



ANDRÉ LUIZ DE ANDRADE CARVALHO

PRODUÇÃO MASSAL DO FUNGO
***Clonostachys rosea* EM MEIO LÍQUIDO**

LAVRAS – MG

2014

ANDRÉ LUIZ DE ANDRADE CARVALHO

**PRODUÇÃO MASSAL DO FUNGO *Clonostachys rosea* EM MEIO
LÍQUIDO**

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

Orientador

Dr. Wagner Bettiol

Coorientador

Dr. Flavio Henrique V. de Medeiros

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Carvalho, André Luiz de Andrade.

Produção massal do fungo *Clonostachys rosea* em meio líquido /
André Luiz de Andrade Carvalho. – Lavras : UFLA, 2014.
55 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: Wagner Bettiol.
Bibliografia.

1. *Clonostachys rosea*. 2. Produção massal. 3. Meio líquido. 4.
Plackett & Burman. 5. Delineamento central composto rotacional. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.96

ANDRÉ LUIZ DE ANDRADE CARVALHO

**PRODUÇÃO MASSAL DO FUNGO *Clonostachys rosea* EM MEIO
LÍQUIDO**

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

APRESENTADA em 16 de junho de 2014.

Dr. Flávio Henrique V. de Medeiros	UFLA
Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira	Embrapa
Dr. Marcelo Augusto Boechat Morandi	Embrapa

Dr. Wagner Bettiol
Orientador

LAVRAS - MG

2014

DEDICO

Aos meus pais, irmãos, avós, tios, primos e a todos os familiares, por todo incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Embrapa Meio Ambiente, por ceder toda a estrutura para a realização dos trabalhos.

Ao Professor Dr. Wagner Bettiol, por toda confiança, ensinamentos e paciência para a realização dos trabalhos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Flávio Henrique V. de Medeiros e ao pesquisador Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira, por todo o apoio.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos adquiridos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia (Maria de Lourdes, Ana Maria, Carzinho e Ruth), pela ajuda ao longo dos anos.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia, do mestrado, Manoel, Marcelo, Jhonata, Marciel, Marie, Paulão, Edgar, pelos dias e noites de estudos. Em especial a todos do Laboratório de Virologia, Prof^a Dr^a. Antônia, Priscilla, Suellen, Nara, João Gir, Maurício, Bárbara, Dani, Dani Nozaki, Jéssica, Denise, Anderson, Elisangela, Luciana e Jaciara, pois foi onde começaram os aprendizados para me tornar um mestre em Fitopatologia.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Elke, Roseli, Márcia, João, Tati e Anamaria), por toda colaboração nos trabalhos.

Ao Eraldo e ao pessoal da manutenção da Embrapa Meio Ambiente, por toda ajuda com os imprevistos.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Michelli, Figura, Lúcio, Guilherme, Gabriel, Ana Paula, Rayza, Mirian e Camila, pela convivência durante o curso.

Aos meus amigos/irmãos da República Curva de Rio, Cassiano, Dalton, Renato, Carlos e Daniel, pela amizade e companheirismo durante todo o período de estada em Jaguariúna.

À Zayame e Larissa, companheiras de projeto, pelos trabalhos realizados com sucesso.

À minha equipe de produção, Mariana, Natália, Adriano, Vinícius e todos da Tecnicontrol, pela paciência e apoio nesses últimos meses.

Obrigado a todos que colaboraram de alguma forma para o êxito deste trabalho.

RESUMO

Clonostachys rosea é um agente de biocontrole de diversos fitopatógenos e sua ação é por meio de competição, parasitismo e indução de resistência. Um dos problemas para sua comercialização é a sua produção em larga escala, pois é realizada em grãos de cereais que necessita de um longo período, intensa mão de obra e grandes estruturas. Dessa forma, seria importante viabilizar a sua fermentação líquida para produção comercial. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a otimização de meio de cultura líquido e a padronização dos parâmetros que possam interferir na produção massal de conídios de *C. rosea*. Todos os ensaios foram realizados em *erlenmeyers* de 250 mL, em agitação por sete dias e seguiram a metodologia de planejamento de experimento para a redução do número de ensaios e os custos. Posteriormente, testes em biorreator de bancada com o meio otimizado foram realizados. Inicialmente foram estudadas as fontes de carbono (sacarose e glicose/dextrose), bem como temperatura, pH, fotoperíodo, relação carbono/nitrogênio e a atividade da água (glicerol). Um *screening* foi realizado primeiramente em que as variáveis pH e fotoperíodo foram consideradas significativas para a produção de conídios. A otimização das condições de cultivo foi realizada utilizando um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), havendo uma ampliação da faixa de valores das variáveis pH e fotoperíodo. As demais variáveis foram fixadas de acordo com o ensaio de melhor resultado. Análises de Unidade Formadora de Colônia (UFC), biomassa e viabilidade dos esporos foram realizadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos por quatro vezes. A fonte de carbono que mais incrementou a produção de conídios foi a glicose/dextrose. O DCCR para o pH e fotoperíodo mostrou que o máximo de produção predita de conídios foi de $1,78 \times 10^7$ conídios mL⁻¹, 0,5576 g de biomassa fúngica seca e $5,15 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ nas condições otimizadas, com valor de pH 4 e 12h de luz.

Palavras-chave: *Clonostachys rosea*. Produção massal. Meio líquido. Plackett & Burman. Delineamento Central Composto Rotacional.

ABSTRACT

Clonostachys rosea is a biocontrol agent for many plant pathogens, especially *Botrytis cinerea*. One of the limitations to market is its large-scale production, since it is performed in grains, which need a long incubation period, intense labor and large structures. Thus, this study evaluated the potential of liquid culture medium and environmental conditions that may interfere on the mass production of *C. rosea* conidia. All trials were performed in 250 mL Erlenmeyer, in agitation for seven days, and followed the experiment planning methodology for the reduction the number of trials and cost. After this phase, tests in bioreactor were conducted with the optimized medium. Initially, we studied the sources of carbon (sucrose and glucose/dextrose), as well as temperature, pH, photoperiod, carbon/nitrogen relation and water activity (glycerol). A screening was performed in which pH and photoperiod variables were considered significant for the conidia production. The optimization conditions were performed using a rotational central composite design (RCCD), with the extension of the range of pH and photoperiod values. The remaining variables were fixed according to the best resulting trial. Analyses of colony forming units (CFU), biomass and viability of the spores were performed. All trials were performed in triplicate and repeated four times. The carbon source that increased the conidia production in liquid medium was glucose/dextrose. The RCCD for the pH and photoperiod showed that the maximum conidia production predicted was of 1.78×10^7 conidia mL⁻¹, 0.5576 g of dry biomass and 5.15×10^6 CFU mL⁻¹ in the optimized conditions, with pH value of 4 and light for 12 h.

