



OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE *Beauveria caledonica*

Sthefany Nery de Sá¹; Ana Clara Vieira Cangani²; Gabriel Moura Mascarin³; Jeanne Scardini Marinho - Prado⁴

Nº25409

RESUMO – O fungo entomopatogênico *Beauveria caledonica* tem se destacado como um organismo de potencial interesse agrônomo devido à sua capacidade de infectar insetos-praga que afetam culturas de importância econômica. A fim de viabilizar a aplicação deste microrganismo como agente de controle biológico em escala comercial, torna-se imprescindível o desenvolvimento de protocolos eficientes para sua multiplicação em laboratório e posterior escalonamento industrial. O presente trabalho teve como objetivo a padronização e otimização das condições de cultivo de *B. caledonica*, englobando desde a seleção da pré-cultura mais adequada para obtenção do inóculo até a escolha das fontes ideais de nitrogênio e carbono em cultivo submerso. Em relação às fontes de nitrogênio avaliadas, o farelo de ervilha proporcionou a maior concentração de blastosporos. Quanto às fontes de carbono, a sacarose foi a que proporcionou elevados rendimentos de blastosporos. Portanto, o meio líquido composto por sacarose e farelo de ervilha inoculado com pré-cultura líquida é o mais indicado para a produção ótima de blastosporos desse agente de biocontrole.

Palavras-chaves: Fermentação submersa, entomopatógeno, arroz, farelo de ervilha, sacarose.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, IB / Unicamp, Campinas-SP; sthefanynerides@gmail.com

2 Bolsista Embrapa: Mestrado em Agronomia, FCA / Unesp, Botucatu-SP; acvcangani@gmail.com

3 Analista: Analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; gabriel.mascarin@embrapa.br

4 Orientador: Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; jeanne.marinho@embrapa.br



ABSTRACT – The entomopathogenic fungus Beauveria caledonica has emerged as a microorganism of potential agronomic interest due to its ability to infect pest insects that affect economically important crops. To enable the application of this microorganism as a biological control agent on a commercial scale, it is essential to develop efficient protocols for its laboratory cultivation and subsequent industrial scale-up. This study aimed to standardize and optimize the cultivation conditions of *B. caledonica*, including the selection of the most suitable pre-culture for inoculum preparation and the identification of ideal nitrogen and carbon sources for submerged fermentation. Among the nitrogen sources evaluated, pea bran yielded the highest blastospore concentration. Regarding carbon sources, sucrose was the most effective. Therefore, a liquid medium composed of sucrose and pea bran, inoculated with a liquid pre-culture, is recommended for optimal blastospore production of this biocontrol agent.

Keywords: Submerged fermentation, entomopathogen, rice, pea flour, sucrose.

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico de pragas agrícolas é uma estratégia promissora no contexto da agricultura sustentável, pois oferece alternativas menos impactantes ao ambiente em comparação aos defensivos químicos tradicionais. Dentre os agentes biológicos, os fungos entomopatogênicos vêm ganhando destaque por sua eficácia na infecção de insetos hospedeiros, apresentando ciclo de vida adaptado à colonização do corpo dos artrópodes, levando à sua morte (Inglis et al., 2002; Shah; Pell, 2003). *Beauveria caledonica*, pertencente à família Clavicipitaceae, é um desses microrganismos com reconhecido potencial como bioinseticida, tendo sido isolado em diversas regiões e estudado por sua atividade patogênica contra insetos (Reay et al., 2008; Mascarin et al., 2022; Ding et al., 2025).

Além dos propágulos infectivos, esse fungo é capaz de sintetizar metabólitos secundários com ação entomotóxica, destacando-se a oosporina, substância cuja atividade tóxica foi demonstrada em diversos estudos e que contribui para sua patogenicidade e eficácia como agente de controle biológico (Vey et al., 2001; Zimmermann, 2007). No entanto, sua produção em larga escala requer métodos otimizados que garantam alta esporulação, viabilidade dos propágulos e baixo custo de cultivo.

