



**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
2.1 Controle biológico	3
2.2 Dillon Biotecnologia	4
2.3 Fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico	5
2.4 <i>Beauveria bassiana</i>	6
2.5 Cultivo de <i>Beauveria bassiana</i>	8
2.5.1 Cultivo submerso de <i>Beauveria bassiana</i>	9
2.6 Formulações de <i>Beauveria bassiana</i>	13
2.7 <i>Tetranychus urticae</i> Koch	15
3.OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
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

- Figura 1.** Ciclo esquemático do processo de colonização de *Beauveria bassiana* em artrópodes.....08
- Figura 2.** Estágios de desenvolvimento de *Tetranychus urticae*.....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 1×10^9 ES mL⁻¹ 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 ± 1 °C) com concentração de UFC g⁻¹ superior a 1×10^9 . 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 1×10^9 ES mL⁻¹, 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 1×10^9 SS mL⁻¹ 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 ± 1 °C) with a UFC g⁻¹ concentration exceeding 1×10^9 . 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 1×10^9 SS mL⁻¹, 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