Keywords: *Clonostachys rosea*. Mass production. Liquid medium. Plackett & Burman. Rotational Central Composite Design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para produção de conídios.....	35
Figura 2	Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para Unidade Formadora de Colônias (UFC)	36
Figura 3	Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para Biomassa fúngica seca.....	37
Figura 4	Superfícies de contorno geradas pelo modelo proposto, (A) concentração de conídios mL ⁻¹ , (B) para UFC e (C) biomassa fúngica seca	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Concentração de conídios/mL do fungo <i>Clonostachys rosea</i> crescido em meio líquido com adição de Dextrose ou Sacarose.....	31
Gráfico 2	Número de UFC/mL de <i>Clonostachys rosea</i> crescido em meio líquido com adição de Dextrose ou Sacarose	32
Gráfico 3	Biomassa seca (g) de <i>Clonostachys rosea</i> crescido em meio líquido com adição de Dextrose ou Sacarose	33
Gráfico 4	Colonização de <i>Clonostachys rosea</i> e esporulação de <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folhas de morangueiro tratados com <i>Clonostachys rosea</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Meio basal Czapek-Dox com as fontes de carbono (Dextrose ou Sacarose)	23
Tabela 2	Valores reais e codificados para as variáveis do planejamento experimental Plackett & Burman 12	25
Tabela 3	Matriz do planejamento Plackett & Burman 12 com as cinco variáveis e seus valores codificados	26
Tabela 4	Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com níveis codificados e decodificados das variáveis.....	27
Tabela 5	Concentração de conídios, de UFC e biomassa fúngica seca de <i>Clonostachys rosea</i> no Planejamento Plackett & Burman (P&B 12).....	34
Tabela 6	Resultados das análises estatísticas, valores das estimativas dos efeitos e valores de p	35
Tabela 7	Resultados do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para concentração de conídios, UFC e Biomassa fúngica seca.....	38
Tabela 8	Coefficiente estimado pelo modelo de regressão no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para concentração de conídios	39
Tabela 9	Coefficiente estimado pelo modelo de regressão reparametrizado no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para concentração de conídios.....	39
Tabela 10	Coefficiente estimado pelo modelo de regressão reparametrizado no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para UFC	40

Tabela 11 Coeficiente estimado pelo modelo de regressão reparametrizada no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para biomassa fúngica seca	40
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Local.....	21
3.2	Manutenção das culturas	21
3.3	Meio de cultura padrão.....	21
3.4	Batata Dextrose Agar (BDA) + TRITON	22
3.5	Paraquat-Cloranfenicol-Ágar (PCA).....	22
3.6	Fontes de carbono para a produção de conídios de <i>Clonostachys rosea</i>	22
3.7	Testes preliminares.....	23
3.8	Seleção das condições de cultivo em meio líquido utilizando o planejamento Plackett & Burmann 12	24
3.9	Otimização das condições de cultivo utilizando o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	26
3.10	<i>Scaleup</i> : produção massal de conídios em fermentador de bancada.....	27
3.11	Colonização de folhas de morangueiro por <i>Clonostachys rosea</i>	28
3.12	Capacidade antagônica de <i>Clonostachys rosea</i> a <i>Botrytis cinerea</i>	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Fontes de carbono para a produção de conídios de <i>Clonostachys rosea</i>	30
4.2	Seleção das condições de cultivo em meio líquido utilizando o planejamento Plackett & Burmann 12	33
4.3	Otimização das condições de cultivo utilizando o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	37
4.4	<i>Scaleup</i> : produção massal de conídios em fermentador de bancada.....	43
4.5	Dinâmica de crescimento foliar do fungo <i>Clonostachys rosea</i> em folhas de morangueiro.....	43
4.6	Capacidade antagônica de <i>Clonostachys rosea</i> à <i>Botrytis cinerea</i>	43
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Clonostachys rosea foi selecionado como um eficaz e versátil agente de biocontrole de doenças, como o mofo cinzento, causado pelo patógeno *Botrytis cinérea* (SURGEONER, 1998; SUTTON et al., 1997), gerando interesse entre os pesquisadores. Isto se deve à sua eficácia, confiabilidade e segurança. Além disso, este fungo possui vantagens como: facilidade de produção de inóculo; baixo risco de alergia associada com a exposição dos trabalhadores ao produto e seu uso não causa risco ecológico devido a sua ampla distribuição natural nas plantas e no solo (SURGEONER, 1998). Comprovada sua importância como agente de biocontrole, a produção de *C. rosea* em grande escala passou a ser necessária para viabilizar a sua utilização. Na produção massal existe uma estreita relação do uso e a qualidade do fungo com a composição do meio, podendo influenciar o tipo, o formato e a quantidade do propágulo produzido (OLIVEIRA, 2000). Um meio de cultura deve possuir fontes de carbono e de nitrogênio, sais minerais e alguns fatores de crescimento (ALVES, 1998; SOPER; WARD, 1981).

O uso do meio líquido para a produção de agentes de biocontrole foi relatado em diferentes estudos (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006; WATANABE et al., 2006). Essa metodologia de produção possui várias vantagens em relação aos meios mais utilizados, que tem como matriz elementos sólidos, como: controle dos parâmetros, como pH e temperatura; necessidade de menor espaço físico; redução das vias de contaminação e menor quantidade de mão de obra (FERNANDES, 2006). Nos testes em meio líquido, *erlenmeyers* em agitação são amplamente utilizados nos estudos e na otimização dos processos biotecnológicos, permitindo a realização de experiências com menores custos de material, antes do uso em biorreatores (BUCHS et al., 2001).

O presente trabalho teve como objetivo definir um meio de cultura líquido padrão para a máxima produção de conídios viáveis do fungo *Clonostachys rosea*, avaliando o efeito e a interação das variáveis: temperatura, pH, relação carbono/nitrogênio, fotoperíodo e adição de glicerol para uso em fermentadores com produção em grande escala.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Clonostachys rosea é um ascomiceto da ordem Hypocreales com anamorfo de *Nectria ochroleuca* (Schwein.) (SUTTON et al., 1997). O fungo produz conídios unicelulares em duas formas distintas, penicilado solitários ou agregados, formando pústulas eventualmente obscuras ou ausentes, ou na forma verticilada (MOREIRA, 2012). As suas colônias são geralmente esbranquiçadas, alaranjadas ou salmão em Agar. Existem relatos de ser encontrado em diversas regiões do mundo, como nas tropicais, temperadas, subárticas e até nas desérticas. Com pH variando entre neutro e alcalino, já foi descrito em culturas, campo, matas, florestas, água doce e solos litorâneos (SUTTON et al., 1997). *Clonostachys rosea* é conhecido por colonizar raízes, hastes, vagens e sementes de soja, raízes de trevo vermelho, folhas de morango e framboesa, sendo assintomático (SUTTON et al., 1997). Sua fase teleomorfa é encontrada na maioria das vezes nos galhos de árvores recém-mortas, mas também sobre tecidos jovens de plantas herbáceas e fungos.

