- Esterilização é o processo pelo qual se eliminam todos os microrganismos vivos existentes.
- Desinfecção é a eliminação dos microrganismos que se encontram dentro de alguns corpos, realizada principalmente por processos químicos.
- Desinfestação é a eliminação de microrganismos que se encontram na superfície de objetos, plantas e animais.
- Assepsia é a utilização de composto mineral ou orgânico para impedir a multiplicação microbiana, sem necessariamente eliminá-la.

Segundo Alves (1998), existem vários métodos para esterilização dos materiais em laboratório e podem ser físicos, químicos e mecânicos.

### Os métodos físicos

Levam em conta a ação letal do calor sobre os microrganismos, através de temperatura e tempo de exposição. Eles podem ser o calor seco ou úmido, por exemplo.

Por calor seco, pode-se fazer a esterilização pelo ar quente utilizando-se de fornos ou estufas elétricas. Também se pode flambar o material diretamente sobre uma chama ou incinerar o material queimando-o totalmente. Este último é mais utilizado para descarte de material contaminado.

Por calor úmido, pode-se utilizar a autoclave (Figura 3), que é um equipamento que utiliza vapor d'água e alta pressão, bastante comum em laboratórios onde a esterilização de materiais e meios de cultura são atividades corriqueiras. Outros métodos por calor úmido são o fluxo de vapor, a água em ebulição, a pasteurização e a tinalização.

A radiação ultravioleta também é um método físico bastante utilizado para diminuir a população de microrganismos, principalmente em câmaras assépticas (módulo de fluxo laminar) e para desinfestação de materiais. A radiação gama também pode ser usada com essa finalidade.



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 3. Autoclaves para esterilização de materiais e meios de cultura.

## Métodos mecânicos de esterilização

São mais utilizados para meios de cultura termolábeis ou para remoção de microrganismos do ar. O filtro de ar é utilizado para a remoção de microrganismos do ar dentro de câmaras assépticas de fluxo laminar ou em salas assépticas no laboratório. Os filtros microbiológicos servem para filtrar gases, ar e líquidos termolábeis. Os filtros mais utilizados são os de porcelana com papel filtro, o Milipore de membrana ou molecular, entre outros.

## Métodos químicos

Utilizam vários compostos para a assepsia e desinfecção de materiais de laboratório, porém nenhum deles é capaz de, isoladamente, eliminar a flora microbiana. Os mais utilizados são os antissépticos e os desinfetantes. Os mais comuns são os ácidos orgânicos como o acético, o carbônico, o bórico, o salicílico e o benzoico. As bases mais utilizadas são o hidróxido de sódio e o hidróxido de cálcio. Existem os metais pesados derivados do mercúrio, do cobre e da prata. Compostos orgânicos têm ação bactericida e (ou) bacteriostática e fungicida como o formol, clorofórmio, fenol e álcoois. Existem também os oxidantes como a água oxigenada, o ozônio e o permanganato de potássio. O hipoclorito de sódio é um halogênio muito utilizado no Brasil. Por último, têm-se os óleos, essências e sabões, com efeito bactericida e desodorizante.

## Determinação da Viabilidade e Concentração dos Esporos (Preparo da Suspensão de Esporos para Contagens)

O correto, quando se vai comparar efeito de óleos ou de qualquer outro ingrediente sobre a viabilidade dos esporos, é a utilização de esporos novos, que estejam com alta viabilidade (conferida) e com a umidade desejada (também conferida), para se fazer o teste comparativo. Devem, preferencialmente, ter a mesma idade e serem oriundos do mesmo lote de produção. Deve-se conferir a umidade dos esporos armazenados através do método gravimétrico, pois o número de esporos por grama varia em função da umidade da amostra.

### Esporos puros

- 1) Deve-se reidratar, por 24 horas, os esporos secos armazenados, antes de se preparar a suspensão de esporos para se conferir a viabilidade dos mesmos. Se os esporos forem frescos, não é necessário reidratar. O tempo para leitura da viabilidade é de, no máximo, 24 horas para esporos frescos e de, no máximo, 48 horas para esporos secos reidratados ou não (Tabela 1).

Tabela 1. Teste de germinação de esporos de fungos entomopatogênicos.

Fungo: \_\_\_\_\_ Isolado: \_\_\_\_\_

Experimento: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome de quem fez a leitura: \_\_\_\_\_

Campo de leitura	Esporos germinados	Esporos não germinados	Total
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
Somatório final			

Quando o total de esporos observados (germinados e não germinados) atingir ou ultrapassar o número de 300, já se terá um número mínimo de esporos contados para se calcular a porcentagem de germinação.

Número total de esporos contados \_\_\_\_\_ 100%

Número de esporos germinados \_\_\_\_\_ X

$$X (\% \text{ de germinação}) = \frac{\text{Número de esporos germinados} \times 100}{\text{Número total de esporos contados}} = \%$$

- 2) Colocar 0,1 g de esporos puros em 200 ml de água com 0,1% Tween 80 esterilizada. Misturar bem no agitador magnético (Figura 4) por 15 minutos ou através de ultrassom durante 2 minutos.
- 3) Diluição 1:10; colocar 1 ml da suspensão original em 9 ml de água com 0,1% Tween 80 esterilizada e misturar conforme sugerido anteriormente (Figura 5).

