

PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE **BIOINSUMOS** À BASE DE BACTÉRIAS E FUNGOS PARA USO NA AGRICULTURA



ROSE GOMES MONNERAT
MARCELO TAVARES DE CASTRO
SANDRO COELHO LINHARES MONTALVÃO
ANTÔNIA DÉBORA CAMILA DE LIMA FERREIRA
IZABELA NUNES DO NASCIMENTO
GABRIELA TEODORO ROCHA
FLÁVIA MELO MOREIRA
MATHEUS FELIPE CELESTINO
MAGNO RODRIGUES DE CARVALHO FILHO

Atena
Editora
Ano 2025

Solu
Science
by SoluBio®

PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE **BIOINSUMOS** À BASE DE BACTÉRIAS E FUNGOS PARA USO NA AGRICULTURA



ROSE GOMES MONNERAT
MARCELO TAVARES DE CASTRO
SANDRO COELHO LINHARES MONTALVÃO
ANTÔNIA DÉBORA CAMILA DE LIMA FERREIRA
IZABELA NUNES DO NASCIMENTO
GABRIELA TEODORO ROCHA
FLÁVIA MELO MOREIRA
MATHEUS FELIPE CELESTINO
MAGNO RODRIGUES DE CARVALHO FILHO

Atena
Editora
Ano 2025

Solu
Science
by SoluBio®

2025 by Atena Editora

Copyright © 2025 Atena Editora

Copyright do texto © 2025, o autor

Copyright da edição © 2025, Atena Editora

Os direitos desta edição foram cedidos à Atena Editora pelo autor.

Open access publication by Atena Editora

Editora chefe

Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira Scheffer

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Yago Raphael Massuqueto Rocha



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob a Licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

A Atena Editora mantém um compromisso firme com a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, assegurando que os padrões éticos e acadêmicos sejam rigorosamente cumpridos. Adota políticas para prevenir e combater práticas como plágio, manipulação ou falsificação de dados e resultados, bem como quaisquer interferências indevidas de interesses financeiros ou institucionais.

Qualquer suspeita de má conduta científica é tratada com máxima seriedade e será investigada de acordo com os mais elevados padrões de rigor acadêmico, transparência e ética.

O conteúdo da obra e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade, são de responsabilidade exclusiva do autor, não representando necessariamente a posição oficial da Atena Editora. O download, compartilhamento, adaptação e reutilização desta obra são permitidos para quaisquer fins, desde que seja atribuída a devida autoria e referência à editora, conforme os termos da Licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

Os trabalhos nacionais foram submetidos à avaliação cega por pares, realizada pelos membros do Conselho Editorial da editora, enquanto os internacionais passaram por avaliação de pareceristas externos. Todos foram aprovados para publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOINSUMOS À BASE DE BACTÉRIAS E FUNGOS PARA USO NA AGRICULTURA

| Autores:

Rose Gomes Monnerat
Marcelo Tavares de Castro
Sandro Coelho Linhares Montalvão
Antônia Débora Camila de Lima Ferreira
Izabela Nunes do Nascimento
Gabriela Teodoro Rocha
Flávia Melo Moreira
Matheus Felipe Celestino
Magno Rodrigues de Carvalho Filho

| Revisão:

Os autores

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P964 Produção e controle de qualidade de bioinsumos à base de bactérias e fungos para uso na agricultura / Rose Gomes Monnerat, Marcelo Tavares de Castro, Sandro Coelho Linhares Montalvão, et al. - Ponta Grossa - PR: Atena, 2025.

Outros autores
Antônia Débora Camila de Lima Ferreira
Izabela Nunes do Nascimento
Gabriela Teodoro Rocha
Flávia Melo Moreira
Matheus Felipe Celestino
Magno Rodrigues de Carvalho Filho

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-3534-1
DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.341251807>

1. Bioinsumos (bactérias e fungos) aplicados à agricultura e seu controle de qualidade. I. Monnerat, Rose Gomes. II. Castro, Marcelo Tavares de. III. Montalvão, Sandro Coelho Linhares. IV. Título.

CDD 631.46

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

+55 (42) 3323-5493

+55 (42) 99955-2866

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

CONSELHO EDITORIAL

CONSELHO EDITORIAL

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Ariadna Faria Vieira – Universidade Estadual do Piauí
Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Cláudio José de Souza – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Fabrício Moraes de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Glécilla Colombelli de Souza Nunes – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Humberto Costa – Universidade Federal do Paraná
Prof. Dr. Joachin de Melo Azevedo Sobrinho Neto – Universidade de Pernambuco
Prof. Dr. João Paulo Roberti Junior – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Juliana Abonizio – Universidade Federal de Mato Grosso
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Prof. Dr. Sérgio Nunes de Jesus – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF) pelo financiamento do livro (Processo 551/2024).

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

O uso de micro-organismos na agricultura está cada vez ganhando mais espaço nas fazendas de todo o Brasil. Algumas espécies de bactérias e fungos possuem inúmeros benefícios, seja controlando pragas e doenças, ou promovendo o crescimento de plantas por meio da fixação biológica de nitrogênio atmosférico e pela solubilização de nutrientes. A produção “on farm”, ou seja, produção de micro-organismos na própria fazenda, foi regulamentada em 2024 por meio da Lei de Bioinsumos (Lei nº 15.070/2024), criando um marco histórico na agricultura do país.

Diante de tantos acontecimentos, o estabelecimento de procedimentos básicos para a produção e o controle de qualidade de insumos biológicos é fundamental. Esse manual visa cobrir essa lacuna, com metodologias atuais e de fácil execução, com informações sobre a morfologia, os mecanismos de ação, a produção e o controle de qualidade das principais bactérias e fungos utilizados no controle de pragas e doenças agrícolas. Portanto, esse manual é destinado para estudantes, técnicos, pesquisadores e profissionais das Ciências Biológicas e Agrárias que possam interesse em se aprofundar no conhecimento de bioinsumos de origem microbiana.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

PARTE 1 - BACTERIAS

INTRODUÇÃO GERAL15

BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE ARTRÓPODES-PRAGA.....17

1. Introdução	17
2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
3. <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	21
4. <i>Brevibacillus laterosporus</i>	22
5. <i>Serratia entomophila</i> e <i>Serratia proteamaculans</i>	23
6. <i>Pseudomonas entomophila</i>	24
7. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	24
8. <i>Chromobacterium subtsugae</i>	25
9. <i>Saccharopolyspora spinosa</i>	26

BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS .. 27

1. Introdução	27
2. Uso de Bactérias no Controle de Doenças de Plantas	27
3. Gêneros <i>Bacillus</i> , <i>Cytobacillus</i> e <i>Priestia</i>	28
3.1. <i>Bacillus subtilis</i>	29
3.2. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	30
3.3. <i>Bacillus pumilus</i>	31
3.4. <i>Bacillus licheniformis</i>	31
3.5. <i>Bacillus velezensis</i>	32
3.6. <i>Cytobacillus firmus</i>	32
3.7. <i>Priestia megaterium</i>	33
3.8. <i>Priestia aryabhatai</i>	34

SUMÁRIO

SUMÁRIO

4. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	34
5. <i>Pasteuria penetrans</i> e <i>Pasteuria nishizawae</i>	35
PRODUÇÃO DE BACTÉRIAS EM BIOFÁBRICAS “ON FARM”	36
1. Introdução.....	36
2. Sanitização do tanque e das peças.....	36
3. Água da multiplicação.....	36
4. Meio de cultura	37
5. Qualidade do inóculo.....	37
6. Multiplicação nas biofábricas.....	37
CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO BIOINSUMOS	38
1. Critérios necessários para a realização do controle de qualidade	38
1.1. Qualidade do estoque da estirpe que será multiplicada	38
1.2. Qualidade dos inóculos produzidos com os diferentes microrganismos	40
1.3. Controle de qualidade de bioprodutos.....	41
1.3.1. Procedimento para identificação morfológica das bactérias	41
1.3.2. Procedimento para determinação de pH	41
1.3.3. Procedimento para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC)	42
1.3.4. Procedimento para determinação da presença de contaminantes.....	43
LITERATURA CITADA	45

SUMÁRIO

SUMÁRIO

PARTE 2 - FUNGOS

FUNGOS PARA O CONTROLE DE ARTRÓPODES-PRAGA 53

1. Introdução 53
2. Principais espécies de fungos entomopatogênicos e seus alvos 54
 - Beauveria bassiana* 54
 - Metarhizium anisopliae* 54
 - Cordyceps fumosorosea* 54
3. Mecanismo de ação contra insetos 54
4. Metabólitos 56

FUNGOS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS 57

1. Introdução 57
2. Conclusão 64

PRODUÇÃO DE FUNGOS EM GRANDE ESCALA 65

1. Introdução 65
2. Fermentação sólida de fungos 66

PRODUÇÃO DE FUNGOS EM BIOFÁBRICAS “ON FARM” 73

1. Introdução 73
2. Sanitização do tanque e das peças 73
3. Água da multiplicação 73
4. Meio de cultura 74
5. Qualidade do inóculo 74
6. Multiplicação nas biofábricas 74

SUMÁRIO

SUMÁRIO

CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE FUNGOS UTILIZADOS COMO BIOINSUMOS	75
1. Definição e objetivos do controle de qualidade	75
2. Qualidade da estirpe a ser multiplicada	75
2.1. Seleção da estirpe	75
2.2. Caracterização da estirpe	75
3. Qualidade do bioinsumo multiplicado	77
3.1. Análise morfológica	77
3.2. Concentração de unidades formadoras de colônias	77
3.3. Concentração de propágulos totais	79
3.4. Concentração de propágulos viáveis	80
3.5. Vigor conidial	81
3.6. Bioensaios	82
3.7. Parâmetros físico-químicos	84
3.8. Vida de prateleira	84
LITERATURA CITADA	85
SOBRE OS AUTORES	91



PARTE

1

BACTERIAS

Um dos maiores problemas da agricultura são as perdas ocasionadas pelos insetos e por fitopatógenos. No Brasil temos condições ideais para que diferentes espécies se proliferem e caso não sejam controladas, podem levar a perdas incalculáveis nas lavouras. O controle desses organismos danosos usualmente é realizado com o uso de produtos químicos, que além de perigosos ao meio ambiente e a saúde dos seres vivos, tem se tornado ineficientes por selecionarem populações de insetos e fitopatógenos resistentes.

Uma alternativa para o controle de insetos e doenças agrícolas é o uso de bactérias benéficas. As bactérias são organismos procariontes, unicelulares e que podem ser encontradas nos mais variados tipos de ambientes, inclusive em condições extremas, como temperaturas elevadas e solos extremamente ácidos. Algumas espécies podem causar doenças no homem, plantas e animais, mas a grande maioria é benéfica e essencial para a manutenção do equilíbrio de organismos e do meio ambiente.



INTRODUÇÃO GERAL

Em todo o mundo, tem-se notado uma crescente preocupação com os problemas ambientais decorrentes das diversas atividades humanas, incluindo a agricultura. Essa preocupação, que se traduz na busca por uma agricultura “limpa”, alimentos sem resíduos e conservação dos recursos naturais, demanda novas tecnologias, assentadas nos conceitos ecológicos e de sustentabilidade. O controle biológico se ajusta a esses conceitos, por isso vem ganhando mais espaço nos últimos anos.

Conceitua-se o controle biológico pela redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno pelo uso de um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista ou, ainda, pela introdução em massa de um ou mais antagonistas. Os componentes do controle biológico de plantas são os patógenos, os hospedeiros e os antagonistas, interagindo num sistema biológico, onde todos sofrem isolada ou conjuntamente influências do ambiente. O controle biológico tem sido usado no manejo de vários fitopatógenos e de pragas presentes em diferentes sistemas agrícolas, como das grandes culturas, hortaliças, fruticultura e silvicultura.

Hoje existe uma grande quantidade de bioprodutos disponibilizados para comercialização, principalmente com princípio ativo à base de fungos e bactérias. Esses produtos apresentam variabilidade em termos de formulação, concentração do ingrediente ativo e vida de prateleira. Os bioprodutos são resultados de um processo que inclui a seleção do agente de biocontrole, com extensiva avaliação da eficácia, desenvolvimento do formulado, registro, “scale up” e avaliação do mercado.

Os bioprodutos podem ser aplicados diretamente no solo, em tratamento de sementes ou, ainda, na parte aérea das plantas, tais como folhas e órgãos de propagação, a depender da parte da planta que se deseja proteger. A maior parte dos bioprodutos, além de atuar no manejo fitossanitário, também atuam como promotores de crescimento e produtividade de plantas, produzindo uma série de compostos capazes de solubilizar nutrientes do solo e/ou sintetizar hormônios vegetais capazes de incrementar o metabolismo da planta.

A demanda de bioprodutos para agricultura (bioprotetores, inoculantes, bioestimulantes e biofertilizantes) vem se tornando cada vez maior no mercado mundial. No ano de 2022 foi estimado em US\$ 12,9 bilhões de dólares, com projeção da taxa composta anual de crescimento de 13,7% até 2027, devendo chegar a US\$ 24,6 bilhões de dólares em 2027. Em relação ao mercado brasileiro de bioprodutos, observou-se que o mercado nacional em 2021 foi de R\$ 2,27 bilhões, representando um crescimento de 33% em relação ao ano de 2020. No Brasil, a área tratada com produtos biológicos em 2022 foi de 70 milhões de hectares, colocando o país como o maior produtor e utilizador de produtos biológicos no mundo.

O conceito de controle de doenças e pragas de plantas mudou nas últimas décadas. Anteriormente, o objetivo era eliminar completamente o organismo danoso com o uso contínuo dos agroquímicos, sem medir as consequências. O uso indiscriminado dos agroquímicos provocou alterações no ambiente, como a seleção de artrópodes e patógenos resistentes, ocorrência de surtos de organismos antes considerados secundários, diminuição de microrganismos benéficos, além dos efeitos nocivos ao homem, animais e na qualidade ambiental, com o crescente acúmulo de resíduos no solo, na água e nos alimentos.

Atualmente, os principais microrganismos utilizados no controle biológico de pragas e doenças são as bactérias e os fungos, com dezenas de espécies apresentando diferentes mecanismos de ação em diversos alvos. Esse manual tem como objetivo fornecer informações quanto à morfologia, mecanismos de ação, produção e controle de qualidade de bactérias e fungos utilizados no controle de pragas e doenças agrícolas.



M Ó D U L O 1

BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE ARTRÓPODES-PRAGA

1. INTRODUÇÃO

As bactérias entomopatogênicas (que controlam insetos) são divididas em dois grandes grupos: esporulantes (que produzem esporos) e não esporulantes. Dentre as esporulantes, existem as que são aeróbicas, como as pertencentes ao gênero *Bacillus* e correlatos, e as anaeróbicas, que pertencem ao gênero *Clostridium*. As bactérias do gênero *Bacillus* e correlatos são as mais utilizadas no controle biológico. Elas têm ocorrência cosmopolita, são encontradas em todas as partes do mundo, em vários substratos como solo, plantas, rizosfera, grãos armazenados, insetos mortos, dentre outros. São bactérias gram-positivas e aeróbicas, podendo facultativamente crescer em anaerobiose. As espécies de bactérias esporulantes mais utilizadas são: *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* e *Saccharopolyspora spinosa*. As bactérias não esporulantes pertencem a diversos gêneros, cujas principais espécies são: *Chromobacterium subtsugae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas chlororaphis* e *Burkholderia cepacia*.

2. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é a bactéria mais utilizada em controle biológico de insetos no mundo. Ela foi isolada pela primeira vez em 1901 no Japão onde estava causando a morte de larvas do bicho da seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Dez anos depois, em 1911, Berliner, na cidade alemã de Thuringe, isolou a mesma bactéria que causava mortes de larvas da traça da farinha *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), e a chamou *B. thuringiensis*.

Esta bactéria produz, no momento da fase de esporulação, inclusões proteicas cristalinas denominadas cristais proteicos (Figura 1), delta endotoxinas ou proteínas Cry e Cyt. As primeiras estirpes conhecidas eram tóxicas apenas a larvas de insetos da ordem Lepidoptera e, devido ao grande potencial de controle, foi lançado em 1938 na França o produto Sporeina. Nos anos 1960, o pesquisador Howard

Dulmage isolou uma estirpe chamada HD-1 pertencente à subespécie *kurstaki* que apresentou toxicidade de até 200 vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. Essa estirpe é utilizada até hoje como base da maioria dos produtos biológicos à base de *B. thuringiensis*. Em 1977, Goldberg e Margalit isolaram uma estirpe eficaz contra os mosquitos (Diptera). Alguns anos mais tarde, em 1983, outra estirpe foi identificada como patogênica contra larvas de besouros (Coleoptera).

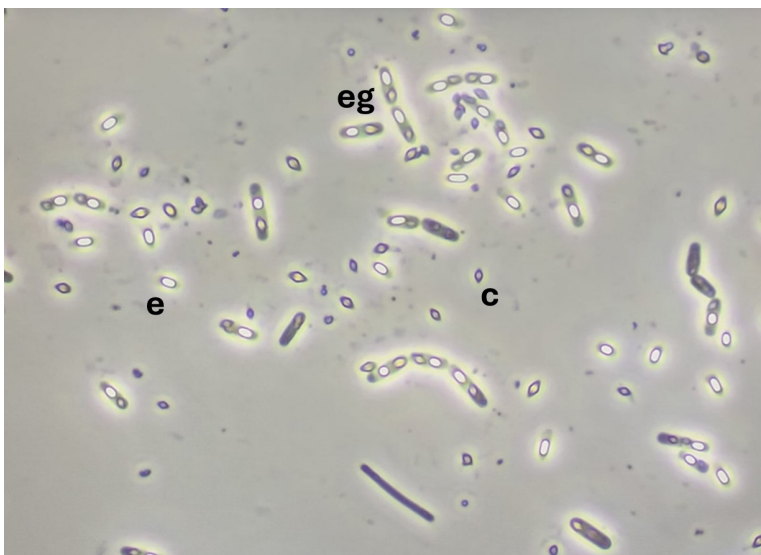


Figura 1: Microscopia de contraste de fases de *Bacillus thuringiensis* mostrando esporângios (eg), esporos (e) e cristais (c).

Existe uma grande diversidade de genes presentes em *B. thuringiensis* que expressam proteínas tóxicas a diversas pragas, que combinados deram origem a uma enorme variabilidade de estirpes. Este fato estimulou a busca de novos isolados e até os dias de hoje essa busca ainda acontece. Amostras de *B. thuringiensis* foram encontradas em todas as partes do mundo, provenientes de vários substratos como solo, água, plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados. Existem várias coleções espalhadas pelo mundo e estima-se que existam em torno de 50.000 estirpes conhecidas até o momento. Entre estas, algumas são tóxicas a lagartas, larvas de mosquito e besouro, nematoides, protozoários, percevejos, psílídeos, gafanhotos, ácaros e inclusive a células cancerígenas. Estas toxinas são altamente específicas aos seus alvos, são inócuas ao ser humano, vertebrados e plantas e tem efeito não poluente ao meio ambiente, por serem completamente biodegradáveis.

Bacillus thuringiensis produz diferentes fatores de virulência, como as δ -endotoxinas, α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases. Algumas estirpes produzem toxinas na fase de crescimento vegetativo, denominadas VIP (vegetative insecticidal proteins) e SIP (secreted insecticidal proteins), moléculas bioestimuladoras e biofertilizadoras, como fitohormônios, proteínas solubilizadoras de fosfato e sideróforos, além de proteínas Parasporinas, as quais exibem atividade citotóxica específica contra células humanas de câncer.

A taxonomia de *B. thuringiensis* tem sido alvo de muitos estudos. Uma das formas mais simples de identificá-lo é através da morfologia em microscópio de contraste de fases, pois os cristais produzidos podem ser observados juntamente com os esporos. No entanto, para uma identificação mais precisa, o ideal é que o genoma dos isolados seja sequenciado. Através desta técnica, pode-se saber, além da espécie, quais os genes de toxinas estão presentes.

A nomenclatura das toxinas produzidas pelo *B. thuringiensis* é baseada na identidade dos aminoácidos. Essa base e trabalho é realizado pelo Comitê de Nomenclatura de toxinas de *B. thuringiensis*, que desde 2021 mantém um site (<https://www.bpprc-db.org/home/>) que está sendo permanentemente atualizado. Foram identificados mais de 810 genes *cry*, e as proteínas por eles codificadas estão agrupadas em 78 proteínas Cry, 39 genes *cyt* que codificam 3 grupos de proteínas Cyt e aproximadamente 150 genes *vip* que codificam 4 grupos de proteínas VIP. Nos grupos de proteínas existem quatro subcategorias: proteínas que compartilham identidade inferior a 45% (atribuído um número arábico), proteínas compartilhando identidade inferior a 78% (atribuído uma letra maiúscula), proteínas que compartilham identidade inferior a 95% (atribuído uma letra minúscula) e proteínas que compartilham mais de 95% de identidade (número arábico), formando assim o nome da proteína. A Figura 2 ilustra a nomenclatura das proteínas Cry.