O fungo *C. rosea* surgiu como um eficaz e versátil antagonista de um amplo espectro de fungos fitopatogênicos em estudos no final da década de 1980 devido aos seus diversos mecanismos de ação, como microparasitismo (BARNETT; LILLY, 1962; XUE, 2003; YU; SUTTON, 1997), competição por nutrientes ou substrato (MORANDI et al., 2007) e indução de resistência (SUTTON et al., 1997). Dessa forma, gerou-se grande interesse entre os pesquisadores nos diversos países onde foi encontrado, entre eles o Brasil (PENG; SUTTON; KEVAN, 1992; SUTTON et al., 1997). A atuação de *C. rosea* tem destaque como agente de biocontrole de *B. cinerea* devido aos impactos econômicos causados em diversas culturas pelo patógeno, como em cultivos de begônia, ciclâmen, gerânio, gérbera, hortências, violeta persa (*Exacum*), poinsettia, rosa, pepino, pimentão, tomate, morango e framboesa

(SUTTON et al., 1997), e em virtude do seu antagonismo, suprimindo a esporulação e a infecção do patógeno em competição por fontes de energia, protegendo toda a planta (PENG; SUTTON, 1991). Sutton e Peng (1993) relataram que por ser um ótimo saprófita e colonizar restos culturais, também caracterizam o *C. rosea* como bom agente de biocontrole.

O fungo não atua somente contra fungos fitopatogênicos. Estudos comprovam sua eficiência como patógeno dos insetos *Oncometopia tucumana* e *Sonesimia grossa* (TOLEDO et al., 2006) e como parasita facultativo para nematoides fitopatogênicos (LI et al., 2006; ZHAO et al., 2005).

Comprovada sua eficácia como agente de biocontrole, a produção de *C. rosea* em grande escala passou a ser desejada. Para isso, existe uma estreita relação do uso e a qualidade do fungo produzido com a composição do meio, podendo influenciar o tipo, o formato e quantidade do propágulo produzido (OLIVEIRA, 2000). Um meio de cultura deve possuir uma fonte de carbono e de nitrogênio, sais minerais e alguns fatores de crescimento (ALVES, 1998; SOPER; WARD, 1981). As fontes de carbono comumente utilizadas são amido, sacarose, dextrose, entre outros açúcares. Já as fontes de nitrogênio são geralmente derivadas de compostos ricos em proteína ou aminoácidos, como extrato de soja, extrato de levedura e peptona. Meios ricos em carbono e com deficiência em nitrogênio tendem a produzir maior quantidade de conídios (LEITE et al., 2003). Produtos vegetais ricos em amido, como batata, arroz, aveia, milho e feijão, geralmente constituem os meios utilizados na produção massal. Destes, o arroz cozido é um dos meios mais utilizados para a produção de fungos (JACKSON, 1997).

Na produção de *Saccharomyces cerevisiae* foram testados diferentes fontes de carbono e os melhores resultados foram com glicose e sacarose (MILL, 1964). Joung e Blaskovitz (1985) relataram evidências de que fontes de nitrogênio influenciam no tipo de morfologia. Como exemplo, o nitrato de

amônio exerceu um efeito considerável na morfologia de *Aspergillus niger* em cultura submersa. Já os minerais, também são essenciais para o crescimento como: fósforo, magnésio, cálcio, manganês e zinco, e em menor grau que o N, interferem na morfologia dos fungos (PAPAGIANNI, 2004).

Para a sua produção em escala industrial, basicamente existem dois processos para multiplicação massal de fungos: em substrato sólido, nos quais são produzidos esporos aéreos; e cultivo submerso, no qual o substrato está na forma líquida.

Na fermentação em estado sólido, os substratos empregados têm umidade máxima de 70% (SILVA, 2002) e o microrganismo se desenvolve na superfície desses materiais, que apresentam a propriedade de conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Os substratos sólidos mais utilizados são os grãos de arroz, milho, milheto, trigo e aveia (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997). As principais vantagens da fermentação no estado sólido são o baixo custo, pois a maioria dos substratos exige pré-tratamentos simples, devido à água estar concentrada no substrato-suporte e o líquido extrator estar mais concentrado, simplificando o processo de purificação. Os microrganismos utilizados nos processos de fermentação, em sua grande maioria, são fungos na forma filamentosa (SILVA, 2002). O que limita o número de microrganismos a adaptar-se a esse processo é a quantidade reduzida de água no substrato, porém os fungos se mostram bastante tolerantes a esse ambiente (FERNANDES, 2006).

A fermentação submersa ou líquida é tradicionalmente utilizada para produção de enzimas, pois há melhor controle de importantes parâmetros para se obter resultados desejáveis do processo como pH e crescimento celular, além de ser fácil a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação da biomassa. Essa metodologia é utilizada principalmente para processos fermentativos de bactérias (FERNANDES, 2006). Além das vantagens citadas acima, também o que o diferencia em relação à fermentação sólida é o rápido crescimento

fúngico, a necessidade de menor espaço físico, redução considerável das vias de contaminação e menor quantidade de mão de obra. Por outro lado, no caso de fungos anamorfos existem problemas devido ao seu crescimento filamentosos, que provoca aumento na viscosidade dos caldos durante a fermentação e é a causa de diferentes problemas, como a limitação de oxigênio devido ao incremento da viscosidade, uma mistura menos eficiente, podendo existir gradientes no sistema fermentativo que alterem a diferença de energia e massa (VATS; BANERJEE, 2004).

Krauss e Soberanis (2002) testaram tanto fermentação líquida quanto a fermentação sólida para o *C. rosea*. Para a fermentação líquida, utilizou-se *erlenmeyers* de 500 mL, contendo 250 mL de um meio líquido básico, a base de 80 g L⁻¹ de melaço, 10 g L⁻¹ de neopeptona e 2 g L⁻¹ de extrato de levedura. Inoculou-se 10⁶ conídios mL⁻¹ e, posteriormente, colocou em agitador rotativo (Thermolyne, Big Bill) a temperatura de 26 ± 2°C por quatro dias. Após os quatro dias, a produção de conídios chegou a 10⁷ mL⁻¹ e uma viabilidade de 99%. Mas os testes não foram feitos em fermentadores comerciais.

A influência do pH na produção de conídios de fungos do gênero *Trichoderma* foi relatada por Lewis e Papavizas (1983) e Steyaert, Weld e Stewart (2010). Steyaert, Weld e Stewart (2010) observaram que a maior produção de conídios de *Trichoderma atroviridae* foi em meios com valores menores de pH. Já Lewis e Papavizas (1983) minimizaram os efeitos do pH para a produção de conídios do fungo *T. viridae*.

Segundo Wynn-Williams (1982), a temperatura afeta a taxa de germinação de esporos de fungos, e posteriormente, o crescimento mexeria, podendo causar danos aos tecidos e a liberação de nutrientes, caso esteja fora do intervalo ótimo de temperatura. Fernandes e Morandi (2006) avaliaram o crescimento *in vitro* de *C. rosea* e, todos os isolados testados cresceram melhor na faixa entre 20 -25 °C.

A otimização da composição do meio é um dos passos essenciais para minimizar a quantidade de componentes e sua proporção, em uma produção rentável comercialmente. Uma composição adequada para o meio ainda não foi estabelecida como ideal para uma melhor produção de conídios, uma vez que a diversidade genética presente em diferentes fontes microbianas faz com que cada organismo ou linhagem deste tenha suas condições especiais de produção máxima (RAO et al., 2008). Nesse sentido, diversos substratos e condições de cultivo são estudados para a modificação de fatores essenciais na determinação das características que conferem uma maior viabilidade e resistência de esporos quando o processo ocorre em meios submersos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O presente trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) da Embrapa Meio Ambiente, sediada na cidade de Jaguariúna-SP.