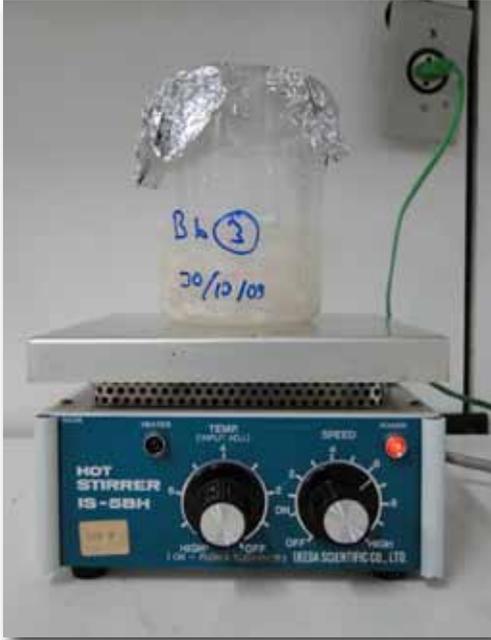


Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 4. Becker contendo 0,1 g de esporos de *Beauveria bassiana* em 200 ml de água e 0,1% Tween 80 sobre agitador magnético para homogeneizar a suspensão.

Figura 5. Suspensão de esporos de *Beauveria bassiana* diluída 1:10 em Becker sobre agitador magnético para facilitar as contagens.



Foto: Roberto Teixeira Alves

- 4) Colocar 0,3 ml (300 microlitros) da suspensão diluída, por placa de BDA + antibiótico (estreptomicina). Agitar manualmente com bastante vigor a placa de Petri em todas as direções para espalhar a suspensão sobre o BDA sem a alça de Drigalsky. Incubar as placas a 25 °C. O tempo para leitura da viabilidade é de, no máximo, 24 horas para esporos frescos.
- 5) No caso de produtos comerciais à base de esporos puros, cada grama deverá conter, normalmente, entre  $1 \times 10^{10}$  e  $9 \times 10^{10}$  esporos e, no mínimo, 80% de viabilidade para que a qualidade seja considerada satisfatória.
- 6) Deve-se conferir a umidade dos esporos armazenados, pelo método gravimétrico, uma vez que o número de esporos por grama varia em função da umidade do produto.

### ***Avaliação da umidade dos esporos puros***

Utiliza-se o método gravimétrico para a obtenção da umidade dos esporos puros. Inicialmente, pesam-se recipientes vazios feitos de papel alumínio em balança analítica (com precisão de quatro casas decimais). Tara-se a balança e depois se acrescenta exatamente 0,5 gramas de esporos puros (peso inicial de cada amostra). Essas amostras de esporos puros sobre papel alumínio são colocadas no interior de uma estufa de esterilização e secagem com a temperatura ajustada para 85 °C. Após 24 horas de secagem, realiza-se a pesagem de cada amostra, quando o peso já estará estabilizado pela eliminação da umidade da amostra (Tabela 2). A umidade da amostra será obtida pela diferença entre o peso inicial e o peso final transformada em porcentagem. O ideal é que as amostras utilizadas nas análises tenham teor de água abaixo de 10% de umidade.

Tabela 2. Pesagens e verificação da umidade de arroz + fungo (metade superior) e de esporos puros (metade inferior).

<b>Tratamento</b>				
<b>Horário e dia da pesagem</b> __ : __ h/ __-__-__	<b>Embalagem 1</b> <b>(gramas)</b>	<b>Embalagem 2</b> <b>(gramas)</b>	<b>Embalagem 3</b> <b>(gramas)</b>	<b>Média</b> <b>(gramas)</b>
Peso do papel alumínio para arroz + fungo (g)				
Peso dos esporos puros antes da estufa (g)				
Peso dos esporos puros depois da estufa (g)				
Diferença entre peso inicial e final só do arroz + fungo (g)				
Diferença entre peso inicial e final só do arroz + fungo (%)				
<b>Horário e dia da pesagem</b> __ : __ h/ __-__-__	<b>Embalagem 1</b> <b>(gramas)</b>	<b>Embalagem 2</b> <b>(gramas)</b>	<b>Embalagem 3</b> <b>(gramas)</b>	<b>Média</b> <b>(gramas)</b>
Peso do papel alumínio para os esporos puros (g)				
Peso dos esporos puros antes da estufa (g)				
Peso dos esporos puros depois da estufa (g)				
Diferença entre peso inicial e final só dos esporos puros (g)				
Diferença entre peso inicial e final só dos esporos puros (%)				

## Arroz cozido colonizado pelo fungo

- 1) Colocar 10 g de arroz + fungo em 200 ml de água esterilizada + 0,1% Tween 80. Misturar bem no agitador magnético (15 minutos) ou através de ultrassom (2 minutos).
- 2) Diluição 1:10; colocar 1 ml da suspensão original em 9 ml de água esterilizada + 0,1% Tween 80. Misturar bem no agitador magnético (15 minutos) ou através de ultrassom (2 minutos).

- 3) Colocar 0,3 ml (300 microlitros) da suspensão diluída por placa de BDA + antibiótico (estreptomomicina). Agitar manualmente sem a alça de Drigalsky. Incubar as placas com BDA a 25 °C e realizar a leitura da viabilidade dos esporos em até 24 horas após a incubação das placas com BDA contendo a suspensão preparada. A determinação da concentração de esporos poderá ser feita de imediato, isto é, logo após a preparação da suspensão fúngica.
- 4) Preparar três amostras de suspensão de esporos provenientes de 3 embalagens diferentes. De cada saco plástico, realizam-se duas leituras de concentração de conídios, perfazendo um total de seis leituras (Tabela 3). O resultado final (média geral) será igual a X esporos por grama de arroz com fungo. Cada grama de arroz + fungo deverá conter, no mínimo,  $5 \times 10^8$  esporos (preferencialmente acima de  $1 \times 10^9$ ) e 80% de viabilidade dos esporos para se ter um produto de qualidade satisfatória.
- 5) Deve-se conferir a umidade do produto arroz + fungo armazenado, através do método gravimétrico.

