

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DEXTROSE E EXTRATO DE LEVEDURA NO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *LECANICILLIUM LECANII* EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

I.M. Wenzel, J.E.M. Almeida, E.R. Cardoso

Instituto Biológico, Centro Experimental Central do Instituto Biológico, CP 70, CEP 13001-170, Campinas, SP, Brasil. E-mail: jemalmeida@biologico.sp.gov.br

RESUMO

Lecanicillium lecanii é um entomopatógeno capaz de controlar várias pragas como afídeos, coccídeos e aleirodídeos. Na Europa é utilizado em culturas como pepino, tomate, ornamentais entre outras. Para que seja eficientemente utilizado no Brasil há necessidade de adaptá-lo às condições brasileiras de cultivo assim como produzi-lo em grandes quantidades. Assim, este trabalho objetivou avaliar diferentes concentrações de dextrose (D) e extrato de levedura (E.L.) em g/L, 60 g D – 60 g EL, 60 g D – 40 g EL, 60 g D – 20 g EL, 60 g D – 10 g EL, 40 g D – 40 g EL, 40 g D – 20 g EL, 40 g D – 10 g EL, 20 g D – 60 g EL, 20 g D – 40 g EL, sendo a dextrose a fonte de C e o extrato de levedura a fonte de N, na produção de massa seca e esporulação deste fungo. O fungo foi cultivado até o décimo dia, com avaliação a cada 2 dias. Verificou-se que combinações mais próximas de D-EL foram mais eficientes em relação à massa seca micelial e 8 dias de cultivo são suficientes para a produção máxima de conídios. Este fungo é exigente em carbono já que as combinações com maior dosagem de C (60 g D – 60 g EL, 60 g D – 40 g EL, 60 g D – 20 g EL, 60 g D – 10 g EL, 40 g D – 40 g EL) não diferiram estatisticamente.

PALAVRAS-CHAVE: *Lecanicillium lecanii*, fermentação líquida, controle biológico.

ABSTRACT

EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF DEXTROSE AND YEAST EXTRACT ON THE DEVELOPMENT OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *LECANICILLIUM LECANII* ON LIQUID FERMENTATION. The strain JAB02 of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium lecanii* was cultivated in liquid media with different concentrations of dextrose (D) and yeast extract (YE) sources (60g D – 60 g YE, 60 g D – 40 g YE, 60 g D – 20 g YE, 60 g D – 10 g YE, 40 g D – 40 g YE, 40 g D – 20 g YE, 40 g D – 10 g YE, 20 g D – 60 g YE, 20 g D – 40g YE). The dextrose was used as carbon source and the yeast extract as a nitrogen source. The objective of this research was to evaluate the dry biomass and the sporulation of this strain. The fungus was cultivated for ten days after inoculation, with evaluations each 2 days. The combinations of dextrose and yeast extract tending to wand equals parts of each element were more efficient in regard to dry biomass. For sporulation, 8 days of growth are sufficient for greatest production of conidia. This strain is demands in carbon since the combinations 60 g D – 60 g YE, 60 g D – 40 g YE, 60 g D – 20 g YE, 60 g D – 10 g YE, 40 g D – 40 g YE did not differ statistically.

KEY WORDS: *Lecanicillium lecanii*, liquid fermentation, biological control.

Lecanicillium lecanii é um fungo entomopatogênico com amplo potencial de utilização por ser patógeno de várias espécies de hospedeiros como afídeos, coccídeos e aleirodídeos (KHALIL & TABORSKY, 1982; GRAJEK, 1994). Este entomopatógeno já é bastante utilizado em casas de vegetação em vários países da Europa, onde já existe o produto formulado para mosca-branca e pulgões (ROVESTI *et al.*, 1997). Entretanto, no Brasil este fungo ainda não é utilizado. Para que sua utilização seja possível são necessários estudos sobre produção em meios de cultura para que possa ser produzido em grande quantidade.

A produção de *L. lecanii* pode ser feita, em grãos de sorgo esterilizados e fechados em sacos de polietileno, incubados em estufas durante três semanas, como é feita na Índia (SOUNDARARAJAN *et al.*, 1984). Complementações de meios de cultura também podem ser feitas como, por exemplo, farelo de trigo, polpa de beterraba e a mistura de ambos adicionados ao meio de Sabouraud (GRAJEK, 1994).