3.2 Manutenção das culturas

No experimento, foi utilizada uma cepa do fungo *Clonostachys rosea* LQC-150 proveniente da coleção da Embrapa Meio Ambiente. O cultivo das culturas foi realizado em placas de Petri, com meio batata-dextrose-ágar – BDA (Acumedia Manufacturers, Michigan). As placas com o fungo foram mantidas a 25 °C, 14h de luz, por 14 dias e, posteriormente, foi preservado em água esterilizada (CASTELLANI, 1939) e BDA em geladeira a 4 °C.

3.3 Meio de cultura padrão

O meio de cultura padrão utilizado foi o Czapek-Dox modificado (Tabela 1), por permitir a padronização dos elementos utilizados, com variação nas fontes de carbono (sacarose 42,1% de C e dextrose 40% de C) e nitrogênio (peptona de caseína, 12% de N), para verificação da influência destes fatores específicos no crescimento e produção de conídios de *C. rosea*. O meio basal foi composto por 2g de NaNO₃, 1g de K₂HPO₄, 0,5g de KCl, 0,5 g de MgSO₄ e 0,02 de FeSO₄ (Tabela1). A proporção de nitrogênio e glicerol (relacionado à atividade de água no meio) foi de acordo com cada tratamento, assim como o pH (Matriz do Delineamento Plackett & Burman 12). Os valores de pH inicial

foram ajustados antes da autoclavagem, com a utilização de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH ou $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_3PO_4 .

3.4 Batata Dextrose Agar (BDA) + TRITON

Para a determinação das Unidades Formadoras de Colônias foi utilizado o meio BDA (Acumedia Manufacturers, Michigan), seguindo as indicações do fabricante, adicionado de 1 mL de Triton e autoclavado por 20 minutos a 121°C . Posteriormente, foram vertidos 20 mL em placas de Petri. O Triton foi utilizado para retardar o crescimento das colônias, facilitando a visualização e contagem das mesmas.

3.5 Paraquat-Chloranfenicol-Ágar (PCA)

Para os testes em discos de folhas de morangueiro, foi utilizado o meio Paraquat-Chlorofenicol-Ágar. O preparo consistiu na adição de 12 g de Ágar em 1.000 mL de água destilada, autoclavado por 20 minutos a 121°C . Após o resfriamento do meio, adicionou-se 1 g de clorofenicol e 1 mL de Paraquat. O meio foi agitado e vertido 20 mL em placas de Petri.

3.6 Fontes de carbono para a produção de conídios de *Clonostachys rosea*

No delineamento Plackett & Burmann 12, os ensaios foram montados com o uso de glicose/dextrose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) ou sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), com teor de C em 40% e 42,1% respectivamente. Foi usado meio Czapek-Dox modificado e na Tabela 1 apresentada a composição do meio, com as respectivas fontes de carbono. Foram avaliadas a concentração de conídios/mL, a unidade formadora de colônias (UFC) e biomassa. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Tabela 1 Meio basal Czapek-Dox com as fontes de carbono (Dextrose ou Sacarose)

Componente	20/1	110/1	200/1
NaNO ₃ (g)	2	2	2
K ₂ HPO ₄ (g)	1	1	1
KCl (g)	0,5	0,5	0,5
MgSO ₄ (g)	0,5	0,5	0,5
FeSO ₄ (g)	0,02	0,02	0,02
Peptona de caseína (g)	1,6	0,31	0,16
Dextrose ou Sacarose (g)	10	10	10
Água destilada (ml)	1000	1000	1000

3.7 Testes preliminares

Testes em menor escala foram realizados antes do ensaio em fermentadores, escolhendo somente as condições [relação C/N, pH e atividade de água (determinado pela adição do glicerol), temperatura e fotoperíodo] que apresentaram a maior produção de conídios. Os ensaios foram realizados em *erlenmeyers* de 250 mL de capacidade, previamente identificados, contendo 90 mL do meio de cultura padrão com adição de 10 mL da suspensão do fungo *C. rosea* contendo $3,0 \times 10^6$ conídios, sob agitação constante em mesa agitadora (TECNAL) de 160 rpm por sete dias. Como fonte de luz, foi usada lâmpadas (Agrolux) Luz do dia de 36 watts. Nos ensaios sem presença de luz, os *erlenmeyers* foram revestidos com folhas de papel laminado. Transcorridos os sete dias, os *erlenmeyers* foram colocados em banho ultrassom por cinco minutos. Para quantificar a produção de conídios, foi transferido 1 mL do meio de cultura para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina com Tween (NaCl P.A.: 9,0 g; água destilada: 1.000mL e Tween 80: 8μL) e diluído em série

até 10^{-4} . Entre cada diluição, foi feita em triplicata a homogeneização da suspensão nos tubos de ensaio até ocorrer turbilhonamento. A quantificação de conídios foi realizada em câmara de Neubauer. Para a UFC, foi utilizada a diluição 10^{-4} . Da diluição, 100 μ l foram semeados em placas de Petri contendo BDA + Triton e, com o uso de uma alça de Drigalski foi espalhado por toda a superfície das placas, com cinco repetições para cada tratamento/ensaio. Após 72 horas, foram feitas as contagens das colônias. Para a porcentagem de esporos viáveis, foram pipetadas cinco alíquotas de 15 μ L da suspensão em placas de Petri com meio de BDA. As placas foram mantidas a 25 °C, após 24 horas foi colocada uma gota de azul de lactofenol (15 μ L) em cada ponto com a suspensão e avaliado o número de esporos germinados com auxílio de um microscópio óptico no aumento de 400x. Foram contados pelo menos 100 esporos por ponto. Para a avaliação da biomassa, o meio de cultivo com fungo crescido nos *erlenmeyers* e uma testemunha com água foram filtrados em papel filtro e colocados em estufa a 55°C até atingir peso constante e, posteriormente, pesado em balança analítica de precisão. Os resultados finais foram obtidos através da diferença entre cada pesagem e a testemunha.

3.8 Seleção das condições de cultivo em meio líquido utilizando o planejamento Plackett & Burmann 12

Para o estudo da interação entre as cinco variáveis estudadas (pH, temperatura, fotoperíodo, relação C:N e glicerol) e sua significância, foi utilizado como técnica o delineamento Plackett & Burman 12, composto de 12 ensaios + 3 pontos centrais, totalizando 15 ensaios, baseado na Metodologia de Superfície de Resposta (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Este é um planejamento que fornece informações quanto à importância dos efeitos sobre as respostas e se a faixa escolhida é a mais adequada, e ainda, qual direção seguir no próximo

planejamento, nesse caso um delineamento composto central rotacional – DCCR com 2^2 . Para dar maior confiabilidade aos resultados, os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos quatro vezes. Para gerar a Tabela de ANOVA e os diagramas de Pareto no programa Statistica 10.0, foi calculado o desvio padrão e usadas as médias dos valores que estiveram dentro do intervalo de confiança (IC).