Tabela 3. Contagem do número de esporos (concentração).

Experimento:

Fungo: \_\_\_\_\_ Isolado: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Nome de quem fez a leitura: \_\_\_\_\_

Quadrado	Desenho superior	Desenho inferior
A 1		
B 2		
C 3		
D 4		
E 5		
Somatório		

O campo de contagem contido na câmara de Neubauer (Figura 6), suas dimensões, volumes e fatores de conversão para mililitro são mostrados a seguir (Figura 7). A câmara de Neubauer possui quatro campos de contagem, os quais podem ser utilizados na mensuração da quantidade de esporos da suspensão (Tabela 4). Escolhendo-se o campo 1, as linhas podem ser chamadas de A, B, C, D e E e as colunas de 1, 2, 3, 4 e 5. Uma forma bem representativa para a leitura da concentração é a escolha dos quadrados A1, B2, C3, D4 e E5 para contagem dos esporos.

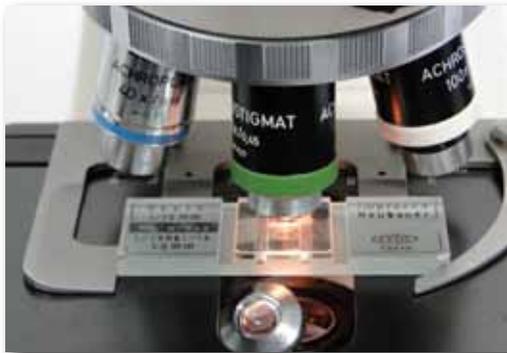


Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 6. Câmara de Neubauer para leitura da concentração de esporos por mililitro.

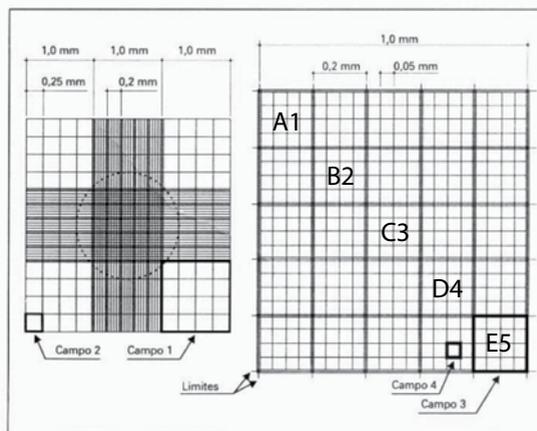


Figura 7. Câmara de Neubauer com os respectivos campos de contagem. Fonte: Alves (1986).

Os esporos no campo de contagem dos desenhos superior e inferior devem ser contados e, então, calcula-se a média do somatório de cada campo. Em seguida, multiplica-se por 5, uma vez que há 25 quadrados nessa área central da câmara de Neubauer e, finalmente, multiplica-se pelo fator de conversão ( $10^4$ ) para se obter o número de esporos por mililitro da suspensão.

$$\text{Média: } \frac{(\text{soma dos esporos do desenho superior}) + (\text{soma dos esporos do desenho inferior})}{2}$$

$$\text{Média} = \frac{\quad}{2} =$$

Fórmula para cálculo do nº de esporos por mililitro

$$\text{Número de esporos/ml} = \text{média obtida} \times 5 \times 10^4$$

Observação: se houve diluição, não esquecer de multiplicar pela diluição para se obter a concentração correta da suspensão original de esporos.

Cálculo do número de esporos por grama de arroz com fungo

1) Número de esporos contido no total de mililitros de água com Tween 80 = (nº de esporos/ml) x (nº total de mililitros de água com Tween 80) =

2) Se o número de esporos contido no número de gramas de arroz com fungo é igual ao número de esporos contido no total de mililitros de água com Tween 80, então:

$$\begin{aligned} \text{Nº de esporos por um grama de arroz com fungo} &= \\ &= \frac{(\text{nº de esporos contido no nº de gramas de arroz com fungo})}{\text{nº de gramas de arroz com fungo}} = \\ &= X \text{ esporos/grama de arroz com fungo} \end{aligned}$$

Cálculo do número de esporos por grama de esporos puros

1)  $(n^\circ \text{ de esporos/ml}) \times (n^\circ \text{ total de mililitros de água com Tween 80}) =$

2) Se o número de esporos contido no número de gramas de esporos puros é igual ao número de esporos contido no total de mililitros de água com Tween 80, então:

$N^\circ \text{ de esporos por um grama de esporos puros} =$

$$= \frac{(n^\circ \text{ de esporos contido no } n^\circ \text{ de gramas de esporos puros})}{n^\circ \text{ de gramas de esporos puros}}$$

$= X \text{ esporos por grama de esporos puros}$

Tabela 4. Campo de contagem da câmara de Neubauer com as respectivas áreas, volumes e fatores de conversão para ml.

Campos de contagem	Área (mm <sup>2</sup> )	Volume		Fator de conversão (esporos/ml)
		mm <sup>3</sup>	ml	
1	1,0000	0,10000	10 <sup>-4</sup>	$n \times 10^4$
2	0,0625	0,00625	$62,5 \times 10^{-7}$	$n \times 16 \times 10^4$
3	0,0400	0,00400	$4,0 \times 10^{-6}$	$n \times 2,5 \times 10^5$
4	0,0025	0,00025	$2,5 \times 10^{-7}$	$n \times 4 \times 10^6$

$n = n^\circ$  médio de esporos contados/campo.

Observação: a profundidade entre a câmara e a lamínula é de 0,100 mm.

Fonte: Alves (1986).

