



Activity, concentration and viability of conidia of *Beauveria* sp. in palm oil waste

Atividade, concentração e viabilidade de conídios de *Beauveria* sp. em resíduos de palma de óleo

SILVA, Juliane Aragão da⁽¹⁾; RODRIGUES, Pablo Leal⁽²⁾; MACEDO, Luana Pereira de⁽³⁾

⁽¹⁾ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2835-2684>; Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal da Amazônia (UFRA), BRASIL. E-mail: eng.agro.juliane@gmail.com.

⁽²⁾ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7845-2520>; Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Agronegócios da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). BRAZIL. E-mail: agronopablo@gmail.com.

⁽³⁾ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5367-754X>; Graduanda em Engenharia de Agrimensura pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL).BRAZIL. E-mail: luana.macedo@ceca.ufal.br.

O conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos/as seus/as autores/as.

ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is an industrial crop widely used worldwide, however, it is affected by the attack of pest insects that represent a limiting factor for their large-scale production, in this sense, entomopathogenic fungi are important biological pest control agents, as they can infect the insect at different stages of development. Therefore, environmentally viable and low-cost alternatives are important for the production of these fungi. Thus, the present work aims to evaluate the development of the fungus *Beauveria* sp. (BP05) in oil palm residues, as well as to determine the highest production of the fungus, through the analysis of the activity, concentration and viability of the developed conidia. To evaluate the development of the fungus, Parboiled Rice-AP; TDM-wet palm pie; TDL-washed palm pie; Washed palm kernel cake-TPL and wet palm kernel cake-TPM, where the activity, concentration and viability of the fungus conidia were evaluated. Treatments T3 (TDM 30% + TPM 30% + AP 40%) and T5 (TDM 25% + TPM 25% + AP 50%) were more productive for the development of the fungus. These results may contribute to a greater production of reproductive structures of *Beauveria* sp. (BP05) and the reuse of oil palm residues, reducing their environmental impacts, and the costs of large-scale production of entomopathogenic fungi.

RESUMO

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma cultura industrial amplamente utilizada no mundo todo, contudo, é afetada pelo ataque de insetos praga que representam um fator limitante para a sua produção em grande escala, neste sentido, os fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle biológico de pragas, pois podem infectar o inseto em diversos estágios de desenvolvimento. Por isso, alternativas ambientalmente viáveis e de baixo custo são importantes para a produção destes fungos. Deste modo, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o desenvolvimento do fungo *Beauveria* sp. (BP05) em resíduos da palma de óleo, bem como, determinar a maior produção do fungo, por meio das análises da atividade, concentração e viabilidade dos conídios desenvolvidos. Para avaliar o desenvolvimento do fungo utilizou-se, Arroz parboilizado-AP; Torta de dendê molhada-TDM; Torta de dendê lavada-TDL; Torta de palmiste lavada-TPL e torta de palmiste molhada-TPM, onde avaliou-se a atividade, concentração e viabilidade dos conídios do fungo. Sendo os tratamentos T3 (TDM 30% + TPM 30% + AP 40%) e T5 (TDM 25% + TPM 25% + AP 50%) mais produtivos para o desenvolvimento do fungo. Esses resultados podem contribuir para uma maior produção de estruturas reprodutivas de *Beauveria* sp. (BP05) e o reaproveitamento dos resíduos da palma de óleo, reduzindo os seus impactos ambientais, e os custos de produção em grande escala de fungos entomopatogênicos.

Doi: <https://doi.org/10.48017/dj.v7i1.2124>

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Histórico do Artigo:

Recebido: 13/10/2021

Aceito: 15/11/2021

Publicação: 01/01/2022



Keywords:

Organic substrates,
entomopathogenic fungus,
bioproducts.

Palavras-Chave:

Substratos orgânicos,
fungo entomopatogênico,
bioprodutos.

Introdução

Estima-se que até o ano de 2050 a demanda por óleo de palma (*Elaeis guineensis*) deverá atingir uma enorme quantidade de 240 Milhões de toneladas. Com isso, espera-se que os seus subprodutos também aumentem, o que representa uma oportunidade de ouro para o aproveitamento sustentável desses resíduos e o desenvolvimento de novos produtos (Chilakamarry et al., 2021; Ong et al., 2021).