As Tabelas 2 e 3 representam, respectivamente, a matriz do planejamento e os valores codificados e reais para as variáveis do planejamento experimental.

Tabela 2 Valores reais e codificados para as variáveis do planejamento experimental Plackett & Burman 12

Variáveis	Código	Níveis		
		-1	0	1
pH	X ₁	3,5	6	8,5
Temperatura (°C)	X ₂	20	24	28
Fotoperíodo (h)	X ₃	0	12	24
C/N	X ₄	20/1	110/1	200/1
Glicerol (%)	X ₅	0	1	2

Tabela 3 Matriz do planejamento Plackett & Burman 12 com as cinco variáveis e seus valores codificados

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
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

X₁:pH; X₂:Temperatura; X₃:Fotoperíodo; X₄: Relação C/N; X₅: Glicerol (%)

3.9 Otimização das condições de cultivo utilizando o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

A otimização das condições de cultivo selecionadas pelo delineamento Plackett & Burman 12 para maximizar a produção de conídios foi determinada com um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). As variáveis e os valores dos seus níveis, codificados e reais estão descritos na Tabela 4, onde a matriz apresenta o delineamento de 11 ensaios para as duas variáveis estudadas, pH e fotoperíodo, cada uma em cinco níveis. As variáveis temperatura, C/N e glicerol (atividade da água) tiveram seus valores fixados. Foram avaliadas em cada tratamento a concentração de conídios, a UFC e a biomassa fúngica seca. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos quatro vezes. Para gerar as superfície de resposta e posterior equação de regressão no programa Statistica

10.0, foi feito o desvio padrão e usaram-se as médias dos valores que estiveram dentro do intervalo de confiança (IC).

Tabela 4 Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com níveis codificados e decodificados das variáveis

Ensaio	pH	Fotoperíodo (horas)
1	-1 (2,29)	-1 (4)
2	1 (3,71)	-1 (4)
3	-1 (2,29)	1 (20)
4	1(3,71)	1 (20)
5	-1,41 (2,0)	0 (12)
6	1,41 (4,0)	0 (12)
7	0 (3,0)	-1,41 (0)
8	0 (3,0)	1,41 (24)
9	0 (3,0)	0 (12)
10	0 (3,0)	0 (12)
11	0 (3,0)	0 (12)

3.10 *Scaleup*: produção massal de conídios em fermentador de bancada

Em um biorreator/fermentador de bancada (Brunswick) de volume total do recipiente cilíndrico de 10 L, com controle de temperatura e agitação, foram feitos os testes em *scaleup*. O meio basal utilizado foi o Czapek-Dox modificado (7 litros), com os valores das variáveis de acordo com o melhor resultado obtido durante o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), onde a proporção de carbono e nitrogênio foi de 200:1, com a adição de 1,12 g de peptona de caseína e o pH foi ajustado para 4. O meio foi submetido à inoculação de 700 mL de suspensão com concentração de $3,0 \times 10^6$ conídios mL⁻¹

do fungo *C. rosea*. O fotoperíodo foi de 12 horas e, a temperatura e agitação fixada em 25°C e 160 rpm, respectivamente. Após sete dias em processo fermentativo no biorreator, alíquotas foram retiradas e análises de concentração de conídios, UFC, biomassa (g), colonização e capacidade antagônica a *Botrytis cinerea* foram realizadas.

3.11 Colonização de folhas de morangueiro por *Clonostachys rosea*

Após a produção massal de *Clonostachys rosea* em fermentador, foram feitos testes de colonização foliar, adaptando a metodologia proposta por Morandi, Sutton e Maffia (2000), na qual os discos de folhas de morangueiro (cv Caminho Real) com 1 cm de diâmetro, foram superficialmente desinfestados (1min etanol 70%, 1min em hipoclorito de sódio 1% e lavados em água destilada e esterilizada em abundância (ADE), e posteriormente secas em câmara de fluxo. Trinta discos de folhas de morango foram dispostos em caixas plásticas tipo gerbox forradas com papel filtro umedecido esterilizado e uma tela metálica. Primeiramente, 20 µl de suspensão de *C. rosea* (10^6 , 10^5 conídios mL⁻¹), foram depositados em cada disco. Esses discos foliares foram mantidos em BOD na temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12h por 24horas. Posteriormente, os discos foram transferidos para placas contendo meio PCA (10 discos por placa) e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12h. Após 10 dias, foi avaliada a área com esporulação de *C. rosea* por meio da escala de notas desenvolvida por Nobre et al. (2005). Como testemunhas, foram usados discos com a aplicação de água esterilizada e discos sem aplicação de água. O teste foi realizado com três repetições.

3.12 Capacidade antagônica de *Clonostachys rosea* a *Botrytis cinerea*

A avaliação da capacidade antagônica do isolado de *C. rosea* em suprimir a esporulação de *B. cinerea* foi feita utilizando a metodologia descrita no tópico 3.9, com discos de folhas de morangueiro dispostas em gerbox. Foram aplicados 20 µl da suspensão de *C. rosea* nos discos de folhas com concentração de 10^6 e 10^5 conídios mL⁻¹. Após 24h em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12h, foram inoculados 20 µl da suspensão a 10^4 conídios mL⁻¹ de *B. cinerea*. Transcorridas 24h, os discos foram transferidos para placas contendo meio PCA (10 discos por placa) e incubados a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Após 10 dias, foi avaliada a área com esporulação de *B. cinérea* seguindo a metodologia de escalas de notas propostas por Peng e Sutton (1991). Nas testemunhas, foi aplicada água esterilizada e discos sem aplicação de água. O teste foi feito com três repetições.

4 RESULTADOS

4.1 Fontes de carbono para a produção de conídios de *Clonostachys rosea*

Em praticamente todos os ensaios, a adição da fonte de carbono dextrose obteve resultados melhores que o uso da sacarose. O ensaio sete com dextrose foi o que apresentou a maior produção de conídios ($1,49 \times 10^7$ conídios mL^{-1}). Usando a sacarose, o ensaio com melhor resultado também foi o número sete com $7,30 \times 10^6$ conídios mL^{-1} (Gráfico 1). Na avaliação da UFC, a melhor fonte de C foi a dextrose. O ensaio com o melhor resultado foi o de número sete com $1,30 \times 10^7$ UFC mL^{-1} . Para UFC com o uso da sacarose também o ensaio de número sete proporcionou o maior valor que foi de $9,97 \times 10^6$ mL^{-1} (Gráfico 2). A maior produção de biomassa fúngica seca de *C. rosea* pode ser observada no Gráfico 3, em que o pico de produção foi praticamente o mesmo tanto para dextrose quanto para sacarose. A produção máxima de massa seca com o uso da dextrose foi de 0,657 g no ensaio seis e foi de 0,6589 g no ensaio três com o uso da sacarose.

