



**CONFORME SOLICITAÇÃO DO AUTOR, ESTA  
PRODUÇÃO INTELECTUAL POSSUI RESTRIÇÃO  
DE ACESSO**

**CAXIAS DO SUL  
2023**



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS**  
**DA VIDA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Otimização e escalonamento da produção do agente de controle biológico *Beauveria bassiana* em cultivo submerso**

**VANESSA BASSO**

**CAXIAS DO SUL**  
**2023**

Vanessa Basso

**Otimização e escalonamento da produção do agente de controle biológico *Beauveria bassiana* em cultivo submerso**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Aldo José Pinheiro Dillon

CAXIAS DO SUL

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

B322o Basso, Vánessa

Otimização e escalonamento da produção do agente de controle biológico *Beauveria bassiana* em cultivo submerso [recurso eletrônico] / Vánessa Basso. – 2023.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.

Orientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Fungos como agentes no controle biológico de pragas. 2. Fungos - Controle biológico. 3. Microorganismos. 4. Biotecnologia. I. Dillon, Aldo José Pinheiro, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 582.28:632.937

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

**VANESSA BASSO**

Otimização e escalonamento da produção do agente de controle  
biológico *Beauveria bassiana* em cultivo submerso

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,  
visando à obtenção do título de Doutora em  
Biotecnologia.

TESE APROVADA EM 13 DE DEZEMBRO DE 2023.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Profa. Dra. Eloane Malvessi

Prof. Dr. Gabriel Mascarin

Prof. Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida

*“Que tudo o que vocês fizerem seja  
feito com amor.”*

(1 Coríntios 16.14 – NTLH)

*“Procure descobrir, por você  
mesmo, como o SENHOR Deus é  
bom. Feliz aquele que encontra  
segurança nele!”*

(Salmos 34.8 – NTLH)

*Dedico este trabalho a  
minha amada filha, **Isabela**  
**Zoe**, e ao meu amigo e esposo,  
**Joni**.*

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, o autor e consumidor da minha fé, pela sua infinita bondade e amor.

À minha família, a base da minha vida, pelo constante incentivo e apoio. Em especial:

- Ao meu esposo, *Joni*, que me deu o presente mais valioso durante o período do doutorado: nossa filha, *Isabela Zoe*;

- A minha mãe, *Sonia*, uma mulher cheia de força, que mesmo enfrentando um grande desafio, na minha percepção um dos mais temidos por todos, permanece firme diariamente;

- Ao meu pai, *Delmar*, que tanto me ensinou e ensina sobre cuidado e amor genuíno pela família.

Ao meu orientador, Prof. Dr. *Aldo José Pinheiro Dillon*, pelos ensinamentos e dedicação a este trabalho.

A Dillon Biotecnologia, por todo apoio estrutural, em especial a *Débora Barberis Dillon* e *Alexandre Barberis Dillon*, pela oportunidade e confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

As professoras da banca de acompanhamento, Profa. Dra. *Eloane Malvessi* e Profa. Dra. *Joséli Schwambach*.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todos os funcionários do Instituto de Biotecnologia.

Aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassa, em especial a Dra. *Roselei Claudete Fontana* e a Dra. *Sheila Montipó*, mulheres especiais que me ensinaram e auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Controle Biológico de Pragas, em especial a querida Ma. *Camila Bonatto Vicenço*, pelo auxílio e conhecimento compartilhado.

À UCS e CNPq pelo apoio estrutural e financeiro.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ii
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	i
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
<b>2.1 Controle biológico</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Dillon Biotecnologia</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3 Fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4 <i>Beauveria bassiana</i></b> .....	<b>6</b>
<b>2.5 Cultivo de <i>Beauveria bassiana</i></b> .....	<b>8</b>
<b>2.5.1 Cultivo submerso de <i>Beauveria bassiana</i></b> .....	<b>9</b>
<b>2.6 Formulações de <i>Beauveria bassiana</i></b> .....	<b>13</b>
<b>2.7 <i>Tetranychus urticae</i> Koch</b> .....	<b>15</b>
3.OBJETIVOS.....	19
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>19</b>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.1 Capítulo 1 .....	21
4.2 Capítulo 2 .....	58
4.3 Capítulo 3 .....	89
5. DISCUSSÃO GERAL.....	100
6. CONCLUSÕES .....	104
7. PERSPECTIVAS .....	106
8. REFERÊNCIAS .....	107

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Ciclo esquemático do processo de colonização de <i>Beauveria bassiana</i> em artrópodes.....	08
<b>Figura 2.</b> Estágios de desenvolvimento de <i>Tetranychus urticae</i> .....	16

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CA** – Conídios aéreos

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**DAI** – Doutorado Acadêmico para Inovação