### ***Avaliação da umidade do arroz com fungo***

Utiliza-se o método gravimétrico para a obtenção da umidade do arroz com fungo. Inicialmente, pesam-se recipientes vazios feitos de papel alumínio em balança analítica (com precisão de quatro casas decimais). Tara-se a balança e depois se acrescenta exatamente 10 gramas de arroz com fungo, que será o peso inicial de cada amostra. Essas amostras de arroz com fungo sobre papel alumínio serão colocadas no

interior de uma estufa de esterilização e secagem com a temperatura ajustada para 85 °C. Após 24 horas de secagem, realiza-se a pesagem de cada amostra, quando o peso já estará estabilizado pela eliminação de toda a umidade da amostra. A umidade da amostra será obtida pela diferença entre o peso inicial e o peso final transformada em porcentagem (Tabela 2).

### Formulados em óleo emulsionável (dispersões oleosas)

- 1) Colocar 10 ml do produto formulado em 200 ml de querosene desodorizado. Misturar bem no agitador magnético (20 minutos) ou através de ultrassom (2 minutos).
- 2) Diluição 1:10; colocar 1 ml da suspensão original em 9 ml de querosene desodorizado e misturar.
- 3) Pode-se fazer com óleo de girassol puro esterilizado, ou similares, caso não se consiga o querosene desodorizado.
- 4) Colocar 0,5 ml (500 microlitros) da suspensão diluída por placa de BDA + antibiótico (estreptomicina). Agitar manualmente sem a alça de Drigalsky.
- 5) O tempo para leitura da viabilidade dos esporos fica entre 24 horas pós-incubação e 48 horas, para produtos recém-preparados e formulados, e entre 48 horas e 72 horas para produtos formulados e armazenados há várias semanas ou meses (Tabela 1). Um método recente que possibilita a determinação da viabilidade de esporos formulados em óleo seria por meio da utilização do surfactante Solub'oil, conforme descrito por Oliveira (2009).

O teste de germinação de esporos de fungos entomopatogênicos é de grande importância nas rotinas de um laboratório que trabalha com fungos para o controle biológico de insetos-praga. O objetivo deste teste é verificar se a maioria dos esporos a serem utilizados em experimentos laboratoriais e aplicações no campo está com uma viabilidade satisfatória (acima de 80%).

## Produção de Fungos Entomopatogênicos

### Produção em substratos sólidos

- Meios de cultura contendo agar mais outros nutrientes como batata e dextrose; meio com batata, cenoura e agar; ou meio com Sabouraud, dextrose e agar e antibióticos ou em substratos naturais como arroz cozido são os mais empregados para produções mais volumosas, empregando-se Erlenmeyers, sacos plásticos ou bandejas. Em geral, uma grande área de superfície é necessária para a esporulação do fungo. Os substratos sólidos são usados para a produção de esporos aéreos.

### **Substrato sólido**

- Colocar 350 ml de água/kg de arroz  $\Rightarrow$  1 kg/saco plástico (ou 87,5 ml de água em 250 g de arroz com recipientes com volumes e pesos marcados). Fazer uma mistura manual rápida para homogeneizar a umidade. Autoclavar durante 30 min. a 125 °C e 1,5 atm. O saco plástico com arroz fica enrolado (Figura 8) e aberto em um dos lados.



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 8. Colocação da água no meio de arroz para autoclavagem e para posterior inoculação com o fungo.

- Em cada saco plástico contendo 250 g de arroz autoclavado e já resfriado no interior de capela (Figura 9), adicionar 20 ml da suspensão de esporos ( $10^8$  esporos/ml) proveniente das culturas matrizes.



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 9. Inoculação do fungo no arroz autoclavado, já frio, no interior da capela.

- Misturar bem o inóculo no arroz esterilizado.
- Soldar o lado aberto e levar para a sala de incubação (desenvolvimento).
- Incubar a 27 °C por 10 a 15 dias (Figura 10). No segundo dia, fazer nova mistura manual do arroz com o inóculo e fazer um pequeno corte (1 cm), com tesoura estéril, no centro do lado superior do saco plástico para aumentar a aeração e conseqüentemente a esporulação.



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 10. Sacos plásticos com arroz já inoculado com fungo para desenvolvimento.

- Após 10 a 15 dias, cortar a parte superior do saco plástico onde o fungo está se desenvolvendo (Figura 11).



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 11. Arroz com fungo desenvolvido e sacos plásticos cortados para secagem.

- Deixar secar por mais dois dias no mesmo ambiente com baixa umidade relativa.
- Lavar o fungo esporulado no arroz em um liquidificador industrial de 25 litros com água limpa durante um minuto (Figura 12). Coloca-se água até no máximo 10 litros (iniciar com 3 kg de arroz + fungo e 5 litros de água).



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 12. Liquidificador industrial contendo água para lavagem do arroz com fungo.

- Recomenda-se que o operador sempre utilize os equipamentos de proteção individual (EPIs) como protetor de ouvido, luvas, jaleco e máscara.
- Filtra-se somente o arroz em uma tela fina sobre balde plástico ou metálico. Coleta-se a suspensão originada e separam-se os esporos da água através de papéis-filtro sobre funis de Buchner succionados por uma bomba de vácuo. A água separada fica em um Kitasato e pode ser reaproveitada para novas lavagens no liquidificador.
- O tempo gasto para se lavar 100 kg de arroz + fungo no liquidificador é de aproximadamente 2 horas.
- A etapa mais lenta é a filtragem da suspensão no sistema papel/funil/kitasato/bomba de vácuo (Figura 13). Processam-se 2 litros de suspensão por hora/funil. Se tivermos um conjunto de oito funis, processaremos 16 litros por hora ou 96 litros a cada 6 horas.