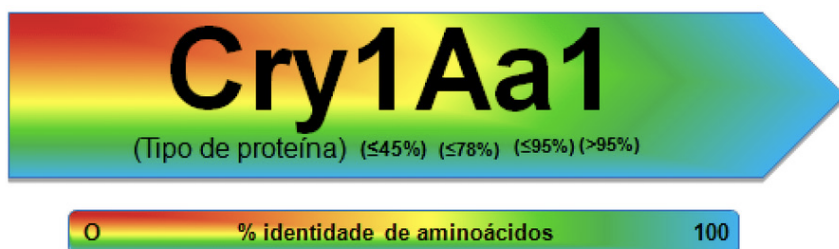


Figura 2: Diagrama da nomenclatura para proteínas Cry: proteínas que compartilham identidade inferior a 45% (atribuído um número arábico), proteínas compartilhando identidade inferior a 78% (atribuído uma letra maiúscula), proteínas que compartilham identidade inferior a 95% (atribuído uma letra minúscula) e proteínas que compartilham mais de 95% de identidade (número arábico), formando assim o nome da proteína.

O modo de ação das toxinas Cry tem sido bastante estudado em insetos da ordem Lepidoptera e pode ser dividido nas seguintes etapas: inicialmente as larvas dos insetos sensíveis ingerem a protoxina. Em seguida elas são solubilizadas pelo pH alcalino do intestino dos insetos e ativadas por proteases, transformando-se em toxinas ativadas. O próximo passo é o reconhecimento, união e inserção da toxina à membrana do epitélio intestinal dos insetos-alvo, formação dos oligômeros e dos poros e citólise. O reconhecimento e união do receptor às toxinas Cry tem sido considerado um passo chave para toxicidade das proteínas Cry, sendo fundamental para a especificidade ao inseto. Em 2014, Gómez e colaboradores, demonstraram que a toxina Cry1Ab tanto em sua forma de protoxina quanto na de toxina ativada são capazes de se ligar a receptores tipo caderina com afinidades semelhantes e que dois diferentes poros foram observados. Esses dados deram início a novos estudos sobre a ação das protoxinas e toxinas permitindo a constatação da existência de um mecanismo que foi denominado pela equipe do Dr. Tabashnik de “modelo dual”. Esses pesquisadores demonstraram que a atividade de protoxinas, inicialmente proposta por Gómez e colaboradores, foi muito importante para o controle de insetos resistentes a toxinas Cry presentes em plantas transgênicas. Desta forma, uma mesma toxina na verdade apresenta dois princípios ativos, como protoxina e como toxina. Testes realizados tanto com a toxina quanto com a protoxina de Cry1A para *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* e *Diatraea saccharalis* mostraram inclusive que as protoxinas foram mais potentes que as toxinas ativas. Esses estudos explicam a razão de populações de *Spodoptera frugiperda* resistentes a plantas Bt continuam susceptíveis a bioinseticidas Bt. Como consequência, bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* podem ser utilizados no controle de insetos resistentes às toxinas presentes nos eventos transgênicos à base de toxinas dessa bactéria.

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – Agrofit, existem no mercado mais de 65 produtos à base de *B. thuringiensis*. A maioria deles utiliza como base a estirpe S1450 pertencente a Coleção de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estes produtos comerciais têm como princípios ativos as estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, que são utilizados no controle de lagartas, como *Helicoverpa armigera* (lagarta-do-algodão), *Anticarsia gemmatilis* (lagarta da soja) *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho), *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro) e *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas).

Existem duas cepas de *Bacillus thuringiensis* descritas na Especificação de Referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), (Especificação de referência de números 28 e 35).

3. *Lysinibacillus sphaericus*

Lysinibacillus sphaericus, anteriormente denominada *Bacillus sphaericus*, é uma bactéria Gram positiva e aeróbica estrita. Ela apresenta esporos esféricos localizados na região sub-terminal, que deformam o esporângio dando ao mesmo forma semelhante a uma raquete (Neide, 1904). É normalmente encontrada em ambientes aquáticos e no solo (Figura 3).

Quase todas as espécies de mosquitos do gênero *Culex* (Diptera: Culicidae), transmissores de filariose, são altamente sensíveis ao *L. sphaericus*. Entretanto, esta bactéria não apresenta ou apresenta pouca eficácia sobre larvas de mosquitos do gênero *Aedes* (Diptera: Culicidae), principalmente o *Aedes aegypti*, transmissor da dengue, febre amarela e outras doenças. Os mosquitos dos gêneros *Anopheles* (Diptera: Culicidae), transmissores da malária, *Psorophora* e *Mansonia*, transmissores de arboviroses também são sensíveis.

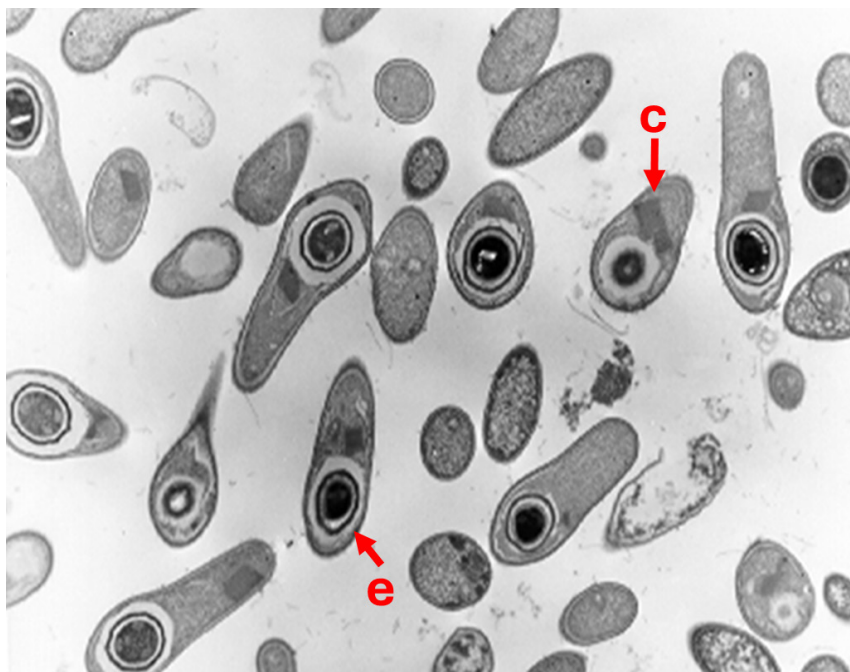


Figura 3: Microscopia de contraste de fases de *Lysinibacillus sphaericus* mostrando esporos (e) e cristais (c).

As primeiras estirpes entomopatogênicas de *L. sphaericus* foram isoladas na Califórnia a partir de larvas de *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae) e foram chamadas de estirpes K e Q. Atualmente muitas estirpes tóxicas são conhecidas e muitos trabalhos estão concentrados nas estirpes 1593 e 2362 isoladas respectivamente na Indonésia e na Nigéria. É importante salientar que esta última serve como base para todos os produtos comerciais à base de *L. sphaericus* que são usados para o controle de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles*. Por ser inócua ao homem, animais e meio ambiente, o uso desta bactéria é recomendada pela Organização Mundial de Saúde em programas de saúde pública.

Lysinibacillus sphaericus é muito persistente e eficaz em águas poluídas, sendo assim, uma boa opção para o combate ao mosquito urbano *Culex quinquefasciatus*, que vive em águas poluídas nas cidades das zonas tropicais e subtropicais e que é um importante vetor da filariose de Bancroft.

A toxicidade do *L. sphaericus* deve-se à presença de cristais proteicos produzidos durante o processo de esporulação. Esses cristais são compostos por uma toxina binária formada por duas proteínas de pesos moleculares de 51 e 42 kDa. Foi descrita ainda, uma terceira toxina de 100 kDa, chamada MTX, cuja atividade mosquitocida não é muito significativa.

Os cristais proteicos, uma vez ingeridos pelas larvas dos mosquitos sensíveis, são solubilizados pelo pH alcalino do intestino e em seguida ativados pelas proteinases intestinais. Este processo ativa a toxina que é reconhecida por receptores presentes nas microvilosidades do epitélio intestinal, causando autólise das células e morte da larva.

Por ser uma bactéria promissora, diversos laboratórios espalhados pelo mundo buscam novas estirpes desta bactéria que produzam diferentes toxinas ou que estejam já adaptadas às condições regionais, para que tenham melhor eficácia em campo e possam ser usadas no manejo da resistência.

4. *Brevibacillus laterosporus*

Brevibacillus laterosporus é uma bactéria formadora de esporos pertencente ao grupo filogenético de *Brevibacillus brevis* da família Paenibacillaceae. Além dos esporos, esta bactéria produz inclusões parasporais típicas em forma de canoa que se encontra presa a um lado do esporo, facilmente visível em microscópio de contraste de fases. Possui ampla distribuição, sendo encontrada em água, solo e insetos.

Brevibacillus laterosporus é uma espécie patogênica a insetos de diferentes ordens, incluindo Coleoptera (*Diabrotica* spp. e *Anthonomus grandis*), Diptera (*Simulium vittatum*, *C. quinquefasciatus*, *A. aegypti*, *An. stephensi* e *Musca domestica*) e Lepidoptera (*Anticarsia gemmatilis* e *Plutella xylostella*), como também a nematóides e moluscos.

A ação inseticida de diferentes linhagens de *B. laterosporus* parece envolver mecanismos semelhantes ao de *B. thuringiensis* como, por exemplo, a interação entre as toxinas e os receptores que estão localizados no epitélio intestinal do organismo-alvo. Posteriormente à ingestão da toxina, ocorre o desequilíbrio osmótico e a paralisia intestinal, resultando em inanição, septicemia e morte. As toxinas produzidas por *B. laterosporus* são capazes de provocar a deterioração do epitélio do intestino dos imaturos, desorganização do citoplasma e organelas, e lesões na membrana celular e nas microvilosidades. Esses eventos combinados levam à extrusão do conteúdo citoplasmático das células do intestino do inseto hospedeiro.

Diversos genes potenciais codificadores de toxina de invertebrados foram identificados no genoma de *B. laterosporus* por sequenciamento de nova geração (NGS), incluindo genes *cry*. Entretanto, o papel destes genes na toxicidade a insetos ainda não é conhecido.

Atualmente, não existem produtos registrados à base desta bactéria no Brasil.

5. *Serratia entomophila* E *Serratia proteamaculans*

O gênero *Serratia* (Enterobacteriaceae) contém estirpes patogênicas a coleópteros. Essas bactérias são letais aos insetos-alvo quanto colonizam a hemocle do inseto após algum processo de lesão ou estresse. *Serratia entomophila* e *S. proteamaculans* são os agentes causadores da doença âmbar em *Costelytra zealandica*, *C. giveni* e *Pyronota* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae). Essa doença tem uma patologia única, ou seja, após a ingestão de *S. entomophila*, as larvas de *C. zealandica* deixam de se alimentar em poucos dias; em seguida, ocorre a dissolução do intestino médio, resultando na característica coloração âmbar das larvas.

Três genes denominados *sep* estão associados à doença âmbar causada por *S. entomophila*. As proteínas Sep apresentam similaridade significativa aos complexos de toxina que são produzidos pelos entomopatógenos bacterianos *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila*. Estas proteínas estão associadas aos efeitos celômicos e não há muito conhecimento sobre sua atividade.

Atualmente, não existem produtos comerciais registrados à base desses microrganismos no Brasil.

6. *Pseudomonas entomophila*

O gênero *Pseudomonas* compreende várias espécies de bactérias gram-negativas, caracterizadas pela produção de numerosos metabólitos secundários de importância farmacêutica, agrícola e veterinária. *Pseudomonas entomophila* é uma bactéria estritamente aeróbica, com células do tipo bastonete móveis por meio de um flagelo polar, catalase e oxidase positiva, e produz um pigmento fluorescente, que não está relacionado com a pioverdina. As colônias exibem uma forte atividade hemolítica em placas de ágar-sangue, uma atividade significativa de protease em placas contendo caseína e teste positivo de gelatinase. Ela produz diversos metabólitos, sendo um deles a diptericina, que é altamente tóxico para larvas e adultos de *Drosophila* por ingestão oral.

Pseudomonas entomophila demonstrou ser patogênica para três ordens de insetos: Diptera (*Anopheles gambiae* e *D. melanogaster*), Lepidoptera (*Bombyx mori* e *Galleria mellonella*) e Coleoptera (*Sitophilus oryzae*). A capacidade de *P. entomophila* de infectar oralmente e matar larvas de espécies de insetos pertencentes a diferentes ordens faz dela um modelo promissor para o estudo de interações patógeno-hospedeiro e para o desenvolvimento de agentes de biocontrole contra insetos-praga. Porém, até o momento não existem produtos registrados à base desta bactéria.

7. *Pseudomonas chlororaphis* E *Pseudomonas fluorescens*

A combinação de *Pseudomonas chlororaphis* e de *Pseudomonas fluorescens* tem sido uma novidade no mercado de produtos biológicos pois combate diversas pragas de importância agrícola como a mosca branca (*Bemisia tabaci*), a cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*), percevejo marrom (*Euschistus heros*), psilideo (*Diaphorina citri*), tripses (*Caliothrips brasiliensis*). Esses microrganismos produzem uma variedade de metabólitos que interagem e matam os insetos. Além disso, controlam doenças causadas por fungos. O mecanismo de ação ainda não é muito bem conhecido, porém a produção de fenazinas, pirrolinrina e cianeto de hidrogênio (HCN) estão diretamente relacionadas à mortalidade dos insetos, prejudicando a digestão e o sistema nervoso. Além disso, a produção de enzimas hidrolíticas como quitinases, proteases e lipases participam ativamente na mortalidade dos insetos. A indução de resistência sistêmica em plantas também é um mecanismo que parece estar envolvido no sucesso de controle.

Atualmente, existem dois produtos à base dessas bactérias registrados no MAPA.

8. *Chromobacterium subtsugae*

Chromobacterium subtsugae é uma bactéria gram-negativa que tem como características a pigmentação violeta e a mobilidade flagelar. Esse microrganismo foi isolado a partir de amostras de solo de uma floresta em Maryland, nos Estados Unidos. A pigmentação violeta (Figura 4), denominada violaceína, apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essa bactéria apresenta atividade tóxica a larvas de coleópteros como *Leptinotarsa decemlineata*, *Aethina tumida* e *Diabrotica* spp., de lepidópteros como *P. xylostella* quando ingerida e de hemípteros como *Bemisia tabaci* e *Nezara viridula*. Além disso, possui um gene que codifica uma proteína inseticida semelhante ao encontrado em *Pseudomonas luminescens* e *Xenorhabdus nematophila*. A maior mortalidade de insetos tratados com *C. subtsugae* ocorre devido a uma combinação de células vivas e compostos (toxinas inseticidas) presentes no meio líquido que são produzidos na fase estacionária de crescimento da bactéria.

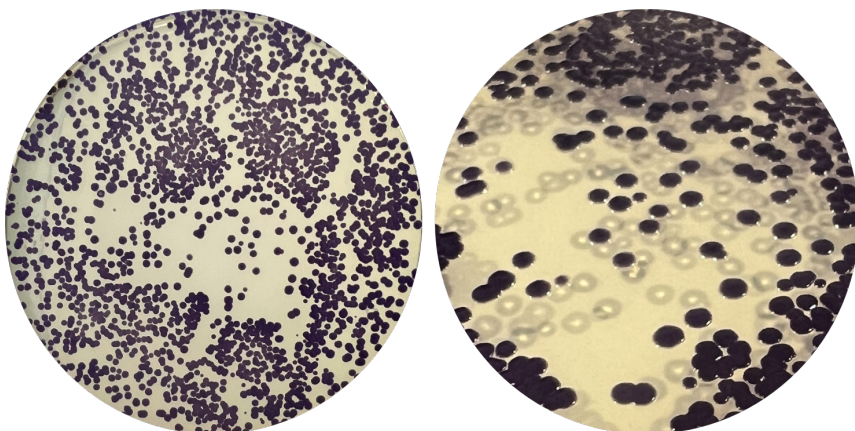


Figura 4: Colônias de *Chromobacterium subtsugae* em meio de cultivo TSA onde é possível evidenciar a cor violeta indicando a produção de violaceína.

O mecanismo de infecção de *C. subtsugae* não é totalmente esclarecido, podendo apresentar vários efeitos em insetos-praga como toxicidade oral, repelência, redução da oviposição e da fecundidade em fêmeas, além da inibição da alimentação em indivíduos das ordens Hemiptera, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Acari (ácaros fitófagos) (MARTIN et al., 2007a; GOLEC et al., 2020). Sua atividade inseticida é considerada de amplo espectro, devido aos múltiplos modos de ação e dos diversos metabólitos sintetizados por essa bactéria (RUIU, 2015).

Existe um único produto comercial chamado Grandevo® registrado nos Estados Unidos à base dos metabólitos de *C. subtsugae*, sendo recomendado para o controle de insetos e ácaros em cultivos convencionais e orgânicos. No Brasil ainda não existem produtos registrados à base desse microrganismo nem de seus metabólitos.

9. *Saccharopolyspora spinosa*

Saccharopolyspora spinosa é uma actinobactéria isolada nos anos 80 a partir de amostras coletadas nas ilhas Virgens (Figura 5). A atividade inseticida desta bactéria se deve a produção de substâncias chamadas espinosinas durante o processo de fermentação aeróbica deste microrganismo. Existem nove tipos de espinosinas, entretanto as que apresentam maior atividade inseticida são as espinosinas A e D.

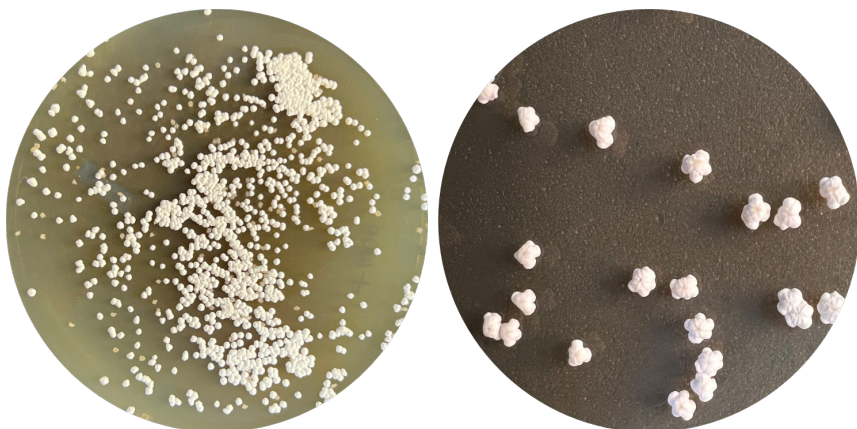


Figura 5. Colônias de *Saccharopolyspora spinosa* em meio de cultura TSA após 7 dias de incubação.

As espinosinas têm sido utilizadas na agricultura contra insetos das ordens Diptera, Lepidoptera e Coleoptera. Após a ingestão essas substâncias atuam nos receptores nicotínicos de acetilcolina e nos receptores do ácido gama aminobutírico (GABA) no sistema nervoso, causando hiperexcitabilidade, levando os insetos à morte. Os produtos registrados hoje são à base de seus metabólitos e não há nenhum produto contendo as bactérias vivas.



M Ó D U L O 2

BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças de plantas causadas por fitopatógenos consiste em um dos principais problemas fitossanitários na produção vegetal. Dentre eles, os fungos, bactérias, vírus e nematoides são os principais agentes patogênicos e são responsáveis por mais de 99% das doenças de plantas. Caso medidas de controle não sejam adotadas, as perdas na produção causadas por esses patógenos podem chegar a 100%.

Atualmente, o principal método de controle de doenças de plantas consiste no uso de defensivos químicos, o que acarreta problemas relacionados à contaminação do meio ambiente e de animais, seleção de populações resistentes e a permanência de resíduos tóxicos nos alimentos produzidos. Uma das soluções para diminuir a aplicação dessas substâncias consiste no uso de microrganismos benéficos, dentre eles fungos e bactérias, que são encontradas e isoladas do ambiente.

2. USO DE BACTÉRIAS NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

Diversos gêneros bacterianos apresentam grande potencial para serem utilizados como antagonistas de fitopatógenos, através de três principais mecanismos de ação: antagonismo por antibiose, indução de resistência sistêmica e pela competição por nutrientes e nichos com outros microrganismos (Figura 6).

O antagonismo consiste na ação direta de compostos produzidos pela bactéria sobre o patógeno. Dentre os compostos produzidos estão os lipopeptídeos, que incluem as surfactinas, iturinas e fengicinas, além de proteínas e produtos não-peptídicos, que atuam diretamente nas estruturas dos patógenos. Já a indução de resistência sistêmica ativa a defesa da planta por meio da produção de ácido jasmônico e ácido salicílico, atuando contra o estabelecimento de fitopatógenos na planta. Por fim, na competição por espaço e nutrientes, a bactéria utiliza exsudatos radiculares para se multiplicar e consequentemente colonizar a rizosfera, não permitindo que outros organismos se desenvolvam facilmente.