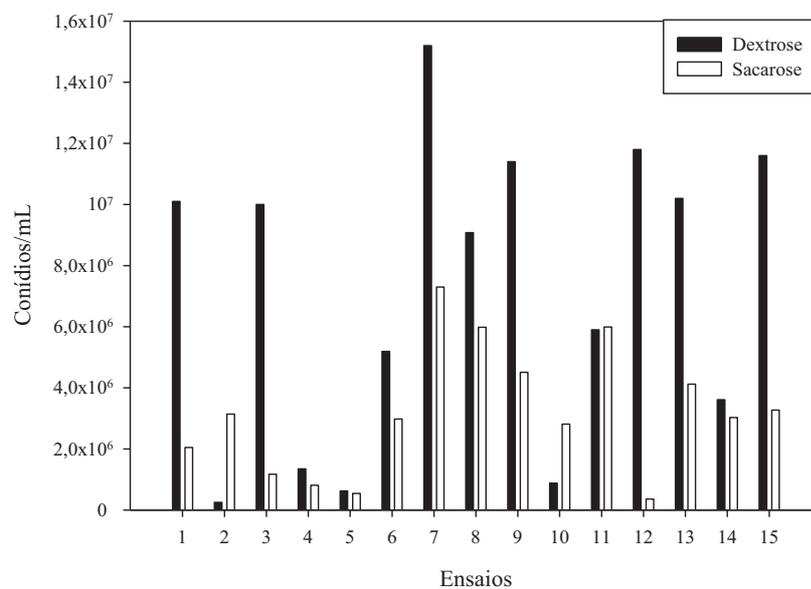


Gráfico 1 Concentração de conídios/mL do fungo *Clonostachys rosea* crescido em meio líquido com adição de Dextrose ou Sacarose

Nota: As condições dos ensaios estão descritas na Tabela 3.

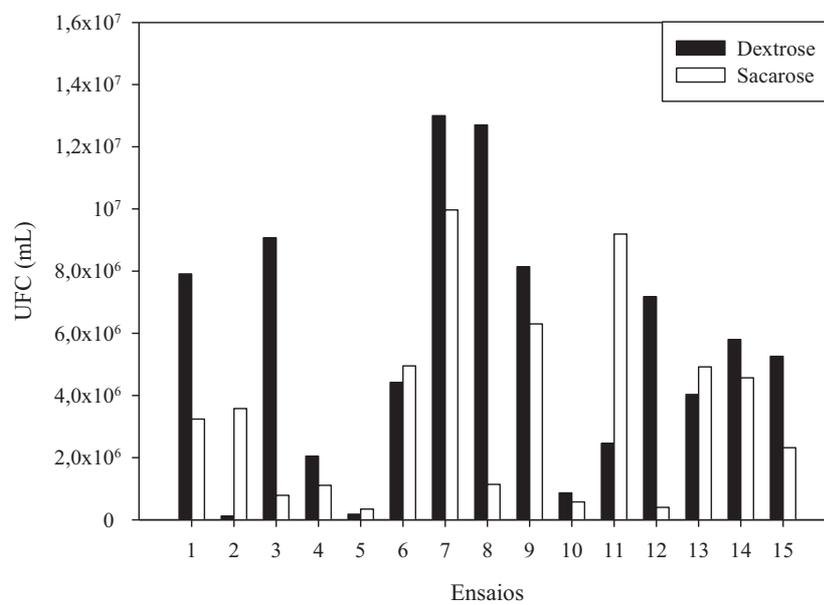


Gráfico 2 Número de UFC/mL de *Clonostachys rosea* crescendo em meio líquido com adição de Dextrose ou Sacarose

Nota: As condições dos ensaios estão descritas na Tabela 3.

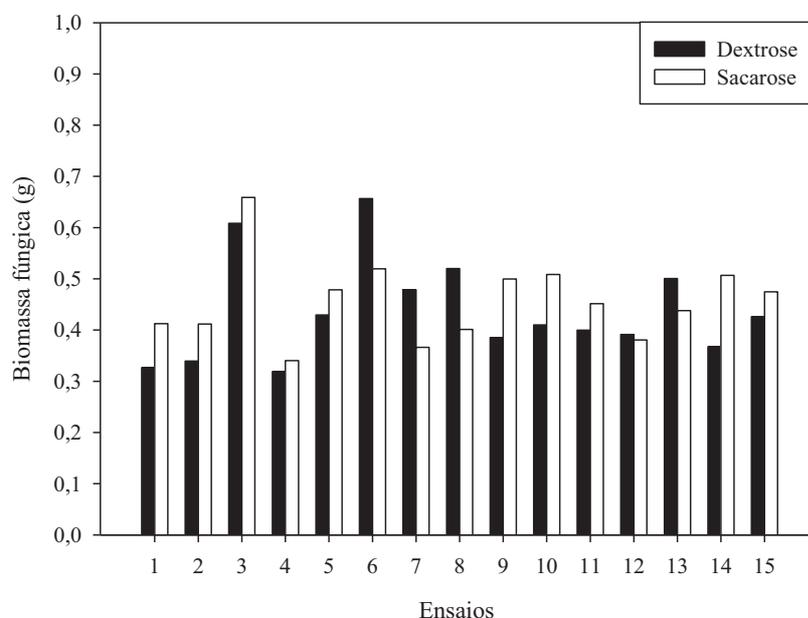


Gráfico 3 Biomassa seca (g) de *Clonostachys rosea* crescido em meio líquido com adição de Dextrose ou Sacarose

Nota: As condições dos ensaios estão descritas na Tabela 3.

4.2 Seleção das condições de cultivo em meio líquido utilizando o planejamento Plackett & Burmann 12

Após sete dias na mesa agitadora para a produção de conídios, foram observados resultados discrepantes entre os ensaios, sendo os ensaios 7 e 12 os que obtiveram os melhores resultados (Tabela 5). Destacando-se entre todos os ensaios, o número 7, com condições de maior temperatura (28°C), pH mais ácido (3,5), presença constante de luz, sem glicerol e com maior relação C/N (200/1). Nessas condições, o fungo *C. rosea* produziu até $1,52 \times 10^7$ conídios mL^{-1} . O ensaio 12, que teve a segunda maior produção de conídios ($1,18 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$), teve características em comum ao ensaio 7: o pH (3,5) e a

ausência de glicerol. Já os ensaios 2 (ausência) e 5 (presença), que se diferenciam somente na variável glicerol, obtiveram os piores resultados, produzindo $1,0 \times 10^5$ conídios mL^{-1} .