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 13. Processo de filtragem da água com bomba de vácuo para obtenção de esporos puros.

- O rendimento, em termos de coleta de esporos, é bastante alto e compensador.
- Os esporos sobre os papéis-filtro (tipo pizzas) são colocados em prateleiras no interior de uma sala com 20 °C de temperatura e com 10 % de umidade relativa do ar para secarem ao longo de sete dias.

- Em seguida, faz-se a moagem dos esporos em um moedor de café ou similar e armazena-se em recipientes de plástico em temperaturas entre 2 °C e 5 °C por até nove meses em boas condições de germinação (alta viabilidade). Com isso, pode-se evitar a sazonalidade da produção e da utilização da mão-de-obra especializada. Podem-se produzir esporos secos de diferentes espécies de fungos ao longo do ano para estocagem e formulação às vésperas das encomendas.

### Meio líquido de cultura submersa (fermentação líquida em Erlenmeyer)

- 20 g/litro de extrato de levedura
- 20 g/litro de glucose
- 1000 ml de água

### Produção com fermentação líquido-sólida (método bifásico)

#### **Primeiro estágio**

- Misturar 20 g extrato de levedura + 20 g glucose + 1 litro de água.
- Distribuir 75 ml do meio em Erlenmeyers de 250 ml.
- Autoclavar o meio de cultura líquido a 125 °C e 1,5 atm durante 30 minutos.
- Inocular 1 ml da suspensão conidial ( $6 \times 10^6$  esporos/ml em água + 0.05% Tween 80) em 75 ml do meio líquido.
- Os Erlenmeyers com o meio líquido deverão ser incubados em agitador rotativo (shaker) a 150 rpm por três dias a 27 °C.
- O inóculo com micélio é diluído em 50% com água estéril fria antes de ser transferido para o substrato sólido.
- Pode-se também inocular 10 grãos de arroz com fungo em 250 ml de água + 0.05% Tween 80, contendo 5 g de extrato de levedura e 5 g de glucose, já autoclavados. Depois de desenvolvido no “shaker”, completa-se o volume com água fria estéril até 1.000 ml e inocula-se 20 ml dessa suspensão em cada saco plástico com arroz autoclavado.

### **Segundo estágio**

- Colocar 350 ml de água/kg de arroz  $\Rightarrow$  1 kg/saco plástico (ou 87,5 ml de água em 250 g de arroz com recipientes com volumes e pesos marcados)  $\Rightarrow$  autoclavar por 30 min. a 125 °C e 1,5 atm.
- Adicionar 150 ml de inóculo micelial em sacos plásticos com 1 kg de arroz frio.
- Incubar a 27 °C por 10 a 15 dias.
- Abrir os sacos plásticos com o fungo esporulado para secagem do substrato (7 dias a 20 °C e 10-15% U.R. na sala de secagem para formulações secas ou 2 dias para formulações oleosas).
- Os esporos poderão ser separados do arroz pelo método já descrito ou com uma peneira de 300  $\mu$ m, ou então se usando um ciclone extrator. O ideal é que o teor de água dos esporos fique entre 5% e 10% de umidade antes de serem formulados.

## Formulação de Fungos Entomopatogênicos

Formulação de micoinseticidas se refere à composição resultante da mistura de fungos entomopatogênicos com outros ingredientes. Esses ingredientes devem contribuir para uma alta viabilidade, estabilidade, virulência e eficácia do agente de controle microbiano e para a aceitação do produto pelo usuário (ALVES, 2006).

Esporos, blastosporos e até o micélio podem ser o ingrediente ativo de micoinseticidas, constituindo-se no componente biológico da formulação.

Segundo Alves (2003), o desenvolvimento de uma formulação de micoinseticida envolve ou necessita de estudos sobre:

- Compatibilidade dos formulantes com os esporos do fungo (ALVES et al., 2002).
- Possibilidade de armazenamento do produto formulado em prateleiras, preferencialmente em temperatura ambiente.

- Aumento da eficiência do fungo em relação às formulações anteriormente utilizadas (ALVES et al., 1998a).
- Boa capacidade de espalhamento sobre o corpo do inseto e sobre a folhagem com superfícies hidrofóbicas (ALVES et al., 2001).
- Testes de volatilidade provando diminuí-la (ALVES et al., 2000).
- Bioensaios com diferentes proporções dos formulantes e do ingrediente ativo.
- Medições da viscosidade com diferentes proporções dos formulantes para relacionar com a evaporação e com a qualidade da pulverização.
- Capacidade de proteção dos esporos contra a radiação solar (ALVES et al., 1998b).
- Proporcionar melhorias na atomização da suspensão formulada de modo que possa ser utilizada a aplicação de gotas controladas (CDA) com equipamentos convencionais de uso cotidiano.
- Ser de fácil adoção pelo produtor rural.

## Tipos de formulação

Existem vários tipos de formulações de inseticidas e micoinseticidas. A maioria dos produtores aplica esses produtos em formulações à base de água para controlar insetos-praga em baixos, médios e altos volumes de aplicação usando pulverizadores com bicos hidráulicos ou atomizadores (MATTHEWS, 1992).

De acordo com Michereff Filho et al. (2009), várias formulações encontram-se disponíveis no mercado mundial.

### ***Para serem pulverizadas***

Suspensões concentradas, suspensões concentradas miscíveis em óleo, suspensões para aplicação a ultra baixo volume, pós-molháveis, grânulos dispersíveis em água, e dispersões oleosas (esporos misturados a óleos emulsionáveis).

## ***Para serem aplicadas de forma seca***

Pós para contato, grânulos e iscas.

