



LARISSA CASTRO DE REZENDE

**FERMENTAÇÃO LÍQUIDA COMO
ESTRATÉGIA PARA PRODUÇÃO MASSAL DE
CONÍDIOS DE *Trichoderma***

LAVRAS – MG

2017

LARISSA CASTRO DE REZENDE

**FERMENTAÇÃO LÍQUIDA COMO ESTRATÉGIA PARA PRODUÇÃO
MASSAL DE CONÍDIOS DE *Trichoderma***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Controle Biológico, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Wagner Bettiol

Orientador

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

Coorientador

LAVRAS – MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ribeiro, Larissa Castro de Rezende.

Fermentação líquida como estratégia para produção massal de
conídios de *Trichoderma* / Larissa Castro de Rezende. - 2014.
55 p.: il.

Orientador: Wagner Bettiol.

Coorientador: Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2014.

Bibliografia.

1. *Trichoderma*. 2. Fermentação líquida. 3. Produção massal. I.
Bettiol, Wagner. II. Medeiros, Flávio Henrique Vasconcelos de. III.
Título.

LARISSA CASTRO DE REZENDE

**FERMENTAÇÃO LÍQUIDA COMO ESTRATÉGIA PARA PRODUÇÃO
MASSAL DE CONÍDIOS DE *Trichoderma***

**LIQUID FERMENTATION AS STRATEGY FOR THE MASS
PRODUCTION OF *Trichoderma* CONIDIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Controle Biológico, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de junho de 2014.

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros	UFLA
Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira	Embrapa Meio Ambiente
Dr. Marcelo Augusto Boechat Morandi	Embrapa Meio Ambiente

Dr. Wagner Bettiol
Orientador

LAVRAS – MG

2017

Aos meus pais José Adalberto e Fátima pelo constante estímulo ao estudo. As minhas irmãs, por me apoiarem sempre. Ao Matheus, que mesmo longe se faz tão presente em minha vida, me proporcionando sempre muitas alegrias.

OFEREÇO

Ao Prof. Reginaldo da Silva Romeiro (in memoriam), pelos ensinamentos que vou levar por toda vida e pelo incansável incentivo à pesquisa, contribuindo para que este mestrado fosse realizado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do programa CAPES/Embrapa, por me confiar a bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, por quem tenho grande admiração, pela paciência, confiança e incentivo durante estes dois anos, contribuindo para meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros, pela receptividade desde os primeiros contatos, pelas cobranças e conselhos que contribuíram muito na realização deste trabalho.

Ao Pesquisador da Embrapa Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira, por ter sido tão acessível e atencioso, ajudando desde as dúvidas de estatística à montagem dos ensaios.

Aos técnicos e professores do Departamento de Fitopatologia da UFLA, pelo apoio e amizade.

À Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade de desenvolver o trabalho de dissertação e aos técnicos do LMA, pela ajuda constante.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico (UFLA), pelo companheirismo durante o tempo de convivência.

Aos meus grandes amigos de curso André, Dayana, Marie, Marciel, Manoel e Luana, por me apoiarem sempre e pela incansável torcida.

Às companheiras de Lavras, Dani e Larissa, pelas longas conversas, conselhos e risadas.

Aos amigos do LMA, Cassiano, Daniel, Dalton, Carlos, Gabriel, Guilherme, Lúcio, Michelli, Regiane e Zayame, por terem sido uma verdadeira família em Jaguariúna.

A todos aqueles que em maior ou menor grau contribuíram dando sugestões e ajudando nos trabalhos, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A demanda por produtos biológicos para controle de doenças de plantas cresce constantemente. Dentre os principais agentes de biocontrole de doenças de plantas, destaca-se o *Trichoderma* spp. Os produtos comerciais à base desse antagonista são obtidos a partir da fermentação em meio sólido, que apesar de esporos de boa qualidade, não conseguem atender a demanda, além da falta de padronização. A fermentação em meio líquido é o método mais adequado comparado ao meio sólido para produção em grande escala de *Trichoderma* spp. Objetivou-se, neste trabalho, otimizar a combinação de variáveis que interferem no processo de produção de conídios de *Trichoderma asperellum*, viabilizando sua produção por fermentação líquida. Ensaaios em Erlenmeyers foram utilizados para estabelecer a melhor condição e composição dos fatores: pH, fotoperíodo, temperatura, relação C:N e atividade de água na produção de conídios, unidades formadoras de colônias e incremento de biomassa fúngica do isolado LQC-96 de *T. asperellum*. Após a otimização do meio de cultivo, foi estabelecida a curva de crescimento do isolado LQC-96 e novos isolados de *Trichoderma* spp. foram testados nessas condições. Foram utilizados Erlenmeyers de 250 ml de capacidade, contendo 90 ml de meio Czapek-Dox modificado e 10 ml da suspensão de inóculo (3×10^6 conídios mL⁻¹) de *T. asperellum*. Os Erlenmeyers foram mantidos em agitação orbital a 160 rpm sob diferentes temperaturas e fotoperíodos, por sete dias. Após esse período, foi avaliado o número de conídios da suspensão, o peso seco da biomassa e determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC). Cada Erlenmeyer representou um tratamento distinto, submetido aos diferentes níveis dos fatores testados, como determinado pelo delineamento do tipo Plackett-Burman (PB 12) e, posteriormente, pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Das cinco variáveis testadas, apenas o pH e a relação C:N foram significativos para a produção de conídios e submetidas ao segundo delineamento. As demais variáveis tiveram suas condições fixadas. As melhores condições para produção de conídios de *T. asperellum* por fermentação líquida foram em pH inicial de 3,5, relação C:N do meio de 200:1, 30 °C, sem glicerol e sob luz por 24 h. Além dos conídios, foi observada a produção de clamidósporos. A maior concentração de conídios foi observada após sete dias de agitação. Os isolados de T12 e T18 de *Trichoderma erinaceum* e o isolado T15 de *T. harzianum* também produziram altas concentrações de conídios (10^8 conídios mL⁻¹) nas condições otimizadas.

Palavras-chave: *Trichoderma*. Fermentação líquida. Produção massal. Bioprodutos. DCCR.

ABSTRACT

The demand for biological products for the control of plant diseases is in constant growth. Among the main agents for the biocontrol of plant diseases, the *Trichoderma* spp. is prominent. The commercial products based on this antagonist are obtained by means of the fermentation in solid medium, which, despite presenting good quality spores, cannot meet the demand and is presented with lack of standardization. Fermentation in liquid medium is a more adequate method when compared to solid medium for the large-scale production of *Trichoderma* spp. In this work, the objective was to optimize the combination of variables that interfere in the production process of *Trichoderma asperellum* conidia, making its production in liquid medium feasible. Trials in Erlenmeyers were used to establish the best condition and composition of factors: pH, photoperiod, temperature, C:N relation and water activity for the production of conidia, colony forming units and increment of fungal biomass of the LQC-96 *T. asperellum* isolate. After optimization of the cultivation medium, the growth curve of the LQC-96 isolate was established, and new *Trichoderma* spp. isolates were tested under these conditions. Erlenmeyers of 250 mL of capacity, containing 90 mL of modified Czapek-Dox medium and 10 mL of *T. asperellum* inoculum suspension (3×10^6 conidia mL⁻¹) were used. The Erlenmeyers were maintained in orbital agitation at 160 rpm under different temperatures and photoperiods, for seven days. After this period, the number of conidia in the suspension and the dry biomass weight were evaluated, also determining the number of colony forming units (CFU). Each Erlenmeyer represented a distinct treatment, submitted to the different levels of factors, as determined by the Plackett-Burman design (PB 12) and, posteriorly, by the Rotational Central Composite Design (RCCD). Of the five variables tested, only pH and C:N relation were significant to the production of conidia and submitted to the second design. The remaining variables were fixed. The best conditions for the production of *T. asperellum* conidia by liquid fermentation were under initial pH of 3.5 and C:N relation of 200:1, at 30°C, with no glycerol and under light for 24 hours. In addition to the conidia, the production of chlamydo spores. The highest concentration of conidia was observed after seven days of agitation. The *Trichoderma erinaceum* isolates, T12 and T18, and *T. harzianum* isolate, T15, also produced high concentrations of conidia (10^8 conidia mL⁻¹) under optimized conditions.

Keywords: *Trichoderma*. Liquid fermentation. Mass production. Bioproducts. RCCD.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados das variáveis sobre a produção de conídios de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.31
- Figura 2 - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados das variáveis sobre a unidade formadora de colônia (UFC) de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.....31
- Figura 3 - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados das variáveis sobre a biomassa fúngica seca de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.....32
- Figura 4 - Superfície de resposta e curva de contorno descritas pelo modelo proposto (Y), para a produção de conídios (A e B), a unidade formadora de colônias (UFC) (C e D) e biomassa fúngica seca (E e F), do isolado de *Trichoderma asperellum* LQC 96 produzidos por fermentação líquida.....38
- Figura 5 - Clamidósporos de *Trichoderma asperellum* formados em meio líquido com pH inicial 2,0 apresentando massa de micélio (A) e clamidósporos formados em meio líquido com pH inicial de 1,5, apresentando estruturas mais dispersas (B).....39
- Figura 6 - Curva de crescimento de *Trichoderma asperellum* em meio líquido otimizado. Número de conídios produzidos (A); pH do meio líquido (B); unidade formadora de colônias (UFC) (C) e biomassa fúngica seca (D).42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Variáveis e seus valores codificados e reais, utilizados no planejamento experimental Plackett-Burman (PB 12), para otimização da produção de conídios de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.....23
- Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman (PB 12), para cinco variáveis.24
- Tabela 3 - Variáveis e seus valores codificados e reais utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização da produção de conídios de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.....25
- Tabela 4 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis visando a otimização da produção de conídios de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.....26
- Tabela 5 - Número de conídios, unidade formadora de colônias (UFC) e biomassa fúngica seca (g) de *Trichoderma asperellum* obtidos em experimentos conduzidos com a matriz do delineamento Plackett-Burman (PB 12) para estudo das variáveis pH inicial, temperatura, fotoperíodo, relação C:N e concentração de glicerol.30
- Tabela 6 - Número de conídios, unidade formadora de colônia (UFC) e biomassa fúngica seca de *Trichoderma asperellum*, obtidos por fermentação líquida utilizando a matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para estudo do pH inicial e relação C:N do meio.....34