A produção de bioagentes fúngicos pode ser realizada por fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação líquida submersa (FLS), sendo esta última mais apropriada para escalas industriais por permitir maior controle dos parâmetros físico-químicos e facilidade no manuseio dos cultivos



(Jackson et al., 2010). A escolha adequada dos componentes do meio de cultivo é um fator determinante para o sucesso da fermentação. Substratos ricos em nutrientes como fontes de carbono e nitrogênio devem ser avaliados quanto à sua capacidade de promover crescimento micelial vigoroso e elevada produção de blastosporos viáveis (Mascarin; Jaronski, 2016).

Neste contexto, este trabalho investigou, de forma sequencial e criteriosa, as melhores condições nutricionais para a produção de *B. caledonica* via fermentação líquida submersa, contribuindo para sua aplicação como agente de biocontrole e proporcionando um método mais eficiente (rápido), robusto e de alto rendimento em relação ao método tradicional de produção de conídios aéreos por fermentação em estado sólido. Importante ainda ressaltar que esse trabalho é pioneiro em propor um método de cultivo submerso para *B. caledonica*, visto que é uma espécie fúngica pouquíssimo estudada no mundo em comparação a outros fungos como *Metarhizium anisopliae* e *B. bassiana*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo do inóculo para pré-cultura

Para o preparo da pré-cultura líquida à base de batata-dextrose (BD) foram utilizados três a quatro discos de 8 mm (diâmetro) a partir de culturas esporuladas de *B. caledonica* CMAA 1810 crescidas em BDA (batata-dextrose-ágar) em condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C) e fotoperíodo (12:12, L:E). A pré-cultura inoculada permaneceu sob agitação em Shaker (28 °C e 250 rpm) por três dias, atingindo concentração entre $2,0 \times 10^8$ e $5,0 \times 10^8$ blastosporos/mL. Essa foi a pré-cultura padrão utilizada em todos os ensaios de seleção de fontes de carbono e nitrogênio.

2.2 Avaliação de fontes de nitrogênio

Com o objetivo de avaliar a fonte de nitrogênio mais adequada para a produção de blastosporos de *B. caledonica* em fermentação líquida submersa, foram testados seis tratamentos: controle BD (Potato Dextrose Broth), caseína, farelo de glúten de milho, farelo de soja, farelo de algodão e farelo de ervilha. A composição detalhada dos meios utilizados encontra-se na Tabela 1.

A partir das pré-culturas obtidas como descreve o item 2.1, foi utilizado 5 mL da suspensão (5×10^7 blastosporos/mL) para inocular os meios contendo as diferentes fontes de nitrogênio.



Tabela 1. Formulação de seis meios de cultura com diferentes fontes de nitrogênio.

Ingredientes	1	2	3	4	5	6
Relação C:N	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
Carbono Total (g/L)	70,56	70,56	70,56	70,56	70,56	70,56
Controle BD (g)	1,35					
Caseína (g)		1,5				
Farinha de glúten de milho (g)			1,1			
Farelo de soja (g)				1,5		
Farelo de algodão (g)					1,25	
Farelo de ervilha (g)						1,25
Pré-cultura (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Glicose 35% (mL)	20,0	19,4	20,4	19,4	20,0	20,0
Meio basal (mL)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Água residual (mL)		0,6		0,6		
Total (mL)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Os frascos foram incubados a 25 °C sob agitação contínua. Diariamente, alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada cultivo para realização de diluições seriadas e posterior contagem de blastosporos em câmara de Neubauer.

2.3 Avaliação de fontes de carbono

Com o intuito de determinar a fonte de carbono mais eficiente para o cultivo submerso de *Beauveria caledonica*, foram testadas seis substâncias: dextrose (controle), maltodextrina, maltose, sacarose, frutose e sorbitol. Todas as formulações dos meios foram preparadas com base em uma concentração total de carbono de 45,0 g/L e uma razão C:N padronizada em 20:1. A descrição detalhada dos meios encontra-se apresentada na Tabela 2.