Alguns subprodutos da palma estão disponíveis no mercado nacional, uma vez que o Brasil é o nono produtor mundial dessa cultura. Do mesocarpo carnoso do fruto é extraído o óleo de palma e da amêndoa, o óleo de palmiste, cuja obtenção, por extração mecânica, gera como resíduo a torta, quando feito com o uso de solvente, obtém-se o que é chamado de farelo (Heuzé et al., 2016; Silva et al., 2019).

A cultura é afetada por insetos pragas, que representam uma das principais causas da perda de rendimento e qualidade das safras de culturas industriais em todo mundo (Li *et al.*, 2021). O uso de pesticidas químicos ainda é o método mais utilizado na agricultura, porém, tem sido motivo de grande preocupação devido aos seus efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente; daí a necessidade de encontrar formas alternativas de controle de pragas.

Neste sentido, os biopesticidas são um dos meios para alcançar práticas agrícolas sustentáveis, sem comprometer a produtividade das culturas, representando uma mudança de paradigma na indústria de pesticidas em todo o mundo (Rajula et al., 2021).

Alguns fungos entomopatogênicos, podem ser incorporados na composição de diversos biopesticidas, dentre eles *Beauveria bassiana*, que é considerado o mais importante contra insetos e outras pragas de artrópodes, sendo descrito por infectar mais de 707 espécies de insetos hospedeiros, o que representa, uma demanda crescente no desenvolvimento de formulações de biopesticidas sendo que este fungo já tem sido usado há décadas no manejo de pragas de insetos (Gebremariam et al., 2021; Tomson et al., 2021; Rajula et al., 2021).

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar atividade, concentração e viabilidade de conídios do fungo entomopatogênico *Beauveria sp.* em resíduos da palma de óleo, tendo em vista ampliar as estratégias de reaproveitamento dos subprodutos da cultura, além de determinar o resíduo mais eficiente do ponto de vista da atividade fúngica, sendo uma alternativa para condições favoráveis de crescimento do patógeno e o desenvolvimento de produtos biológicos inovadores.

Procedimento Metodológico

O experimento foi conduzido no Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA) e no Laboratório de Proteção de Plantas (LPP), no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade de Federal Rural da Amazônia (UFRA); Campus: Belém - Pará. Os resíduos utilizados foram: arroz parboilizado, resíduos da palma de óleo (dendê), sendo elas; a torta de dendê e a torta de palmiste, os quais foram obtidos da agroindústria da Agropalma S/A. localizada no município de Tailândia no Estado do Pará. O arroz parboilizado foi o comercial, tipo: 1; classe: longo fino; subgrupo: parboilizado polido.

Os isolados utilizados no ensaio fazem parte da coleção do Laboratório de Proteção de Plantas, e foram selecionados previamente em ensaios de laboratório quanto a sua eficiência no controle de insetos (*screening* toxicológico), os melhores do gênero *Beauveria* (BP05) foram utilizados nesta pesquisa. Assim a repicagem de conídios em meio de cultura ocorreu com a multiplicação dos fungos no Laboratório de Proteção de Plantas, em placas de *petri* com meio de cultura a base de Batata Dextrose e Ágar (BDA). As placas com meio de cultura, repicadas com os fungos foram mantidas a 28°C em B.O.D., com fotoperíodo de 24 h, durante uma semana, para o desenvolvimento das colônias puras, que foram utilizadas para o teste.

Após obtenção de placas puras do fungo, foram preparadas as suspensões com os conídios, na concentração de 10^8 conídios/ml, aferidas em câmara de Neubauer, sendo elas: $6,15 \times 10^8$ c/ml para um volume de 46,35ml/H₂O; $4,59 \times 10^8$ c/ml para um volume de 32,31ml/H₂O; $5,26 \times 10^8$ c/ml para um volume de 38,34ml/H₂O e $4,78 \times 10^8$ c/ml para um volume de 34,02ml/H₂O. As fórmulas usadas foram adaptadas de (ALVES *et al.*, 2010).