Os resultados obtidos com produtos não-formulados tendem a ser mais variáveis do que aqueles obtidos com produtos formulados, sendo diretamente influenciados pelas condições climáticas, pela qualidade dos micoinseticidas utilizados e pelo correto manuseio e aplicação destes.

## **Orientação prática para a formulação do fungo em óleo emulsionável**

Deve-se verificar a data de produção e de vencimento dos óleos emulsionáveis vegetais ou minerais a serem empregados na formulação de micoinseticidas, procurando-se não utilizar produtos com datas de fabricação muito diferentes.

- Quando houver uma encomenda, para a formulação de produtos com  $2 \times 10^{12}$  esporos por litro, aproximadamente 20 g de esporos de *B. bassiana* ou 60 g de esporos de *M. anisopliae* devem ser misturados com cada litro de óleo emulsionável apropriado, com o auxílio de liquidificador industrial. Assim, o produto formulado será sempre novo, havendo ainda economia de espaço na biofábrica.
- A mistura homogênea dos esporos com o óleo emulsionável é passada do liquidificador retrátil para as embalagens finais com o auxílio de um funil.
- A embalagem pode ser de plástico como polietileno de alta densidade, resistente a impactos e de fácil manuseio. A tampa deve ser muito bem vedada para evitar vazamentos. A boca da embalagem pode ser vedada com filme de alumínio.
- O controle de qualidade deve ser feito periodicamente, verificando-se o número de esporos por grama e a viabilidade dos mesmos, para sempre oferecermos produto com alto padrão de qualidade aos usuários.

## ***Vantagens e desvantagens do uso de óleos emulsionáveis vegetais ou minerais***

Existem vantagens e desvantagens no uso de óleos emulsionáveis vegetais ou minerais.

### ***Vantagens do uso de óleos vegetais***

- Podem ser certificados e utilizados em cultivos orgânicos e, por isso, não sofrem críticas por não serem naturais.
- Geralmente, são mais viscosos e por isso dão maior adesividade à superfície dos insetos e plantas.
- Não são inflamáveis e, por isso, são mais seguros.
- Conferem certa proteção aos esporos contra a radiação ultravioleta.
- Evaporam menos que óleos minerais.

### ***Desvantagem do uso de óleos vegetais***

- Se os esporos tiverem teor de água acima de 10%, podem dar início ao processo de germinação depois de alguns meses em virtude da presença de nutrientes (resíduos de grãos), reduzindo a viabilidade durante o armazenamento em temperatura ambiente.

### ***Vantagem do uso de óleos minerais***

- Se os esporos tiverem uma umidade acima de 10%, dificilmente irão germinar porque os óleos minerais não possuem nutrientes como os óleos vegetais.

### ***Desvantagens do uso de óleos minerais***

- Não podem ser certificados e utilizados em cultivos orgânicos porque o produto biológico não será totalmente natural.
- Alguns podem ser inflamáveis e, por isso, são menos seguros durante o armazenamento na biofábrica, antes da formulação (quando estão puros).
- Nem todos protegem os esporos contra a radiação ultravioleta (ALVES et al., 1998b).
- Evaporam mais que os óleos vegetais.

Na Figura 14, pode-se observar toda a sequência da produção de fungos formulados em óleo emulsionável.

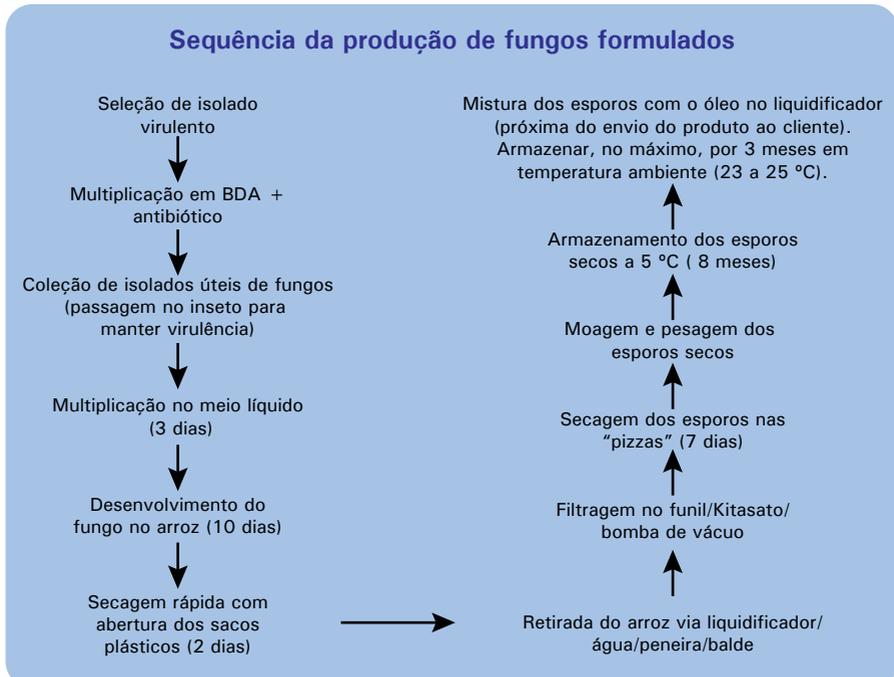


Figura 14. Sequência da produção de fungos formulados em óleo emulsionável.

## Armazenamento de Fungos Entomopatogênicos

A possibilidade de um micoinseticida ser armazenado ou colocado em uma prateleira de uma revenda agropecuária é muito dependente da formulação.