Tabela 7 - Coeficientes de regressão do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para produção de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> em meio líquido.....	35
Tabela 8 - Coeficientes de regressão do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a unidade formadora de colônias (UFC) de <i>Trichoderma asperellum</i> em meio líquido.	36
Tabela 9 - Coeficientes de regressão do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a biomassa fúngica de <i>Trichoderma asperellum</i> em meio líquido.....	37
Tabela 10 - Produção de conídios, unidade formadora de colônias (UFC) e biomassa fúngica de quatro isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em fermentação líquida em dois experimentos distintos, utilizando as condições otimizadas de produção.....	40
Tabela 11 - Efeito de diferentes proporções de aeração do meio líquido na produção de conídios, unidade formadora de colônias (UFC) e biomassa fúngica seca de <i>Trichoderma asperellum</i> , em dois experimentos distintos.	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Isolados e preparação do inóculo	21
3.2	Meio de cultura padrão	21
3.3	Ensaio preliminares (shake-flask)	22
3.3.1	Seleção das variáveis para a produção líquida de <i>Trichoderma asperellum</i> utilizando o planejamento Plackett-Burman	23
3.3.2	Otimização das variáveis para produção líquida de <i>Trichoderma asperellum</i> utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional.....	25
3.3.3	Diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. produzidos por fermentação líquida sob condições otimizadas.....	27
3.3.4	Efeito da aeração durante a fermentação líquida de <i>Trichoderma asperellum</i> sob condições otimizadas.....	27
3.3.5	Curva de crescimento de <i>Trichoderma asperellum</i> em meio líquido, sob condições otimizadas	28
4	RESULTADOS	29
4.1	Ensaio preliminares (shake-flask)	29
4.1.1	Seleção das variáveis para a produção líquida de <i>Trichoderma asperellum</i> utilizando o planejamento Plackett-Burman	29
4.1.2	Otimização das variáveis para produção líquida de <i>Trichoderma asperellum</i> utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional.....	33
4.1.3	Diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. produzidos por fermentação líquida sob condições otimizadas.....	39
4.1.4	Efeito da aeração durante a fermentação líquida de <i>Trichoderma asperellum</i> sob condições otimizadas.....	40
4.1.5	Curva de crescimento de <i>Trichoderma asperellum</i> em meio líquido, sob condições otimizadas	41
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A interação natural entre microrganismos por recursos biológicos limitados é a base para o biocontrole de patógenos de plantas (WATANABE; KUMAKURA; NAGAYAMA, 2006). O uso destes microrganismos antagonistas é uma alternativa atraente para produção e oferta de alimentos mais saudáveis, em um sistema sustentável de produção integrada (LOPES, 2009), menos dependente do uso de agrotóxicos (MORANDI; BETTIOL, 2009).

A demanda por agentes de controle biológico vem crescendo no Brasil e no mundo, nos últimos anos (TEIXEIRA et al., 2010), em função desses bioprodutos atingirem alguns nichos onde o controle químico não é capaz de atuar (MACHADO et al., 2012). Também os inúmeros problemas ambientais, como contaminação do solo, água e eliminação de organismos benéficos, causados pelo uso dos agrotóxicos (BETTIOL et al., 2009) e a resistência dos patógenos a esses produtos (HARMAN, 2000) colabora com o aumento do mercado.

Produtos comerciais formulados com bioagentes para o controle de doenças de plantas estão disponíveis no mercado mundial (BETTIOL et al., 2012). Esses autores encontraram 117 produtos biológicos, a maioria deles à base de *Trichoderma* spp., é este o agente mais estudado no Brasil e outros países da América Latina contra patógenos de plantas (BETTIOL et al., 2008, 2014). Entretanto, ainda existem fatores limitantes para a utilização agrícola de bioformulados à base de *Trichoderma* spp. no Brasil. Dentre os principais aspectos, está o pequeno número de produtos devidamente registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Pomella e Ribeiro (2009) citam, ainda, a dificuldade de produção massal e problemas de formulação desses agentes de biocontrole. As formulações, que geralmente não são publicadas, tratam-se de segredos comerciais das empresas produtoras (GREASHAM, 1993), o que dificulta o acesso a informação.

Técnicas para a produção massal de *Trichoderma* spp. foram em grande parte desenvolvidas para a produção de fungos entomopatogênicos (LOPES, 2009). Atualmente, a produção massal desse antagonista é feita por fermentação em meio sólido (LOPES, 2009; MACHADO et al., 2012; MUNOZ et al., 1995; SINGHT; SRIVASTAVA; SINGH, 2007), devido à facilidade de produção (MUNOZ et al., 1995) e a tolerância dos conídios produzidos ao estresse abiótico, comparados com os propágulos derivados da fermentação líquida (WATANABE; KUMAKURA; NAGAYAMA, 2006). Entretanto, apesar de esporos de alta qualidade, a fermentação em meio sólido para produção de *Trichoderma* em grande escala não tem seu processo bem desenvolvido para atender a demanda de produção (SRIRAM; ROOPA; SAVITHA, 2011). Associado a isso, há falta de padronização, enquanto a fermentação líquida permite controle da produção e tempo de processo, ocupa menor espaço e menos mão de obra, e permite o controle sobre o nível de contaminação, facilitando, assim, a produção abundante de biomassa (HARMAN et al., 1991).

A fermentação líquida é o método mais adequado comparado ao meio sólido de fermentação para a produção em grande escala (VERMA et al. , 2007) e trabalhos no intuito de permitir que conídios com boa viabilidade e maior tolerância a fatores adversos sejam produzidos estão sendo realizados.

O objetivo deste trabalho foi o de otimizar a combinação entre diferentes variáveis que interferem no processo de produção de conídios de *Trichoderma asperellum*, viabilizando sua produção em cultura submersa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Trichoderma spp. são fungos de vida livre, ubíquos e altamente interativos na raiz e no solo, bem como no interior da planta, considerados saprófitas (POMELLA; RIBEIRO, 2009; SAMUELS, 1996). Quanto à sua capacidade antagonista, pode-se afirmar que a eficiência está ligada aos seus diferentes modos de ação, como parasitismo, antibiose, competição e indução de resistência (VERMA et al., 2007). Jin, Taylor e Harman (1996) atribuíram essa característica à sua produção de compostos antimicrobianos, além do agressivo crescimento e fisiologia, podendo agir, ainda, como promotores de crescimento. Os mecanismos desse fungo na promoção de crescimento vegetal, ainda são pouco esclarecidos em comparação aos mecanismos de ação envolvendo o antagonismo direto (POMELLA; RIBEIRO, 2009).

Esse gênero é um dos mais explorados, entre os fungos filamentosos, para controle de fitopatógenos, por serem encontrados em uma vasta diversidade de ambientes, pela facilidade de serem cultivados, rápido crescimento em um grande número de substratos e devido ao fato de não serem patogênicos às plantas superiores (PAPAVIZAS; LEWIS; ABD-ELMOITY, 1982). Além disso, são importantes devido ao potencial industrial e biotecnológico (SAMUELS, 1996).

Pomella e Ribeiro (2009) relatam a eficiência de produtos à base de *Trichoderma* spp., disponíveis no mercado, na redução da incidência de tombamentos de plantas e da severidade de doenças ocasionadas por patógenos habitantes de solo, como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Pythium* e *Fusarium*. Representa uma estratégia de controle para o mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, um dos maiores problemas em lavouras de soja, feijão e algodão no Brasil. O antagonista pode ser utilizado no tratamento de sementes e agir nos escleródios.

Propágulos de *Trichoderma* podem ser produzidos em fermentação líquida ou sólida (PANAHIAN; RAHNAMA; JAFARI, 2012; SRIRAM; ROOPA; SAVITHA, 2011). Atualmente, a produção massal desse antagonista é feita, principalmente, por fermentação em meio sólido (LOPES, 2009; MACHADO et al., 2012; MUNOZ et al., 1995; SINGHT; SRIVASTAVA; SINGH, 2007). Entretanto, Sriram, Roopa e Savitha (2011) afirmaram que a fermentação em meio sólido não tem técnicas desenvolvidas o suficiente para atender a demanda de produção industrial para esse bioagente, enquanto que o processo de fermentação líquida apresenta características desejáveis à produção massal comercial e à obtenção de metabólitos produzidos pelos microrganismos, lembrando que esses metabólitos também apresentam importância no biocontrole. Durante o processo, pode-se garantir homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros como pH, temperatura, aeração, umidade e concentração de oxigênio dissolvido (SANROMÁN; COUTO, 2006), é possível obter elevadas quantidades de biomassa em um pequeno espaço físico e em pouco tempo (HARMAN et al., 1991; LOUREIRO et al., 2003) dentre outras vantagens. Também, a possibilidade de automatizar muitas operações (JAKUBÍKOVA et al., 2006) e de controlar o nível de contaminantes (HARMAN et al., 1991), comparado ao processo de fermentação sólida, é importante ser considerada. *Beauveria bassiana*, comercializado como Boverin, *Verticillium lecanii*, comercializado na Europa como Vertalec e Micotal, e *Metarhizium anisopliae*, na formulação BIO 12020 (LOUREIRO et al., 2003) são alguns casos de sucesso com a utilização desse método.

Produtos à base de *Trichoderma* podem apresentar três diferentes tipos de propágulos (AMSELLEM et al., 1999; PAPAIVIZAS, 1985; VERMA et al., 2007): micélio, conídios e clamidósporos, os conídios os mais utilizados para biocontrole de fitopatógenos (ELAD, 2000). Cada um possui características fisiológicas distintas em termos de estabilidade de produção e atividade de

biocontrole (VERMA et al., 2007). Os clamidósporos são os mais estáveis, porém, para sua produção, requerem longo período de cultivo (LEWIS, 1983 apud VERMA et al., 2007), já os conídios são mais suscetíveis às condições ambientes, mas são produzidos mais rapidamente (VERMA et al., 2005), além de sua maior viabilidade, são considerados como a melhor opção do ponto de vista da aplicação (AMSELLEM et al., 1999). Eyal et al. (1997) testaram as condições ideais de produção massal de clamidósporos em fermentação líquida e obtiveram os melhores resultados de viabilidade destes, quando fermentados por 120-160 h, praticamente o dobro do tempo quando comparados à fermentação líquida para produção de conídios, que variam de 72-96 h (JIN; TAYLOR; HARMAN, 1996) e o mesmo tempo para a produção de conídios via fermentação sólida. Quanto ao micélio, Amsellem et al. (1999) afirma que os conídios podem não sobreviver às etapas de seu processamento, não viáveis para formulação de produtos. No entanto, a presença dos vários metabólitos essenciais para a atividade de biocontrole, ligados à ruptura das membranas lipídicas, atividades antimicrobianas e indução de resistência da planta (SZEKERES et al., 2005), está associada ao micélio, portanto, é necessária uma estratégia para sua produção massal junto aos conídios (HANSON; HOWELL, 2002).