A busca de meios alternativos é interessante no que diz respeito ao fator viabilidade econômica. Países do Mediterrâneo utilizam mesocarpo de amêndoas e resíduos de folhas de palmeiras e sementes da

planta *Phoenix dactylifera* (LOPEZ-LORCA & CARBONEL, 1998; LOPEZ-LORCA *et al.*, 1999). Ainda, os meios de cultura líquidos para *L. lecanii* podem ser preparados com substratos naturais como arroz, batata, farelos de arroz, de soja, de trigo, feijão branco, feijão carioca, feijão guandu, fubá de milho, lentilha, grãos de soja, de sorgo e de trigo.

Para os meios sintéticos, outros fatores de crescimento também podem ser estudados como adição de fontes de fósforo (P), equilíbrios das relações C:P e C:N:P, além da adição de vitaminas e extrato de levedura (WENZEL, 2002).

A seleção de um meio para o cultivo de uma linhagem ou isolado é uma importante consideração no que diz respeito à produção massal e no conhecimento das condições adequadas de cultivo que possibilitem a obtenção de bom crescimento com alta esporulação (KHALIL *et al.*, 1985).

Os meios de cultura incluem, basicamente, uma fonte de carbono e outra de nitrogênio, sais inorgânicos ou substâncias orgânicas contendo macro e micro nutrientes além de vitaminas. A relação entre carbono e nitrogênio é considerada de grande importância no balanço do meio de cultura (SOPER & WARD, 1981). Os meios de cultura ricos em carbono e nitrogênio podem proporcionar um maior crescimento vegetativo de fungos, enquanto que, aqueles deficientes em nitrogênio podem aumentar a conidiogênese (ROMBACH *et al.*, 1988).

Os fungos cultivados em meio líquido podem produzir diversas estruturas: conídios submersos que são gerados de conidióforos ligados ao micélio ou diretamente ao blastosporo; blastosporo que são células leveduriforme produzidas por brotamento, septação ou fragmentação da hifa e ainda micélio que são estruturas ramificadas geradas a partir do tubo germinativo, blastosporo ou corpo hifal. A produção de conídios submersos é geralmente estimulada pelo aumento da proporção C:N. Assim, muitos fungos são inicialmente produzidos na forma de blastosporos e micélio e, em seguida, o meio é substituído por outro mais rico em carbono e deficiente em N (LETE *et al.*, 2003).

Grande parte dos meios de cultura constituem-se de uma mistura simples de proteína hidrolizada, geralmente, extrato de levedura, como fonte de nitrogênio e um açúcar, como fonte de carbono (VAN ROERMUND *et al.*, 1984; MCGUIRE *et al.*, 1987; ALVES, 1986; BARROS *et al.*, 1988 citados por OLIVEIRA, 2000).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as quantidades adequadas de dextrose e extrato de levedura que proporcionem melhor produção de conídios e maior peso seco da massa micelial deste isolado.

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Biológico - do Centro Experimental Central do Instituto Biológico em Campinas, SP. Foi utilizado o isolado JAB 02 de *L. lecanii* proveniente do Laboratório de Ecologia de Microrganismos da FCAV/

UNESP de Jaboticabal, SP, isolado da cochonilha verde *Coccus viridis* (Green) (Hemiptera: Coccidae) coletada em pomares de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck) no Município de Ubirajara, SP.

Foram testadas diferentes concentrações de dextrose (D) e extrato de levedura (EL), combinados nas quantidades de 60 g de D com 60, 40, 20 e 10 g de EL/L; 40 g de D com 40, 20 e 10 g de EL/L; 20 g de D com 60, 40 g de EL/L totalizando 9 tratamentos.

Os meios de cultura, preparados em quantidades de 120 mL, foram acondicionados em frascos de vidro com tampa de borracha para posterior autoclavagem a 120° C durante 20 min. Cada frasco recebeu 30 mL de meio, totalizando 4 frascos, que são as repetições do experimento.