Utilizou-se dois testes, 1 e 2 com 2,400 kg de Arroz (Controle Padrão), Torta de Dendê de 2,100 kg e a Torta de Palmiste de 2,100 kg, cada valor desse dividido a metade para cada teste, foram assim pesados distribuídos em potes plásticos de 500 ml para serem colocados de molho por 15 minutos cada e os outros lavados por 15 segundos. Após esse processo foram transferidos para sacos plásticos autoclavável de 2 quilos e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Após a retirada da autoclave deixou-se esfriar o material, para serem distribuídos, conforme cada tratamento, em bandejas plásticas, com volume total de 2,7 Litros, para então, ocorrer dentro da câmara de fluxo laminar, as inoculações por meio de tubos de ensaios contendo 5 ml de suspensão fúngica na concentração de 1×10^8 conídios/ml em todos os tratamentos e suas respectivas repetições.

As bandejas foram colocadas dentro de sacos plásticos de 10 quilos, onde cada bandeja foi mantida a temperatura ambiente sob bancadas no laboratório, fotofase de 12 h, o início das

avaliações diárias foram a partir de 24 horas após a montagem do ensaio, e permaneceu até aos 10 dias (240 horas).

Com base nas avaliações dos dados obtidos por meio dos resultados do teste 1 e da melhor produção dos fungos *Beauveria* sp. em menor tempo nos resíduos da palma de óleo. Foi montado um novo experimento, utilizando as melhores metodologias para produção de conídios nos resíduos da palma de óleo, para avaliar a relação entre proporção de arroz, torta de dendê e torta de palmiste.

Para verificação da concentração (produção total) após o período de incubação em 5 dias, o conteúdo de cada saco, separadamente, foi diluído em 100 ml de água destilada, homogeneizado e coado no crivo. A esta suspensão foi adicionado espalhante adesivo *Tween* a 0,1% e o número de conídios quantificados em câmara de Neubauer. Para a determinação da viabilidade, foram preparados meios de cultura BDA por tratamento, sobre o meio de cultura foi inoculado 1 ml de suspensão fúngica (a mesma utilizada para análise de concentração) com 10^8 conídios/ml. Estas lâminas, acondicionadas individualmente em placa de Petri com algodão umedecido e esterilizadas, permaneceram nas bancadas na ausência de luz por 24 horas, após esse horário foi realizada a leitura em um contador de colônias eletrônico, para determinar a germinação dos conídios.

Análise Estatística

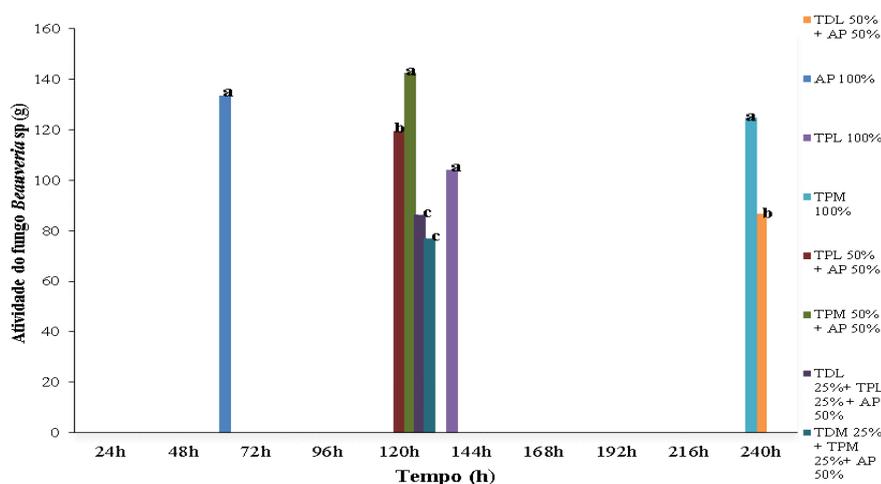
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 13 tratamentos e 5 repetições, para *Beauveria* sp. Os dados foram tabulados no *Microsoft Excel* 2013 e submetidos à análise de variância ANOVA e na comparação das médias dos tratamentos, usou-se o teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$), através do *software* R 3.1. Com avaliação da Atividade (g), da Concentração média (ml) e da Viabilidade (%) dos fungos esporulados.