Ajustes nas condições de fermentação líquida devem ser feitos para viabilizar a produção de conídios de *Trichoderma* em cultura submersa, beneficiando, assim, a produção, a comercialização e a utilização de produtos à base desses bioagentes. O conhecimento das variáveis como: meios e sua relação C:N (GAO et al., 2007), tipo de inóculo inicial, temperatura de fermentação, pH, atividade de água, fotoperíodo e taxas de agitação são essenciais ao desenvolvimento dos critérios para a fermentação líquida em larga escala (JIN; TAYLOR; HARMAN, 1996).

O inóculo inicial, a idade da cultura e a presença ou não de micélio inoculados no meio líquido para fermentar, interferem no tempo de fermentação (JIN; TAYLOR; HARMAN, 1996). Conídios e micélio, com 48 h, foram inoculados e esporularam 30 h antes do que conídios inoculados sozinhos. Informações precisas sobre esses fatores, que dirigem o processo de esporulação em fermentação líquida de fungos, especialmente para *Trichoderma* spp., são escassas e incompletas, é uma tarefa desafiadora e o ponto chave deste trabalho.

Os meios microbiológicos, para fins industriais ou de laboratório, devem ser formulados no intuito de fornecer a energia adequada, satisfazendo os requisitos nutricionais elementares e específicos do microrganismo para que ele cresça (GREASHAM, 1993). Além de não conterem materiais que sejam inibidores ao crescimento do microrganismo (OKAFOR, 2007). Os processos de fermentação, geralmente, empregam dois meios, bifásicos, um para o desenvolvimento do inóculo inicial e outro para o processo fermentativo em si (GREASHAM, 1993). Meios líquidos são geralmente utilizados por necessitarem de menos espaço, são mais propícios a processos de engenharia e por eliminarem o custo do fornecimento de ágar e outros agentes sólidos (OKAFOR, 2007). Para a produção do inóculo inicial de *Trichoderma* é comum o uso do meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (LATORRE et al., 1997; SRIRAM; ROOPA; SAVITHA, 2011; STEYAERT; WELD; STEWART, 2010) e para o processo fermentativo o meio basal Czapek Dox (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006). Para escolha dos meios, os custos dos reagentes utilizados devem ser levados em consideração (PANAHIAN; RAHNAMA; JAFARI, 2012).

Vários fatores abióticos são conhecidos por influenciar a conidiogênese de *Trichoderma* spp., incluindo os níveis de carbono e nitrogênio, relação C:N e o pH do meio (GAO et al., 2007). Este último, influenciando tanto a conidiação quanto a morfologia das colônias de *Trichoderma*, mas a natureza exata dessa influência não é conhecida (STEYAERT; WELD; STEWART, 2010). A

quantidade e a fonte de carbono do meio são importantes (GREASHAM, 1993) e promovem diferenças de esporulação do fungo (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006). Nitrogênio também é um elemento crítico para os microrganismos, pois compõe as proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas e coenzimas necessárias para o crescimento e funcionamento da célula (GOLUEKE, 1991). A relação C:N na composição do substrato é importante e uma maior relação C:N leva benefícios para a esporulação do *Trichoderma* spp. e para sua atividade de biocontrole (VERMA et al. , 2007).

A expressão gênica dos fungos filamentosos, como o *Trichoderma* spp., é regulada pelo pH do ambiente. Esses genes são preferencialmente expressos sob condições ácidas ou alcalinas, dependendo do gene em particular. À medida que o pH do ambiente é reduzido ou elevado, aumenta o nível de expressão de alguns genes, como a hidrofobina, ou diminui uniformemente (STEYAERT; WELD; STEWART, 2010). Jin, Taylor e Harman (1996) constatou que alterações no pH do meio e os valores de oxigênio dissolvido foram correlacionados com os estágios de desenvolvimento morfológico e conidiação de *Trichoderma* durante o processo de fermentação líquida, utilizando assim os valores de pH como indicadores para controlar as fases do processo de fermentação. Toda essa complexa morfologia dos microrganismos filamentosos os diferencia do comportamento em fluxo de caldos de fermentação contendo culturas bacterianas (PAPAGIANNI, 2004).

Jin, Taylor e Harman (1996) e Sriram, Roopa e Savitha (2011) produziram e testaram conídios de *Trichoderma* spp., advindos de fermentação em meio líquido e concluíram que o período de incubação e período de fermentação afetam a tolerância à dessecação, e que a adição de glicerol é uma alternativa para aumentar a tolerância a esse fator. A adição de glicerol altera a atividade da água no meio, induzindo a produção de trealose nos conídios, proporcionando tolerância à dessecação aos propágulos. A atividade reduzida da

água no meio de produção, devido à adição de glicerol, resultou em formulações tolerantes à dessecação, apresentando também melhores resultados quando comparado ao uso do polietilenglicol (PEG), que confere viscosidade ao meio e dificulta a oxigenação (SRIRAM; ROOPA; SAVITHA, 2011).

Outros parâmetros a serem ajustados para maximizar a conidiogênese são o fotoperíodo e a temperatura. Em várias espécies do gênero *Trichoderma* um breve pulso de luz desencadeia a conidiação, levando à produção de anéis de conídios concêntricos em resposta à alternância dos ciclos de luz-escuro (STEYAERT; WELD; STEWART, 2010), mostrando a importância da luz em seu processo de produção massal de conídios. Quanto à temperatura, estudos feitos por Jin, Taylor e Harman (2006) mostraram que uma temperatura por volta de 32 °C promoveu uma maior conidiação dos isolados de *Trichoderma* em meio líquido, existindo certa especificidade dependendo da espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados nas instalações do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) da Embrapa Meio Ambiente, situado em Jaguariúna, São Paulo.

3.1 Isolados e preparação do inóculo

Trichoderma asperellum (isolado LQC96), *Trichoderma erinaceum* (isolados T12 e T18) e *Trichoderma harzianum* (isolado T15), provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Quarentena “Costa Lima” (LQC) da Embrapa Meio Ambiente, foram utilizados neste estudo. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Acumedia Manufactures, Michigan) e incubados em câmara de crescimento a $25\text{ °C} \pm 2$ com fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. A partir dessas placas, foram preparadas suspensões de conídios, ajustadas em câmara de Neubauer para 3×10^6 conídios mL^{-1} . As suspensões foram utilizadas como inóculo inicial nos ensaios de fermentação em meio líquido.

3.2 Meio de cultura padrão

Para estudar o efeito de fatores específicos no crescimento e produção de conídios dos isolados de *Trichoderma* spp., durante a fermentação líquida, foi utilizado o meio básico de Czapek-Dox modificado: 2,0 g L de NaNO_3 , 1,0 g L de K_2HPO_4 , 0,5 g L de KCl, 0,5 de MgSO_4 , 0,01 g L de FeSO_4 (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006) e 10,0 g L de sacarose ($\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). A fonte de nitrogênio utilizada foi a peptona de caseína (teor de N 12% e C 13%), variando a quantidade de acordo com o tratamento, assim como a concentração de glicerol e o pH inicial medido com pHmetro e ajustado pela adição de uma solução de $0,1\text{ mol L}^{-1}$ NaOH ou $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de H_3PO_4 , antes da esterilização.

3.3 Ensaios preliminares (shake-flask)

Ensaios preliminares foram necessários para estabelecer a melhor condição e composição dos fatores envolvidos na produção de conídios e incremento de biomassa fúngica do isolado LQC96 de *T. asperellum*, por fermentação em meio líquido.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de polipropileno de 250 ml de capacidade, contendo 90 ml do meio basal e 10 ml da suspensão de inóculo (concentração de 3×10^6 conídios mL^{-1}). Os Erlenmeyers foram mantidos em agitação orbital a 160 rpm sob diferentes temperaturas e fotoperíodos. Após sete dias, avaliou-se o número de conídios e determinou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) e a biomassa seca de cada tratamento.

Para quantificação do número de conídios, uma alíquota representativa de 1 mL da suspensão de conídios produzida foi retirada e transferida para câmara de Neubauer. Antes de se iniciar a contagem, a câmara de Neubauer contendo a suspensão foi deixada em repouso por cinco minutos. A contagem foi feita com auxílio de microscópio de luz. Após a retirada das alíquotas da suspensão de conídios, todo o volume do Erlenmeyer foi transferido para um filtro de papel e mantido em estufa a $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$, por 48 horas, para determinação da biomassa seca produzida. Decorrido o tempo de secagem, os papéis de filtro foram pesados e por sua diferença da massa com a testemunha (apenas o filtro de papel seco) foi determinada a biomassa seca.

Para a determinação da UFC, foram utilizadas placas contendo meio BDA com a adição de 10 μL de Triton[®] (Projeto Qualibio –Embrapa Meio Ambiente), totalizando cinco placas por tratamento. O Triton[®] foi utilizado como redutor de crescimento das colônias, permitindo que ficassem isoladas, facilitando a visualização e sua contagem. Foi realizada uma diluição seriada até 10^{-6} (diluição de trabalho), a partir de uma alíquota da suspensão de conídios obtida. Em cada placa foram pipetados 100 μL da suspensão retirada da diluição

de trabalho e com o auxílio de uma alça de Drigalski espalhou-se por toda superfície da placa. As placas foram mantidas por 48 horas a $25\text{ °C} \pm 2$. A avaliação foi realizada através da contagem das colônias do fungo, a olho nu, após o período de incubação.

3.3.1 Seleção das variáveis para a produção líquida de *Trichoderma asperellum* utilizando o planejamento Plackett-Burman

Neste ensaio de seleção das variáveis, aplicou-se a técnica de planejamento de experimentos, utilizando-se uma matriz do tipo Plackett-Burman de 12 ensaios (PB 12) mais três pontos centrais, para que os principais efeitos das variáveis em estudo pudessem ser estimados e avaliados, selecionando, assim, as variáveis significativas para o ensaio seguinte. A Tabela 1 apresenta as variáveis e seus valores codificados e reais estudados neste planejamento.

Tabela 1 - Variáveis e seus valores codificados e reais, utilizados no planejamento experimental Plackett-Burman (PB 12), para otimização da produção de conídios de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.

Variáveis	Código	Níveis		
		-1	0	1
pH inicial	X ₁	3,5	6,0	8,5
Temperatura (°C)	X ₂	23,0	26,5	30,0
Fotoperíodo (h)	X ₃	0	12	24
Relação C:N	X ₄	20:1	90:1	160:1
Glicerol (%)	X ₅	0	1	2

Fonte: Dados da autora (2013).

Foram testados três níveis para cada uma das variáveis. A matriz do planejamento é observada na Tabela 2 (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman (PB 12), para cinco variáveis.