Em câmara asséptica, cada frasco recebeu 2 discos, com 0,5 cm de diâmetro, recortados através de um furador de metal, das placas de Petri com o crescimento fúngico. Os frascos inoculados foram levados para a agitação em Shaker orbital, onde permaneceram durante 10 dias. A cada 2 dias, num total de 5 avaliações, 1 mL de meio de cultura foi retirado e colocado em tubo de ensaio com 9 mL de água destilada mais espalhante adesivo (Tween 80®) para o preparo da suspensão utilizada na avaliação da esporulação. Os tubos foram agitados em agitador elétrico de tubos, e 1 mL da suspensão foi retirada para a contagem dos conídios em câmara de Neubauer.

Para a avaliação do peso micelial, foram retirados 2 mL de meio de cultura para passagem em papel filtro, previamente seco e pesado, colocado em Funil de Buckman e acoplado à bomba de vácuo. Estes papéis foram levados para estufa a 30° C por aproximadamente 16h, tempo suficiente para adquirir peso constante.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e a análise foi realizada através do programa ESTAT - Sistema para Análises Estatísticas - versão 2.0 desenvolvido pela FCAV/UNESP de Jaboticabal, SP. As médias da massa seca e esporulação dos tratamentos foram submetidas à análise de variância com teste F a 1% de probabilidade e teste de Tukey a 5% de significância.

As produções máximas de massa seca variaram em função do tempo de cultivo. Pode ser observado que alguns tratamentos atingiram o máximo de peso seco já no 2º dia de cultivo enquanto outros necessitaram de 8 dias de cultivo para atingir este peso (Tabela 1).

A exigência do isolado por dextrose foi ficando mais nítida do 6º ao décimo dia. Nestes dias os tratamentos com as maiores concentrações de dextrose não diferiram estatisticamente entre si. Os meios líquidos com as maiores concentrações de dextrose foram aqueles que obtiveram maior massa micelial (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores do peso micelial (g), de JAB 02, secos em estufa a 30° C durante 16h, obtidos nos diferentes meios de cultura e tempos de avaliação¹

Tratamentos	Tempo de Avaliação (Dias)				
	2	4	6	8	10
60 g D– 60 g EL	0,12 a	0,11 a	0,13 ab	0,14 a	0,09 a
60 g D– 40 g EL	0,08 b	0,08 abc	0,15 a	0,12 ab	0,07 a
60 g D– 20 g EL	0,06 b	0,06 bc	0,11 abc	0,11 abc	0,06 ab
60 g D–10 g EL	0,06 b	0,06 bc	0,10 bc	0,10 bc	0,05 abc
40 g D– 40 g EL	0,12 a	0,11 a	0,06 d	0,11 abc	0,06 abc
40 g D– 20 g EL	0,07 b	0,08 abc	0,05 d	0,09 bc	0,03 bcd
40 g D–10 g EL	0,08 ab	0,09 ab	0,08 cd	0,08 c	0,01 d
20 g D– 60 g EL	0,08 ab	0,09 ab	0,08 cd	0,08 c	0,01 d
20 g D– 40 g EL	0,06 b	0,05 c	0,04 d	0,01 d	0,02 cd

¹Dados não transformados (D - Dextrose; EL - Extrato de levedura).

Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula em comum, na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

C.V. = 21,46%

Tabela 2 – Valores da esporulação (nº de conídios x 10⁶/mL), de JAB 02, obtidos nos diferentes meios de cultura e tempos de avaliação¹

Tratamentos	Tempo de Avaliação (Dias)				
	2	4	6	8	10
60 g D– 60 g EL	2,74 b	3,40 bcd	4,08 a	4,99 abc	4,90 a
60 g D– 40 g EL	2,77 b	4,05 ab	4,86 a	6,15 a	5,11 a
60 g D– 20 g EL	3,32 ab	5,20 a	4,80 a	5,28 ab	4,76 a
60 g D–10 g EL	4,05 a	4,35 ab	3,85 a	3,99 cde	4,16 ab
40 g D– 40 g EL	2,30 b	3,64 bc	4,55 a	4,66 bc	3,92 abc
40 g D– 20 g EL	2,30 b	3,49 bcd	3,79 ab	4,29 bcd	3,52 bcd
40 g D–10 g EL	2,30 b	3,87 b	3,75 ab	3,43 def	2,81 cd
20 g D– 60 g EL	2,40 b	2,45 cd	2,64 bc	2,91 ef	2,59 d
20 g D– 40 g EL	2,38 b	2,31 d	2,37 c	2,32 f	2,37 d

¹Dados transformados em log x + 10.

Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula em comum, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

C.V. = 14,68%.

Os tratamentos que tem em sua composição baixas quantidades de extrato de levedura são mais vantajosos por serem mais baratos, diminuindo os custos de produção já que as fontes de carbono costumam ter um custo menor.

Avaliando diferentes concentrações de C e N na produção de *Sporothrix insectorum*, BATISTA FILHO *et al.* (2003) testou o ácido casamino como fonte de N e a glicose como fonte de C. Foi observado que a combinação 60 g/L de ácido casamino e 20 g/L de glicose permitiu maior número de corpos hifais e que não houve diferença entre as combinações 60-60, 60-40, 40-60 e 20-60 g/L quanto à produção de biomassa no 8º dia de cultivo.

SANO (2005) avaliando a produção de biomassa do isolado IBCB 425 de *Metarhizium anisopliae* verificou que

ao 10º dia de cultivo não houve diferença entre as quantidades de D-glicose e extrato de levedura testados.

Verificou-se que houve diferença significativa na produção de conídios em relação às quantidades de dextrose e extrato de levedura (Tabela 2). As maiores produções de conídios foram obtidas nos meios com maiores quantidades de dextrose e à medida que foi aumentando o tempo de cultivo a exigência em carbono foi aumentando também (Tabela 2).

A maioria dos tratamentos teve seu pico máximo de esporulação no oitavo dia de cultivo e neste dia os tratamentos com maiores quantidades de dextrose, 60 g D – 60 g EL, 60 g D – 40 g EL, 60 g C – 20 g EL, não diferiram estatisticamente entre si.

Notou-se também que a partir do 4º dia de avaliação o número de conídios submersos começou a crescer

significativamente na maioria dos tratamentos. No 4^o dia os tratamentos 60 g D- 10 EL e 40 g D - 10 g EL tiveram sua maior esporulação (Tabela 2).

A presença da dextrose em maiores quantidades foi favorável à esporulação do isolado JAB 02, independente dos dias de cultivo. Entretanto, foi possível verificar que até o 8^o dia de cultivo ocorreu aumento da esporulação, já no 10^o dia observou-se que a esporulação começou a decrescer em todos os tratamentos com exceção dos tratamentos 60 g D - 10 g EL, 20 g D - 40 g EL e 40 g D - 10 g EL (Tabela 2).

SANO (2005) verificou que a quantidade de extrato de levedura é inversamente proporcional à produção de blastosporos de *M. anisopliae*. Foi observado que nos tratamentos com menores quantidades do extrato houve maior produção de blastosporos.

CAMPBELL et al. (1983) em ensaios com isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* testaram 22 fontes de carbono para avaliar a influência no crescimento e esporulação. Os resultados mostram que *B. bassiana* cresceu melhor em melezitose e esporulou melhor em sacarose, glicose e trealose.

Segundo MONTEIRO (1988) a glicose e a sacarose foram as melhores fontes de carbono para o crescimento e esporulação de *Paecilomyces marquandii* dentre outras fontes testadas como amido e lactose.

Entretanto, vários trabalhos demonstram que uma fonte de nitrogênio também é necessária ao desenvolvimento dos fungos, apesar de não ter tido tanta influência na esporulação. WENZEL (2002) verificou que a suplementação do meio de cultura com extrato de levedura em baixas concentrações (1%), estimulou a esporulação do isolado JAB 02. O mesmo foi verificado por OLIVEIRA (2000) que obteve aumento significativo do fungo *S. insectorum* ao suplementar o meio de cultura com extrato de levedura na concentração de 0,5%.

BATISTA FILHO et al. (2003), visando o aumento e produção de blastosporos e corpos hifais em meios de cultura alternativos, selecionou algumas fontes de C e N. Melhor resultado foi obtido em meio contendo 164 g (60 g/L de N e 40 g/L de C) de levedo de cerveja/L de água, mostrando assim que este fungo necessita de maior quantidade de N do que de C. Melhor resultado encontrado por ROCHA et al. (2001) em diferentes meios líquidos foi verificado com levedo de cerveja na mesma quantidade para o fungo *M. anisopliae* e na quantidade de 112 g/L de água (60 g N/L e 20 g C/L) para *B. bassiana*.