Resultados e Discussão

Os resultados do teste 1 da produção do fungo *Beauveria* sp, em cada tratamento como (AP100%, TPM 50% + AP50%, TPL100% e o TPM100%), não apresentaram diferenças estatística, independente dos dias diferentes de esporulação dos conídios, destacando assim dos demais tratamentos que produziram, mas em menor quantidade e apresentando diferença estatística entre si, assim a esporulação de alguns tratamentos ocorreu a partir das 24 horas, contudo, somente com 72 horas (3º dia) um tratamento apresentou total esporulação o T1: (AP 100%) e também com 120 horas (5º dia) outros quatro tratamentos apresentaram total esporulação o T8: (TPL 50% + AP 50%), T9: (TPM 50% + AP 50%), T10: (TDL 25% + TPL 25% + AP 50%) e T11: (TDM 25% + TPM 25% + AP 50%), baseado na rápida atividade de

produção de conídios nos cinco tratamentos anteriores, foram os tratamentos considerados, por terem apresentado esporulação de conídios do fungo *Beauveria* sp. (BP05) em menor tempo, diferenciando dos demais tratamentos que produziram, porém em períodos maiores a partir das 144 horas (6º dia), ver figura 1.

Figura 1. Atividade em produção do fungo entomopatogênico *Beauveria* sp. em diferentes substratos e períodos. As médias foram comparadas pelo teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$)



Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

Esses diferentes resultados podem ser justificados pela textura e suporte nutricional de cada substrato, como a torta de dendê pela alta composição em nutrientes, teores de proteínas e fibras, a torta de palmiste pelo elevado conteúdo de fibra, proteína bruta 15% e 48% de carboidratos e o arroz parabolizado, que possui alta concentração de amido (carboidrato 39g) e proteínas, vitaminas e minerais facilitando assim, o desenvolvimento em produção de conídios do fungo *Beauveria* sp. (Junior, 2006; Costa *et al.*, 2011).

Em trabalhos conduzidos por Awan *et al.* (2021), com o objetivo de aperfeiçoar a produção de conídios de *Beauveria bassiana* F-HY006 foram utilizados diversos produtos nutricionais de baixo custo como; farelo de soja, pó de algodão, além de fatores ambientais como luz, umidade e temperatura, verificou-se que o meio constituído por farelo de soja + pó de algodão (1:1) e luz fluorescente contínua, resultou na maior produção de conídios do fungo ($5,7 \times 10^9$ / g substrato seco).

Em nosso trabalho, a análise de agrupamentos revelou a formação de três grupos, onde o grupo 1 (T1) e 3 (T2, T4, T6, T7, T8, T9, T10, T11) apresentaram números inferiores para todas as variáveis de atividade, concentração e viabilidade dos conídios de *Beauveria* sp. em relação aos grupos 2, composto pelo tratamento T3 e T5. A partir dos resultados da análise de *Cluster* foram realizados novos ensaios compostos pelos tratamentos T1, T3, T5 para analisar a

atividade, concentração e viabilidade dos conídios de *Beauveria* sp. em diferentes substratos em arroz, torta dendê e torta de palmiste (figura 2).

Figura 2. Esporulação do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em diferentes substratos em laboratório

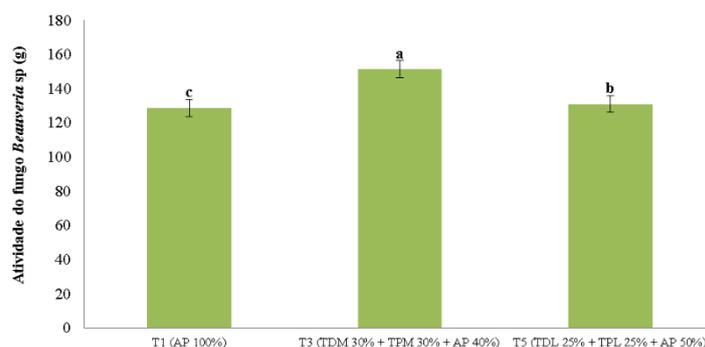


Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

As fermentações de fungos em resíduos agrícolas no estado sólido são consideradas adequadas e podem ser convertidas em produtos lucrativos, a exemplo disso, a produção de fungos entomopatogênicos em meio sólido de baixo custo apresentam bons resultados, uma vez que não necessitam de elevada tecnologia e permitem à produção direta de unidades infectivas, a exemplo disso, a farinha de aveia, farinha de óleo de feijão, além de casca de batata e casca de arroz apresentaram bons resultados para a produção de esporos de *B. bassiana* em condições ambientes (Doolotkeldieva *et al.*, 2019; Chilakamarry *et al.*, 2021).