Tratamento*	X₁	X₂	X₃	X₄	X₅
1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1
4	1	-1	1	1	-1
5	1	1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0

Fonte: Dados da autora (2013).

(*) Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml do meio líquido Czapek Dox modificado submetidos a diferentes condições. (**) X₁: pH; X₂: Temperatura (°C); X₃: Fotoperíodo (horas); X₄: Relação C:N; X₅: Concentração glicerol (v:v).

Foram avaliados em cada tratamento o número de conídios, UFC e biomassa fúngica seca em cada Erlenmeyer (item 3.3). O ensaio foi realizado em triplicata e repetido três vezes.

Para a análise dos dados, foram utilizados os softwares STATISTICA 8.0. A análise estatística foi realizada separadamente para cada repetição do ensaio. Foram utilizadas as médias das repetições de cada tratamento para as análises. A avaliação foi realizada por meio do Diagrama de Pareto.

3.3.2 Otimização das variáveis para produção líquida de *Trichoderma asperellum* utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional

Duas das variáveis testadas anteriormente foram selecionadas (pH inicial e relação C:N do meio) e utilizadas neste ensaio. As demais variáveis tiveram seus valores fixados e considerados otimizados, já que não foram significativas para a produção de conídios em meio líquido. O pH inicial e a relação C:N do meio foram testadas utilizando uma nova faixa de valores em um novo planejamento, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com oito ensaios mais três pontos centrais. A Tabela 3 apresenta as variáveis e seus novos valores codificados e reais estudadas neste segundo delineamento experimental. Foram testados cinco níveis para cada uma das variáveis. A matriz do planejamento apresenta, além dos tratamentos em triplicata do ponto central, tratamentos utilizando pontos axiais (TABELA 4) (RODRIGUES; IEMMA, 2009). As avaliações foram semelhantes às descritas anteriormente. O ensaio foi feito em triplicata e repetido duas vezes.

Tabela 3 - Variáveis e seus valores codificados e reais utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização da produção de conídios de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.

Variáveis	Código	Níveis				
		-1.41	-1	0	1	1.41
pH inicial	X ₁	1,5	2,0	3,5	5,0	5,5
Relação C:N	X ₂	20:1	60:1	110:1	160:1	200:1

Fonte: Dados da autora (2013).

Tabela 4 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis visando a otimização da produção de conídios de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.

Tratamento*	X ₁	X ₂
1	-1 (2,0)	-1 (60:1)
2	1 (5,0)	-1 (60:1)
3	-1 (2,0)	1 (160:1)
4	1 (5,0)	1 (160:1)
5	-1.41 (1,5)	0 (110:1)
6	1.41 (5,5)	0 (110:1)
7	0 (3,5)	-1.41 (20:1)
8	0 (3,5)	1.41 (200:1)
9	0 (3,5)	0 (110:1)
10	0 (3,5)	0 (110:1)
11	0 (3,5)	0 (110:1)

Fonte: Dados da autora (2013).

(*) Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml do meio líquido Czapek Dox modificado submetidos a diferentes condições. (**) X₁: pH; X₂: Relação C:N.

Nos ensaios seguintes foram utilizadas as condições otimizadas das variáveis, do meio basal e de incubação dos Erlenmeyers, estabelecidas neste ensaio e no anterior (item 3.3.1), para a produção de conídios de *T. asperellum*.

Para a análise dos dados, foram utilizados os softwares STATISTICA 8.0. A análise estatística foi realizada separadamente para cada repetição do ensaio, utilizando as médias das repetições de cada tratamento para as análises. Foram definidas as equações estatísticas para representar o modelo para cada variável analisada. A avaliação foi feita baseada na curva de superfície de resposta.

3.3.3 Diferentes isolados de *Trichoderma* spp. produzidos por fermentação líquida sob condições otimizadas

Neste ensaio foram utilizados quatro isolados de *Trichoderma* previamente testados contra Mofo-Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) no cultivo do feijão. O isolado LQC 96 de *T. asperellum*, os isolados T12 e T18 de *T. erinaceum* e o isolado T15 de *T. harzianum*. Suspensões de conídios de cada isolado foram preparadas na concentração de 3×10^6 conídios mL⁻¹ e transferidas em Erlenmeyer contendo 90 mL do meio Czapek Dox modificado, isoladamente, na proporção de 10% (v:v). Foram avaliados para cada isolado o número de conídios, a UFC e biomassa fúngica seca (item 3.3). Os ensaios foram repetidos duas vezes e realizados em triplicata.

Para a análise dos dados, foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias. Os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

3.3.4 Efeito da aeração durante a fermentação líquida de *Trichoderma asperellum* sob condições otimizadas

A fim de determinar o efeito da aeração durante o processo de fermentação líquida de *T. asperellum* (LQC 96) em Erlenmeyer, foram testadas quatro proporções diferentes de aeração [5:1_{500mL} (Erlenmeyer de 500 mL:100 mL de meio); 5:1_{250mL} (Erlenmeyer de 250 mL:50 mL de meio); 2,5:1_{250mL} (Erlenmeyer de 250 mL:100 mL de meio); 2,5:1_{pv} (Erlenmeyer de 250 mL:100 mL de meio com pérolas de vidro)].

Os Erlenmeyers foram preparados como descrito no item 3.2, com variação da quantidade de inóculo inicial, e submetidos às condições otimizadas das variáveis, determinadas anteriormente (item 3.3.2). As avaliações foram semelhantes às descritas anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicata

Para a análise dos dados, foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias. Os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

3.3.5 Curva de crescimento de *Trichoderma asperellum* em meio líquido, sob condições otimizadas

Para o estabelecimento da curva de crescimento micelial e produção de conídios, foi utilizado o isolado LQC96 de *T. asperellum*. Foram preparados 10 Erlenmeyers idênticos (item 3.2), submetidos às condições otimizadas das variáveis, determinadas anteriormente (item 3.3.2). Os frascos foram mantidos em agitação orbital a 160 rpm e avaliados diariamente, no mesmo horário, a fim de determinar o pH, número de conídios, a UFC e biomassa fúngica seca (item 3.3). O ensaio foi realizado duas vezes e em duplicata.

Foi utilizado o software SigmaPlot 10.0 para a realização da análise estatística.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios preliminares (shake-flask)

Na produção massal de *T. asperellum* por fermentação líquida, a maior produção de conídios foi em baixas condições de pH inicial e maiores valores de relação C:N do meio. Essas condições também foram satisfatórias para a produção das outras espécies de *Trichoderma*. A maior produção de conídios ocorreu após sete dias de agitação. Durante esse período, foi observado um aumento dos valores de UFC e diminuição do peso da biomassa fúngica.

4.1.1 Seleção das variáveis para a produção líquida de *Trichoderma asperellum* utilizando o planejamento Plackett-Burman

Das cinco variáveis independentes estudadas no planejamento experimental Plackett-Burman (PB 12), apenas o pH inicial e a relação C:N do meio foram selecionadas para ensaio seguinte. Na Tabela 5, observa-se que a maior produção de conídios e de UFC foram encontrados no tratamento 7 (pH inicial 3,5, 30 °C, luz 24 h, relação C:N 160:1 e 0% de glicerol) e o maior valor do peso da biomassa fúngica seca no tratamento 8 (pH inicial 3,5, 23 °C, luz 24 h, relação C:N 160:1 e 2% de glicerol).

A produção de conídios entre os diferentes tratamentos durante a fermentação líquida, variou entre $4,80 \times 10^5$ a $8,35 \times 10^7$ conídios mL⁻¹, a UFC variou de $2,24 \times 10^5$ a $3,17 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ e o peso seco da biomassa fúngica de 0,1196 a 0,4197 g 100 mL⁻¹ (TABELA 5).

Tabela 5 - Número de conídios, unidade formadora de colônias (UFC) e biomassa fúngica seca (g) de *Trichoderma asperellum* obtidos em experimentos conduzidos com a matriz do delineamento Plackett-Burman (PB 12) para estudo das variáveis pH inicial, temperatura, fotoperíodo, relação C:N e concentração de glicerol.

Tratamento*	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Nº conídios mL ⁻¹	UFC	Biomassa (g)**
1	1	-1	1	-1	-1	2,87 x 10 ⁷	7,68 x 10 ⁶	0,2300
2	1	1	-1	1	-1	1,95 x 10 ⁷	1,65 x 10 ⁷	0,1924
3	-1	1	1	-1	1	3,75 x 10 ⁶	6,44 x 10 ⁶	0,4197
4	1	-1	1	1	-1	4,80 x 10 ⁵	1,77 x 10 ⁶	0,1196
5	1	1	-1	1	1	3,15 x 10 ⁶	2,24 x 10 ⁵	0,3031
6	1	1	1	-1	1	1,70 x 10 ⁶	7,88 x 10 ⁵	0,2903
7	-1	1	1	1	-1	8,35 x 10 ⁷	3,17 x 10 ⁷	0,2625
8	-1	-1	1	1	1	4,35 x 10 ⁷	1,12 x 10 ⁷	0,4560
9	-1	-1	-1	1	1	1,52 x 10 ⁷	4,48 x 10 ⁶	0,4160
10	1	-1	-1	-1	1	2,48 x 10 ⁶	9,88 x 10 ⁵	0,3386
11	-1	1	-1	-1	-1	1,54 x 10 ⁷	3,57 x 10 ⁶	0,3374
12	-1	-1	-1	-1	-1	3,52 x 10 ⁷	1,75 x 10 ⁷	0,2867
13	0	0	0	0	0	2,26 x 10 ⁶	6,15 x 10 ⁶	0,3822
14	0	0	0	0	0	3,02 x 10 ⁶	5,18 x 10 ⁶	0,3646
15	0	0	0	0	0	2,80 x 10 ⁶	1,89 x 10 ⁶	0,3927

Fonte: Dados da autora (2013).

(*) Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml do meio líquido Czapek Dox modificado, submetidos a diferentes condições. (**) Biomassa seca para 100 ml de meio. X₁: pH; X₂: Temperatura (°C); X₃: Fotoperíodo (horas); X₄: Relação C:N; X₅: Concentração glicerol (v:v). Valores representam médias de três repetições.

Os gráficos de diagrama de Pareto com os efeitos padronizados das variáveis independentes testadas sobre a produção de conídios, UFC e biomassa fúngica seca estão apresentados nas Figuras de 1, 2 e 3, respectivamente. Os efeitos que se estendem além da linha de referência são considerados significativos.

Figura 1 - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados das variáveis sobre a produção de conídios de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.