O preparo das pré-culturas foi realizado conforme descrito na Seção 2.2. Cada frasco experimental foi inoculado com 5 mL da suspensão padronizada a 5×10^7 blastosporos/mL. As culturas foram incubadas a 28 °C sob agitação constante em incubadora shaker.



Tabela 2. Formulação de seis meios de cultura com diferentes fontes de carbono.

Ingredientes	1	2	3	4	5	6
Relação C:N	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
Carbono Total (g/L)	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,5
Dextrose (mL)	12,8					
Maltodextrina (mL)		11,6				
Sacarose (mL)			12,5			
Maltose (mL)				11,6		
Frutose (mL)					13,1	
Sorbitol (mL)						12,1
Pré-cultura (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Farelo de ervilha (g)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Meio basal (mL)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Água residual (mL)	7,16	8,3	7,5	8,3	7,5	7,8
Total (mL)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

2.4 Análise dos dados

Os dados referentes à concentração de blastosporos/mL foram ajustados ao modelo linear misto com distribuição normal para fontes de nitrogênio, enquanto os dados para as fontes de carbono foram ajustados ao modelo linear generalizado com distribuição quasi-poisson, sendo os efeitos fixos atribuídos às fontes de carbono ou nitrogênio, tempo de cultivo e a interação desses dois fatores. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas no ambiente R versão 4.3.3 (2024).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação das fontes de nitrogênio, houve efeito significativo das fontes de nitrogênio na produção de blastosporos ($F=28,4$, gl = 5, 20, $p < 0.0001$), e a concentração de blastosporos aumentou com a progressão do tempo de cultivo em todas as fontes de nitrogênio testadas ($F=202.58$, gl = 3, 202, $p < 0.0001$) (Figura 1). Logo, observou-se que todos os farelos vegetais (glúten de milho, soja, algodão e ervilha) foram significativamente superiores em termos de produção de blastosporos em comparação às fontes de batata-dextrose e caseína.

Adicionalmente, destaca-se a capacidade de *B. caledonica* em produzir metabólitos secundários de reconhecida atividade entomotóxica, como a oosporina. Estudos prévios com outras espécies do gênero *Beauveria* demonstraram que a síntese de oosporina está diretamente relacionada às condições nutricionais do meio de cultivo, principalmente às fontes de carbono e nitrogênio disponíveis (Vey et al., 2001; Zimmermann, 2007).