Comparando-se os resultados de cada tratamento testado (figura 3), verificou-se que houve diferença significativa entre eles, e o T3 foi o que mais se desenvolveu (TDM 30% + TPM 30% + AP 40%) em relação ao T5 (TDL 25% + TPL 25% + AP 50%) seguido do T1 controle (AP 100%), sendo que as médias de atividade em produção de cada um foi de 151,2g; 130,9g e 129,04g de esporos do fungo *Beauveria* sp respectivamente em cada tratamento.

Figura 3. Atividade (g) de produção de esporos do fungo entomopatogênico *Beauveria* sp. desenvolvido em diferentes substratos de resíduos da palma de óleo. As médias foram comparadas pelo teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$)

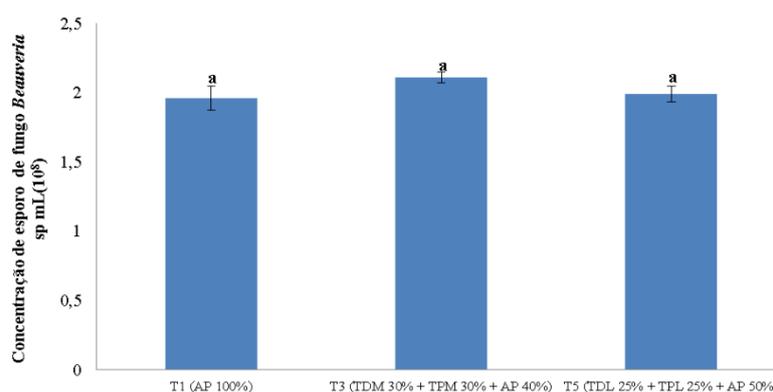


Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Analisando cada tratamento na figura 4, verificou-se que as médias das concentrações proveniente do desenvolvimento de esporos em cada um deles, não diferiram estatisticamente, porém entre todos os tratamentos, que apresentou maior concentração foi o tratamento 3 (TDM 30% + TPM 30% + AP 40%) em relação aos demais tratamentos como tratamento 5 (TDL 25% + TPL 25% + AP 50%) e o tratamento 1 Controle (AP 100%), com concentrações de $2,11 \times 10^8$; $1,99 \times 10^8$; $1,96 \times 10^8$ esporos/ml do fungo *Beauveria* sp respectivamente.

Do mesmo modo, Gebremariam et al. (2021), avaliando o pico de germinação, a esporulação e a taxa de crescimento radial de isolados de *B. bassiana* AAUKB-11 e *B. bassiana* AAUMFB-77 observaram que o pico de germinação de AAUKB-11 foi de 99,67%, no entanto, o isolado AAUMFB-77 atingiu a maior taxa de crescimento radial $3,43 \text{ mm dia}^{-1}$, com a maior esporulação $4,60 \times 10^8$ esporos / ml em meio constituído por batata.

Figura 4. Atividade (g) de produção de esporos do fungo entomopatogênico *Beauveria* sp. desenvolvido em diferentes substratos de resíduos da palma de óleo. As médias foram comparadas pelo teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$)



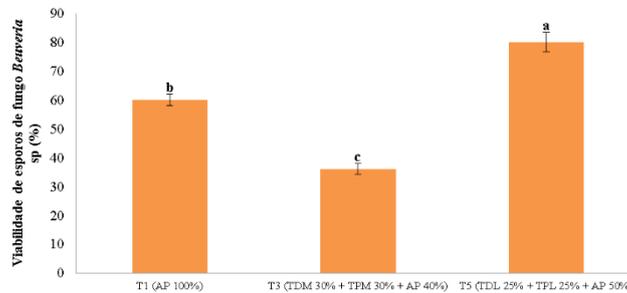
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Adiante, observou-se que os resultados apresentados na figura 5, mostraram uma diferença significativa entre os tratamentos, sendo o tratamento 5 composto por (TDL 25% + TPL 25% + AP 50%) foi o qual apresentou maior viabilidade de esporos desenvolvidos do fungo *Beauveria* sp. de 80%, o qual foi maior que o tratamento 1 controle (AP 100%) com 60%, seguido do tratamento 3 (TDM 30% + TPM 30% + AP 40%) com 36% apenas de viabilidade de esporos.