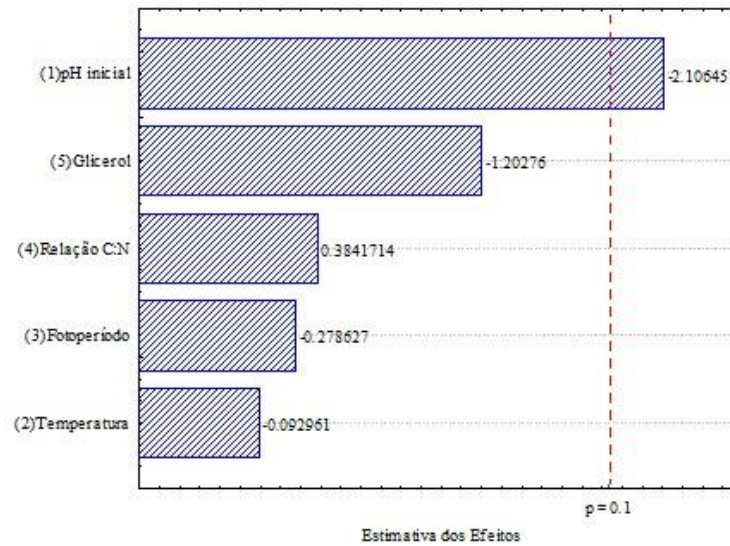
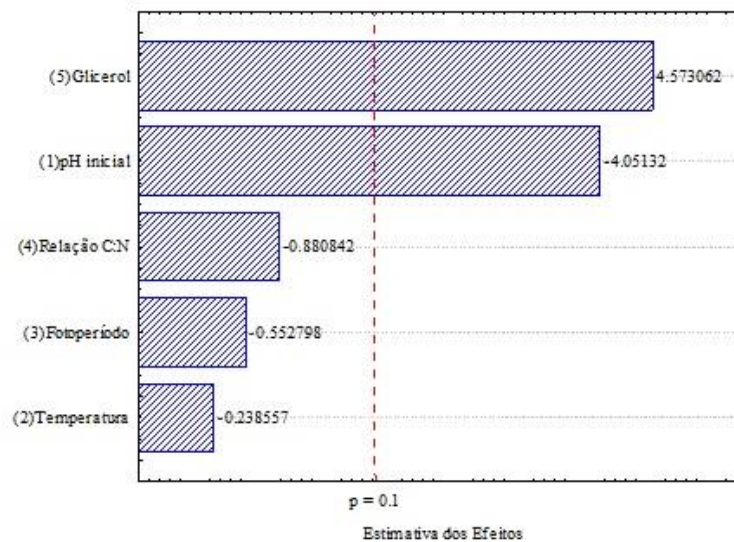
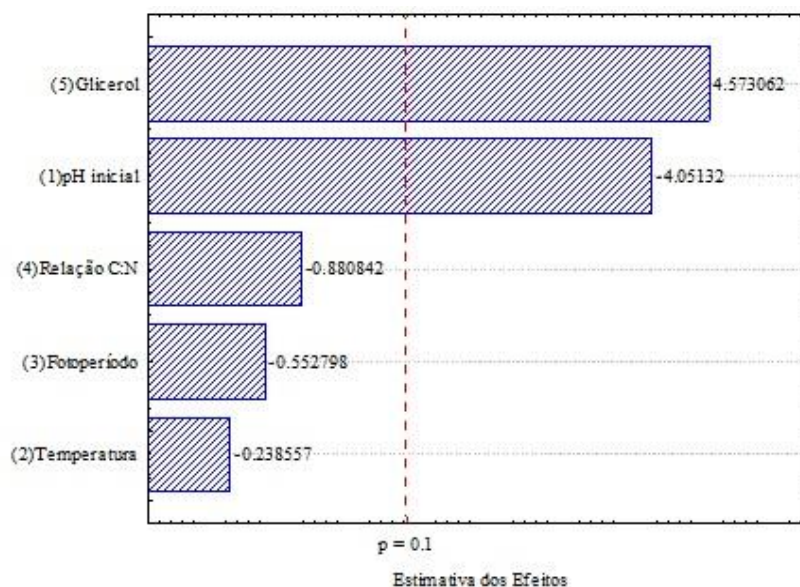


Figura 2 - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados das variáveis sobre a unidade formadora de colônia (UFC) de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.



Fonte: Dados da autora (2013).

Figura 3 - Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados das variáveis sobre a biomassa fúngica seca de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.



Fonte: Dados da autora (2013).

Apenas o pH foi estatisticamente significativo ($p \leq 0,1$) para todas as variáveis respostas analisadas. Para a produção de conídios ($p = 0,0644$) e UFC ($p = 0,0194$), o pH apresentou um efeito negativo, ou seja, um incremento no nível -1 (pH 3,5) para +1 (pH 8,5) conduziu a um decréscimo médio de $2,34 \times 10^7$ conídios mL^{-1} e $7,83 \times 10^6$ UFC mL^{-1} , respectivamente. Por isso, com o intuito de aumentar a produção de conídios, os níveis de estudo foram deslocados para níveis inferiores, de 1,5 a 5,5, no planejamento seguinte. A biomassa fúngica seca ($p = 0,0028$) obteve um aumento médio de 0,117 g com o aumento do pH de 3,5 para 8,5. Os ensaios realizados na condição de pH 3,5 apresentaram valores superiores das variáveis respostas (TABELA 5).

Para UFC e biomassa fúngica seca, além do pH, a concentração de glicerol também apresentou efeito significativo ($p \leq 0,1$). A adição de 2 ml de

glicerol ao meio levou a uma redução de 9.10×10^6 UFC mL⁻¹ e um incremento de 0,132 g de biomassa fúngica. Como o interesse é a produção de conídios e não o aumento da biomassa durante a fermentação líquida, esse fator foi retirado do planejamento seguinte, por não ser significativo ($p = 0,2597$) e, ainda, apresentar efeito negativo para essa resposta analisada.

Temperatura e fotoperíodo não foram estatisticamente significativos dentro da faixa estudada para nenhuma das respostas analisadas, foram então fixados a 30 °C e 24 horas de luz, respectivamente, no planejamento seguinte. Foram selecionados esses valores, por terem sido utilizados no ensaio que apresentou melhor resultado para produção de conídios, atingindo $8,35 \times 10^7$ conídios mL⁻¹. Os ensaios realizados em Erlenmeyer são preliminares a testes em fermentadores, que, muitas vezes, não apresentam condições de controle e/ou presença de luz. Por esse motivo, o delineamento do DCCR foi realizado, primeiramente, com luz 24 horas e, em um segundo momento, sem luz.

Embora a relação C:N também não tenha se mostrado significativa, ela foi incluída no DCCR. Essa variável foi mantida para que faixas mais baixas pudessem ser testadas, diminuindo o custo de produção. A nova faixa estudada foi de 20:1 a 200:1. A relação de 20:1 foi mantida no novo delineamento devido a ensaios anteriores em que apresentou bons resultados.

4.1.2 Otimização das variáveis para produção líquida de *Trichoderma asperellum* utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional

Neste segundo planejamento, o DCCR, foi possível calcular a interação das variáveis e os seus respectivos coeficientes para o modelo de regressão. Também permitiu a análise das superfícies de resposta, determinação das faixas ótimas das variáveis analisadas e a validação experimental dos resultados.

A matriz do delineamento experimental, bem como os resultados da produção de conídios, UFC e biomassa fúngica obtidos estão apresentados na

Tabela 6. Observando-se os resultados obtidos nesse planejamento, verificou-se que tratamento 8 foi o que apresentou a maior média de produção de conídios e UFC, $1,38 \times 10^8$ conídios mL^{-1} e $9,15 \times 10^7$ UFC mL^{-1} , respectivamente, seguidos dos tratamentos dos pontos centrais. A maior biomassa fúngica seca obtida (0,36 g) foi no tratamento 4.

O pH inicial de 3,5 e relação C:N do meio de 200:1 foram as condições referentes ao tratamento 8 e, estas foram definidas como ótimas para a produção massal de *T. asperellum* por fermentação líquida.

Tabela 6 - Número de conídios, unidade formadora de colônia (UFC) e biomassa fúngica seca de *Trichoderma asperellum*, obtidos por fermentação líquida utilizando a matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para estudo do pH inicial e relação C:N do meio.

Ensaio	X ₁	X ₂	N ^o conídios mL^{-1}	UFC	Biomassa (g) *
1	-1 (2)	-1 (60:1)	$2,0 \times 10^6$	$3,21 \times 10^6$	0,23
2	1 (5)	-1 (60:1)	$6,60 \times 10^7$	$2,41 \times 10^7$	0,26
3	-1 (2)	1 (160:1)	$8,13 \times 10^6$	$5,57 \times 10^6$	0,22
4	1 (5)	1 (160:1)	$2,98 \times 10^7$	$1,71 \times 10^7$	0,36
5	-1.41 (1.5)	0 (110:1)	$1,25 \times 10^5$	$3,48 \times 10^5$	0,23
6	1.41 (5.5)	0 (110:1)	$1,07 \times 10^8$	$8,87 \times 10^7$	0,29
7	0 (3.5)	-1.41 (20:1)	$7,76 \times 10^7$	$6,18 \times 10^7$	0,31
8	0 (3.5)	1.41 (200:1)	$1,38 \times 10^8$	$9,15 \times 10^7$	0,26
9	0 (3.5)	0 (110:1)	$9,75 \times 10^7$	$7,82 \times 10^7$	0,25
10	0 (3.5)	0 (110:1)	$9,03 \times 10^7$	$8,21 \times 10^7$	0,27
11	0 (3.5)	0 (110:1)	$9,60 \times 10^7$	$8,29 \times 10^7$	0,26

(*) peso de 100 ml; (**) X₁: pH; X₂: Relação C:N

Fonte: Dados da autora (2013).

Na Tabela 7, verifica-se que para a produção de conídios foram significativos o termo linear e quadrático do pH inicial a 5% de significância ($p \leq 0,05$), gerando assim um modelo de segunda ordem reparametrizado, com

coeficiente de determinação $R^2 = 0,90$, ou seja, 90,4% da variação total é explicada pelo modelo, que sugere uma representação satisfatória do processo de produção de conídios. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados.

Tabela 7 - Coeficientes de regressão do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para produção de conídios de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.

Fator	Número de conídios			
	Coefficiente de regressão	Erro	t (5)	p-valor
Média	18,36589	0,456467	40,23487	< 0,0001
pH inicial (L)	1,79473	0,279948	6,41093	0,001370
pH inicial (Q)	-1,72846	0,334051	-5,17424	0,003542
Relação C:N (L)	0,17708	0,279948	0,63253	0,554830
Relação C:N (Q)	-0,04770	0,334051	-0,14279	0,892033
pH x C:N	-0,54966	0,395317	-1,39042	0,223116

Fonte: Dados da autora (2013).