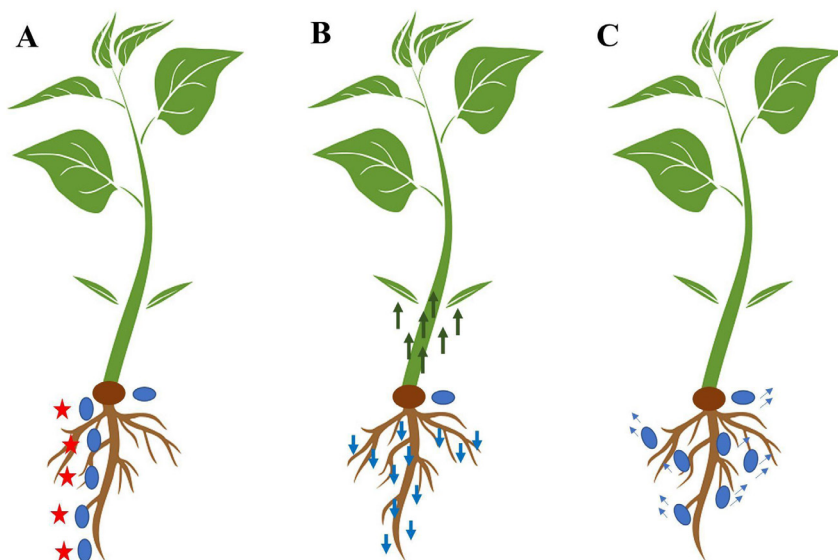


Figura 6. Mecanismos de controle biológico de doenças de plantas induzidos por bactérias [baseado em Lugtenberg e Kamilova (2009), com modificações]. A) Antibiose: colonização da bactéria durante o crescimento radicular e fornecimento de compostos antibióticos ao redor das raízes, conferindo proteção direta contra fitopatógenos. B) Indução de Resistência Sistêmica: fortalecimento da planta através da produção de sideróforos e fitohormônios. C) Competição por nutrientes e nichos com outros organismos.

Dentre as principais bactérias que são utilizadas como antagonistas de patógenos, estão as do gênero *Bacillus*, *Priestia*, *Pseudomonas* e *Pasteuria*. Uma só espécie bacteriana pode ter vários mecanismos de ação e produzir diferentes metabólitos, o que potencializa a recomendação do uso desses microrganismos no campo, além de serem inofensivas para o meio ambiente e para o homem.

3. GÊNEROS *Bacillus*, *Cytobacillus* E *Priestia*

Os gêneros *Bacillus*, *Cytobacillus* e *Priestia* são compostos por espécies Gram positivas, com células vegetativas do tipo bastonetes e são capazes de formar endósporos, que são células que conferem resistência às condições adversas do ambiente. Os esporos, quando em situações favoráveis, germinam e resultam na multiplicação do microrganismo. A capacidade de formar esporos confere aos dois gêneros uma vantagem no uso como bioinsumos, sobretudo devido ao aumento do tempo de prateleira.

Tanto *Bacillus* spp. quanto *Priestia* spp. e *Cytobacillus* spp. possuem representantes que são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos que inibem ou danificam as estruturas dos patógenos, podendo ser utilizadas para controlar sobretudo fungos, bactérias e nematoides fitopatogênicos. As principais espécies de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. velezensis* e *B. licheniformis*), *Cytobacillus* (*C. firmus*) e *Priestia* (*P. megaterium* e *P. aryabhatai*) utilizadas na agricultura podem ser melhor entendidas nos tópicos a seguir.

3.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma das espécies bacterianas mais estudadas e mais utilizadas no controle biológico de doenças de plantas. É uma bactéria facilmente encontrada na natureza e que pode se adaptar a diversas mudanças ambientais. Por ser uma espécie comumente associada à rizosfera de plantas, ela é conhecida como Rizobactéria Promotora de Crescimento de Plantas (RPCP), podendo, então, ser utilizada como um biofertilizante natural para mitigar estresses bióticos e abióticos.

A colonização realizada pela bactéria com a raiz da planta resulta em um benefício mútuo, na qual as plantas oferecem carbono e nutrientes para as bactérias e, em contrapartida, as bactérias excretam metabólitos que estimulam o crescimento e desenvolvimento das plantas, protegendo-as de condições adversas (como altas temperaturas, salinidade, secas prolongadas, acidez do solo, entre outros) e de fitopatógenos.

Diversos estudos demonstraram a eficiência de estirpes de *B. subtilis* em controlar patógenos de solo (como fungos, bactérias e nematoides) e de parte aérea (sobretudo fungos) em diversas culturas. Para que ocorra doença em plantas, três fatores devem acontecer e estarem alinhados: o patógeno deve ser virulento; o ambiente deve ser favorável para que ocorra a doença; e a hospedeira deve ser suscetível. Todos esses fatores juntos são conhecidos como “triângulo da doença”. *B. subtilis* pode afetar esses três fatores direta ou indiretamente, diminuindo a incidência e a severidade de doenças.

Seus metabólitos possuem propriedades antimicrobianas bem conhecidas, como lipopeptídeos biossurfactantes, bacteriocinas e quitinases, além de produzir fitorhormônios que estimulam o crescimento e o desenvolvimento vegetal, como auxinas e citocininas.

Diversos fungos fitopatogênicos, incluindo de solo e de parte aérea, foram controlados em condições de laboratório, casa de vegetação e de campo com o uso de *B. subtilis*. Dentre os fungos de solo mais notáveis, têm-se as espécies *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, todos patógenos importantes em diversos cultivos vegetais, capazes de causar grandes

danos e perdas. Patógenos importantes de parte aérea como os fungos *Alternaria solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Septoria glycines* e *Hemileia vastatrix* também foram controlados com o uso da bactéria.

3.2. *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens é uma bactéria encontrada em diferentes tipos de ambientes, incluindo alimentos (produtos frescos e alimentos secos), plantas, fezes de animais, água e principalmente de forma livre no solo. Assim como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* também é considerada um RPCP.

Diversos metabólitos secundários produzidos por *B. amyloliquefaciens* já foram descritos, como lipopeptídeos biossurfactantes do tipo surfactina, iturina e fengicina, fitohormônios, como o ácido indolacético, que são responsáveis pelo crescimento de plantas, antibióticos e hidrolases, sideróforos que solubilizam ferro e potássio, e também ajudam na fixação de nitrogênio atmosférico. Além disso, essa espécie bacteriana também é capaz de produzir compostos orgânicos voláteis, responsáveis pela supressão de patógenos de solo e pelo incremento indireto de nutrientes (Figura 7).

Pesquisas com o uso de estirpes de *B. amyloliquefaciens* contra fitopatógenos foliares e de solo estão em expansão e cada vez mais frequentes, apresentando em sua maioria resultados positivos. Já foi comprovada ação tóxica de *B. amyloliquefaciens* contra oomicetos (*Pythium*), bactérias (*Streptomyces* e *Xanthomonas*), fungos (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, entre outros) e nematoides (*Heterodera*, *Meloidogyne* e *Pratylenchus*).

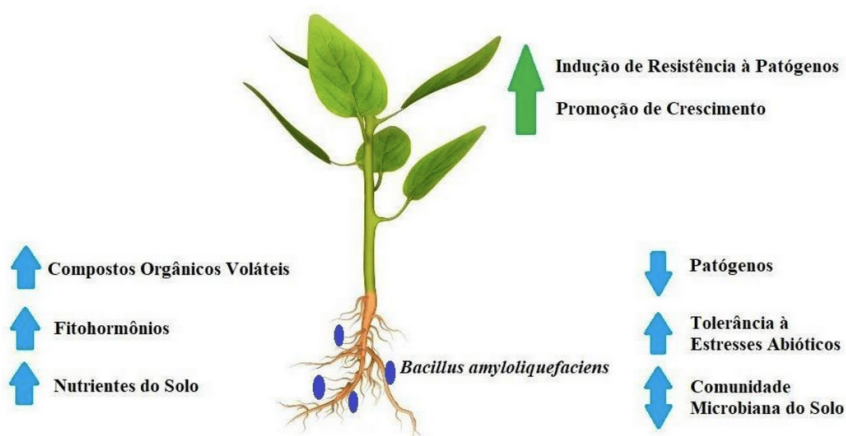


Figura 7. Benefícios promovidos pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* para as plantas e para o solo (baseado em Lin et al., 2022).

3.3. *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus é uma bactéria gram-positiva móvel do tipo bastonete, aeróbia e formadora de endósporos subterminais. Os esporos de *B. pumilus* são altamente resistentes, inclusive em condições extremas como a de altas concentrações de H_2O_2 (5% por 60 minutos) e de irradiação UV simulada em condições análogas à de Marte.

Bacillus pumilus é encontrada em principalmente no solo e também é considerada uma RPCP. Já foi comprovado que *B. pumilus* é capaz de formar biofilmes ao redor das raízes de plantas de trigo e arroz, reduzindo condições de estresse provocados por excesso de sais no solo. Além de ser encontrada na rizosfera das plantas, *B. pumilus* também já foi relatado como endofítico em flores e árvores e também como epifítico em plantas de arroz, apresentando, em ambos os casos, efeitos benéficos para as plantas.

Pesquisadores identificaram e classificaram trinta e dois compostos orgânicos voláteis produzidos por uma estirpe de *B. pumilus* com grande atividade antifúngica, incluindo etanóis e cetonas. Fitohormônios também são produzidos por *B. pumilus*, como giberelinas e auxinas, hormônios esses importantes no crescimento e desenvolvimento vegetal. Além disso, essa RPCP é capaz de induzir a fixação de nitrogênio atmosférico, produzir amônia e sideróforos e solubilizar fósforo.

Bacillus pumilus age principalmente por antibiose, competição e indução de resistência. Os compostos produzidos pela bactéria afetam diretamente ou indiretamente os microrganismos patogênicos, causando efeitos deletérios na morfologia ou interferindo no seu metabolismo. Diversas doenças fúngicas foram controladas com o uso de *B. pumilus*, incluindo patógenos foliares e de solo, como a ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), o mofo-branco em couve-flor (*Sclerotinia sclerotiorum*), mal-do-pé do trigo (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*). Em condições de casa de vegetação, um isolado de *B. pumilus* foi eficaz na supressão da bactéria *Xanthomonas vesicatoria*, agente causal da mancha-bacteriana, e de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causal da murcha-de-*Fusarium*, ambos em tomateiro.

3.4. *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis é encontrada principalmente na rizosfera de plantas formando associações benéficas. Por ser uma RPCP, *B. licheniformis* atua como um biofertilizante natural, produzindo e metabolizando diversos compostos que auxiliam no desenvolvimento das plantas. Biofilmes também são formados por *B. licheniformis* ao redor das raízes de plantas em conjunto com outras bactérias, formando uma comunidade que inibe o ataque de organismos danosos, além de protegê-las de condições de estresse abiótico.

Além de promoverem o crescimento de diversos vegetais, estirpes de *B. licheniformis* são comprovadamente tóxicas a oomicetos, fungos e nematoides, reduzindo a severidade e a incidência de doenças provocadas por esses patógenos em plantas. Além de compostos antimicrobianos, *Bacillus licheniformis* também é capaz de solubilizar fosfato, sintetizar fitohormônios como o ácido indolacético (relacionado ao crescimento de plantas), sideróforos e também produzir a enzima aminociclopropano deaminase, reduzindo a síntese de etileno e promovendo o crescimento de plantas. Atualmente os produtos registrados à base de *B. licheniformis* são para uso como bionematicidas.

3.5. *Bacillus velezensis*

Bacillus velezensis é uma espécie que tem ganhado destaque no uso de controle de patógenos, especialmente de fungos fitopatogênicos. Além disso, a sua habilidade de controle está sendo expandida também para os insetos, apresentando taxas de controle superiores à 80% contra algumas lagartas, como *Diatraea saccharalis*. Assim como as outras espécies de *Bacillus*, isolados de *B. velezensis* são capazes de produzir diversos metabólitos, incluindo enzimas hidrolíticas (como proteases, catalases, amilases, quitinases e outros), exopolissacarídeos, e lipopeptídeos como iturinas, fengicinas, surfactinas e outros. *Bacillus velezensis* uma espécie que tem ganhado destaque pela sua ampla habilidade de inibir fitopatógenos, como pode ser visualizado na figura 8.

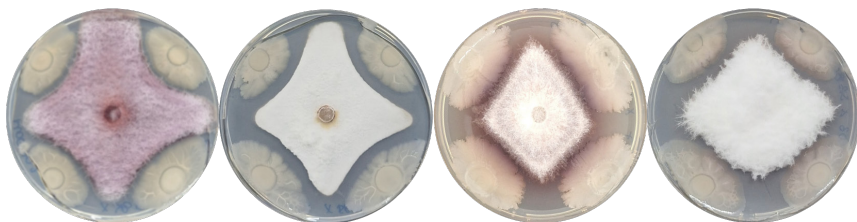


Figura 8. Inibição do crescimento de *Fusarium* spp por *Bacillus velezensis* em placa (fungo ao centro e a bactéria nas quatro extremidades).

3.6. *Cytobacillus firmus*

Cytobacillus firmus é uma bactéria esporulante encontrada no solo que anteriormente era alocada no gênero *Bacillus* e que, após análises moleculares, foi proposto um novo gênero para alocar algumas espécies. *Cytobacillus firmus* apresenta células vegetativas, esporângios e esporos menores quando comparadas com as espécies de *Bacillus* (figura 9). É uma espécie que apresenta efeito supressor em populações de nematoides fitopatogênicos, com grande eficiência de controle.

Seu principal mecanismo de ação envolve a produção de metabólitos secundários que interferem na eclosão de juvenis e na orientação da migração dos mesmos no sentido das raízes, impedindo o processo de infecção e ocorrência de doenças. Além disso, cepas de *C. firmus* são capazes de parasitar agentes patogênicos, competir com outros microrganismos por espaço e nutrientes, induzir resistência sistêmica em plantas e promover o crescimento de plantas através da produção de fitohormônios e compostos orgânicos voláteis.

Atualmente há dois produtos à base de *C. firmus* registrados no Brasil para controle de nematoides (*Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita*).

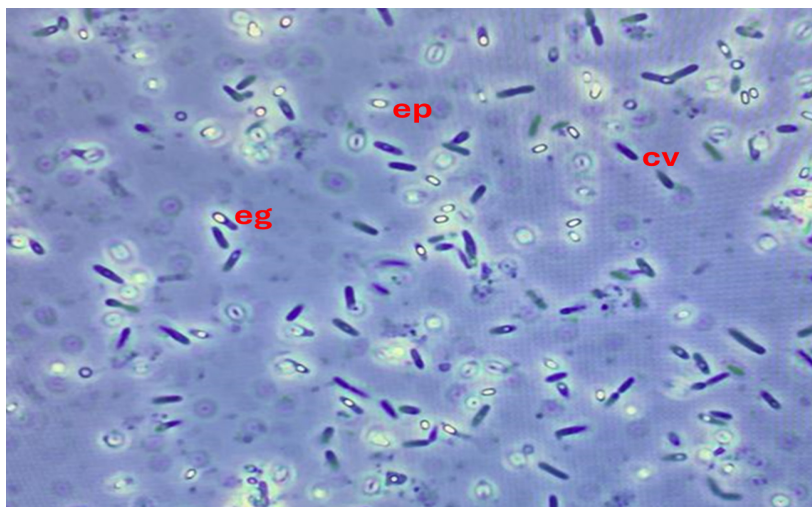


Figura 9. Microscopia de *Cytobacillus firmus* em microscópio de contraste de fase mostrando células vegetativas (cv), esporângios (eg) e esporos (ep).

3.7. *Priestia megaterium*

Anteriormente pertencente ao gênero *Bacillus*, a espécie foi reclassificada para o gênero *Priestia* juntamente com outras sete espécies por meio de análises filogenéticas e comparação dos genomas. *Priestia megaterium* é encontrada em principalmente no solo, mas também em água doce, água salgada, mel, vinho, peixes, como endófitos e endofíticos de plantas e em insetos vivos e mortos.

Assim como outras espécies da família Bacillaceae, *P. megaterium* possui uma grande habilidade fisiológica e metabólica. Os principais metabólitos antimicrobianos produzidos pela bactéria consistem nos lipopeptídeos, como as surfactinas, iturinas e fengincinas, que possuem grande atividade antifúngica e antibacteriana. Alguns pesquisadores sugerem que esses compostos também induzem resistência e promovem o crescimento de plantas.

Assim como outras rizobactérias, *P. megaterium* também é capaz de produzir fitohormônios responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento vegetal, como auxinas, ácido abscísico e citocininas. *Priestia megaterium* age diretamente sobre os organismos por meio de antibiose, onde os seus metabólitos afetam o crescimento e o desenvolvimento de patógenos, e também indiretamente através da promoção de crescimento de plantas, tornando-as mais vigorosas e resistente ao ataque de fungos, bactérias e nematoides fitopatogênicos.

3.8. *Priestia aryabhatai*

Priestia aryabhatai é uma bactéria encontrada sobretudo no solo e que atualmente é usada principalmente para evitar situações de estresse ambiental, como restrição hídrica, excesso de sais e presença de metais pesados. Sua ação ocorre principalmente pela produção de exopolissacarídeos extracelulares que formam biofilmes nas raízes das plantas, mantendo a umidade. Assim como as espécies anteriores, *P. aryabhatai* também é considerada uma bactéria promotora de crescimento vegetal e pode ser encontrada de forma endofítica nas plantas.

De maneira geral, *P. aryabhatai* promove o crescimento e aumento da superfície radicular, beneficiando a absorção de água e nutrientes pela planta, tornando-a mais tolerante à seca. Algumas cepas são capazes de solubilizar nutrientes minerais como fósforo, potássio e zinco e produzir ácido indol acético, ACC deaminase, amônia e sideróforos. Por estimular o crescimento e desenvolvimento das plantas, *P. aryabhatai* também pode induzir resistência sistêmica contra fitopatógenos e reduzir a população destes por meio da competição por nutrientes.

4. *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens é uma bactéria Gram negativa que não forma esporos, portanto resiste menos às condições ambientais desfavoráveis, ao contrário dos *Bacillus* e *Priestia*, porém apresenta propriedades interessantes para uso no controle biológico de doenças. É uma bactéria facilmente encontrada no solo, água e na superfície de plantas, vivendo em uma relação comensal na qual utiliza exsudatos vegetais e sobrevive em condições ambientais adversas. Em contrapartida, a bactéria protege a planta contra fitopatógenos, altera processos fisiológicos, degrada poluentes ambientais e facilita o acesso a nutrientes importantes.

Alguns metabólitos produzidos por *P. fluorescens* são diferentes dos que são normalmente encontrados em *Bacillus* e *Priestia*, o que estimula o uso de forma isolada ou em conjunto com outras bactérias. Dentre os principais compostos já isolados, estão antibióticos, cianeto de hidrogênio e sideróforos piochelina e pioverdina, que confere luminescência sob luz ultravioleta (figura 10), que inibem

o crescimento e a multiplicação de patógenos de solo, incluindo microorganismos importantes como *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Sclerotinia* spp. e *Erwinia carotovora*.

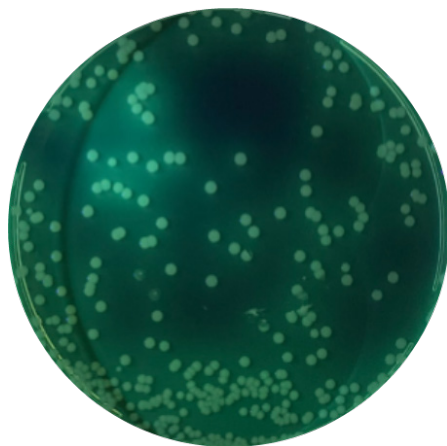


Figura 10. Colônias luminescentes de *Pseudomonas fluorescens* sob luz ultravioleta.

5. *Pasteuria penetrans* E *Pasteuria nishizawae*

Pasteuria é uma bactéria formadora de endósporos reconhecidamente endoparasita de nematoides. Apesar de ser altamente eficiente e com grandes taxas de controle, a bactéria apresenta restrição quanto às populações dos nematoides, que frequentemente variam no campo, apresentando, assim, grande especificidade quanto ao hospedeiro.

A fixação dos esporos de *Pasteuria* na cutícula dos nematoides é determinante para que o parasitismo tenha sucesso e parece haver características moleculares envolvidas nesse processo. Outro ponto importante que deve ser observado está relacionado com a textura do solo, que implica diretamente no sucesso do uso da bactéria. Atualmente há dois produtos registrados à base de *Pasteuria nishizawae*, com eficiência comprovada contra o nematoide-de-cisto (*Heterodera glycines*).



M Ó D U L O 3

PRODUÇÃO DE BACTÉRIAS EM BIOFÁBRICAS “ON FARM”

1. Introdução

O cultivo em biofábricas “On Farm” não usa muitos dos parâmetros que são utilizados nos biorreatores e muitas variáveis não são totalmente controladas, como a temperatura e o pH. Portanto, é imprescindível que se faça uma boa sanitização do tanque, use água e inóculo de boa procedência, meios de cultivo livres de contaminantes e que se mantenha boas práticas de higiene ao longo do processo.

2. Sanitização do tanque e das peças

Antes de iniciar o processo de multiplicação, é imprescindível que o tanque de multiplicação esteja limpo e livre de contaminações. Para isso, produtos sanitizantes devem ser utilizados, como ácidos e detergentes. Além disso, uma boa limpeza mecânica é necessária para que sejam retirados resquícios de biofilmes e de restos de multiplicações anteriores.

As peças removíveis, como o saca-amostra, suspiro, mangueiras, spray-ball e outros, também devem ser limpos e sanitizados. A sanitização pode ser feita com produtos químicos apropriados tais como detergentes alcalinos e ácidos, a depender da necessidade.