Tabela 5 Concentração de conídios, de UFC e biomassa fúngica seca de *Clonostachys rosea* no Planejamento Plackett & Burman (P&B 12)

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Conídios mL^{-1}	UFC mL^{-1}	Biomassa (g)
1	1	-1	1	-1	-1	$1,01 \times 10^7$	$7,91 \times 10^6$	0,3268
2	1	1	-1	1	-1	$2,50 \times 10^5$	$1,19 \times 10^6$	0,3393
3	-1	1	1	-1	1	$1,00 \times 10^7$	$9,07 \times 10^6$	0,6083
4	1	-1	1	1	-1	$1,35 \times 10^6$	$2,05 \times 10^6$	0,3187
5	1	1	-1	1	1	$6,25 \times 10^5$	$1,78 \times 10^6$	0,4294
6	1	1	1	-1	1	$5,19 \times 10^6$	$4,42 \times 10^6$	0,6566
7	-1	1	1	1	-1	$1,52 \times 10^7$	$1,30 \times 10^7$	0,4785
8	-1	-1	1	1	1	$9,08 \times 10^6$	$1,27 \times 10^7$	0,5199
9	-1	-1	-1	1	1	$1,14 \times 10^7$	$8,14 \times 10^6$	0,3853
10	1	-1	-1	-1	1	$8,75 \times 10^5$	$8,64 \times 10^5$	0,4099
11	-1	1	-1	-1	-1	$5,90 \times 10^6$	$2,42 \times 10^6$	0,3998
12	-1	-1	-1	-1	-1	$1,18 \times 10^7$	$7,18 \times 10^6$	0,3914
13	0	0	0	0	0	$1,02 \times 10^7$	$1,03 \times 10^7$	0,5005
14	0	0	0	0	0	$3,61 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	0,3972
15	0	0	0	0	0	$1,16 \times 10^7$	$5,86 \times 10^6$	0,4259

X₁: pH; X₂: Temperatura; X₃: Fotoperíodo; X₄: Relação C/N; X₅: Glicerol (%)

Quando realizadas as análises estatísticas, as variáveis pH e fotoperíodo tiveram valores “p” inferiores a 0,1 (probabilidade 90%) (Tabela 6). Portanto, foram considerados significativos estatisticamente, podendo ser observado pelo diagrama de Pareto (Figura 1), onde as barras que transcendem a linha de referência são consideradas significativas, tornando o próximo Delineamento

Composto Central Rotacional (DCCR) ser de 2^2 . As estimativas do efeito das variáveis pH, temperatura, relação C/N e glicerol tiveram valores negativos, possibilitando o uso de menores valores de cada variável na DCCR.

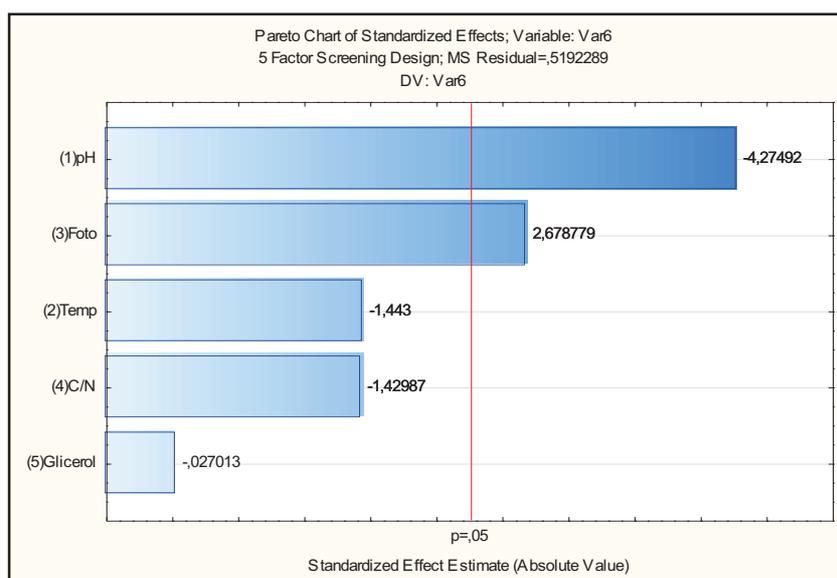


Figura 1 Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para produção de conídios

Nota: As condições dos ensaios estão descritas na Tabela 3.

Tabela 6 Resultados das análises estatísticas, valores das estimativas dos efeitos e valores de p

Variáveis	Efeitos	p-valor
Médias	15,32558	0,000000
(1) pH	-1,77847	0,002065
(2) Temperatura	-0,60032	0,182906
(3) Fotoperíodo	1,11444	0,025257
(4)C/N	-0,59486	0,186536
(5) Glicerol	-0,01124	0,979039

No teste de viabilidade, sempre foram observados índices de germinação acima de 90% em todos os ensaios realizados. Para UFC, os melhores resultados foram nos ensaios 7 e 8 (Tabela 5) e com os menores valores nos ensaios 2 e 5. As variáveis pH, temperatura e fotoperíodo foram consideradas significantes ($p \leq 0,1$) como pode ser observado no Diagrama de Pareto (Figura 2). O aumento da temperatura para 28°C, pH para 8,5 e sem a presença de luz acarretou um decréscimo de 98,4% de conídios mL⁻¹. A presença de *C. rosea* e a não de contaminantes foi confirmada por meio das características das colônias como as descritas na literatura, com colônias esbranquiçadas (SUTTON et al., 1997).

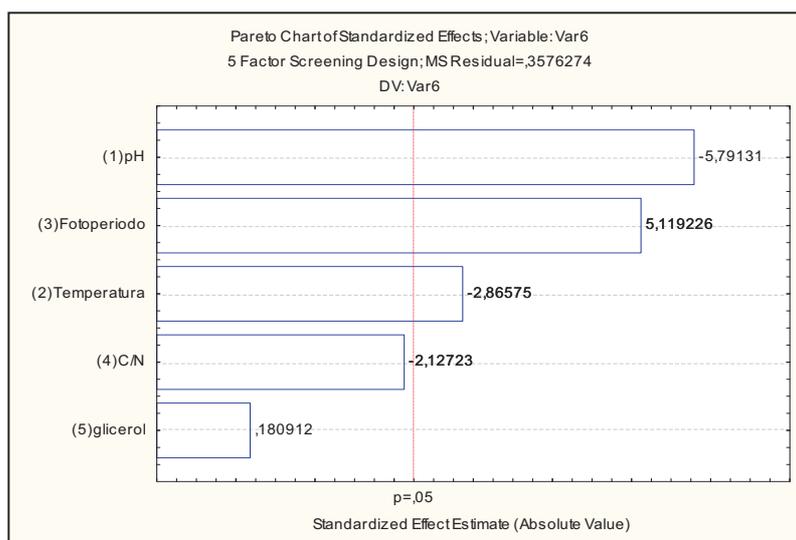


Figura 2 Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para Unidade Formadora de Colônias (UFC)

Nota: As condições dos ensaios estão descritas na Tabela 3.

O ensaio que obteve a maior biomassa foi de número 6, com 0,6566 g, e o de menor biomassa foi o ensaio 4 com 0,3187 g. Estatisticamente foram consideradas significativas as variáveis temperatura, fotoperíodo e glicerol (Figura 3). O aumento dos valores de temperatura e a adição do glicerol

conduziram a um incremento na biomassa seca de 0,3379 gramas. Como o interesse é a produção de conídios, os valores de temperatura e relação C/N para o delineamento seguinte (DCCR) foram fixados em 25°C e 200:1 respectivamente, sem adição de glicerol.