L=termo linear, Q=termo quadrático.

A Equação 1 apresenta o modelo codificado otimizado para a produção de conídios em função do pH:

$$Y_1 = 18,36 + 1,79x_1 - 1,72x_1^2 \quad (1)$$

Y_1 é a resposta predita da produção de conídios, e x_1 valores codificados de pH.

Para UFC, o termo linear e quadrático do pH a 5% de significância ($p < 0,05$) também compõe o modelo da equação, com $R^2 = 0,86$. Já para biomassa fúngica seca, apenas o termo linear do pH inicial foi significativo, também a 5% de significância com um $R^2 = 0,47$ ($F_{\text{calc}} > F_{\text{Tab}}$) apresentando, assim, um modelo de primeira ordem (TABELAs 8 e 9). As equações 2 e 3 apresentam o modelo

codificado otimizado para a determinação da UFC e biomassa fúngica seca, respectivamente, em função do pH:

$$Y_2 = 17,99 + 1,37x_1 - 1,47x_1^2 \quad (2)$$

$$Y_3 = 0,26 + 0,03x_1 \quad (3)$$

Y_2 e Y_3 representam a resposta predita da UFC e biomassa fúngica, respectivamente, x_1 representa os valores codificados de pH.

Tabela 8 - Coeficientes de regressão do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a unidade formadora de colônias (UFC) de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro	t (5)	p-valor
Média	18,21356	0,517076	35,22414	< 0,0001
pH inicial (L)	1,37344	0,634238	4,33099	0,007492
pH inicial (Q)	-1,54665	0,756811	-4,08728	0,009472
Relação C:N (L)	0,09536	0,634238	0,30072	0,775731
Relação C:N (Q)	-0,23586	0,756811	-0,62329	0,560422
pH x C:N	-0,22374	0,895613	-0,49963	0,638545

Fonte: Dados da autora (2013).

L=termo linear, Q=termo quadrático.

Tabela 9 - Coeficientes de regressão do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a biomassa fúngica de *Trichoderma asperellum* em meio líquido.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro	t (5)	p-valor
Média	0,260026	0,017598	14,77545	< 0,0001
pH inicial (L)	0,031920	0,010793	2,95746	0,031611
pH inicial (Q)	0,000038	0,012879	0,00298	0,997737
Relação C:N	0,001473	0,010793	0,13643	0,896803
Relação C:N	0,011481	0,012879	0,89150	0,413503
pH x C:N	0,030000	0,015241	1,96838	0,106143

Fonte: Dados da autora (2013).

L=termo linear, Q=termo quadrático.

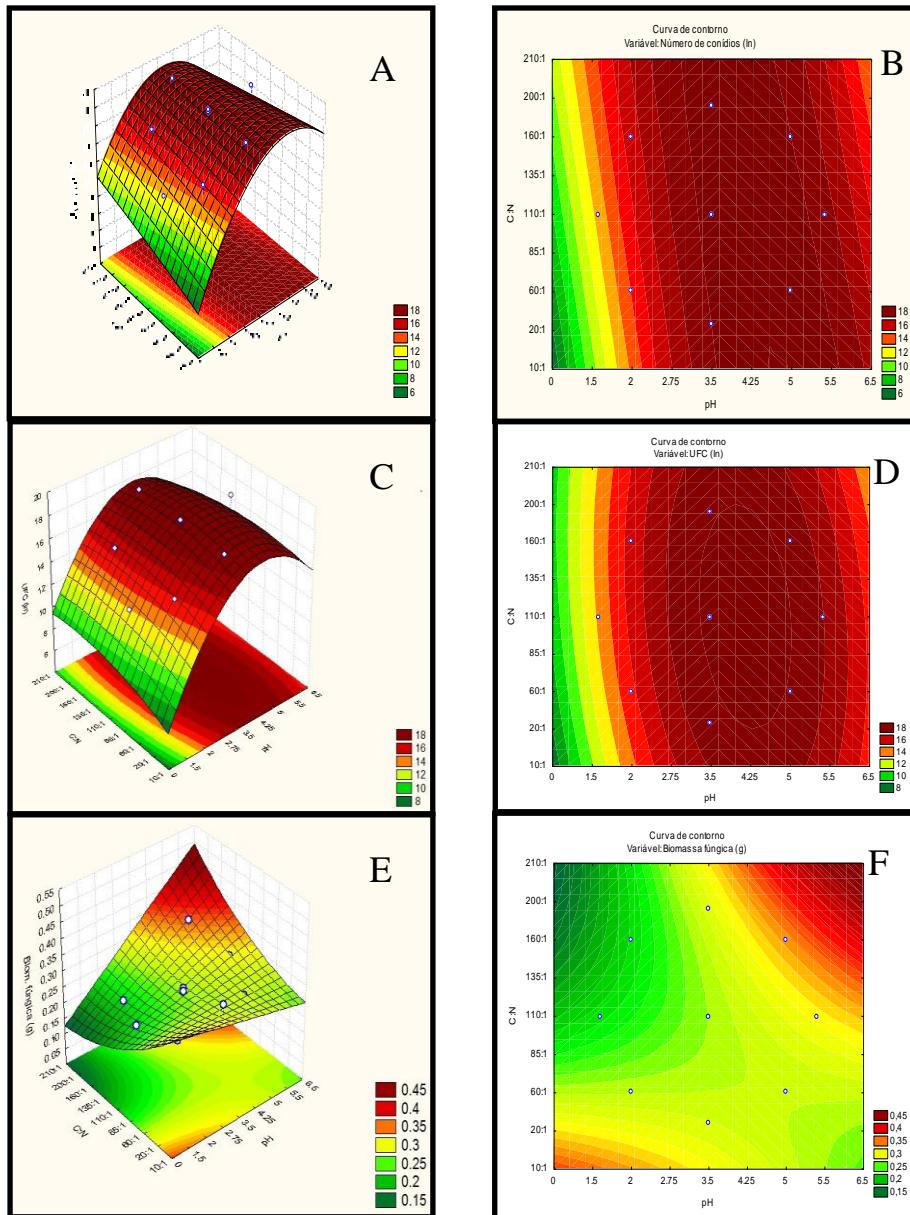
As equações estatísticas (1, 2 e 3) representam o modelo para a produção de conídios, UFC e biomassa fúngica em diferentes níveis de composições de meio e condições externas variáveis.

A Figura 5 apresenta as superfícies de resposta e curvas de contorno geradas a partir do modelo apresentado nas equações 1, 2 e 3, para as variáveis respostas analisadas. De acordo com a Figura 4 A-D, observou-se que a região ótima dos valores de pH está compreendida entre 3,5 e 5,0 e da relação C:N do meio entre 20:1 e 200:1, dentro da faixa estudada, para a obtenção de melhores resultados de produção de conídios e UFC. Analisando a Figura 4 E e F, nota-se que um aumento do valor de pH inicial ($\text{pH} \geq 6,5$) e da relação C:N do meio ($\text{C:N} \geq 200:1$) ocasionaria um incremento da biomassa fúngica.

Observa-se, também, que em condições extremas, dentro da faixa investigada para as variáveis independentes, ocorreu uma tendência à diminuição do pH inicial e UFC.

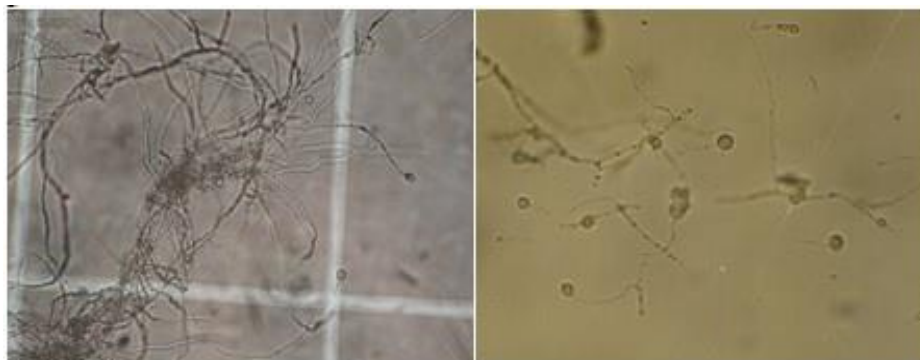
Sob os diferentes valores de pH testados, foi observada a formação de clamidósporos. É possível notar uma diferença nestes propágulos produzidos sob diferentes pH's iniciais do meio quanto a sua ligação a hifa. (FIGURA 6).

Figura 4 - Superfície de resposta e curva de contorno descritas pelo modelo proposto (Y), para a produção de conídios (A e B), a unidade formadora de colônias (UFC) (C e D) e biomassa fúngica seca (E e F), do isolado de *Trichoderma asperellum* LQC 96 produzidos por fermentação líquida.



Fonte: Dados da autora (2013).

Figura 5 - Clamidósporos de *Trichoderma asperellum* formados em meio líquido com pH inicial 2,0 apresentando massa de micélio (A) e clamidósporos formados em meio líquido com pH inicial de 1,5, apresentando estruturas mais dispersas (B).



Fonte: Dados da autora (2013).

4.1.3 Diferentes isolados de *Trichoderma* spp. produzidos por fermentação líquida sob condições otimizadas

As condições otimizadas, determinadas nos ensaios anteriores para produção massal de *T. Asperellum*, podem ser aplicadas para a produção de conídios de *T. harzianum* por fermentação líquida, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os isolados LQC 96 e T15, quanto ao número de conídios produzidos. Esses isolados apresentaram maior produção de conídios quando comparada aos demais. Houve diferença significativa entre os isolados de *T. erinaceum* T12 e T18, dentro da espécie de *Trichoderma*, quanto à produção de conídios e peso seco obtido (TABELA 10).

Tabela 10 - Produção de conídios, unidade formadora de colônias (UFC) e biomassa fúngica de quatro isolados de *Trichoderma* spp. em fermentação líquida em dois experimentos distintos, utilizando as condições otimizadas de produção.

Isolado	Espécie	Nº de conídios mL ⁻¹	UFC mL ⁻¹	Biomassa seca(g)
Experimento 1				
LQC 96	<i>T. asperellum</i>	2,0 x10 ⁸ a	2,30 x10 ⁸ a	0,26 b
T18	<i>T. erinaceum</i>	8,0 x10 ⁷ b	6,06 x10 ⁷ b	0,15 c
T15	<i>T. harzianum</i>	1,8 x10 ⁸ a	1,45 x10 ⁸ ab	0,11 c
T12	<i>T. erinaceum</i>	6,6 x10 ⁶ c	2,63 x10 ⁶ b	0,45 a
CV%		1,15	1,83	14,72
Experimento 2				
LQC 96	<i>T. asperellum</i>	2,60 x10 ⁸ a	1,95 x10 ⁸ a	0,26b
T18	<i>T. erinaceum</i>	8,23 x10 ⁷ c	5,93 x10 ⁷ b	0,16 c
T15	<i>T. harzianum</i>	1,91 x10 ⁸ b	1,47 x10 ⁸ a	0,13 c
T12	<i>T. erinaceum</i>	6,63 x10 ⁶ d	2,92 x10 ⁶ c	0,44 ^a
CV%		0,95	1,07	12,46

Fonte: Dados da autora (2013).