3. Água da multiplicação

A água de multiplicação deve ser de boa procedência, com a menor presença de contaminantes possível. Em muitas situações no Brasil isso não acontece, sendo necessária a utilização de produtos químicos e/ou métodos físicos que visam limpar a água e deixá-la livre de microrganismos e materiais em suspensão.

4. Meio de cultura

Assim como os biorreatores, o meio de cultura é muito importante para que se obtenha sucesso na multiplicação em biofábricas. Devem-se usar meios específicos para cada espécie ou grupo de espécies bacterianas, favorecendo e reduzindo o tempo de multiplicação. Além disso, o meio de cultivo pode ser esterilizado com radiação.

5. Qualidade do inóculo

O inóculo utilizado nas biofábricas deve ser livre de contaminantes e com a concentração mínima aceitável (normalmente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). O inóculo deve passar por um controle de qualidade, atestando a sua pureza e concentração.

6. Multiplicação nas biofábricas

A multiplicação nas biofábricas se inicia com o processo de limpeza dos tanques. Após isso, a água da multiplicação pode ou não ser limpa, a depender das condições observadas. Caso seja necessário, a água é limpa com o uso do sanitizante e posteriormente neutralizada.

O meio de cultura é então adicionado, o pH é ajustado para 7,0 e o inóculo é colocado no tanque. Além disso, é importante adicionar anti-espuma no início do processo de multiplicação. Como foi mencionado anteriormente, alguns parâmetros como o pH e a OD não são medidos durante o processo de multiplicação. Para medir o pH, amostras do multiplicado devem ser retiradas pelo saca-amostra.

O processo de multiplicação deve ser acompanhado por meio da visualização em microscópio e plaqueamento. Recomenda-se retirar amostras após 8h, 16h e 24h de multiplicação. Dependendo da espécie bacteriana, esse período pode ser estendido até 48 horas de multiplicação. Após a multiplicação, o processo é parado.

Atualmente, as principais espécies bacterianas produzidas em biofábricas *on farm* são: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Priestia aryabhatai*, *Priestia megaterium*, *Chromobacterium subtsugae*, *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*.

Trabalhos realizados pelo nosso grupo demonstraram que a qualidade da produção de *B. thuringiensis* em biofábricas, pode ser semelhante a qualidade dos produtos comerciais, inclusive apresentando CL50 comparável, o que poderá levar a redução de doses dos produtos “On Farm” em campo.



M Ó D U L O 4

CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO BIOINSUMOS

1. CRITÉRIOS NECESSÁRIOS PARA A REALIZAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE

1.1. Qualidade do estoque da estirpe que será multiplicada

As estirpes microbianas a serem multiplicadas devem ser originárias de Coleções de Culturas confiáveis e que sigam critérios de qualidade rigorosos, tais como, estarem puras, sejam conservadas em pelo menos dois métodos de preservação diferentes, sigam procedimentos operacionais padrão de qualidade e que estejam registradas no SISGEN.

Para que a pureza das amostras seja constatada, elas devem ser semeadas em forma de estrias, com uma alça estéril, em placas contendo meios TSA (Agar Triptona de Soja) e HiCrome *Bacillus* agar (a figura 11 mostra o crescimento de *Bacillus thuringiensis* nesses dois meios). Em seguida, devem ser fechadas com filme plástico e incubadas em estufa de crescimento à temperatura de $30 \pm 4^\circ\text{C}$ por 18 a 36 horas, a depender da espécie bacteriana. O meio TSA propicia o crescimento da maioria das bactérias, incluindo as espécies de *Bacillus* e permite também a observação de outros microrganismos. O meio HiCrome é um meio cromogênico onde as colônias de *B. thuringiensis* e *B. subtilis* apresentam-se esverdeadas, de *Priestia megaterium* e *P. aryabathaii* apresentam-se amarelo, de *B. pumilus* verde com centro esbranquiçado, de *B. velezensis* esbranquiçado com aspecto cotonoso, por exemplo (Figura 12).

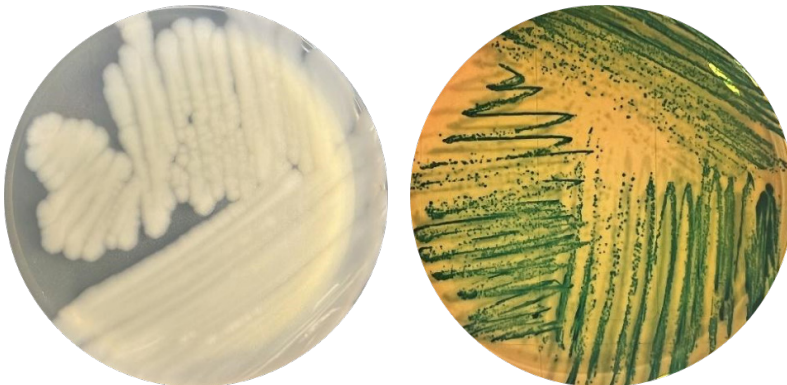


Figura 11. Estrias de *B. thuringiensis* em meio TSA (esquerda) e no meio HiCrome (direita).

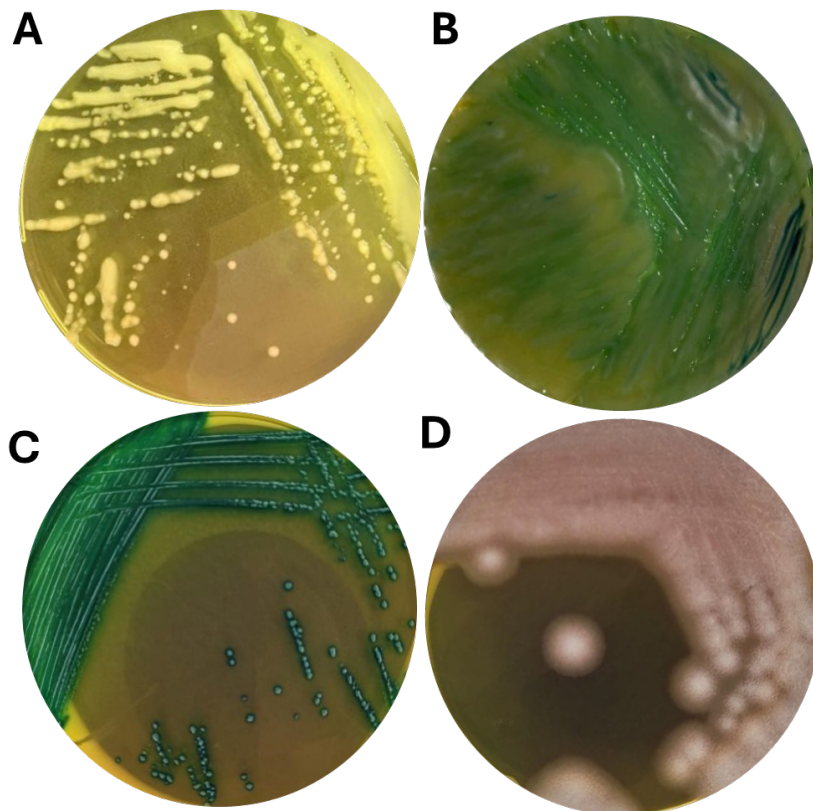


Figura 12. Estrias de *P. megaterium* (A), *B. subtilis* (B), *B. pumilus* (C) e *B. velezensis* (D) em meio HiCrome.

1.2. Qualidade dos inóculos produzidos com os diferentes microrganismos

Uma vez inoculados, os microrganismos devem ser avaliados para que se possa garantir a pureza e qualidade dos mesmos. Para isso, as amostras devem ser coletadas ao final do processo de produção do inóculo e analisadas morfolologicamente em microscópio de contraste de fases com aumento de 1000x e/ou em microscópio óptico com coloração de Gram. Para isso, deve-se levar a amostra coletada para a capela de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70% e esterilizada por 20 min em luz UV. Com uma micropipeta ou pipeta estéril, colocar uma gota da bactéria em lâmina e cobrir com uma lamínula. Adicionar uma gota de óleo de imersão sobre a lamínula e realizar a visualização das amostras sob microscópio. A Figura 13 apresenta uma amostra de *B. thuringiensis* observado a fresco em microscópio de contraste de fases e observado após coloração de Gram.

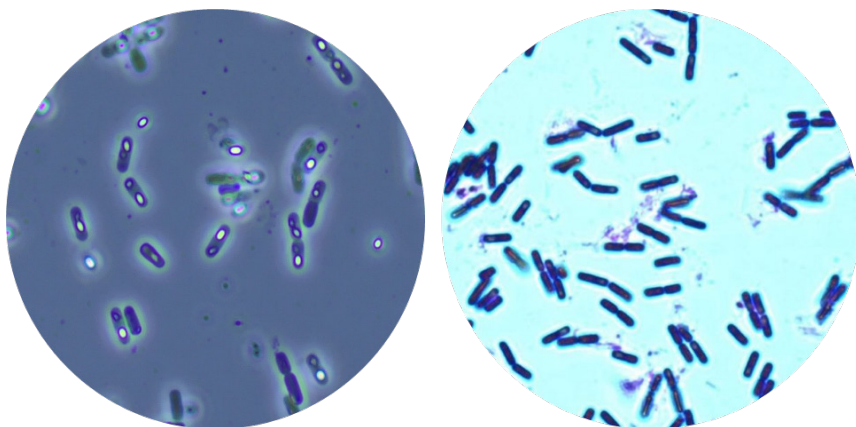


Figura 13. Observação de células de *Bacillus thuringiensis* em microscópio de contraste de fases (esquerda) e com coloração de Gram (direita) (aumento de 1000x).

As principais características que devem ser checadas na microscopia são: tamanho e forma da célula vegetativa, forma e posição do esporo, motilidade e no caso do *B. thuringiensis*, também, a presença de corpos paraesporais/cristais. As informações referentes a cada espécie do gênero *Bacillus* estão especificadas na Tabela 1.

<i>Bacillus</i> / <i>Priestia</i>	Célula Vegetativa (µm)	Esporângio	Esporo	Cristal	Motilidade
<i>B. thuringiensis</i>	Pequena a grande (3-5)	Subterminal	Elíptico	Sim	Sim
<i>B. subtilis</i>	Pequena (2-3)	Subterminal	Elíptico-redondo	Não	Sim
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Pequena (1,8-3)	Central	Elíptico-alongado	Não	Sim
<i>B. pumilus</i>	Pequena (2-3)	Subterminal	Elíptico-pequeno	Não	Sim
<i>B. licheniformis</i>	Pequena (1,5-3)	Subterminal	Elíptico-cilíndrico	Não	Sim
<i>B. velezensis</i>	Pequena (1,8-2,7)	Central	Bastonete-curto	Não	Sim
<i>P. megaterium</i>	Grande (até 10)	Central	Bastonete-grande	Não	Sim
<i>P. aryabhatai</i>	Pequena a grande (2,5-5)	Central	Elíptico	Não	Sim

Tabela 1: Características morfológicas visualizadas no microscópio de contraste de fases dos principais *Bacillus* e *Priestia* utilizados na agricultura.

Para confirmar a pureza, as amostras devem ser semeadas em forma de estrias, conforme descrito no item 5.1.

1.3. Controle de qualidade de bioprodutos

1.3.1. Procedimento para identificação morfológica das bactérias

O procedimento utilizado nesta etapa é o mesmo descrito no item 5.1.1.

1.3.2. Procedimento para determinação de pH

O pH da amostra pode ser determinado através do uso de equipamento pHmetro, indicadores ou fitas de pH. O procedimento mais comum e eficaz é através do uso de um pHmetro. Para isso, deve-se coletar 100 mL da amostra, no caso de produtos líquidos e no caso de amostras sólidas, deve-se diluir 1 grama em 100 mL de água destilada. Em seguida, retirar o eletrodo da solução de KCl (onde ele é normalmente conservado), lavar com água destilada, secar com papel macio (sem esfregar) e inseri-lo na amostra. Fazer a leitura após a estabilização no mostrador do pHmetro.

1.3.3. Procedimento para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC)

Para a realização deste ensaio, é necessário que as amostras sejam diluídas de forma decimal. No caso de amostras líquidas as diluições devem ser realizadas diretamente a partir das amostras, no caso de amostras sólidas, deve-se pesar 1 g em balança de precisão e transferir o conteúdo pesado para o tubo de ensaio com 9 mL de solução salina com 0,01% de Tween 80 (v/v).

No caso das amostras de *Bacillus* spp, o número de UFC deve ser calculado em função do número de esporos. Para isso deve-se coletar 1 mL da amostra em microtubo tipo eppendorf e submeter a choque térmico em placa aquecedora ou banho maria por 80° C por 12 minutos seguido de banho de gelo por 5 minutos. Desta forma, todas as células vegetativas irão morrer e apenas os esporos continuarão viáveis. As diluições decimais devem ser iniciadas a partir dessas amostras.

Para a execução das diluições seriadas deve-se transferir 1 mL da solução do tubo 1 para o tubo 2, homogeneizar no agitador de tubos e repetir este procedimento até o último tubo, sempre homogeneizando cada solução antes da transferência para o próximo tubo. A cada tubo, a ponteira da pipeta deve ser trocada por outra estéril. Depois de realizadas todas as diluições, semear 100 µL de cada uma das diluições em placas de Petri com meio adequado a cada espécie. Para cada diluição devem ser semeadas 3 placas. Finalmente espalhar, com alça de Drigalsky, a solução sobre toda a superfície do meio de cultura, fechar a placa de Petri e vedar com filme plástico (Figura 14).

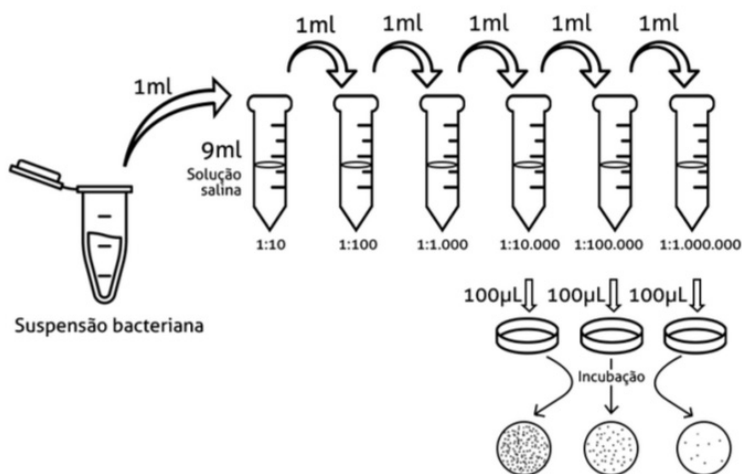


Figura 14. Esquema do preparo das diluições seriadas decimais e inoculação em placas de Petri.

As placas deverão ser incubadas em estufa bacteriológica à temperatura de 30 ± 4 °C por 16 a 24 horas. Em seguida, retirar as placas da estufa e contar o número de colônias de cada uma das diluições, a fim de calcular o número de unidades formadoras de colônias. Apenas as placas que apresentarem de 30 a 300 colônias de bactérias devem ser contadas.

Para a determinação do número de unidades formadoras de colônia por mL, deve-se multiplicar o nº de colônias pela diluição que a placa representa e pela quantidade de suspensão semeada na placa. Por exemplo: na diluição 10⁻³ foram contadas 180 colônias. O cálculo será: 180 (número de UFC por placa) x 1.000 (fator de diluição) x 10 (conversão de µL para mL) = 1,8 x 10⁶ colônias/mL.

As três placas devem ser contadas e o resultado final será a média dos valores.

1.3.4. Procedimento para determinação da presença de contaminantes

É muito importante que os produtos biológicos não contenham microrganismos perigosos, assim, devem ser realizados testes específicos para detectá-los. Existem meios de cultivo seletivos que podem rapidamente detectar a presença desses microrganismos. Na tabela 2 estão listados quais microrganismos devem ser investigados segundo a Portaria Conjunta n. 01 de 10 de abril de 2023 no produto formulado, quais os meios de cultivo apropriados para sua detecção e qual a quantidade aceitável para estar presente nos produtos.

Esta avaliação deve ser realizada através da determinação da concentração total de células viáveis pela técnica de semeadura em diferentes meios de cultivo seletivos e posterior contagem das unidades formadoras de colônia.

Microrganismo	Especificação	Meio de cultura
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência em 25 g ou mL	Ágar Verde-Brilhante
Coliformes termotolerantes	Até 10 ³ UFC/g ou mL	Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho Neutro
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Até 10 ³ UFC/g ou mL	Ágar Baird Parker

Tabela 2: microrganismos indesejáveis, quantidade aceitável para estar presente nos produtos e meios de cultivo apropriados para sua detecção.

Para a execução do ensaio, os meios de cultura Ágar Verde-Brilhante, Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho Neutro e Ágar Baird Parker deverão ser preparados de acordo com a recomendação dos diferentes fabricantes.

Em seguida, as suspensões-mãe devem ser preparadas. Para isso, no caso de produto biológico sólido, preparar a suspensão, diluindo 1 g do bioproduto em 9 mL de solução salina. No caso de produto biológico líquido, diluir 1 mL do bioproduto em 9 mL de solução salina. As amostras devem ser diluídas até 10^{-3} e então 0,1 mL de cada amostra deve ser inoculada em placas de Petri com o meio de cultura específico para a detecção de cada microrganismo. Semear 3 placas, ou seja, realizar 3 repetições para a diluição 10^{-3} . Finalmente espalhar, com alça de Drigalsky, a solução sobre toda a superfície do meio de cultura, fechar a placa de Petri e vedar com filme plástico e incubar em temperatura apropriada.



LITERATURA CITADA

- ABDEL-HAMID, M.E.; NOVOTNY, L.; HAMZA, H. J. 2001. Pharm. Biomed. Anal, 24, 587
- ABRIOUEL, H.; FRANZ, M. A. P. C.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. FEMS Microbiology Reviews, v. 35, p. 201-232.
- AGROFIT. 2020. Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 22 março.
- ALVES, S. B. & MORAES, S. A. 1998. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: Controle microbiano de insetos. Ed. Alves, S.B., FEALQ, Piracicaba, p. 765-777.
- ARCAS, J. A. 1996. In: Producción de Bacterias Entomopatogenicas. Leucona, R. (ed), Microorganismos Patogenos Empleados em el Control Microbiano de Insectos Plagas, Buenos Aires, v. 1, p. 208-222.
- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens; in Microbiol. Rev. (ed.) J L Ingraham (Washington D C: American Society for Microbiology) p. 1-24
- BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology, v. 134, p. 307-319. 2004.
- BAUM, J. A.; JHONSON, T. B.; CARLTON, B. C. 1999. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticide products. Methods Biotechnology, v. 5, p. 189-209.
- BLOEMBERG, G. V.; LUGTEMBERG, B. J. J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr. Opin. Plant Biol, v. 4, p. 343-350.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 41, n. 7. p. 423-431.

CHERIF, A.; CHEHIMI, S.; LIMEM, F.; HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9. *J Appl Microbiol*, v. 95, p. 990–1000.

COUCH, T. L. 2000. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (Org.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications*. New York: Kluwer Academic Publishes, p. 297-316.

DULMAGE, H. T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. alesti. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 15, p. 232-239.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, v. 16, p. 269–275.

EDWARDS, P.; PULLIN, R. S. V.; GARTNER, J. A. 1988. Research and development of integrated croplivestock-fish farming systems in the tropics. *ICLARM Studies and Reviews*, v. 16, 53 pp. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 11, p. 5389-5394.

FREIRE, I.; NASCIMENTO, I.; ROCHA, G.; BUFFON, P.; FERREIRA, C.; CASTRO, M.; MONNERAT, R., 2024, Production of *Bacillus thuringiensis* in “On Farm” Biofactories Is So Efficient Like a Commercial Product to Control Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae), *Agronomy*, 14(2776):1-11

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles gambiae*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, v. 37, p 355-358.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. 1998. Bactérias entomopatogênicas. In: *Controle microbiológico de insetos*. Ed. Alves, S.B., FEALQ, Piracicaba, p. 383-446.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. 2000. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. 2000. Chapter (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.41-64.

HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. 2000. Genetic engineering of biocontrol agentes for insects, on: Biological and Biotechnological Control of Insect Pests. J. Rechcigl, ed., Lewis Publishers/ CRC Press/ACS, p. 243-280.

HOLMBERG, A.; SIEVANEN, R.; CARLBERG, G. 1980, Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxi production: Process analysis study. Biotechnol. Bioeng, v. 22, p. 1707-1724.

HURTADO, G. B. La producción de ingredientes activos com *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERON, J. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá: Editora Buena Semilla, 2004. p. 233-273.

KRIEG, A.; HUNGER, A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNEITER, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. Entomology, v. 96, p. 500-508.

LOGAN, N. A.; de VOS, P. 2009. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 174AL. Vol 3. The firmicutes 2nd Edition.

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E.; FIUZA, L. M. 2012. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. Oecologia Australis, v. 16, p. 165 - 182.

MADHAIYAN M, POONGUZHALI S, KWON SW, SA TM. 2010. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 60, p. 2490–2495.

MALDONADO-BLANCO, M. G.; SOLIS-ROMERO, G.; GALÁN WONG, L. J. 2003. The effect of oxigen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. World J. Microbiol. Biotechnol, v. 19, p. 671-74.

MARTIN, P. A., GUNDERSEN-RINDAL, D., BLACKBURN, M., BUYER, J. 2007. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.57, p.993-999.