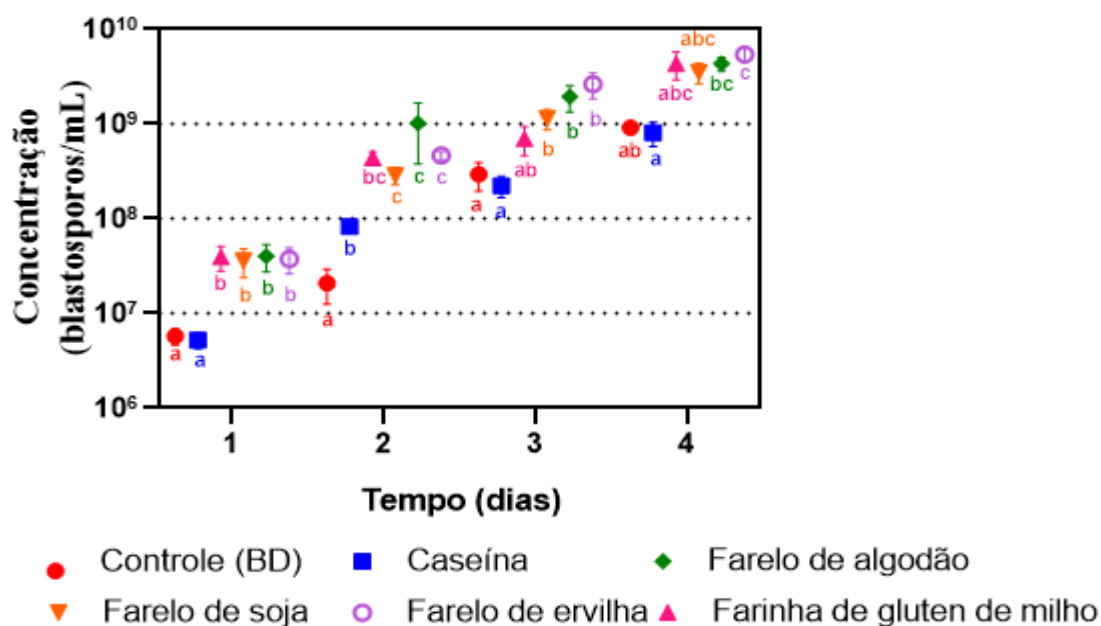


Figura 1. Produtividade de *Beauveria caledonica* em diferentes fontes de nitrogênio. Médias seguidas de erro-padrão são apresentadas no gráfico e seguidas por letras distintas dentro de cada intervalo de tempo, as quais indicam diferença estatística (Tukey, $p<0,05$).

Os dados referentes à concentração de blastosporos/mL foram ajustados ao modelo linear misto com distribuição normal para fontes de nitrogênio, enquanto os dados para as fontes de carbono foram ajustados ao modelo linear generalizado com distribuição quasi-poisson, sendo os efeitos fixos atribuídos às fontes de carbono ou nitrogênio, tempo de cultivo e a interação desses dois fatores. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas no ambiente R versão 4.3.3 (2024).

No presente trabalho, observou-se maior produção de oosporina quando *Beauveria caledonica* foi cultivado em meio BD (Potato Dextrose Broth), particularmente em condições de alta densidade de inóculo. Essa alta densidade refere-se ao uso de uma quantidade de biomassa superior à usualmente empregada para pré-cultivos — enquanto protocolos padrão utilizam cerca de três discos miceliais de 0,8 mm de diâmetro, neste estudo foi utilizado o dobro ou mais dessa quantidade. Essa estratégia resultou em maior produção visível de pigmento (Figura 2), indicando que o acúmulo de biomassa inicial pode atuar como gatilho para a síntese de metabólitos secundários, como a oosporina. Essa indução metabólica em resposta ao aumento da densidade celular e à competição por nutrientes já foi relatada em estudos com fungos filamentosos, incluindo espécies entomopatogênicas (Vey et al., 2001).



Figura 2. Cultivo de *Beauveria caledonica* com produção de oosporina (frasco da esquerda) e sem produção de oosporina (frasco da direita) dependente da concentração de inóculo inicial.

Com relação às fontes de carbono, houve efeito significativo das fontes de carbono na produção de blastosporos por *B. caledonica* na presença de farelo de ervilha como a fonte de nitrogênio comum a todos os tratamentos ($F=3,16$, $gl = 5$, 183 , $p = 0.009$), sendo que a única diferença observada foi com a sacarose em comparação à maltodextrina e ao sorbitol no intervalo de 3 dias de cultivo. A concentração de blastosporos aumentou ao longo do tempo de cultivo em todos os tratamentos ($F=99,06$, $gl = 3$, 188 , $p < 0.0001$). Logo, a sacarose é particularmente eficiente em estimular o crescimento e a multiplicação de *B. caledonica* (Figura 3). Essa eficiência pode estar relacionada à rápida assimilação da sacarose pelo fungo e à geração de metabólitos secundários associados à produção de oosporina. Assim, a combinação entre arroz para obtenção de inóculo, farelo de ervilha como fonte nitrogenada e sacarose como fonte de carbono revela-se altamente

eficaz para sistemas de produção em larga escala. O próximo passo é validar esse bioprocessamento em biorreator de bancada na Embrapa Meio Ambiente.