(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(**) Para análise estatística os dados relacionados ao número de conídios e UFC foram transformados em ln(x).

4.1.4 Efeito da aeração durante a fermentação líquida de *Trichoderma asperellum* sob condições otimizadas

A proporção de aeração (baseada na quantidade de meio de cultivo líquido e volume do recipiente) de 2,5:1 (Erlenmeyer de 250 mL:100 mL de meio), utilizada em todos os ensaios preliminares deste trabalho, não diferiu dos tratamentos com proporção de aeração de 5:1. As pérolas de vidro do tratamento 2,5:1_{pv}, ocasionaram uma diminuição da biomassa fúngica seca e diminuição do número de conídios produzidos (TABELA 11).

Tabela 11 - Efeito de diferentes proporções de aeração do meio líquido na produção de conídios, unidade formadora de colônias (UFC) e biomassa fúngica seca de *Trichoderma asperellum*, em dois experimentos distintos.

Tratamento	Nº de conídios mL ⁻¹	UFC mL ⁻¹	Biomassa fúngica seca (g)
Experimento 1			
2,5:1	2,05 x 10 ⁸ a	1,98 x 10 ⁸ a	0.25 a
5:1 _{500ml}	2,06 x 10 ⁸ a	1,73 x 10 ⁸ a	0.23 a
5:1 _{250ml}	1,54 x 10 ⁸ a	2,18 x 10 ⁸ a	0.12 b
2,5:1 _{pv}	2,26 x 10 ⁵ b	7,86 x 10 ⁸ b	0.07 b
CV%	2,30	1,87	25,10
Experimento 2			
2,5:1	2,60 x 10 ⁸ a	1,90 x 10 ⁸ a	0.26 a
5:1 _{500ml}	1,76 x 10 ⁸ a	1,67 x 10 ⁸ a	0.24 a
5:1 _{250ml}	1,36 x 10 ⁸ a	2,13 x 10 ⁸ a	0.14 ab
2,5:1 _{pv}	2,10 x 10 ⁵ b	4,46 x 10 ⁸ b	0.08 b
CV%	2,51	2,64	27,14

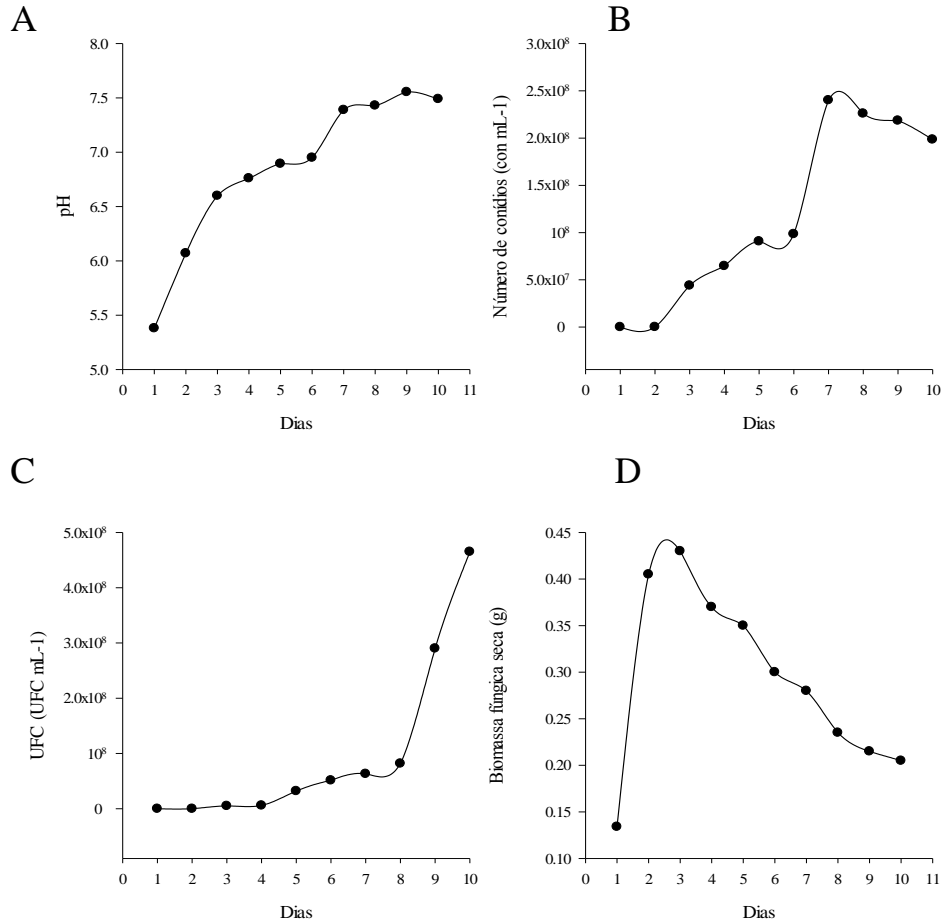
Fonte: Dados da autora (2013).

(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (**) Para análise estatística os dados relacionados ao número de conídios e UFC foram transformados em ln (x).

4.1.5 Curva de crescimento de *Trichoderma asperellum* em meio líquido, sob condições otimizadas

A maior produção de conídios e valor de UFC (1,38 x 10⁸ conídios mL⁻¹ e 1,38 x 10⁸ UFC mL⁻¹, respectivamente) foram determinados sete dias após inoculação do *T. asperellum* em meio líquido sob condições otimizadas (pH 3,5 e relação C:N 200:1) (FIGURA 6).

Figura 6 - Curva de crescimento de *Trichoderma asperellum* em meio líquido otimizado. Número de conídios produzidos (A); pH do meio líquido (B); unidade formadora de colônias (UFC) (C) e biomassa fúngica seca (D).



Fonte: Dados da autora (2013).

5 DISCUSSÃO

A produção em meio líquido de conídios, micélio, clamidósporos, blastósporos e microescleródios de diferentes espécies fúngicas foram testadas em vários estudos (EYAL et al., 1997; JACKSON et al., 1997; JACKSON; JARONSKI, 2009; JAKUBÍKOVÁ et al., 2006; JIN; TAYLOR; HARMAN, 1996; LATORRE et al., 1997; SRIRAM; ROOPA; SAVITHA, 2011; WATANABE; KUMAKURA; NAGAYAMA, 2006). Neste trabalho, foi descrita a otimização do meio líquido e das condições de incubação para a produção massal do agente de biocontrole de doenças de plantas *T. asperellum*.

A fermentação líquida é propícia para produção massal de *Trichoderma*, dentre outros microrganismos para fins comerciais (WATANABE; KUMAKURA; NAGAYAMA, 2006). Quando comparada à fermentação sólida, apresenta maior eficiência no aumento das escalas de produção, menor problema de contaminação e reprodutibilidade dos resultados, o que permitiu que este estudo fosse realizado.

O uso dos biorreatores permite o controle das variáveis envolvidas no processo fermentativo como o pH do meio, agitação, aeração, pressão, temperatura e oxigênio dissolvido. O controle dessas variáveis, associado à utilização de um meio de cultura adequado, são os responsáveis pelos resultados obtidos durante esse processo de fermentação. Para otimização das variáveis envolvidas nesse processo, foi utilizada a técnica de planejamento de experimentos. Essa ferramenta estatística permitiu determinar as variáveis que exerciam maior influência na produção massal de *T. asperellum* por fermentação líquida, assim como, avaliar as possíveis inter-relações entre elas. A redução do número de experimentos, e a consequente redução de custos é citada por Barros, Scarminio e Bruns (1996), como principal vantagem de sua utilização.

As melhores condições para a produção de conídios de *T. Asperellum*, por fermentação líquida, foram em condições de pH inicial de 3,5 e relação C:N

do meio de 200:1, quando comparadas a seu cultivo em pH mais elevado (TABELA 6). Analisando as diferentes condições de crescimento em que o fungo foi submetido, pode-se afirmar que a produção de conídios foi afetada, principalmente, pelo pH inicial.

A influência reguladora do pH do meio sobre a produção de conídios por espécies de *Trichoderma* já foi relatada (JIN; TAYLOR; HARMAN, 1996; STEYAERT; WELD; STEWART, 2010). Steyaert, Weld e Stewart (2010) observaram que em menores valores de pH inicial a produção de conídios de *T. atroviride* foi intensificada. Os resultados do primeiro delineamento (PB 12), em que foi testada a faixa de pH de 3,5-8,5, mostraram a significância dessa variável e o efeito negativo sobre a produção massal de *Trichoderma*, sugerindo que os valores da nova faixa utilizada fossem deslocados para esquerda. O pH 3,5 foi fixado como ótimo a partir do segundo delineamento (DCCR). O pH inicial do meio aumentou durante os dias de cultivo do fungo, atingindo 7,4, após sete dias.

Altas concentrações de conídios de *T. asperellum* foram produzidos rapidamente por fermentação líquida no meio otimizado. A produção de conídios foi observada após 48 horas de cultivo. A concentração máxima de conídios obtida durante a fermentação líquida ($2-3 \times 10^8$ conídios mL^{-1}) foi atingida após sete dias de cultivo nos Erlenmeyers sob agitação.

Analisando as variáveis respostas avaliadas, como o número de conídios, UFC e biomassa fúngica seca, foi possível estabelecer uma correlação de $\rho = 0,95$ entre as duas primeiras variáveis, ou seja, com o aumento do número de conídios foi observado também um aumento dos valores da UFC. A biomassa fúngica seca variou dentre os ensaios, apresentando os maiores pesos secos em pH inicial do meio mais elevado, mas não foi possível estabelecer uma correlação com as outras variáveis.

As observações microscópicas mostraram que foram formados, além dos conídios, mais dois tipos de propágulos durante a fermentação líquida: clamidósporos e micélio. Os clamidósporos estão presentes na maioria das espécies de *Trichoderma*, entremeados nas hifas ou em posição terminal (HOWELL, 2003). Nos tratamentos com menor pH (1,5 e 2,0), a presença de clamidósporos foi maior, comparada aos demais. Os clamidósporos formados podem ser considerados maduros segundo Eyal et al. (1997), pois foram formados após a fase estacionária de produção (120-160 h).