MARTIN, P. A., HIROSE, E., ALDRICH, J. R. 2007. Toxicity of *Chromobacterium subtsugae* to southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Economic Entomology, v.100, n.3, p.680-684.

MEDICE, R. Efeito de produtos alternativos no controle de oídio e *Bacillus* spp. como promotores de crescimento da soja. Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Tese (Doutorado). 2012.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. 2000. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Controle Biológico, eds. Melo, I.S., Azevedo, J.L., Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p.163-200.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCAO, R.; BROD, C. S.; SILVA-WERNECK, J. O.; BERRY, C. 2007. Characterization of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. Biological Control, v. 41, p. 291-295.

MONNERAT, R.G.; PRAÇA, L. SILVA, E.; MONTALVÃO, S.; MARTINS, E.; SOARES, C.; QUEIROZ, P. PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* PARA USO NA AGRICULTURA, www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1098050/1/documentos360Final.pdf

MONNERAT, R.G.; MONTALVÃO, S.; MARTINS, E.; SOARES, C.; QUEIROZ, P.; SILVA, E.; GARCIA, A.; CASTRO, C.; ROCHA, G.; FERREIRA, A.; GOMES, A.C. MANUAL DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* PARA USO NA AGRICULTURA. [HTTPS://AINFO.CNPITIA.EMBRAPA.BR/DIGITAL/BITSTREAM/ITEM/213246/1/DOCUMENTOS-36916.PDF](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/213246/1/documentos-36916.pdf)

MUKHERJ, S.; DAS, P.; SEM, R. 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. Trends in Biotechnology, v. 24, n. 11. p. 509–515.

NWOKORO, O.; DIBUA, M. E. U. 2014. Degradation of soil cyanide by single and mixed cultures of *Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus subtilis*. Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju, v. 65, p. 113–119.

OECD. 2013. Guidelines for the testing of chemicals. Determination of pH, Acidity and Alkalinity. 6 pp.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. 2009. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Res, v. 29, p. 427–433.

Organisation Mondial De La Sante (OMS), 1987. Report of an Informal Consultation on the Detection, Isolation, Identification and Ecology of Biocontrol Agents of Disease Vectors. UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in tropical Diseases, TDR/BCV/IC-GE/87.3, 41 p.

PARK, J. K. 2006. Análise de Materiais Biológicos. Faculdade de Engenharia Agrícola. Universidade Estadual de Campinas. 21pp.

PRIEST, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriology Reviews, v. 41, n. 3, p. 711-753.

RABINOVITCH, L. E OLIVEIRA, E.J., 2015 Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos, 1. Ed. – Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160p. ISBN 978-85-67506-04-3

RADDADI, N.; CHERIF, A.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. 2008. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. Annals of Microbiology, v.58, n.1, p.47-52.

ROBERTSON, J. R.; PREISLER, H. K.; RUSSELL, R. M. 2002. Polo Plus. Probit and logit analysis user's guide. LeOra Software, Petaluna, CA.

ROOSDIANA, A.; PRASETYAWAN, S.; MAHDI, C. 2013. Production and Characterization of *Bacillus firmus* Pectinase. The Journal of Pure and Applied Chemistry Research, v. 2, p. 35–41.

SAKSINCHAI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; VERDUYN, C. 2001. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 17, p. 307-316.

SARANYA, P.; KUMARI, H. S.; RAO, B. P.; SEKARAN, G. 2014. Lipase production from a novel thermo-tolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. Environmental Science and Pollution Research, v. 21, p. 3907–3919.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Canadian Journal of Microbiology, v. 50, p. 1–17.

SCHMIDT, F.G.V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. 2001. Metodologia de criação de Insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos. Circular Técnica nº 9 - Embrapa ISSN 1516-4349

SIKDAR, D. P.; MAJUMBAR, M. K.; MAJUMBAR, S. K. 1991. Effect of Minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. Biotechnology Letters, v. 13, n. 7, p. 511-517.

SOARES, C. M. S. Produção, formulação e aplicação de bactérias. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Eds.) Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. Brasília: Embrapa Cerrados, 2006. p. 219-238.

TUMBARSKI, Y.; PETKOV, E.; DENKOVA, Z. 2015. Study on the influence of the cultural conditions and the composition of the culture medium on the antimicrobial activity of *Bacillus methylophilus* BM47 against some fungal phytopathogens. Journal of Global Biosciences, v. 4, n. 8, p. 2990-2996.

WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CARR, B.; DESAI, N. M.; KOSTICHKA, K.; DUCK, N. B.; ESTRICH, J. J. 1998. Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins. U.S., v. 5, p. 696-770.

WEISER, J.; KRIEG, A.; HUGER, A. M. 1986. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft., v., n. Mitteilungen aus der Berlin: Paul Parey, p. 37-50.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Microbiology, v. 40, p. 549-576.

YOSHIDA S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. 2001. Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. Phytopathology. v. 91, n. 2, p. 181-187.

YOUSTEN, A. A. 1984. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. Advances in Biotechnology Processes v.3, p.315-343.



PARTE

2

FUNGOS

Os fungos constituem um grupo de organismos filogeneticamente diverso, heterotróficos, eucarióticos, unicelulares ou multicelulares (filamentosos) que se reproduzem por meio de esporos sexuais e/ou assexuais. Além disso, possuem células com quitina e geralmente não são móveis. Podem ser encontrados nos mais variados tipos de ambientes, como solo, rizosfera, plantas, água, insetos, animais, entre outros. Portanto, o fato de serem organismos existentes extensivamente em habitats naturais indica que não representam uma ameaça ao meio ambiente.

Embora os produtos à base de fungos necessitem de mais tempo para controlar as pragas e patógenos em comparação com pesticidas químicos, eles possuem baixa toxicidade para mamíferos, são específicos quanto ao hospedeiro e são ecologicamente amigáveis ao meio ambiente. Esses atributos os tornam atraentes dentro da nova estrutura do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Portanto, a segunda parte deste livro tem como objetivo apresentar e descrever os principais fungos utilizados no controle de pragas e doenças de plantas, além de fornecer informações sobre seu modo de ação, produção em larga escala e seu controle de qualidade.



M Ó D U L O 1

FUNGOS PARA O CONTROLE DE ARTRÓPODES-PRAGA

1. INTRODUÇÃO

O termo entomopatogênico refere-se àqueles microrganismos capazes de atacar insetos e ácaros utilizando-os como hospedeiros para desenvolver parte de seu ciclo de vida, reduzindo as populações dos organismos danosos a níveis que não causem prejuízos econômicos às culturas, ou aqueles que são um meio de controle na redução de vetores de doenças. Também são definidos como parasitas facultativos ou obrigatórios de insetos, com alta capacidade de esporulação e sobrevivência e constituem um grupo de grande interesse para o controle biológico de insetos. Quando não causam danos às plantas e a mortalidade de pragas é constatada, os pesticidas fúngicos são considerados eficazes. Os fungos entomopatogênicos persistem no ambiente, pois podem se desenvolver em cadáveres e, assim, reciclar o inóculo. A persistência residual é uma característica desejável em produtos biológicos à base de fungos.

As infecções por insetos induzidas por fungos fazem parte da mecânica da natureza e as epizootias funcionam para controlar as populações de pragas. Fungos virulentos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Cordyceps* (= *Isaria*) *fumosorosea* ocupam a maior fatia do mercado de micoinseticidas. Dentro da estrutura do MIP, o controle biológico de pragas tornou-se uma abordagem de manejo mais do que necessária, pois os produtos químicos com resíduos nocivos sobrecarregam o meio ambiente e os consumidores já estão conscientes da segurança de seus produtos.

Quando não causam danos às plantas e a mortalidade de pragas é constatada, os pesticidas fúngicos são considerados eficazes. Os fungos entomopatogênicos persistem no ambiente, pois podem se desenvolver em cadáveres e, assim, reciclar o inóculo. A persistência residual é uma característica desejável em produtos biológicos à base de fungos.

2. PRINCIPAIS ESPÉCIES DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E SEUS ALVOS

No Brasil, os produtos biológicos comerciais à base de fungos entomopatogênicos são recomendados para os seguintes insetos-praga:

Beauveria bassiana

- *Bemisia tabaci* raça B (Mosca-branca)
- *Tetranychus urticae* (ácaro-rajado)
- *Dalbulus maidis* (cigarrinha-do-milho)
- *Cosmopolites sordidus* (moleque-da-bananeira)
- *Sphenophorus levis* (bicudo-da-cana-de-açúcar)
- *Diabrotica speciosa* (vaquinha verde-amarela)

Metarhizium anisopliae

- *Mahanarva fimbriolata* (Cigarrinha-da-raiz)
- *Zulia entreriana* (Cigarrinha-das-pastagens)
- *Deois flavopicta* (Cigarrinha-das-pastagens)

Cordyceps fumosorosea

- *Bemisia tabaci* raça B (Mosca-branca)
- *Dalbulus maidis* (cigarrinha-do-milho)
- *Helicoverpa armigera* (Helicoverpa)
- *Diaphorina citri* (Psilídeo-asiático-dos-citros)

3. MECANISMO DE AÇÃO CONTRA INSETOS

No campo, os fungos patogênicos de insetos precisam enfrentar vários desafios do hospedeiro para produzir novos esporos infecciosos suficientes em cada geração para manter populações viáveis. Em primeiro lugar, a transmissão bem-sucedida geralmente requer a liberação de números maciços de esporos e/ou superfícies pegajosas de esporos ou substâncias que maximizam a adesão de outras maneiras. Em segundo lugar, os esporos devem germinar e iniciar a penetração no exoesqueleto sólido do inseto de forma relativamente rápida ou sobreviver à digestão após a ingestão oral, como no caso dos fungos do gênero *Ascosphaera*. Em terceiro lugar, as células fúngicas devem proliferar dentro da hemocele, músculos ou outros tecidos do corpo do hospedeiro para colapsar o

sistema imunológico do hospedeiro e, posteriormente, matá-lo. Quarto, o fungo coloniza o cadáver hospedeiro para otimizar a produção e dispersão de esporos sob as condições ambientais predominantes (Figuras 1 e 2).

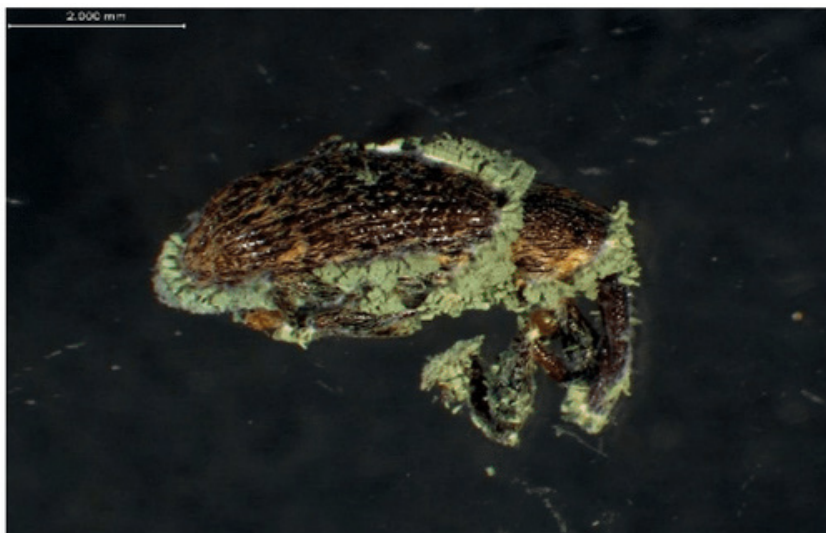


Figura 1. Inseto adulto de *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro) morto por *Metarhizium anisopliae*.



Figura 2. Larvas de *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro) mortas por *Beauveria bassiana*.

Assim, os fungos entomopatogênicos apresentam várias etapas no desenvolvimento de infecções fúngicas (Figura 3):

1. Adesão ou consolidação do esporo pré-germinados na epicutícula (camada mais externa da cutícula do hospedeiro);
2. Germinação e desenvolvimento até a formação do apressório iniciando a fase de penetração;
3. Após atingir a hemocele, formação de blastosporos (propágulos infectivos hidrofóbicos) evitando o reconhecimento pelo sistema imune do inseto;
4. Ocorre sintomas fisiológicos anormais no inseto (como: convulsões, falta de coordenação, comportamento alterado e paralisia) e morte;
5. Sob condições ambientais favoráveis, as hifas atravessam o tegumento do inseto e iniciar a esporulação (fase reprodutiva).



Figura 3. Ciclo básico da relação patógeno-hospedeiro de fungos entomopatogênicos. Fonte: adaptado de Boomsma et al. (2014).

4. METABÓLITOS

Além da ação mecânica para rompimento da cutícula do inseto, os fungos entomopatogênicos produzem agentes degradadores (enzimas) que atuam para a obtenção de nutrientes e, eventualmente, colonizar o inseto. As enzimas envolvidas na degradação da cutícula incluem proteases, quitinases e lipases, necessárias para degradar proteínas, quitina e lipídios, respectivamente. A ação da enzima pode ser auxiliada pela secreção de ácidos orgânicos como o ácido oxálico.

Após atingir a hemocele, há um número considerável de metabólitos produzidos pelos patógenos de insetos: acúmulo de glicoproteínas no intestino simulando a estrutura da parede celular do fungo para desencadear uma resposta imune do inseto, melanina produzida pelo fungo na eliminação de radicais livres na hemocele. Os metabólitos inseticidas produzidos por fungos possuem diversos modos de ação e em muitos casos são a causa direta da morte do inseto, atuando nas células especializadas do sistema imunológico para evitar o ataque às estruturas fúngicas. A produção de toxinas é uma característica da maioria das espécies de fungos entomopatogênicos. Dentre as toxinas produzidas por *Metarhizium anisopliae*, as destruxinas são as mais estudadas, pelo seu modo de ação, que envolve a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas em células de insetos.



M Ó D U L O 2

FUNGOS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

1. INTRODUÇÃO

Existe uma grande quantidade de produtos à base de fungos disponibilizada para comercialização, esses produtos apresentam qualidade variável em termos de formulação e concentração, ingrediente ativo e tempo de prateleira. A maior parte dos produtos biológicos à base de fungos é resultado de um extenso processo que inclui a seleção do agente microbiano, extensiva avaliação da eficácia em laboratório e campo, produção em larga escala, desenvolvimento do formulado e registro frente aos órgãos governamentais. Eles podem ser aplicados diretamente no solo ou em tratamento de sementes ou, ainda, pulverizados em partes aéreas, a depender da parte da planta que se deseja proteger.

Fungos, oomicetos, nematóides e bactérias são responsáveis pela maior parte das doenças de plantas nativas e cultivadas (Figura 4). Esses microrganismos podem promover a redução da produtividade e qualidade das lavouras em todo mundo. Nas grandes culturas, os maiores causadores de doenças fúngicas são as espécies de *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e o complexo de ferrugens, em especial a ferrugem asiática da soja provocada pelo fungo da espécie *Phakopsora pachyrhizi*; quanto aos oomicetos, os principais representantes compreendem os gêneros *Phytophthora* spp. e *Phytium* spp., esses dois gêneros podem causar diversas doenças em todas as plantas cultiváveis como por exemplo a gomose dos citrus causado por espécies de *Phytophthora. nicotianae*, *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora palmivora*; quanto aos nematóides, os principais gêneros fitopatogênicos são: *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Heterodera* spp. e *Globodera* spp causadores de galhas, queima de raízes e cisto, respectivamente; em relação às bactérias, as causadoras de murchas vasculares como a *Ralstonia solanacearum* e *Curtobacterium flaccumfaciens* e manchas foliares como *Xanthomonas* spp., e *Pseudomonas* spp. podem causar severas perdas nas lavouras.

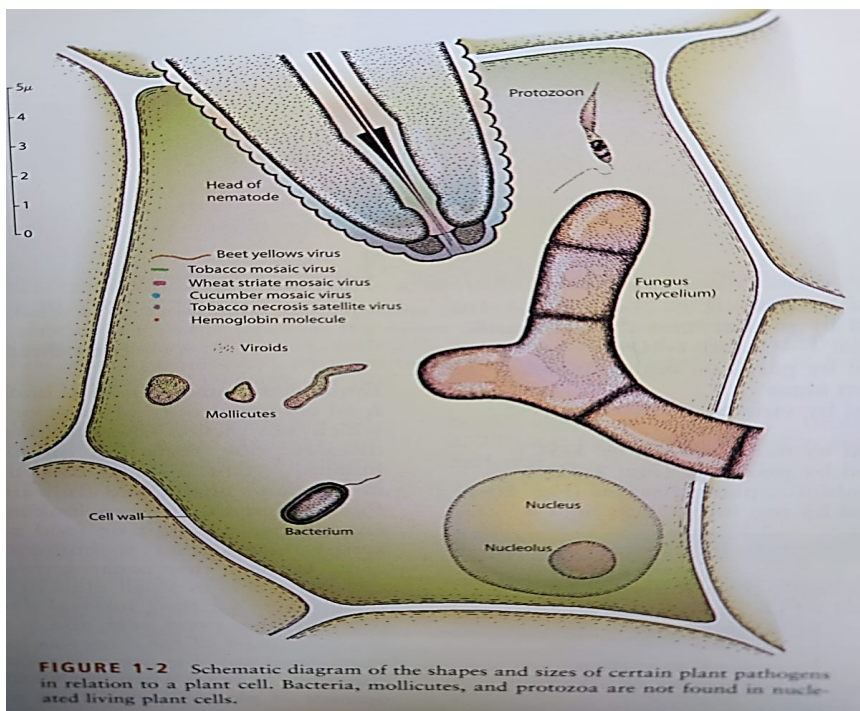


Figura 4. Esquema diagramático do tipo e tamanhos de alguns fitopatógenos em relação à célula vegetal. Fonte: Agrios (2005).

Dentre os microrganismos usados para o manejo de fitopatógenos, os fungos possuem parcela significativa no mercado mundial entre os produtos biológicos. Essa parcela compreende principalmente os fungos das espécies de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Metacordyceps chlamydosporia* (= *Pochonia chlamydosporia*) e *Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*).

Dentre os antagonistas mais utilizados contra fungos fitopatogênicos habitantes de solo, citam-se fungos do gênero *Trichoderma* (Figura 5), capazes de inibir o desenvolvimento e ação de vários fitopatógenos, principalmente os habitantes de solo. Melhoria na absorção de nutrientes, indução de resistência e promoção de crescimento de plantas são também efeitos atribuídos aos microrganismos utilizados no controle de diversas doenças de importantes culturas do mundo.

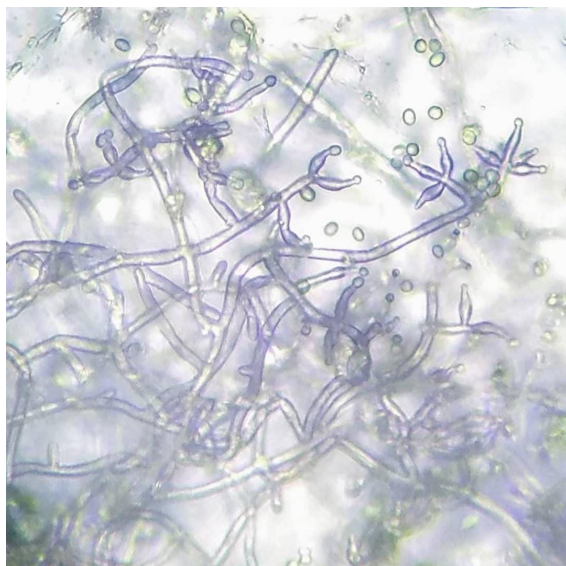


Figura 5. Estruturas reprodutivas típicas de *Trichoderma harzianum*.

Espécies do gênero *Trichoderma* compreendem um conjunto de fungos com importância principalmente como agentes de controle biológico. *Trichoderma* é um habitante natural do solo encontrado em todos os ecossistemas, colonizador de raízes; tem a capacidade de empregar diversos mecanismos que resultam no biocontrole de doenças, tais como antibiose, micoparasitismo, competição e indução de resistência. Mais de um desses mecanismos é utilizado para exercer o biocontrole de doenças. Além da importância agrônômica, fungos do gênero *Trichoderma* atuam como decompositores primários de matéria orgânica. Eles se destacam pelo rápido crescimento, esporulação profusa, capacidade de crescimento em diferentes substratos e tolerância a compostos nocivos.

Os mecanismos utilizados por espécies de *Trichoderma* para reconhecer e controlar os fitopatógenos são essenciais para a manutenção do controle biológico. Antagonistas desse gênero utilizam basicamente quatro mecanismos de ação no controle de fitopatógenos: micoparasitismo, antibiose, competição e a indução de mecanismos de defesa da planta.

O micoparasitismo (Figura 6) é uma forma comum de associação entre organismos, por meio do qual se estabelecem relações nutricionais favoráveis à existência do micoparasita, que pode ser principalmente: necrotrófica – o micoparasita mata o hospedeiro pelo contato direto, absorvendo seu conteúdo celular como fonte de nutrição; biotrófica – o micoparasita obtém nutrientes das células. O micoparasitismo como ação direta de um fungo contra outro fungo compreende um complexo

processos que envolve eventos sequenciais, incluindo reconhecimento, ataque e a subsequente penetração, seguida de morte do hospedeiro.



Figura 6. Enrolamento de hifas de *Trichoderma harzianum* sobre hifas de *Rhizoctonia solani*.