A viabilidade de esporos de *M. anisopliae* misturados com 8 óleos adjuvantes emulsionáveis (OAE), 7 espalhantes adesivos, 3 óleos vegetais e 4 óleos minerais foi avaliada 24 h e 48 h depois de espalhados sobre o meio SDA (ALVES, 1999; ALVES et al., 2002). As formulações desse experimento que não apresentaram efeitos adversos

sobre a viabilidade dos esporos foram selecionadas e utilizadas em outro experimento sobre armazenamento.

Nesse segundo experimento, avaliaram-se os efeitos do armazenamento, a 10 °C e 27 °C durante 40 semanas, de esporos de *M. anisopliae* var. *acridum* formulados em cinco OAE, em um óleo vegetal e em uma mistura de dois óleos minerais, além de conídios puros e secos.

Após a realização do experimento, chegou-se às seguintes conclusões sobre o armazenamento:

- A viabilidade dos esporos de uma mesma formulação declinou com o passar do tempo e esse efeito foi mais pronunciado entre 35 e 40 semanas de armazenamento.
- A viabilidade foi mantida acima de 90% a 10 °C em todas as preparações testadas.
- Apenas os esporos puros e os formulados em óleo vegetal mantiveram a viabilidade superior a 90% após 40 semanas nas duas temperaturas estudadas.

### Comentários sobre o armazenamento

- Geralmente, pode-se armazenar o fungo produzido no próprio arroz a -5 °C durante, no máximo, três meses.
- Normalmente, pode-se armazenar os esporos puros produzidos por, pelo menos, nove meses a 5 °C, desde que os esporos estejam com teor de água ao redor de 5%.
- Comumente, pode-se armazenar os esporos já formulados em óleo emulsionável compatível por, pelo menos, nove meses na temperatura de 5 °C.
- Geralmente, pode-se armazenar os esporos já formulados em óleo emulsionável compatível por, pelo menos, quatro meses à temperatura ambiente (ao redor de 25 °C).

## Aplicação de Fungos Entomopatogênicos

O processo de aplicação eficiente de micoinseticidas ou de um pesticida qualquer, descrito por Steinke e Giles (1995), consiste em algumas etapas como:

- **Mistura** ⇒ Essa primeira etapa pode ocorrer tanto na formulação do produto na biofábrica como no momento da diluição do produto no tanque do pulverizador em função do volume de aplicação (litros/ha). Os diluentes no tanque podem ser água, óleo, espalhantes adesivos, etc.
- **Atomização** ⇒ É a etapa de formação de gotas do produto ou do produto com o diluente. Essa etapa é realizada com o auxílio de bicos hidráulicos, atomizadores rotativos ou pneumáticos. Forças eletrodinâmicas e ultrassônicas também podem ser utilizadas para formar gotas de pulverização. Materiais secos normalmente não são quebrados ou atomizados no momento da aplicação, mas podem ser finamente separados e colocados em uma corrente de ar criado pelo equipamento e serem aplicados como uma fina poeira.
- **Transporte** ⇒ O transporte das gotas ou de pós é muitas vezes acompanhado, propositadamente, de uma corrente de ar e liberado através de pressão hidráulica ou de força gravitacional.
- **Coleta** ⇒ Essa etapa resulta na deposição do produto sobre o alvo desejado, que pode ser um inseto, planta ou animal. Os modos de coleta do produto podem incluir processos de impactação, interceptação, difusão, descida do produto por gravidade e atração eletrostática.
- **Formação de depósito e migração** ⇒ Depois da gota ou partícula ser coletada na superfície-alvo, isso pode ou não mudar o processo de formação de depósito. As gotas ou partículas podem ser transportadas pelos insetos-praga no ambiente.
- **Interação com o inseto-praga** ⇒ Depois de o produto ser depositado sobre a praga, vegetação ou alguma outra superfície, ocorre uma

interação entre o produto e o inseto-praga. Isso poderá ocorrer através de contato (como o caso de esporos na cutícula do inseto), absorção, ingestão, inalação ou por outro modo de ação.

- Ação biológica  $\Rightarrow$  Se todas as etapas mencionadas anteriormente foram executadas com sucesso e uma dose necessária do produto foi aplicada sobre o inseto-praga em uma forma apropriada e em um estado viável, o resultado desejado terá grandes chances de ser alcançado.

É importante ressaltar que, se a compra e a utilização de um equipamento de aplicação especial é um pré-requisito para adoção de um novo micoinseticida, a probabilidade desse produto ser utilizado em grande escala será muito pequena (CHAPPLE; BATEMAN, 1997). O ideal é sempre desenvolver formulações que possam ser utilizadas com os equipamentos convencionais que o produtor rural está acostumado a utilizar em sua propriedade.

As faixas para os diferentes volumes de aplicação podem ser vistas na Tabela 5.

Tabela 5. Volume de aplicação em diferentes culturas (litros/ha).

Termos	Culturas anuais	Árvores e arbustos
Alto volume	> 600	> 1000
Médio volume	200-600	500-1000
Baixo volume	50-200	200-500
Muito baixo volume	5-50	50-200
Ultra baixo volume	< 5	< 50

Fonte: Matthews, 1992.

As formulações de fungos em óleos emulsionáveis (dispersões oleosas) podem ser aplicadas desde muito baixo volumes (5 a 50 l/ha) a médios volumes (200 a 600 l/ha) com técnicas de gotas controladas, e ainda permitir o uso de água e equipamentos convencionais de pulverização.

## Aplicação de gotas controladas (CDA)

Boas formulações devem proporcionar melhorias na atomização da suspensão formulada de modo que possa ser utilizada a aplicação de gotas controladas (CDA) com equipamentos convencionais de uso cotidiano pelo produtor rural (Figura 15).