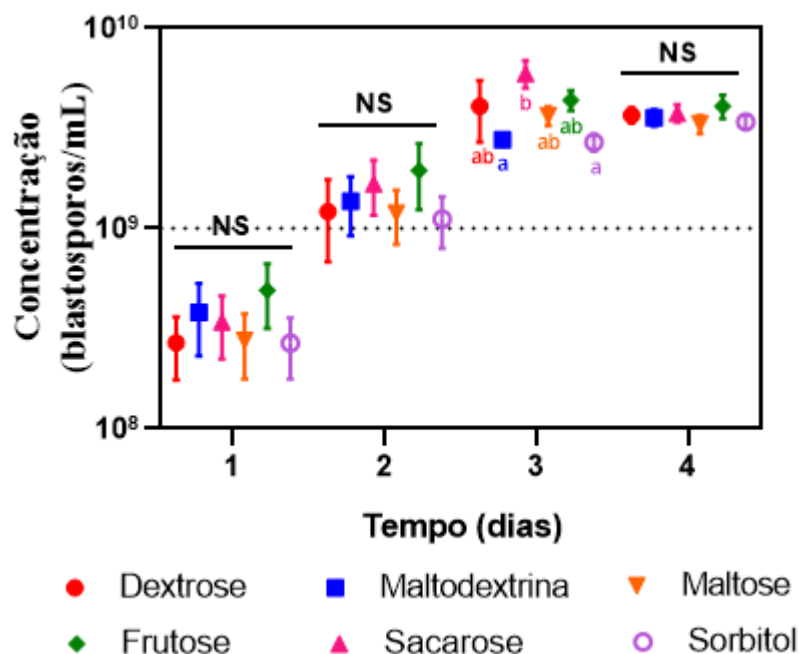


Figura 3. Produtividade de *Beauveria caledonica* em diferentes fontes de carbono. Médias seguidas de erro-padrão são apresentadas no gráfico e seguidas por letras distintas dentro de cada intervalo de tempo indicam diferença estatística (Tukey, $p < 0,05$).

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o farelo de ervilha foi a fonte de nitrogênio que promoveu o maior rendimento de blastosporos sob cultivo submerso em frascos agitados, apresentando-se como uma alternativa eficiente e acessível em função da sua disponibilidade no mercado. A sacarose, por sua vez, demonstrou ser a fonte de carbono mais adequada, resultando em elevadas concentrações de blastosporos, além de ser de baixo custo e fácil disponibilidade no mercado. A integração dessas fontes nutricionais complexas na formulação do meio de cultivo representa um avanço significativo para a produção de *B. caledonica*, viabilizando a fermentação líquida submersa como alternativa à fermentação sólida para produção desse fungo, o qual é ainda pouco explorado no Brasil visando ao controle biológico de coleópteros.



5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPQ), pelo auxílio concedido à primeira autora e à Embrapa pelo financiamento do projeto.

6. REFERÊNCIAS

INGLIS, G. D. et al. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (ed.). **Fungi as biocontrol agents**: progress. problems and potencial. Wallingford UK : CABI, 2002. p. 23–69. DOI: 10.1079/9780851993560.0023.

JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, v. 55, p. 129–145, 2010.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n; 11, p. 1–26, 2016.

MASCARIN, G. M. et al. Natural occurrence of *Beauveria caledonica*, pathogenicity to *Cosmopolites sordidus* and antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Pest Management Science**, v. 78, n. 11, p. 4458-4470, Nov. 2022.

REAY, S. D. et al. Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zeland *Pinus radiata* plantation forests. **Biological Control**, v.46, n. 3, p. 484-494, Sept. 2008.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5–6, p. 413–423, June 2003.

VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (ed.). **Fungi as biocontrol agents**: progress. problems and potencial. Wallingford UK : CABI, 2001. p. 311–346. DOI: 10.1079/9780851993560.0311.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17. n; 6, p. 553-596, 2007.