Antibiose (Figura 7) é um mecanismo no qual os antagonistas interagem com outros microrganismos e secretam metabólitos voláteis ou não voláteis que podem ser capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento de outros organismos de espécies diferentes. A produção desses compostos tóxicos é importante para a sobrevivência de microrganismos por meio da eliminação da concorrência microbiana, acarretando maior disponibilidade de fontes de alimento que geralmente são escassos no solo foram os primeiros a descrever as propriedades tóxicas dos compostos voláteis e não voláteis capazes de inibir o crescimento micelial de outros fungos. Desde então vários metabolitos foram identificados e avaliados seus efeitos inibitórios para inúmeras espécies de fungos.

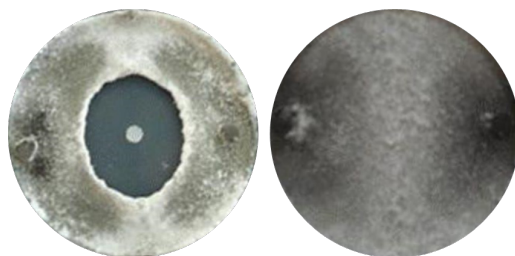


Figura 7. Colônia de *Sclerotinia sclerotiorum* sendo inibida por um metabólito de *Trichoderma* plantado no centro da placa (esquerda); à direita, observa-se uma colônia deste fitopatógeno com crescimento normal sem adição do metabólito do *Trichoderma*.

Competição (Figura 8) é considerada um dos mais eficientes mecanismos de ação utilizados por *Trichoderma*. Baseia-se no fato de que os microrganismos competem uns com os outros para obter fontes a base de carbono, nitrogênio, oxigênio, ferro e outros micronutrientes. Aqueles mais eficientes em usar os recursos disponíveis se multiplicam e colonizam rapidamente a rizosfera. Provavelmente esse mecanismo seja a forma mais comum no controle biológico. A competição por espaço ou sítios de infecção poderá ocorrer concomitantemente contribuindo para a atividade de biocontrole.



Figura 8. Competição e parasitismo de *Trichoderma* contra o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura e sobre escleródio.

A indução de resistência é outro mecanismo de controle biológico no qual a planta responde à agressão por patógenos por meio da produção de fitoalexinas, lignina adicional nas células e compostos fenólicos. Tais respostas também podem ocorrer ao contato com outros organismos não patogênicos ou isolados não virulentos do patógeno.

Considerando a perspectiva do manejo de fitonematoides, destacam-se os fungos parasitas de ovos e massas de ovos. Os fungos que parasitam ovos são promissores agentes de controle biológico devido à facilidade de produção in vitro e pela possibilidade de algumas espécies colonizarem a rizosfera. Os nematoides formadores de galhas depositam seus ovos em massas envoltas por uma substância gelatinosa de constituição lipoprotéica, o que facilita a rápida colonização dos fungos com característica nematicida. Esses fungos induzem desordens fisiológicas nos ovos, interrupção no desenvolvimento embriogênico e, em alguns casos, rompimento físico. Além disso, são parasitas facultativos de nematoides, o que facilita a sua multiplicação e sua sobrevivência no solo após a aplicação.

Dentre os fungos com ação nematicida, as espécies de *Metacordyceps chlamydosporia* (H.C. Evans), anteriormente classificada como *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) e o *Purpureocillium lilacinum* (Thom), anteriormente classificada como *Paecilomyces lilacinus* (Thom) são referências, cosmopolitas, ambos têm sido utilizados no manejo integrado diversas espécies de fitonematoides e como o *Trichoderma*, são capazes de sobreviver como degradadores de matéria orgânica, e não apenas do parasitismo de seus hospedeiros.

Metacordyceps chlamydosporia (Figura 9) é um parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematoides sedentários formadores de galhas e de cistos e possui habilidade de crescer endofiticamente nas raízes sem causar lesões ou danificar o crescimento das plantas, o que auxilia sua sobrevivência no solo na ausência dos nematoides. Uma vantagem competitiva do *M. chlamydosporia* é seu mecanismo de resistência, esse fungo produz em abundância estruturas chamadas clamidósporos que participam ativamente na sua sobrevivência em condições adversas para seu desenvolvimento, mesmo sem a presença de nematoides no solo. Esse mecanismo permite que seu propágulo permaneça mais tempo viável no solo.

Purpureocillium lilacinum (Figura 10) é um fungo altamente adaptável quanto a sua estratégia de sobrevivência, dependendo da disponibilidade de nutrientes, pode ter ação entomopatogênica, micoparasita, saprófita ou nematófaga. Assim como *M. chlamydosporia*, é um parasita facultativo de ovos. Esse fungo age como agente de biocontrole de nematoides e atua no parasitismo de ovos de *Meloidogyne* spp., fêmeas jovens do nematoide de galhas e fêmeas de nematoides dos cistos, podendo exercer forte pressão na capacidade reprodutiva dos nematoides devido a infecção e, posteriormente, morte.

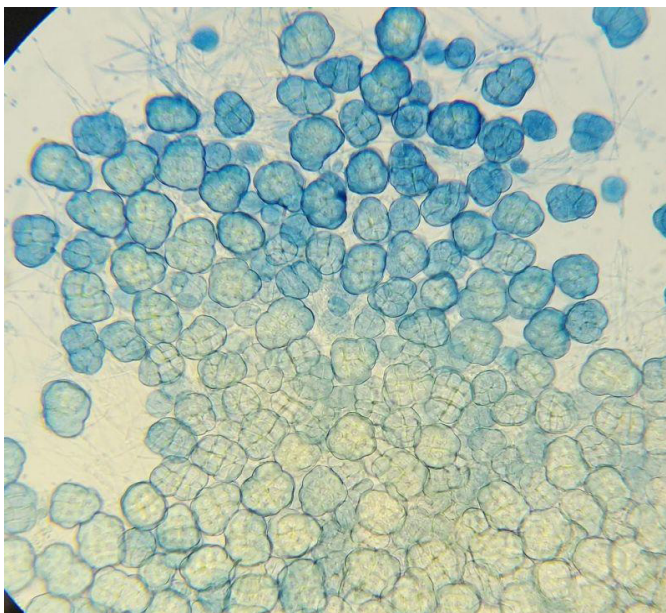


Figura 9. Clamidósporos são estruturas de resistência produzidas pelo fungo *Metacordyceps chlamydosporia*.

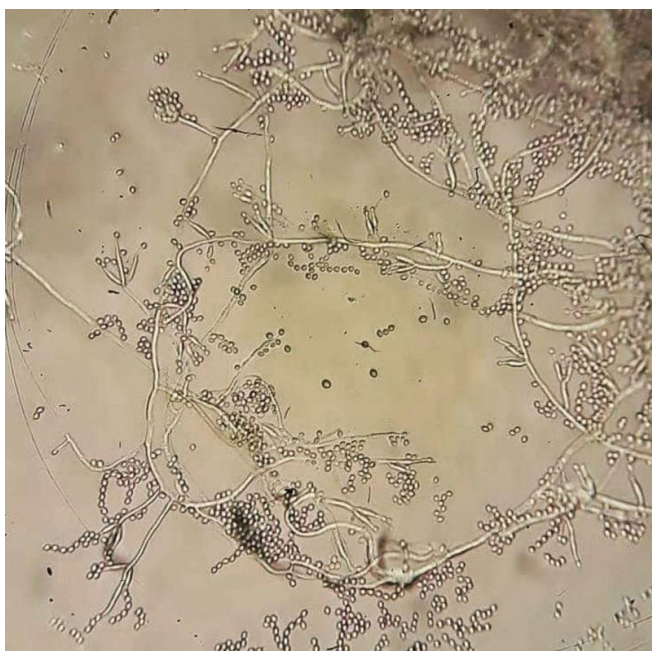


Figura 10. Estruturas típicas de conídios e conidióforos de *Purpureocillium lilacinum*.

O modo dos mecanismos de ação de *M. chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum*, em termos gerais são paralelos ao do *Trichoderma*, principalmente o parasitismo direto e a antibiose sobre o hospedeiro. A infecção dos nematoides pelos fungos nematófagos ocorre por pressão mecânica e atividade enzimática. O processo infeccioso é iniciado quando as hifas do fungo têm seu crescimento sobre a matriz gelatinosa (revestimento de quitina da massa de ovos dos nematoides), os fungos nematófagos penetram nessa massa gelatinosa, liberando um arsenal químico composto principalmente por quitinases que degradam a camada de quitina que envolvem os ovos. Após à dissolução da parede de quitina dos ovos, as hifas dos fungos liberam micotoxinas que inviabilizam o embrião dos nematoides e literalmente se alimentam dessa massa degradada dos ovos e dos embriões dos nematoides, proporcionando seu desenvolvimento micelial e posterior esporulação sobre os nematoides parasitados. Sendo assim, o parasitismo dos fungos nematófagos sobre os nematoides reduzem sua população e a taxa de reprodução, contribuindo com o controle biológico e aumentando o inoculo desses fungos no solo.

2. CONCLUSÃO

A utilização do controle biológico sobre fitopatógenos já é uma realidade na filosofia do manejo integrado de pragas e doenças na agricultura, pois a utilização massiva de agroquímicos vem agredindo cada vez mais o meio ambiente, aumentando a pressão da sociedade por alimentos mais seguros e livres de agroquímicos. Além disso, os agroquímicos são ferramentas que geram populações resistentes de fitopatógenos por contar com poucos mecanismos de ação sobre os alvos, ao contrário dos agentes de controle biológico que dificilmente vão gerar resistência dos fitopatógenos, pois seus mecanismos de ação são categoricamente mais diversificados e complexos.



M Ó D U L O 3

PRODUÇÃO DE FUNGOS EM GRANDE ESCALA

1. INTRODUÇÃO

No contexto atual do agronegócio brasileiro, o crescimento da agricultura combinada com exigência da sociedade pela redução da utilização do agroquímicos na produção de alimentos tem movimentado os mercados consumidores domésticos e estrangeiros, impulsionando as pesquisas para o desenvolvimento de produtos à base de microrganismos benéficos contra pragas e doenças de plantas. Dentre os agentes de controle biológico mais utilizados, os fungos entomopatogênicos e os fungos com atividade biofungicidas ou bionematicida desempenham um papel importante para o manejo de doenças e pragas de plantas. Esses microrganismos são encontrados naturalmente infectando pragas ou parasitando outros fungos fitopatogênicos. Dessa forma, uma maneira de ampliar a utilização desses microrganismos benéficos, e produzi-los em larga escala, consiste em produzi-los em substratos sólidos ou em meios de cultura artificiais.

Nas últimas décadas, os fungicidas e inseticidas químicos se tornaram a principal ferramenta dos agricultores para controlar os danos causados por pragas e microrganismos causadores de doenças de plantas. Por mais de cem anos, os cientistas estudaram várias espécies de fungos biocontroladores de fitopatógenos e pragas de plantas, e o papel desses organismos no meio ambiente tem sido muito específico.

O manejo biológico tem sido considerado uma importante ferramenta no manejo integrado de pragas e doenças de plantas e é uma estratégia ecologicamente favorável em comparação com o manejo químico convencional. Nesta abordagem, os fungos controladores de doenças de plantas e entomopatogênicos são empregados no manejo das populações de pragas e fitopatógenos, consequentemente, reduzindo seus danos em diferentes agroecossistemas (Ingliš et al., 2001).

O uso de fungos no controle de pragas e fitopatógenos agrícolas dependem de diferentes fatores, incluindo a capacidade de produzir altas concentrações de propágulos a um custo razoável. Atualmente existem basicamente dois métodos de produção de fungos: fermentação em estado sólido e a fermentação líquida submersa.

2. FERMENTAÇÃO SÓLIDA DE FUNGOS

Sistemas de produção industrial em fermentação bifásica em estado sólido de fungos tem como princípio a produção do inóculo em meio líquido, composto por hifas e blastosporos que posteriormente é transferido para substratos sólidos para aumentar a produção de conídios. Ainda hoje, em produções de fungos com baixa industrialização, o método monofásico de multiplicação de fungos é muito utilizado. Esse método não contempla a produção de inóculo em meio líquido, o inóculo é produzido diretamente em meio sólido (grãos ou meio de cultura sólido), é composto basicamente por esporos que posteriormente são extraídos e transferidos diretamente para o substrato sólido. Os esporos transferidos para o substrato na produção sólida podem levar até 24 horas para germinar e iniciar seu crescimento, reduzindo a esporulação no tempo final de crescimento. Na produção sólida em sistema bifásico, o inóculo líquido fúngico é transferido para o substrato sólido e seu crescimento sobre o substrato é imediato, pois o micélio não necessita do tempo de germinação que os esporos precisam, ele cresce e inicia a colonização imediatamente, resultando em maior esporulação no tempo final de crescimento.

A diferença da produtividade dos fungos produzidos pelo sistema monofásico e bifásico pode ser até 10 vezes para a produção bifásica. Outra vantagem da produção em sistema bifásico é a redução da contaminação por outros microrganismos, visto que o micélio líquido apresenta alta taxa de crescimento no substrato sólido, sendo mais competitivo que os contaminantes que porventura possam ser trazidos pelo ar. Além disso, esse processo garante uma colonização uniforme do substrato sólido, resultando em fungos com crescimento homogêneo.

Atualmente, os substratos sólidos mais utilizados para a produção de fungos em escala industrial é o arroz parboilizado (Figura 11) e em segundo lugar o milheto. Produções menos tecnificadas podem utilizar resíduos agroindústrias como o bagaço de cana e bagaço de banana, entretanto esses substratos possuem poucos nutrientes, baixa homogeneidade das partículas e presença de muitas impurezas que comprometem a produtividade na esporulação dos fungos de interesse. Para se ter uma ideia, uma produção industrial de esporos de fungos em larga pode variar entre 10^{10} a 10^{11} esporos por grama, já uma produção menos tecnificada pode alcançar valores entre 10^8 a 10^9 esporos por grama. Condições nutricionais

adequadas durante o crescimento dos fungos tendem a favorecer a acumulação de reservas endógenas apropriadas, de forma que os esporos recém-formados apresentem qualidades vantajosas ou adequadas.



Figura 11. Produção de *Beauveria bassiana* em arroz parboilizado.

A decisão em usar arroz parboilizado ou milho e estratégico para a indústria, a taxa de esporulação dos fungos no arroz parboilizado geralmente é maior, principalmente pela maior quantidade de nutrientes, maior pureza e homogeneidade no tamanho dos grãos de arroz, permitindo melhor nutrição e aeração para o desenvolvimento dos fungos. Quanto à de fungos com milho, esse grão apresenta menor pureza, aeração, homogeneidade no tamanho dos grãos, e menor quantidade de nutrientes em relação ao arroz parboilizado, podendo comprometer a esporulação do fungo.

Para a produção de fungos em substrato sólido, outros fatores para o sucesso da produção dos fungos são de grande importância para a produção de esporos. Dentre esses fatores, a temperatura de cultivo, troca gasosa, secagem do substrato colonizado, extração dos esporos, armazenamento e formulação são cruciais para o sucesso na produção de esporos.

Após a transferência do inóculo para os substratos sólidos, a manutenção da temperatura do ambiente de crescimento deve respeitar a temperatura ótima do crescimento do fungo. Essa temperatura pode variar de acordo com o microrganismo produzido, que geralmente gira em torno de 25°C. Se a temperatura estiver mais baixa que a temperatura ideal, a tendência é o subdesenvolvimento dos fungos, levando ao atraso ou até a perda da produção. Já se a temperatura estiver mais alta, os fungos também vão apresentar subdesenvolvimento e abrir a possibilidade da contaminação por bactérias, levando à perda da produção.

A troca gasosa é indispensável para a produção dos fungos, pois quando eles estão em crescimento, metabólitos gasosos são produzidos por eles, esses metabólitos são tóxicos para seu crescimento e o reflexo na produção é o subdesenvolvimento dos fungos e baixa produção de esporos. Esse caso é bem perceptível, principalmente na produção de *Trichoderma*, alguns isolados podem produzir centenas de gases tóxicos, como o 6PAP, esse metabólito tem efeito fungicida e pode reduzir o desenvolvimento e a esporulação do *Trichoderma* caso não seja removido do ambiente.

Em relação à secagem do substrato colonizado pelos fungos (Figura 12), existe um ponto de atenção. A secagem deve reduzir a umidade do substrato para 6 a 12%, esse processo pode ser feito através de máquinas que reduzem a umidade pelo calor seco através de resistências ou por equipamentos compostos por sílica. Ambos os equipamentos podem elevar consideravelmente a temperatura do ambiente, podendo inativar ou até matar os esporos, inviabilizando toda a produção do fungo. Em relação à umidade dos esporos, o ponto de atenção é a umidade de extração, se os esporos apresentarem umidade superior a 13%, o processo de extração será comprometido, pois os esporos úmidos ficam aderidos ao substrato ocasionando perda de esporos totais, outro ponto é a viabilidade dos esporos úmidos, se eles apresentarem a umidade superior a 13%, sua viabilidade será severamente comprometida que vai refletir no tempo de prateleira do futuro produto formulado.



Figura 12. Arroz seco com 10% de umidade antes e depois da extração dos esporos.

Após a secagem do substrato colonizado, outra etapa importante é a extração de esporos (Figura 13). Há inúmeros métodos de extração de esporos, uma delas é o peneiramento, esse método consiste em extrair os esporos por peneiramento em grandes peneiras industriais. Outro equipamento muito utilizado é o extrator de esporos por aspiração, esse método consiste na utilização de grandes aspiradores industriais para sugar os esporos. Ambos os métodos são eficientes para extração de esporos, o único ponto de atenção é o controle da temperatura de extração pelos equipamentos, pois como já dito, altas temperaturas podem inativar ou matar os esporos.

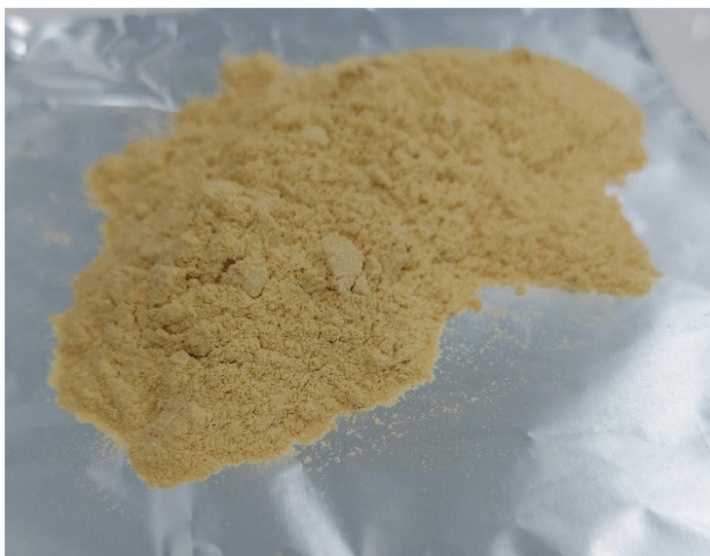


Figura 13. Esporos de *Pochonia chlamydosporia* extraídos por peneiramento do substrato sólido seco e colonizado pelo fungo.

A armazenagem dos esporos extraídos deve ser em temperaturas baixas, com variação de - 5 a 25°C, dependendo do fungo. Oscilações constantes na temperatura de armazenamento podem depreciar a qualidade dos esporos, reduzindo sua viabilidade.

A formulação do produto com base nos esporos é considerada um dos mais críticos de todo o processo de produção de fungos. Atualmente no mercado a maioria das formulações envolvendo fungos compreendem as formulações oleosas, pó molhável e grânulos dispersíveis. O estudo das formulações exige a percepção de mistura de matérias inertes, conservantes, emulsificantes e estabilizantes. Todos os produtos envolvidos nas formulações devem ser compatíveis com os fungos a fim de manter a viabilidade dos propágulos para ampliar seu tempo de prateleira e manter as características infectivas dos fungos intactas por um tempo definido. A tecnologia de aplicação também é um fator importante no desenvolvimento da formulação, ela não deve trazer transtornos quando vai para o campo, como por exemplo no entupimento de bicos dos pulverizadores agrícolas. Os materiais mais utilizados nas formulações de fungos são: óleos vegetais, rochas moídas como zeólita e bentonita, açúcares como a maltodextrina e conservantes alimentícios. Todas as matérias primas envolvidas nas formulações estão disponíveis nas especificações do Ministério da Agricultura.

Outro método de produção de fungos é pela fermentação líquida submersa, esse processo consiste em produzir os fungos apenas em meio de cultura líquido com aeração controlada. A composição dos meios de cultura líquidos são os mais diversos possíveis e pode ter variações para cada tipo de fungo produzido. Os materiais mais utilizados são: açúcar convencional, dextrose, melaço de cana, extrato de levedura, milhocina, dentre outros.

Para a obtenção do sucesso na fermentação líquida de fungos, é importante delinear a relação entre carbono e nitrogênio e adição de vitaminas nos meios de cultura, o equilíbrio desses componentes são indispensáveis na produção das estruturas fúngicas e seus metabólitos em meio líquido.

As estruturas fúngicas que podem ser produzidas em meio líquido são hifas, microescleródios, conídios submersos, blastosporos, clamidósporos e metabólitos. Os principais fungos produzidos em fermentação líquida submersa são os entomopatógenos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *C. fumosorosea*. Essas espécies caracterizam-se pela produção de hifas, metabólitos, blastosporos, em meio líquido. Esses atributos produzidos em meio líquido são responsáveis pelo controle de pragas em lavouras.