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 15. Pulverização do fungo *Metarhizium anisopliae* por trator equipado com barras pulverizadoras em canavial.

Características desejáveis para uma boa pulverização (BATEMAN, 1993):

- Tamanho de gotas entre 50 e 100 micrômetros de VMD para formulações oleosas.
- Tamanho de gotas entre 70 e 150 micrômetros de VMD para formulações aquosas.
- Uniformidade do tamanho das gotas  $\text{Span} < 1,0$ .

VMD é o diâmetro do volume mediano, que divide as gotas de um líquido pulverizado em duas partes, aquelas maiores e aquelas menores que o próprio diâmetro do volume mediano.

Span indica uma faixa de tamanhos semelhantes de gotas e é calculada através da distribuição do volume aplicado pela fórmula:

$$\text{Span} = (D_{(v,0,9)} - D_{(v,0,1)}) / D_{(v,0,5)}$$

Densidade das gotas ( $n^{\circ}$  de gotas/cm<sup>2</sup>) igual ou maior que 20 gotas/cm<sup>2</sup> para inseticidas biológicos ou químicos, para pragas de parte aérea (Figura 16).



Foto: Roberto Teixeira Alves

Figura 16. Papel sensível à água para coleta e avaliação de gotas da pulverização.

## Comentário Final

Tudo o que foi apresentado neste pequeno manual pode ser utilizado para a produção e aplicação dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Sporothrix insectorum*.

O objetivo final deste manual é ajudar os técnicos de biofábricas e de empreendimentos agropecuários envolvidos com o controle de insetos-praga através de micoinseticidas. Um melhor entendimento sobre as etapas relacionadas à coleta de fungos entomopatogênicos, identificação, técnicas de produção, formulação e aplicação no campo são essenciais para o uso adequado do controle biológico, contribuindo para um mundo mais saudável, evitando-se resíduos químicos nos alimentos, contaminação dos recursos naturais e intoxicações dos trabalhadores rurais brasileiros.

Bom trabalho e sucesso a todos!

## Referências

- ALVES, R. T. Development of mycoinsecticide formulations and application techniques appropriate for pest control. 1999. 225 f., Tese (Doutorado). Imperial College. University of London, Ascot, England.
- ALVES, R. T. Formulação e armazenamento de fungos entomopatogênicos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003. São Pedro, SP. Livro de Resumos do 8º Simpósio de Controle Biológico. Piracicaba,SP: Sociedade Entomológica do Brasil - SEB, 2003. p. 42-42.
- ALVES, R. T. Produção, formulação e aplicação de fungos para o controle de pragas. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Org.). Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. p. 239-253.
- ALVES, R. T. ; BATEMAN, R. P. ; GUNN, J. ; PRIOR, C. ; LEATHER, S. R. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. Neotropical Entomology, PR, v. 31, n. 1, p. 91-99, 2002.
- ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C. Performance of *Metarhizium anisopliae* formulations with oil adjuvants on *Tenebrio molitor* In: SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 15., 1998. Proceedings... Memphis, USA, 1998a. p. 170-175.
- ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. Crop Protection, 17, p. 675-679, 1998b.
- ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Volatility comparisons of different formulations used to apply mycoinsecticides. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ENTOMOLOGIA, 21., Foz do Iguaçu. Abstracts... Londrina, PR, 2000. v. 1. p. 512-512.
- ALVES, R. T.; OLIVEIRA, M. A. S.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Espalhamento e eficiência de uma formulação de fungo à base de óleo adjuvante emulsionável. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001 (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 6).
- ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. São Paulo,SP: Editora Manole, 1986. 407 p.
- ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba,SP: FEALQ, 1998. 1163 p.
- BATEMAN R. P. Simple, standardized methods for recording droplet measurements and estimation of deposits from controlled droplet applications. Crop Protection, v. 12, p. 201-206, 1993.v

CHAPPLE, A. C.; BATEMAN, R. P. Application systems for microbial pesticides: necessity not novelty. In: SYMPOSIUM MICROBIAL INSECTICIDES: NOVELTY OR NECESSITY. Proceedings... Farnham, Surrey: The British Crop Protection Council., 1997. p. 181-190.

MATTHEWS, G. A. Pesticide application methods. 2nd ed. New York: Longman Scientific & Technical. Harlow, Essex. 1992. 405 p.

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P.; SILVA, K. F. A. S. MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas?. Arquivos do Instituto Biológico (Online), v. 76, p. 769-779, 2009.

OLIVEIRA, D. G. P. Proposta de um protocolo para avaliação de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável. 2009. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

STEINKE, W. E.; GILES, D. K. Delivery systems for biorational agents. In: HALL, F. R.; BARRY, J. W. (Ed.). Biorational pest control agents: formulation and delivery. Washington: American Chemical Society, 1995, p. 80-94.

# The Little Manual of Entomopathogenic Fungi

---

## Abstract

*This manual was prepared in a user friendly language introducing easy methodologies to be adopted by technicians who are working with entomopathogenic fungi and mycoinsecticides. The objective is to make it easier to develop research activities and a large-scale fungal production in laboratories by governmental and private institutes. Fungi of the genus **Metarhizium**, **Beauveria** and **Sporothrix** will be emphasized, because they are the most common biocontrol agents applied in crops against different insect pests in Brazil. All steps about insect collect, fungal isolation from insects to artificial media, sterilization methods, fungal cultivation and culture maintenance, large-scale production, spore viability, spore concentration, formulation and application techniques are explained to contribute to the appropriate use of biological control, avoiding food and environmental contamination by chemical residues and rural workers intoxication.*

*Index terms: fungal formulation, mycoinsecticides, application techniques, **Metarhizium** production.*