Indução da conidiação pela luz azul é uma característica fisiológica de *Trichoderma* spp. observada em cultivo do fungo em placas de Petri (SCHMOLL; SCHUSTER, 2010; STEYAERT; WELD; STEWART, 2010) e em meio líquido (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006). Durante o delineamento para seleção das variáveis, neste trabalho, foi observado o cultivo do fungo em frascos sob agitação, expostos a 24 horas de luz, com fotoperíodo de 12 horas e totalmente no escuro, e essa variável não apresentou efeito significativo na produção de conídios de *T. asperellum*. Para o delineamento seguinte, o DCCR, ela foi fixada como luz 24 horas, uma vez que o melhor tratamento do primeiro ensaio era sob essa condição.

Embora a relação C:N não tenha se mostrado significativa durante os ensaios de seleção das variáveis, nova faixa de valores para essa variável foi estabelecida nos ensaios seguintes do DCCR. O aumento da proporção da relação C:N testada, de 160:1 para 200:1, possibilitou um aumento na produção de conídios de *T. asperellum* em $5,45 \times 10^7$ conídios mL⁻¹. Esse acréscimo na produção de conídios confirma as expectativas de Verma et al. (2007), de que substratos com maior relação C:N podem beneficiar a produção de conídios e, até mesmo, a atividade de biocontrole de isolados de *Trichoderma* spp. A relação C:N também não apresentou um efeito significativo sobre a produção de blastosporos de *Paecilomyces fumosoroseus* em meio líquido, foi fixada na

proporção de 36:1 (JACKSON et al., 1997). Resultados diferentes foram obtidos durante a produção em meio líquido dos esporos de *Colletotrichum truncatum*, em que a relação C:N apresentou efeito significativo no rendimento dos esporos, influenciando, também, na atividade bioherbicida do fungo sobre sua hospedeira *Sesbania exaltata* (JACKSON; SCHISLER, 1992).

Os propágulos produzidos por fermentação líquida apresentam menor tolerância à dessecação quando comparados aos produzidos por fermentação sólida (WATANABE; KUMAKURA; NAGAYAMA, 2006). No intuito de amenizar esse problema, e não por estar associado à produção de conídios do *Trichoderma*, o glicerol foi adicionado ao meio de produção. Jin, Taylor e Harman (1996) relacionaram a presença de glicerol no meio de cultura à indução da produção de trealose por *T. harzianum*. O acúmulo desse dissacarídeo é responsável pela estabilização da membrana das células durante a dessecação, aumentando a tolerância à dessecação dos conídios no processo de formulação. Trabalhos realizados por Sriram, Roopa e Savitha (2011) comprovaram o aumento da vida de prateleira das formulações de *Trichoderma* em resposta à adição de glicerol no meio líquido de produção. No entanto, dentro das condições testadas neste trabalho, essa variável não foi significativa no delineamento, apresentando ainda um efeito negativo sobre a produção de conídios de *T. asperellum*, contribuindo, apenas, com o incremento de massa seca nos tratamentos em que foi adicionado. Foi observada uma diferença média de $1,88 \times 10^7$ conídios mL⁻¹ entre os tratamentos com e sem glicerol no meio e um aumento da biomassa seca de 0,132 g.

O glicerol é um composto orgânico (C₃H₈O₃) e pode ter interferido na relação C:N do meio, comportando-se como fonte de carbono. Há relatos do uso desse composto orgânico como fonte de carbono, favorecendo a biossíntese de metabólitos por *Trichoderma* spp. (GOGOI et al., 2008). Essa alteração no meio por sua vez pode ter interferido na produção de conídios durante a fermentação.

Assim, sugere-se que o glicerol seja adicionado na etapa de formulação dos conídios, de modo a não interferir em sua produção. Outra opção é o uso direto da suspensão de conídios produzida durante a fermentação líquida, uma vez que sua concentração ($2-3 \times 10^8$ conídios mL⁻¹) está adequada para utilização em alguns tipos de aplicação de biocontrole (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006), economizando tempo e custos relacionados à secagem, à formulação, à embalagem e ao armazenamento dos propágulos fúngicos.

Um fator crítico nos cultivos em fermentadores é a aeração (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006). Nos biorreatores, é possível controlar a velocidade da hélice de agitação, a concentração de oxigênio dissolvido, volume de meio de cultura e pressão, no intuito de maximizar a produção de conídios, mantendo as condições adequadas. Nos ensaios preliminares realizados em Erlenmeyers, essas variáveis não puderam ser ajustadas. Assim, a proporção de meio/volume do Erlenmeyer e a velocidade de rotação do agitador foram as variáveis responsáveis pela manutenção da aeração. A agitação é responsável por uniformizar o ar e a temperatura no meio de cultura (OKAFOR, 2007), sua velocidade deve ser capaz de manter a uniformidade sem afetar a estrutura do fungo, afetando seu desenvolvimento e produção de conídios. Nos ensaios, foi utilizada a velocidade de 160 rpm, com base em resultados anteriores, e uma proporção de aeração de 2,5:1 (Erlenmeyers de 250 mL:100 mL de meio). Os resultados obtidos, utilizando essas condições, não diferiram estatisticamente dos ensaios utilizando a proporção de 5:1.

6 CONCLUSÃO

O pH foi o fator que apresentou a maior influência reguladora na produção de conídios de *T. asperellum* por fermentação líquida.

O meio líquido com pH inicial de 3,5 e relação C:N de 200:1, submetido à luz 24 horas e mantidos à temperatura de 30 °C, proporcionou a maior produção de conídios de *T. asperellum*, após sete dias de agitação.

As condições otimizadas determinadas para a produção massal de *T. asperellum*, podem ser aplicadas para a produção de conídios de *T. harzianum* por fermentação líquida.

O aumento da produção de conídios de *T. asperellum* levou a um aumento dos valores de UFC, mas não da biomassa fúngica seca.

REFERÊNCIAS

- AMSELLEM, Z. et al. Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicide organisms. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, n. 10, p. 643–649, Dec. 1999.
- BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299 p.
- BETTIOL, W. et al. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 17, p. 111-147, 2009.
- _____. **Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe**. Montevideo: Universidad de la República, 2014. 404 p.
- _____. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 303-331.
- BETTIOL, W. et al. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 113 p.
- ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, Guildford, v. 1, p. 709-714, 2000.
- EYAL, J. et al. Large-scale production of chlamydospores of *Gliocladium virens* strain GL-21 in submerged culture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 19, n. 3, p. 163–168, Sept. 1997.
- GAO, L. et al. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n. 1, p. 87-92, Jan. 2007.
- GOGOI, D. K. et al. Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North East India. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2008.

GOLUEKE, C. G. Compost as a micronutrient supplier. In: THE STAFF OF BIOCYCLE JOURNAL OF WASTE RECYCLING (Ed.). **Principles of composting**. Emmaus: The JG Press, 1991. p. 161-162.

GREASHAM, R. L. Media for microbial fermentations. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology**: a multi-volume comprehensive treatise: volume 3. Weinheim: John Wiley & Sons, 1993. p. 127-140.

HANSON, L. E.; HOWELL, C. R. Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 3, p. 321-328, Mar. 2002.

HARMAN, G. E. et al. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 1, n. 1, p. 23-28, June 1991.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 376-393, Apr. 2000.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 1, p. 4-10, Jan. 2003.

JACKSON, M. A. et al. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, n. 1, p. 35-41, Jan. 1997.

JACKSON, M. A.; JARONSKI, I. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, n. 8, p. 842-850, Aug. 2009.

JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2260-2265, July 1992.

JAKUBÍKOVÁ, L. et al. Conidiation of *Trichoderma atroviride* during submerged cultivation in a laboratory stirred-tank fermenter. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 52, n. 3, p. 209-213, 2006.

JIN, X.; TAYLOR, A. G.; HARMAN, G. E. Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, Orlando, v. 7, p. 267–274, Apr. 1996.

LATORRE, B. A. et al. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harziauzm* produced by liquid fermentation against Botrytis bunch rot of table grape in Chile. **Crop Protection**, Guildford, v. 16, n. 3, p. 209-214, May 1997.

LEWIS, J. A.; PAPAIVIZAS, G. C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 15, n. 3, p. 351–357, 1983.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 15-28.

LOUREIRO, E. S. et al. Viabilidade de conídios e blastósporos de *Sporothrix insectorum* (Hoog & Evans) armazenados em diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 89-90, jan./mar. 2003.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, jun. 2012.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

MUÑOZ, G. A. et al. Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 65-70, Jan. 1995.

OKAFOR, N. Fermentors and fermentor operation. In: OKAFOR, N. **Morden industrial microbiology and biotechnology**. Hampshire: CRC Press, 2007. p. 183-206.

PANAHIAN, G. H.; RAHNAMA, K.; JAFARI, M. Mass production of *Trichoderma* spp. and application. **International Research Journal of Applied and Basic Sciences**, London, v. 3, n. 2, p. 292-298, Apr. 2012.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, New York, v. 22, n. 3, p. 189–259, Jan. 2004.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 23-54, Sept. 1985.

PAPAVIZAS, G. C.; LEWIS, J. A.; ABD-ELMOITY, T. H. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 126-132, 1982.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *trichoderma* em grandes culturas: uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 239-244.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Editora Casa do Pão, 2009. 326 p.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 8, p. 923-935, Aug. 1996.

SANROMAN, M. A.; COUTO, S. R. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 76, n. 3, p. 291–302, Oct. 2006.

SCHMOLL, M.; SCHUSTER, A. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 787–799, July 2010.

SINGH, A.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, H. B. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 2, p. 470-473, Jan. 2007.

SRIRAM, S.; ROOPA, K. P.; SAVITHA, M. J. Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 10, p. 1334-1339, Oct. 2011.

STEYAERT, J. M.; WELD, R. J.; STEWART, A. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, n. 2/3, p. 198-208, Feb./Mar. 2010.

SZEKERES, A. et al. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*: a review. **Acta Microbiologica Immunologica Hungarica**, Budapest, v. 52, n. 2, p. 137-168, 2005.

TEIXEIRA, H. et al. Conformidade e qualidade de produtos biológicos para controle de doenças de plantas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Org.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**: volume 1. Viçosa: Epamig, 2010. p. 101-115.

VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 1-20, Oct. 2007.

_____. Wastewater sludge as a potential raw material for antagonistic fungus (*Trichoderma* sp.): role of pre-treatment and solids concentration. **Water Research**, New York, v. 39, n. 15, p. 3587-3596, Sept. 2005.

WATANABE, S.; KUMAKURA, K. E.; NAGAYAMA, K. Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 31, n. 4, p. 375-379, 2006.