O extrato de levedura é uma excelente fonte de vitaminas do complexo B e outros fatores para o crescimento e esporulação dos fungos (BARNES et al., 1975), embora neste trabalho não tenha tido tanta influência, já que *L. lecanii* se mostrou mais exigente em carbono, para a produção de conídios submersos.

O isolado JAB 02 do fungo entomopatogênico *L.*

lecanii é exigente em carbono para a produção de conídios e massa micelial.

Oito dias de cultivo são suficientes para a esporulação e o peso seco máximo do isolado JAB 02.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNES, G.L.; BOETHEL, D.J.; EIKENBARY, R.D.; CRISWELL, J.T.; GENTRY, C.R. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. *J. Invertebr. Pathol.*, v.25, p. 301-305, 1975.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; FRANKLIN, C.; LEITE, L. G.; ALVES, L.F.A. Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio e na produção do fungo *Sporothrix insectorum* em fermentação líquida aeróbica. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo [on-line], v.70, n.4, p.491-496, 2003. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/arquivos/V70_4/batista1.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2005.
- CAMPBELL, R.K.; BARNES, G.L.; CARTWRIGHT, B.O.; EIKENBARY, R.D. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate peptone sources. *J. Invertebr. Pathol.*, v.41, p.117-121, 1983.
- GRAJEK, W. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. *Folia Microbiol.*, v. 39, n.1, p. 29-32, 1994.
- KHALLIL, S.K. & TABORSKY, L. The effect of different media on the growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. *Agric. Trop. Subtrop.*, v.15, p.251-268, 1982.
- KHALLIL, S.K.; SHAH, M.A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. *Agric. Ecosyst. Environ.*, v.13, p.329-334, 1985.
- LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. *Produção de fungos entomopatogênicos*. Ribeirão Preto: Oesp, 2003. 92p.
- LOPEZ-LLORCA, L.L. & CARBONELL, T. Use of almond mesocarp for production of the entomopathogenic fungus *V. lecanii*. *Can. J. Microbiol.*, v.44, p.886-895, 1998.
- LOPEZ-LLORCA, L.L.; CARBONELL, T.; SALINAS, J. Colonization of plant waste substrates by entomopathogenic and microparasite fungi – a SEM study. *Micron*, v.30, p.325-333, 1999.
- MONTEIRO, A.C. *Aspectos fisiológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica*. São Carlos: 1988. 233p. [Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos].
- OLIVEIRA, S.M.C. *Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos*. Jaboticabal: 2000. 45p. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Estadual Paulista].
- ROCHA, T.C.; ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; GINTRA, E.R.R. Produção de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio líquido. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001, São Paulo. *Resumos. Arq. Inst. Biol.*, São Paulo [CD-ROM], v.68, supl., 2001. Resumo 35.

- ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; ROBERTS, D.W. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation on dry mycelium. *Entomophaga*, v.33, n.3, p.315-324, 1988.
- ROVESTI, L.; GRAZZI, G.; VICCINELLI, R.; ALBAJES, R.; CARNERO, A. Use of entomopathogenic fungi for pest control in protected crops in Italy. *Bull. Section Régionale Ouest Palearctique*, v.20, n.4, p.285-292, 1997.
- SOPER, R.S. & WARD, M.G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAVIDAS, G.C. (Ed.). *Biological control in crop protection*. New York: Allanheld Osmun, 1981. v.5, p.161-180.
- SANO, A. H. *Dosagens de extrato de levedura e glicose para a produção de Metarhizium anisopliae em meio líquido*. Jaboticabal: 2005. 42p. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Estadual Paulista].
- SOUNDARARAJAN, K.; KUMARASWAMI, T.; ABDUL KAREEM, A. An easy method for mass multiplication of the entomopathogenic fungus *Cephalosporium lecanii* Zimm. *Curr. Sci.*, v.53, n.21, p.1152-1153, 1984.
- WENZEL, I.M. *Fatores nutricionais e produção em massa de Verticillium lecanii em meios naturais sólidos e líquidos*. Jaboticabal: 2002. 79p. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Estadual Paulista].

Recebido em 28/2/05

Aceito em 19/3/05