No mesmo sentido, a produção e viabilidade dos conídios foram avaliadas utilizando 30 g do substrato e 0,3 μL da suspensão de conídios (1×10^6 conídios/ml). Após 10 dias de incubação (umidade $70 \pm 10 \%$ e temperatura $T = 29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), o arroz ($2,00 \times 10^6$ conídios/g de substrato), algaroba ($2,36 \times 10^6$ conídios/g), malte A ($1,22 \times 10^6$ conídios/g) e B ($1,75 \times 10^6$ conídios/g), apresentaram maior produção de conídios de *Beauveria* sp. Os conídios produzidos

mostraram atividade inseticida sobre o cupim do coqueiro acima de 80% de mortalidade. Estes novos substratos brutos podem representar uma alternativa viável para produção de fungos entomopatogênicos, para uso no controle biológico de vários insetos praga, de acordo com Souza *et al.* (2018).

Figura 5. Viabilidade (%) de esporos do fungo entomopatogênico *Beauveria* sp após 24 horas de inoculação, oriundos de diferentes substratos a base de resíduos de palma de óleo. As médias foram comparadas pelo teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$)



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Em suma nossos resultados sugerem que os meios avaliados apresentaram uma boa produção do fungo *Beauveria* sp o que pode ser um indicativo para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de produção do patógeno, além de um indicativo de reaproveitamento de resíduos da indústria da palma de óleo tendo em vista reduzir os impactos ambientais dos seus subprodutos no meio ambiente e a utilização de produtos químicos na agricultura.

Conclusão

Os resíduos da palma de óleo, como a torta de dendê e a torta do palmiste podem ser utilizados na produção do fungo *Beauveria* sp, sendo 30% de cada resíduo da palma de óleo e 40% de arroz parabolizado. Isso indica que os resíduos foram eficazes na atividade, concentração e viabilidade de conídios do fungo, o que representa uma estratégia inovadora no reaproveitamento dos subprodutos da palma, contribuindo para a redução dos impactos ambientais produzidos por esses resíduos além de contribuição para a produção do fungo.

REFERÊNCIAS

AWAN, U. A., et al. Isolation, characterization, culturing, and formulation of a new *Beauveria bassiana* fungus against *Diaphorina citri*. **Biological Control**, v. 158, p. 104-586, 2021.

- COSTA, D. A. da; COLODO, J. C. N.; FERREIRA, G. D. G.; ARAÚJO, C. V. de; MOREIRA, G. R. Uso da torta de dendê na alimentação de ruminantes. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 133-137, jul./dez. 2011.
- CHILAKAMARRY, C.R., et al. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. **Bioresource Technology**. v. 343. p. 126-065. 2021.
- DOOLOTKELDIEVA, T., et al. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Kyrgyzstan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 167, p. 107-243. 2019.
- GEBREMARIAM, A., et al. Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide, **Heliyon**. v. 7, (n. 5). p. 70-91. 2021.
- HEUZÉ, V., et al. **Feedipedia**: Animal Feed Resources Information System. Paris, France: AFZ/CIRAD, AFZ and FAO. <http://www.feedipedia.org/node/43> Last updated on March 23, p. 1–15, 2016.
- JUNIOR, J. F. **Dendê manejo e uso dos subprodutos e dos resíduos**. EMBRAPA. Doc. 246. 2006.
- LI, WENYONG., et al. Classification and detection of insects from field images using deep learning for smart pest management: A systematic review. **Ecological Informatics**. v. 66, p. 101460, 2021.
- ONG, E. S., et al. Palm oil industrial wastes as a promising feedstock for biohydrogen production: A comprehensive review. **Environmental Pollution**, v. 291, p. 118160. 2021.
- RAJULA, J., et al. Chapter 4 - Current status and future prospects of entomopathogenic fungi: A potential source of biopesticides. **Recent Advancement in Microbial Biotechnology**. p. 71-98. 2021.
- SILVA, R. S., et al. Digestibilidade aparente do farelo de palmiste em tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v. 71, n. 5, p. 1595-1600, 2019.
- SOUZA A. C. B., et al. Avaliação de Substratos Brutos Alternativos para Produção do Fungo Entomopatogênico *Beauveria Bassiana* (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: (Hyphomycetes)). **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, 2018.
- TOMSON, M., SAHAYARAJ, K., SAYED, S., ELARNAOUTY, S.-A., & PETCHIDURAI, G. Entomotoxic proteins of *Beauveria bassiana* Bals. (Vuil.) and their virulence against two cotton insect pests. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33.n. 8. p. 101595, 2021.