Os blastosporos são estruturas infectivas às pragas agrícolas produzidas por fragmentação e diferenciação do micélio vegetativo em meio líquido, com morfologia semelhante a das leveduras. Os blastosporos penetram na parede das pragas por parasitismo direto. Em relação às hifas, existem poucos estudos sobre sua propriedade infectiva em insetos. A produção de metabólitos é um mecanismo de ação dos fungos, principalmente os produzidos em meio líquido. Esses metabólitos podem ser tóxicos para as pragas de plantas, auxiliando os propágulos dos fungos no manejo das pragas.

Atualmente existe grande diversidade de trabalhos publicados sobre a produção líquida de entomopatógenos, assim essa metodologia já vem sendo utilizada a décadas por agricultores, principalmente pelos produtores de cana-de-açúcar para o combate da broca e a cigarrinha da cana de açúcar. O sucesso da produção em meio líquido dos fungos entomopatogênicos é a produção de poucas hifas, produção de metabólitos tóxicos contra pragas e a produção de blastosporos. Essas características permitem uma satisfatória aplicação desses bioprodutos líquidos em campo, reduzindo as chances de entupimento dos bicos de pulverização dos equipamentos agrícolas disponíveis para os agricultores.

Outros fungos também estão sendo estudados na produção líquida em larga escala, entretanto, com menos sucesso em relação à produção líquida dos entomopatógenos. Ainda pouco estudado em produção líquida em escala industrial, o *Trichoderma* é um grande desafio para a produção líquida industrial em larga

escala. Existem diversos trabalhos científicos sobre esse assunto, mas a maior parte deles é em escala de laboratório. O desejo de produzir *Trichoderma* em larga escala vem de encontro às suas características benéficas para as plantas, ele é conhecido por controlar e parasitar fitopatógenos e promover o crescimento de plantas por diversos mecanismos de ação. Na produção do *Trichoderma* em meio líquido, encontramos diversos propágulos como hifas, esporos submersos, clamidósporos e microescleródios, bem como os metabólitos secundários, um grande arsenal químico contra os fitopatógenos. Diversos metabólitos de *Trichoderma* já foram descobertos, alguns exemplos são o ácido harzianico e a asperelina. Esses metabólitos são capazes de inibir o crescimento micelial de dezenas de fitopatógenos encontrados em todos os cultivos vegetais. Outro metabólito produzido pelo *Trichoderma* em meio líquido são os hormônios de crescimento vegetal que podem incrementar o porte das plantas refletindo em sua produtividade. Um dos principais hormônios produzidos pelo *Trichoderma* em meio líquido é o ácido indolacético. Os estudos atuais de produção de *Trichoderma* em meio líquido tem se mostrado satisfatório em relação à produção dos propágulos e metabólitos secundários, entretanto, sua produção gera um problema agrônômico, o *Trichoderma* cresce em meio líquido e produz uma quantidade massiva de hifas, dificultando as aplicações no campo com os maquinários agrícolas disponíveis no mercado. Essa alta produção de hifas em meio líquido, literalmente entopem os bicos de pulverização do maquinário agrícola, inviabilizando sua utilização no campo com os equipamentos disponíveis atualmente. Sendo assim, a multiplicação de *Trichoderma* para pulverização no campo devem caminhar para a redução do crescimento micelial, juntamente com a atualização das máquinas agrícolas para aplicação do *Trichoderma* produzido em meio líquido no campo.

A grande vantagem da produção de fungos em meio líquido é a redução do tempo de cultivo. A produção sólida de fungos pode levar de 7 a 20 dias de incubação, já os bioprodutos produzidos em meio líquido podem ser feitos em 120 horas ou até menos, dependendo do meio de cultura utilizado.



M Ó D U L O 4

PRODUÇÃO DE FUNGOS EM BIOFÁBRICAS “ON FARM”

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de fungos em biofábricas “On Farm” é realizado em sistema de batelada, ou seja, sem adição de outros insumos durante o processo, somente no início da multiplicação. Além disso, algumas variáveis, como pH e temperatura, não são totalmente controladas. Devido a impossibilidade de esterilização das biofábricas, na maioria dos casos, é imprescindível garantir uma eficaz sanitização do tanque de operação, assim como a qualidade dos principais insumos utilizados durante o processo de multiplicação: água, meio de cultura e inóculo.

2. SANITIZAÇÃO DO TANQUE E DAS PEÇAS

O tanque para que ocorra a multiplicação deve ser limpo, além de não conter contaminantes. Para isso, produtos sanitizantes devem ser utilizados, como ácidos e detergentes alcalinos, em todas as regiões que compõem a biofábrica. Além disso, é necessário a realização de limpeza mecânica para que sejam retirados resquícios de biofilmes e de biomassa proveniente de multiplicações anteriores.

As peças removíveis, como a torneira de amostragem, suspiro, mangueiras, *spray ball* e outros, devem ser limpos e sanitizados. A sanitização pode ser feita com ácidos ou bases.

3. ÁGUA DA MULTIPLICAÇÃO

A água utilizada para multiplicar fungos deve ser de boa procedência, sem partículas grosseiras ou solúveis e com a menor concentração de contaminantes possível. No entanto, em muitas regiões do Brasil não é possível obter essa condição devido à variabilidade qualitativa de fornecimento de água, sendo necessária a utilização de filtros e produtos que visam limpar a água e deixá-la livre de contaminantes.

4. MEIO DE CULTURA

O meio de cultura é muito importante para que se obtenha sucesso na multiplicação em biofábricas. A composição de nutrientes é de suma importância, assim como outras variáveis, como relação carbono/nitrogênio e o pH. Para cada espécie fúngica, assim como, para obtenção das células de interesse para a agricultura por meio da multiplicação "On Farm", é necessário um meio específico, isto é, com adequada fonte de carbono e nitrogênio, além de outros nutrientes essenciais, como vitaminas e sais minerais.

5. QUALIDADE DO INÓCULO

O inóculo utilizado nas biofábricas deve ser livre de contaminantes e com a concentração mínima aceitável (geralmente $1,0 \times 10^9$ UFC/g). O inóculo deve passar por um controle de qualidade, atestando a sua pureza e concentração.

6. MULTIPLICAÇÃO NAS BIOFÁBRICAS

A multiplicação nas biofábricas inicia-se com o processo de limpeza dos tanques. Após isso, a água da multiplicação pode ou não ser limpa, a depender das condições de pureza da água. Caso seja necessário, a água deve ser limpa com o uso de sanitizante e posteriormente neutralizada ou acidificada, a depender do tratamento realizado.

A depender do processo realizado, adiciona-se ou não antiespumante no início do processo. Após isso, o meio de cultura é adicionado, o pH é ajustado a depender da espécie fúngica a ser multiplicada, geralmente entre 5,5 e 7,0. Em seguida, ocorre a adição do inóculo no tanque. Além disso, parâmetros como temperatura, pH e OD devem ser, se possível, monitorados durante o processo de multiplicação. Para essas avaliações, além do controle de qualidade, deve-se retirar amostras durante a multiplicação pela torneira de amostragem.

O processo de multiplicação deve ser acompanhado por meio da visualização em microscópio para avaliação das estruturas fúngicas formadas durante o processo e plaqueamento da respectiva amostragem. O processo de multiplicação de fungos varia entre 3 e 4 dias, então, recomenda-se retirar amostras para a avaliação após 24h, 48h, 72h e 96h de multiplicação. Após a multiplicação, o processo é interrompido e o produto pode permanecer no tanque por alguns dias.

Atualmente, as principais espécies fúngicas produzidas em biofábricas on farm são: *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.



M Ó D U L O 5

CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE FUNGOS UTILIZADOS COMO BIOINSUMOS

1. DEFINIÇÃO E OBJETIVOS DO CONTROLE DE QUALIDADE

O controle de qualidade dos microinseticidas refere-se às responsabilidades e aos procedimentos conduzidos pelo fabricante objetivando-se garantir que o usuário final obtenha um produto cujo desempenho atenda suas expectativas e cujos parâmetros de avaliação estejam em conformidade com os padrões produtivos e as especificações dos órgãos regulamentadores.

2. QUALIDADE DA ESTIRPE A SER MULTIPLICADA

2.1. Seleção da estirpe

Dentre as responsabilidades do fabricante para a produção de micro pesticidas estão a seleção e a obtenção da cepa. A estirpe selecionada deve estar cadastrada no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), onde constam todas as pesquisas, experimentais ou teóricas, realizadas com patrimônio genético e onde devem ser realizados os procedimentos de Cadastro, Notificação de Produto Acabado, Termo de Remessa de Amostra e outros previstos na Lei 13.123 (Lei da Biodiversidade), que também traz os prazos para tais atos e penalidades pelo descumprimento de seus termos. Estando cadastrada no SisGen, a cepa pode ser obtida em Coleções de Culturas credenciadas e que seguem procedimentos operacionais padrão de conservação e preservação dos isolados para garantir critérios de qualidade tais quais pureza e vigor e monitorar a persistência e o comportamento do isolado.

2.2. Caracterização da estirpe

A caracterização do microrganismo que constituirá o mico pesticida é fundamental para o controle de qualidade. De tempos em tempos é necessário realizar a identificação do isolado quanto aos seus aspectos morfológicos, genéticos, fisiológicos e reprodutivos para fins de confirmação da espécie.

Anteriormente a identificação dos fungos era centrada apenas em caracteres morfológicos como forma, tamanho e cor das colônias e esporos, contudo, com o avanço da tecnologia e desenvolvimento de novas técnicas, outros critérios além dos critérios morfológicos passaram a ser utilizados para a classificação taxonômica desses microrganismos. Avaliações de comportamento em diferentes temperaturas e meios de cultivo, análises de isoenzimas e métodos moleculares, por exemplo, contribuíram para uma classificação mais assertiva dos fungos.

Embora sejam fundamentais, muitas das vezes os critérios genéticos e fisiológicos requerem equipamentos, reagentes e conhecimentos específicos, além disso, não sofrem alterações constantes, portanto, não são analisados com frequência. Por outro lado, os aspectos morfológicos podem ser avaliados rotineiramente devido a sua praticidade e simplicidade.

A caracterização morfológica pode ser dividida em aspectos macroscópicos e microscópicos. Na avaliação macroscópica realiza-se a avaliação da cor da colônia em si tanto no verso, Figura 14A, quanto no reverso, Figura 14B. Na avaliação microscópica, Figura 14C, realiza-se observações sobre as diferentes estruturas que o fungo pode apresentar: hifas, conidióforos e conídios.

Determinar a espécie do fungo avaliado com base em critérios puramente morfológicos só é possível em pouquíssimos casos, entretanto, aplicando as classificações retratadas na figura 15 é possível descrever os aspectos morfológicos e chegar ao gênero do fungo avaliado.

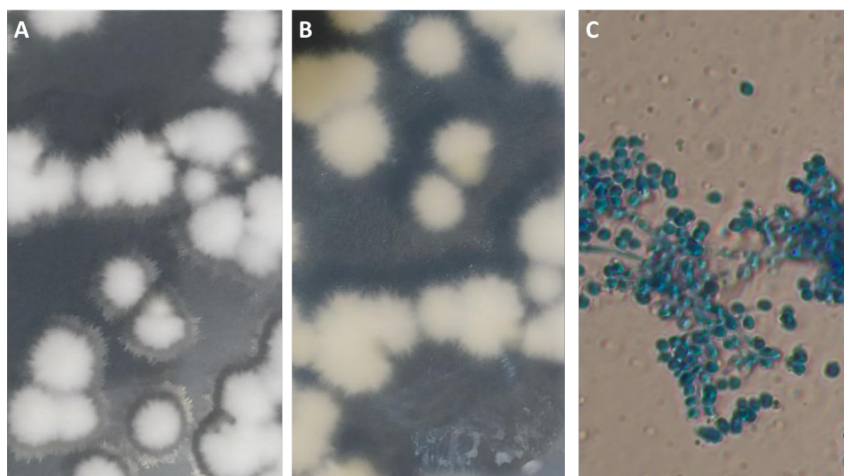


Figura 14. Colônia de *Beauveria bassiana*: verso (A) e reverso (B); Conidióforo e conídios de *B. bassiana*

TIPO DE COLÔNIA •Circular •Filamentosa •Fusiforme •Irregular •Puntiforme •Rizoide	TEXTURA •Algodonosas •Arenosas •Cremosas •Furfuráceas •Glabrosas •Membranosas •Penugentas •Veludosas	RELEVO •Convexa •Crateriforme •Elevada •Papilada •Plana •Rugosa	BORDA •Irregular •Regular	COLORAÇÃO •Carta de Munsell (2009) •Sistema de cores (RGB, HEX)
MORFOLOGIA DA HIFA •Filamentoso •Pseudofilamentoso •Unicelular	ESTRUTURA DA HIFA •Ausente •Falsas •Verdadeiras	ESPESSURA DA HIFA •Delgada •Espessa	PRESENÇA DE SEPTOS •Cenocítica •Septada	COLORAÇÃO •Demácias •Hialino
TAMANHO DO CONÍDIO •Macroconídio •Microconídio		FORMATO DO CONÍDIO •Circular •Clava •Encurvados •Espiralados •Estrela •Ovoide		

Figura 15. Características macro e microscópicas utilizadas na identificação morfológica de fungos.

3. QUALIDADE DO BIOINSUMO MULTIPLICADO

No Brasil, a adoção do controle de qualidade de bioinsumos tem crescido cada vez mais exigida, entretanto há uma certa carência de diretrizes padronizadas e metodologias confiáveis que reflitam de forma incontestável a qualidade dos bioinsumos. Existem diferentes protocolos de avaliação de um mesmo parâmetro, logo, não é possível realizar uma comparação assertiva de uma mesma amostra quando analisadas em laboratórios diferentes.

3.1. Análise morfológica

Os procedimentos utilizados nessa análise são os mesmos descritos no item 2.2.

3.2. Concentração de unidades formadoras de colônias

A determinação da concentração de unidades formadoras de colônias (UFC) é uma técnica de análise amplamente difundida que estima de maneira indireta a quantidade de propágulos viáveis presentes na amostra do microinseticida. Essa técnica é considerada indireta, pois nos cálculos de concentração considera colônias formadas por propágulos infectivos, como conídios e blastosporos, e não infectivos, como fragmentos de hifas.

Para realizar a análise de UFC retira-se uma amostra do produto com peso ou volume conhecido. Caso o produto seja sólido retira-se 1g como amostra de adiciona-se 10 mL de água destilada pura estéril ou, no caso de propágulos hidrofóbicos, água destilada estéril com espalhante adesivo (Tween 80 ou similar). Caso o produto seja líquido retira-se uma alíquota de 1 mL, porém não se adiciona água.

Em seguida, realiza-se sucessivas diluições da alíquota na proporção 1:10 utilizando o mesmo diluente empregado anteriormente. Esse processo é conhecido como diluição seriada. Após realizar a diluição seriada, espalha-se 100 µL de cada uma das diluições em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido, geralmente com antibióticos para evitar a proliferação de bactérias contaminantes. As placas são então incubadas a 23 °C até que seja possível realizar a contagem das colônias. Posteriormente, conta-se o número de colônias do fungo de interesse em cada placa e determina-se o número de colônias de interesse, realizando-se os seguintes cálculos para determinar o número de UFC por mL (Equação 1) ou g (Equação 2) do produto:

Número de colônias $\times D \times 10 =$ Número de UFC/mL (Equação 1)

Número de colônias $\times D \times 100 =$ Número de UFC/g (Equação 2)

...onde D é a diluição plaqueada.

A técnica para determinação da concentração de UFC está ilustrada na Figura 16.

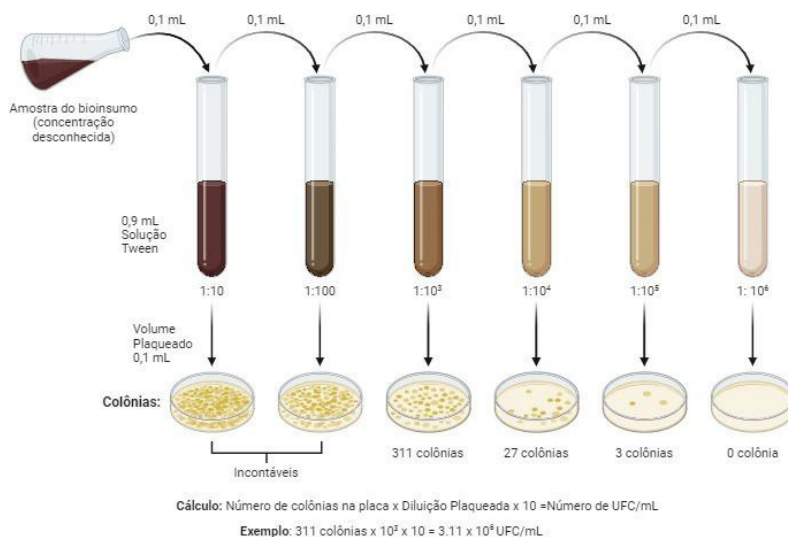


Figura 16. Representação da análise para determinação da concentração de unidades formadoras de colônia (UFC) de um bioinsumo.

3.3. Concentração de propágulos totais

A determinação da concentração de propágulos totais é uma das técnicas mais utilizadas no controle de qualidade de bioinsumos baseados em fungos. Essa técnica permite calcular diretamente a quantidade de propágulos por mL ou g do produto com o auxílio de uma câmara de contagem e microscópio.

Para determinar a concentração de propágulos totais retira-se uma amostra do produto com peso ou volume conhecido. Caso o produto seja sólido retira-se 1g como amostra de adiciona-se 10 mL de água destilada pura estéril ou, no caso de propágulos hidrofóbicos, água destilada estéril com espalhante adesivo (Tween 80 ou similar). Caso o produto seja líquido retira-se uma alíquota de 1 mL, porém não se adiciona água.

Em seguida, realiza-se sucessivas diluições da alíquota na proporção 1:10 utilizando o mesmo diluente empregado anteriormente. Esse processo é conhecido como diluição seriada. Após realizar a diluição seriada, adiciona-se 10 μ L de uma das diluições em cada campo de contagem da câmara de Neubauer e, utilizando um microscópio, realiza-se a contagem dos propágulos dispostos nas regiões delimitadas na câmara. Após determinar o número de propágulos de interesse, realiza-se os cálculos abaixo para determinar o número de propágulos por mL (Equação 3) ou g (Equação 4) do produto.

Número de propágulo $\times D \times Fc =$ Número de propágulos/mL (Equação 3)

Número de propágulos $\times D \times Fc \times 10 =$ Número de propágulos/g (Equação 4)

....onde D é a diluição e Fc é o fator de correção do campo da câmara de Neubauer no qual se realizou a contagem.

A técnica para determinação da concentração de propágulos totais está ilustrada na Figura 17.

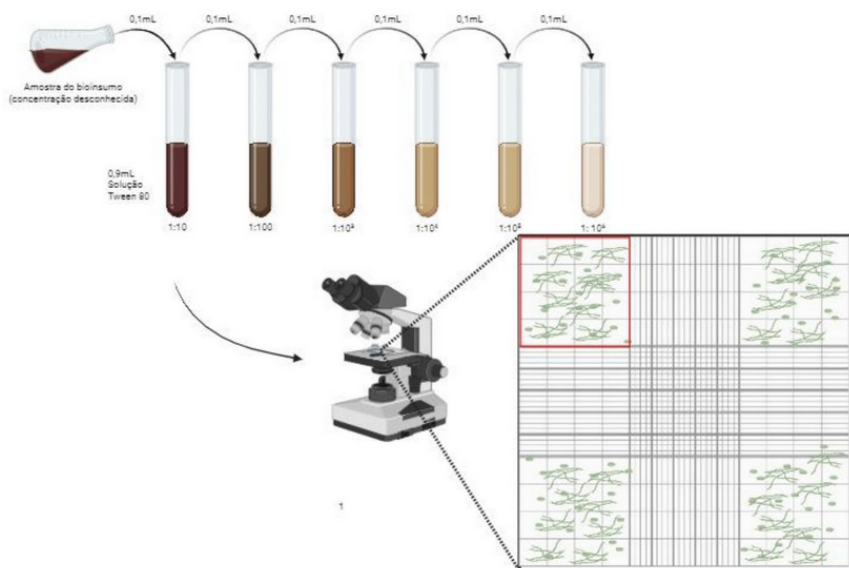


Figura 17. Representação da análise para determinação da concentração de propágulos totais de um bioinsumo.

3.4. Concentração de propágulos viáveis

Assim como a concentração de propágulos totais, a concentração de propágulos viáveis é uma técnica de análise direta. Essa técnica permite determinar a porcentagem da concentração total de propágulos capaz de germinar em meio de cultura após incubação.

Nesta análise, inicialmente, determina-se a concentração de propágulos totais (ver tópico 6.3.3). Em seguida, a partir do valor da concentração de propágulos totais encontrado, prepara-se uma suspensão com concentração de 1×10^6 de propágulos/mL. Adiciona-se um volume de 150 μL nos quadrantes centrais da placa rodac contendo meio de cultura sólido, geralmente com antibióticos para evitar a proliferação de bactérias contaminantes, e aguarda-se que a alíquota evapore. As placas são então incubadas a 23°C por um período de 20 a 24 horas. Posteriormente, determina-se o número de propágulos germinados e não germinados e calcula-se a porcentagem referente.