**DCCR** – Delineamento composto central rotacional

**ES** – Esporos submersos

**MAPA** – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

**OD** – Oxigênio dissolvido

**PB** – Plackett-Burman

**UFC** – Unidades formadoras de colônia

**UV** – Radiação ultravioleta

**TD** – Terra diatomácea

## RESUMO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* consiste em um dos principais microrganismos utilizados na composição de produtos biológicos. Embora a produção comercial deste bioagente seja tradicionalmente baseada no cultivo em estado sólido, o cultivo submerso tem recebido crescente atenção na indústria devido às suas numerosas vantagens em comparação ao processo de cultivo sólido. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi, em parceria com a empresa Dillon Biotecnologia, otimizar a produção de esporos submersos (ES) de *B. bassiana* e escalonar o cultivo submerso do fungo em biorreator de escala piloto, sendo estudadas as linhagens IBCB 868, IBCB 66 e CBMAI 1306. Os esporos submersos produzidos foram formulados e submetidos a avaliações de estabilidade e eficácia no controle do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*). A otimização do meio de cultura, realizada a partir do planejamento experimental Plackett-Burman (PB) seguido do delineamento composto central rotacional (DCCR), resultou na obtenção de concentrações de ES acima de  $1 \times 10^9$  ES mL<sup>-1</sup> em apenas três dias de crescimento para a linhagem IBCB 868 de *B. bassiana*. Adicionalmente, os cultivos em biorreator de escala laboratorial, conduzidos com a mesma linhagem, possibilitaram a identificação das condições ideais de pH e oxigênio dissolvido (OD) para o crescimento ótimo do fungo. Formulações sólidas foram desenvolvidas para as linhagens, a partir do crescimento no meio de cultura otimizado. Os formulados demonstraram ser eficazes no controle do ácaro rajado e mantiveram-se estáveis após 90 dias de armazenamento sob refrigeração ( $4 \pm 1$  °C) com concentração de UFC g<sup>-1</sup> superior a  $1 \times 10^9$ . Por fim, o escalonamento do cultivo realizado com a linhagem IBCB 868 em biorreator de escala piloto de 500 litros, com 350 litros de volume operacional, mostrou a possibilidade de obter quantidades substanciais de ES do fungo *B. bassiana*, acima de  $1 \times 10^9$  ES mL<sup>-1</sup>, em um curto período de apenas três dias. Os resultados obtidos neste estudo representam uma importante contribuição para a ampliação do conhecimento acerca da cultura líquida, uma tecnologia promissora para o desenvolvimento de produtos à base de fungos entomopatogênicos.

**Palavras-chave:** Controle biológico; *Beauveria bassiana*; cultivo submerso; esporos submersos; unidades formadoras de colônia

## ABSTRACT

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is one of the main microorganisms used in the composition of biological products. Although commercial production of this bioagent is traditionally based on solid state cultivation, submerged cultivation has received increasing attention in the industry due to its numerous advantages compared to the solid cultivation process. In this context, the objective of this work was, in partnership with the company Dillon Biotechnology, to optimize the production of submerged spores (SS) of *B. bassiana* and scale up the submerged cultivation of the fungus in a pilot-scale bioreactor, with a focus on studying the IBCB 868, IBCB 66 and CBMAI 1306 strains. The submerged spores produced were formulated and subjected to stability and efficacy evaluations in controlling the two-spotted mite (*Tetranychus urticae*). The optimization of the culture medium, carried out using the Plackett-Burman (PB) experimental design followed by the central composite rotational design (CCRD), led to the achievement of SS concentrations exceeding  $1 \times 10^9$  SS mL<sup>-1</sup> in just three days of growth for the IBCB 868 strain of *B. bassiana*. Additionally, cultivations in a laboratory-scale bioreactor, conducted with the same strain, made it possible to identify the ideal pH and dissolved oxygen conditions for optimal growth of the fungus. Solid formulations were developed for the strains based on growth in the optimized culture medium. The formulated products proved effective in controlling the spider mite and remained stable after 90 days of storage under refrigeration ( $4 \pm 1$  °C) with a UFC g<sup>-1</sup> concentration exceeding  $1 \times 10^9$ . Finally, the scaling up of the cultivation conducted with the IBCB 868 strain in a 500-liter pilot-scale bioreactor, with a 350-liter operational volume, demonstrated the possibility of obtaining substantial quantities of *B. bassiana* SS, above  $1 \times 10^9$  SS mL<sup>-1</sup>, in a short period of just three days. The results obtained in this study represent an important contribution to expanding knowledge about liquid culture, a promising technology for the development of products based on entomopathogenic fungi.

**Keywords:** Biological control; *Beauveria bassiana*; liquid cultivation; submerged spores; colony forming units