A técnica para determinação da concentração de propágulos viáveis está ilustrada na Figura 18.

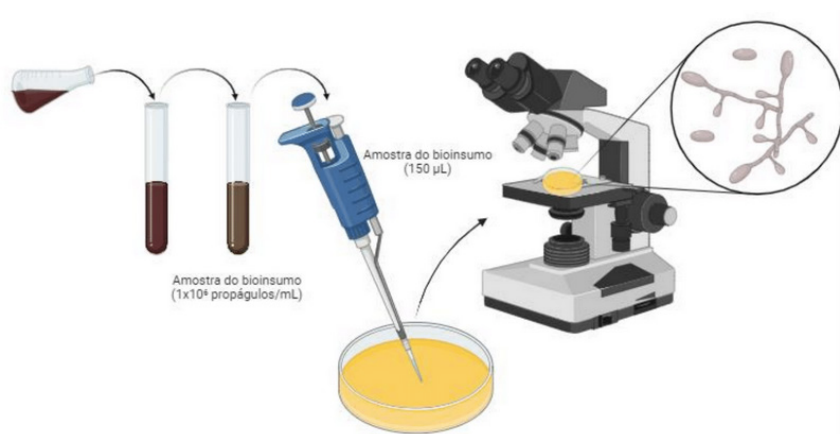


Figura 18. Representação da análise para determinação da concentração de propágulos viáveis de um bioinsumo.

3.5 Vigor conidial

O vigor conidial está relacionado com a capacidade dos conídios germinarem rapidamente e, conseqüentemente, apresentarem um maior potencial infectivo.

Essa análise segue os mesmos passos da análise da concentração de propágulos viáveis mencionada anteriormente (ver tópico 6.3.4), porém, previamente ao processo de diluição, é necessário realizar a secagem dos conídios em dessecadores para teores de água $\leq 8\%$. Os conídios são considerados vigorosos quando o tubo germinativo ultrapassa a largura do conídio germinado. Conídios mortos ou intumescidos não são considerados no cálculo do vigor.

A técnica para determinação do vigor conidial está ilustrada na Figura 19.



Figura 19. Representação da análise para determinação do vigor conidial de um bioinsumo.

3.6. Bioensaios

O bioensaio é uma ferramenta para avaliar o potencial de controle de um isolado fúngico sobre uma praga-alvo fornecendo parâmetros bastante informativos, pois, na prática, consegue correlacionar o sucesso do micopesticida em sistemas reais quando empregado pelo usuário.

Se tratando de fungos entomopatogênicos, cujo controle de pragas é realizado via contato, os bioensaios são realizados pulverizando os insetos com uma suspensão de propágulos infectivos de concentração conhecida por um tempo determinado. Em seguida, os insetos são individualizados e monitorados. Os insetos mortos são incubados em uma câmara úmida com o intuito de se confirmar a mortalidade pelo fungo e então obter a taxa de mortalidade da praga mediante a aplicação do fungo.

Ao se realizar um bioensaio, o delineamento experimental, a inclusão de controles, um número significativo de insetos por repetição/tratamento e análise estatística adequada são fundamentais para a obtenção de resultados confiáveis. Além disso, os bioensaios devem ser realizados em ambientes adequados e sob condições controladas e padronizadas para corroborar os resultados obtidos. Dessa forma, ao realizar um bioensaio, o manipulador deve atentar-se, dentre outros, aos seguintes pontos:

- Delimitar o número de indivíduos por tratamento ou por repetição;
- Garantir a uniformidade dos indivíduos testados quanto ao tamanho, condição física, dentre outros;
- Certificar-se que a dieta oferecida durante a condução do bioensaio não contenha fungicidas e/ou contaminações. Em caso de dieta natural não se deve ofertar alimento transgênico;
- Certificar-se previamente da viabilidade dos propágulos utilizados;
- Garantir que a padronização dos parâmetros do processo para todas as repetições tais como: concentração dos propágulos, volume e tempo de pulverização e temperatura e tempo de monitoramento e incubação.

Diferentes insetos requerem, por vezes, diferentes metodologias de bioensaios. Um bioensaio de *Spodoptera frugiperda*, por exemplo, utiliza-se a seguinte metodologia (Figura 20):

- Monte o delineamento experimental. Para cada tratamento avaliado são realizadas 4 repetições com 16 insetos em 3º ínstar por repetição;
- Disponha as lagartas de cada repetição em uma placa de Petri com uma dieta sem fungicida por duas horas;
- Coloque a placa em uma torre de Potter e pulverize com a amostra do tratamento. Para tratamento com propágulos fúngicos pulverize 1 mL da suspensão com concentração de 1×10^8 propágulos/mL. Para o tratamento controle pulverize 1 mL de Solução Tween 80 [0,05%].
- Após 30 minutos, individualize as lagartas de cada tratamento e incube-as em BOD a 26°C por 14 dias. Troque a dieta a cada dois dias.
- Transfira os indivíduos mortos para uma câmara úmida e incube-os a 26°C.
- Aguarde 7 dias para observar a esporulação e confirmar a mortalidade do inseto pelo fungo.

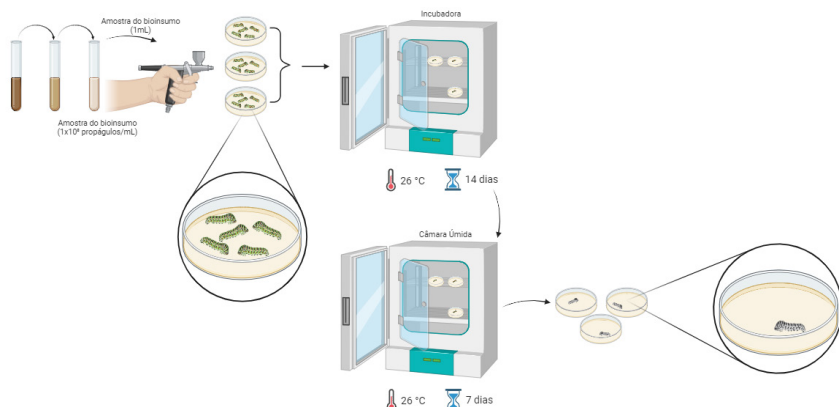


Figura 20. Representação de um bioensaio para determinar o potencial fúngico contra lagartas.

3.7. Parâmetros físico-químicos

Além das análises microbiológicas, as análises físico-químicas fazem parte do controle de qualidade dos bioinsumos. Por meio dessas análises é possível determinar parâmetros intrínsecos do produto tais como pH, solubilidade, molhabilidade, miscibilidade e densidade.

Diferentemente do que acontece com os parâmetros microbiológicos, esses parâmetros podem ser determinados realizando os procedimentos padrões de análises indicados por órgãos responsáveis por meio normativas técnicas, tais quais as normativas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Entretanto, por serem produtos biológicos, ou seja, por possuírem ingrediente ativo vivo, é necessário ter consciência que nem sempre os valores obtidos estarão em concordância com as especificações previamente estabelecidas.

3.8. Vida de prateleira

A vida de prateleira refere-se ao período em que o produto mantém suas características e especificações quando armazenado na embalagem original e conforme as instruções e condições estabelecidas pelo fabricante.

Os testes realizados são os mesmos apresentados anteriormente e são realizados periodicamente para determinar o prazo de validade dos produtos.



LITERATURA CITADA

ABRAF. Associação brasileira de produtores de florestas plantadas. Anuário Estatístico da ABRAF, p. 80. 2005.

ADAMS, P.B. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. Annual Review of Phytopathology, v.28. p.59-72, 2012

ADIKO, A. Biological control of Meloidogyne incognita with Paecilomyces lilacinus. M.S. thesis. North Carolina State University, Raleigh. 1984

AGRIOS, GN. Plant pathology. 5th ed. San Diego: Elsevier; 2005.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 5. ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres, 2018. v. 1. 573 p.

ANWAR, W.; JAVED, M.A.; SHAHID, A.A.; NAWAZ, K.; AKHTER, A.; REHMAN, M.Z.U.; HAMEED, U.; IFTIKHAR, S.; HAIDER, M.S. Chitinase genes from *Metarhizium anisopliae* for the control of whitefly in cotton. Royal Society Open Science, v.6, n.8, p.190412, 2019.

BARRANCO-FLORIDO, J. E., R. ALATORRE-ROSAS, M. GUTIÉRREZ-ROJAS, G. VINIEGRAGONZÁLEZ, AND G. SAUCEDO-CASTAÑEDA. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. Enzyme Microb. Tech. 30: 910-915.

BAILEY JÁ. Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions. Springer-Verlag, Berlin, German. 1985

BENÍTEZ T, RINCÓN AM, LIMÓN MC CODÓN AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7:249-260. 2004

BETTIOL W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Org.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna. Embrapa - CNPMA. 1991

BETTIOL W, GHINI R. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Ceres. 3 ed. São Paulo. 1995

BOOMSMA, J.J.; JENSEN, A.B.; MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. Annual Review of Entomology, v.59, p. 467-485, 2014.

CARVALHO FILHO, M. R. DE. (2013). Identificação e relações filogenéticas, potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro [Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília].

CASSIOLATO AMR. Ecologia de fungos fitopatogênicos formadores de escleródios. In: Melo IS, Azevedo JL. Ecologia Microbiana. Jaguariúna. Embrapa – CNPDA. 1998

CHET I., INBAR J., HADAR I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Soderstrom B (eds) The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. Springer-Verlag, Berlin. 1997

CIANCIO, A.; COLAGIERO, M.; PENTIMONE, I.; ROSSO, L. C. Formulation of *Pochonia chlamydosporia* for plant and nematode management. In: ARORA, N. K.; MEHNAZ, S.; BALESTRINI, R. (eds.). Bioformulations: for Sustainable Agriculture. New Delhi: Springer, jun. 2016.

CONSOLO VF, MONACO CI, CORDO CA, SALERNO GL. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28:1389-1398. 2012

DACKMAN, C., I. CHET AND B. NORDBRING-HERTZ. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera shachtii*: Infection and enzymatic activity. Microbiol. Ecol., 62:201- 208. 1989

DE ALMEIDA, José Eduardo Marcondes. Biofábricas para produção de micopesticidas no Brasil: oportunidades de negócio e inovações. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, v. 3, n. 3, p. 2444-2557, 2020.

DE FARIA, M. R. et al. Controle de qualidade de produtos comerciais à base de fungos para o manejo de invertebrados (insetos, ácaros, nematoides) em sistemas agropecuários. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2022.

DENNIS C, WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. Transactions British Mycological Society 57:363-369. 1971

DI PIERO, M.; FELIPINI, RB; Simpósio sobre Controle Biológico na Agricultura (2022 : Florianópolis) Anais do Simpósio sobre Controle Biológico na Agricultura (COBIAGRI) Florianópolis : UFSC, 2022.

DUNN, M. T.; SAYRE, R. M.; CARREL, A. & WERGIN, W. P. Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. SEM/1982/III. Scanning Electron Microscopy. Inc. Chicago, IL. 1351- 1357. 1982

HARMAN GE *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. Phytoparasitica 39:103-108. 2004

HARMAN GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96:190-194. 2006

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease. 84: 377-93, 2000.

HASAN A, WALKER F, SCHÖNE J, BUCHENAUER H. Antagonistic effect of 6-pentyl alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. Journal of Plant Diseases and Protection 114:62-68. 2006

HORSFALL JG, COWLING EB. Plant Disease: An Advanced Treatise. Vol. 2. How Diseases Develop in Populations. Academic Press, New York. 1980

HOWELL CR. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts, Plant Disease Vol. 87 No. 1. 2003

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In Fungi as Biocontrol Agents; Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 2001; pp. 23–69

JACKSON M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 19:180-187, 1997.

JACOBS H., GRAY S.N.Crump DH Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. Mycol Res 107:47-56. 2003

JATALA, P. Biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review Phytopathology. 24:453-489.1986

JARONSKI, S.T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. BioControl 55, 159–185 (2010). <https://doi.org/10.1007/s1>

JELEŃ, H., BŁASZCZYK, L., CHEŁKOWSKI, J. ET AL. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. Mycol Progress 13, 589–600 (2014).0526-009-9248-3

JENKINS, N. E.; GOETTEL, M. S. Methods for mass-production of microbial control agents for grasshoppers and locusts. In: GOETTEL, M. S.; JOHNSON, L. (Eds.). Microbial control of grasshoppers and locusts. [Berkeley]: Entomological Society of Canada, 1997. p. 37-48. (Memoirs of the Entomological Society of Canada, n. 171).

KERRY, B. R.. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematode. Journal of Nematology, v. 22, n. 45, p. 621-631, 1990.

KUBICEK CP, BISSETT J, DRUZHININA I, KULLNIG-GRADINGER C, SZAKACS G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. Fungal Genetics Biology 98:310-319. 2003

LIMA, G.; DE CURTIS, F.; PIEDIMONTE, D.; SPINA, A.M.; DE CICCIO, V. Activity of antagonists and natural compounds against powdery mildew of cucurbits: Laboratory and field trials. J. Plant Pathol. 2002

LIU, D.; SMAGGHE, G.; LIU, T. Interactions between entomopathogenic fungi and insects and prospects with glycans. Journal of Fungi, v.9, n.5, p.575, 2023.

MACIÁ-VICENTE, J. G.; JANSSEN, H. B.; MENDGEN, K. & LOPEZ-LLORCA, L. V. Colonization of barley roots by endophytic fungi and their 44 reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Can J. of Microbiol. 54:6000-6009. 2008

MACIÁ-VICENTE, J. G.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A.; JANSSEN, H. B. & LÓPEZ-LLORCA, L. V. Colonization of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. Ann. Appl. Biol. 155(3):391-401.2009b

MANTZOUKAS, S.; CHONDROGIANNIS, C.; GRAMMATIKOPOULOS, G. Effects of three endophytic entomopathogens on sweet sorghum and on the larvae of the stalk borer *Sesamia nonagrioides*. Entomologia Experimentalis et Applicata, v.154, 78–87, 2015.

MANTZOUKAS, S.; KITSIOU, F.; NATSIOPOULOS, D.; ELIOPOULOS, P.A. Entomopathogenic fungi: Interactions of Applications. Encyclopedia, v.2, p.646–656, 2022.

MELO, I.S. Trichoderma e Gliocladium como bioprotetores de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.4, p.261-295, 1996.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. Trichoderma: uso na agricultura. 1. ed. Brasília: Embrapa Soja, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-depublicacoes/-/publicacao/1117296/trichoderma-uso-na-agricultura>. Acesso em: 22 Mai. 2022.

MONDAL, S.; BAKSI, S.; KORIS, A.; VATAI, G. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering, v.18, n.2, p.85-99, 2016.

OLIVEIRA, D. G. P.; PAULI, G.; MASCARIN, G. M.; DELALIBERA, I. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. Journal of Microbiological Methods, v.119, p.44-52, 2015.

REINO JL, GUERRERO RF, HERNÁNDEZ-GALA R, COLLADO IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma. Phytochemistry Reviews 7:89-123. 2008

ROSA DR, HERRERA CJL. Evaluation of *Trichoderma* sp. as biocontrol agents against avocado root rot. Biological Control 51:66-71. 2009

ROY, H.E.; STEINKRAUS, D.; EILENBERG, J.; HAJEK, A.E.; PELL, J.K. Bizarre interactions and end-games: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Annual Review Entomology, v.51, p.331-357, 2006.

SANTIAGO, D. C. et al. Selection of isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson to control *Meloidogyne paranaensis* in tomato. Ciência Rural, v. 36, n. 4, 2006.

STEYAERT JM, RIDGWAY HJ, ELAD Y, STEWART A. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of Trichoderma. New Zeal J Crop Hortic Sci 31:281-291. 2003

TSENG, M.N.; CHUNG, C.L.; TZEAN, S.S. Mechanisms relevant to the enhanced virulence of a dihydroxynaphthalene-melanin metabolically engineered entomopathogen. PLoS ONE, v.9, n.3, p. e90473, 2014.

VAN DRIESCHE RG, BELLOWS JR. Biological Control. Ed. Chapman & Hall, London. bar J, Chet L. (1992). Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin coated nylon fibers. J Bacteriol 74:1055-1059. 1996

VAN DRIESCHE RG, BELLOWS JR. Biological Control. Ed. Chapman & Hall, London. 1996

VEGA, F.E., DOWD, P.F. The role of yeasts as insect endosymbionts. In: VEGA, F.E.; BLACKWELL, M. (Eds.). Insect Fungal Associations: Ecology and Evolution. New York: Oxford University Press, 2005. p.211-243.

VELUSAMY P, IMMANUEL JE, GNANAMANICKAM SS, THOMASHOW L. Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4- diacetylphloroglucinol. Can J Microbiol 52:56-65. 2006

VINALE F, SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI EL, MARRA R, WOO SL, LORITO M. Trichoderma–plant–pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40:1-10. 2008

VITERBO A, HORWITZ BA, Mycoparasitism. In: Borkovich K, Ebbole D (ed.) Cellular and molecular biology of filamentous fungi. ASM Press, Washington, DC. 2010

YADAV, B.; SINGH, U.B.; MALVIYA, D. Nematophagous Fungi: Biology, Ecology and Potential Application. In: SINGH, U.B., KUMAR, R., SINGH, H.B. (eds) Detection, Diagnosis and Management of Soil-borne Phytopathogens. Springer, Singapore. 2023



SOBRE OS AUTORES

ROSE GOMES MONNERAT: Bióloga, Ph.D. em Agronomia. Diretora de Pesquisa e Desenvolvimento da SoluScience, SoluBio Tecnologias Agrícolas S/A

MARCELO TAVARES DE CASTRO: Engenheiro Florestal, Ph.D. em Agronomia. Gerente de Pesquisa e Desenvolvimento da SoluScience, SoluBio Tecnologias Agrícolas S/A

SANDRO COELHO LINHARES MONTALVÃO: Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia. Gerente de Pesquisa e Desenvolvimento da SoluScience, SoluBio Tecnologias Agrícolas S/A

ANTÔNIA DÉBORA CAMILA DE LIMA FERREIRA: Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Agronomia. Coordenadora de Pesquisa e Desenvolvimento da SoluScience, SoluBio Tecnologias Agrícolas S/A

IZABELA NUNES DO NASCIMENTO: Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Agronomia. Coordenadora de Pesquisa e Desenvolvimento da SoluScience, SoluBio Tecnologias Agrícolas S/A

GABRIELA TEODORO ROCHA: Engenheira Florestal, Ph.D. em Agronomia. Especialista de Pesquisa e Desenvolvimento da SoluScience, SoluBio Tecnologias Agrícolas S/A

FLÁVIA MELO MOREIRA: Engenheira Florestal, Ph.D. em Agronomia

MATHEUS FELIPE CELESTINO: Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia, Mestre em Biotecnologia. Analista de Pesquisa e Desenvolvimento da SoluScience, SoluBio Tecnologias Agrícolas S/A

MAGNO RODRIGUES DE CARVALHO FILHO: Biólogo, Ph.D. em Fitopatologia

PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE
BIOINSUMOS
À BASE DE BACTÉRIAS E FUNGOS PARA USO
NA AGRICULTURA



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br

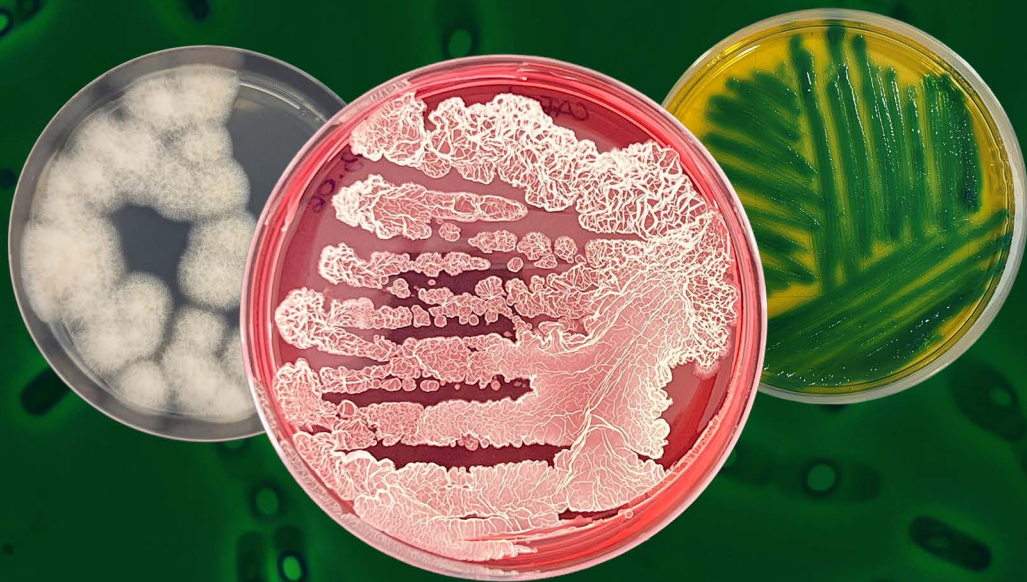


[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br

PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE
BIOINSUMOS
À BASE DE BACTÉRIAS E FUNGOS PARA USO
NA AGRICULTURA



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br