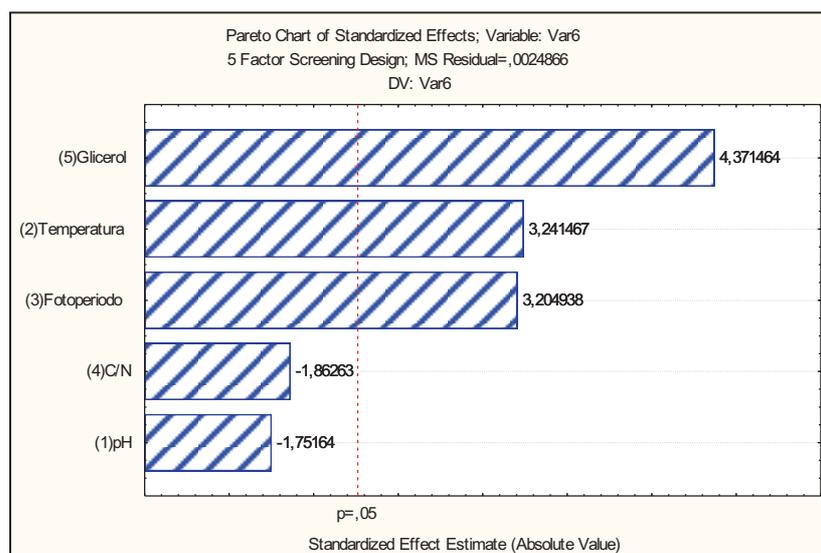


Figura 3 Diagrama de Pareto com a significância das variáveis para Biomassa fúngica seca

Nota: As condições dos ensaios estão descritas na Tabela 3.

4.3 Otimização das condições de cultivo utilizando o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

A produção de conídios variou de $1,0 \times 10^5$ a $1,78 \times 10^7$ conídios mL^{-1} diante dos ensaios propostos pelo Delineamento Composto Central (Tabela 7). As maiores produções de conídios mL^{-1} , $1,78 \times 10^7$ e $1,22 \times 10^7$, foram obtidas com valores de pH 4 e 3,71, respectivamente. As menores produções foram de $1,0 \times 10^5$ e $1,14 \times 10^5$ conídios mL^{-1} , com níveis de pH 2 e 2,29. O maior valor de

biomassa foi de 0,56 g no tratamento 2 e para UFC o melhor resultado, $5,15 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ foi no tratamento 6.

Tabela 7 Resultados do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para concentração de conídios, UFC e Biomassa fúngica seca

Ensaio	pH	Fotoperíodo (horas)	Conídios mL ⁻¹	UFC mL ⁻¹	Biomassa (g)
1	-1 (2,29)	-1 (4)	$1,05 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	0,19372
2	1 (3,71)	-1 (4)	$1,22 \times 10^7$	$3,9 \times 10^6$	0,5576
3	-1 (2,29)	1 (20)	$3,75 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	0,1297
4	1(3,71)	1 (20)	$5,88 \times 10^6$	$3,91 \times 10^6$	0,52
5	-1,41(2,0)	0 (12)	$1,14 \times 10^5$	0	0,152917
6	1,41 (4,0)	0 (12)	$1,78 \times 10^7$	$5,15 \times 10^6$	0,3852
7	0 (3,0)	-1,41 (0)	$3,0 \times 10^6$	$1,97 \times 10^6$	0,4112
8	0 (3,0)	1,41 (24)	$8,88 \times 10^6$	$2,52 \times 10^6$	0,4654
9	0 (3,0)	0 (12)	$3,0 \times 10^6$	$1,44 \times 10^6$	0,3568
10	0 (3,0)	0 (12)	$1,05 \times 10^7$	$3,47 \times 10^6$	0,3971
11	0 (3,0)	0 (12)	$1,20 \times 10^7$	$1,53 \times 10^6$	0,3914

O termo linear do pH dado pelo modelo a 95% de significância foi significativo para concentração de conídios, gerando um modelo de primeira ordem (Tabela 8). O coeficiente de determinação foi de $R^2 = 0,9188$, ou seja, 91,8% da variação total podem ser explicados pelo modelo. Os demais parâmetros não significativos foram descartados. Portanto, foi gerado um modelo reparametrizado em que a equação está representada abaixo com o coeficiente de determinação de $R^2 = 0,7967$, ainda considerada satisfatória (Tabela 9).

Tabela 8 Coeficiente estimado pelo modelo de regressão no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para concentração de conídios

Fatores	Coef. variação	Erro	t (5)	p-valor
Média	15,35381	0,365071	42,05706	0,0000
pH (L)	1,56901	0,223895	7,00780	0,000912
pH (Q)	-0,63768	0,267165	-2,38684	0,062632
Fotoperíodo (L)	0,18067	0,223895	0,80694	0,456352
Fotoperíodo (Q)	-0,22529	0,012879	-0,84328	0,437543
pH x Fotoperíodo	-0,34014	0,267165	-1,07582	0,331157

L: modelo linear; Q: modelo quadrático

A equação 1 representa o modelo de primeira ordem reparametrizado, para a produção de conídios em função do pH:

$$Y_1 = 14,728 + 1,569 \cdot x_1 \quad (1)$$

Em que: Y_1 é a resposta predita da produção de conídios e x_1 valores codificados de pH.

Tabela 9 Coeficiente estimado pelo modelo de regressão reparametrizado no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para concentração de conídios

Fatores	Coef. variação	Erro	t (5)	p-valor
Média	14,72806	0,224953	65,47178	0,0000
pH (L)	1,56901	0,264174	5,93932	0,000218

Para UFC, os termos lineares e quadráticos para o pH foram considerados significativos (95% de significância) (Tabela 10) e para a biomassa somente o termo linear para o pH foi significativo (Tabela 11). Os coeficientes de determinação dos modelos reparametrizado para UFC e biomassa foram

respectivamente $R^2 = 0,90\%$ e $R^2 = 0,72\%$, valores que explicam a variação total pelo modelo.

Equações 3 e 4 representam os modelos reparametrizado para a UFC e biomassa em função do pH:

$$Y_2 = 14,876 + 4,054 \cdot x_1 - 3,173 \cdot x_1^2 \quad (2)$$

$$Y_3 = 0,3601 + 0,1356 \cdot x_1 \quad (3)$$

Em que Y_2 e Y_3 são as respostas previstas de UFC e biomassa fúngica, respectivamente, e x_1 representa os valores codificados de pH.

Tabela 10 Coeficiente estimado pelo modelo de regressão reparametrizado no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para UFC

Fatores	Coef. variação	Erro	t(5)	p-valor
Média	14,87636	0,687990	21,62292	0,0000
pH (L)	4,05443	0,579352	6,99821	0,000113
pH (Q)	-3,17260	0,661321	-4,79736	0,001360

Tabela 11 Coeficiente estimado pelo modelo de regressão reparametrizada no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para biomassa fúngica seca

Fatores	Coef. variação	Erro	t(4)	p-valor
Média	0,360094	0,024258	14,84406	0,0000
pH (L)	0,135616	0,028488	4,76046	0,001029

Os ajustes dos modelos previstos para concentração de conídios, UFC e biomassa foram considerados bons. As superfícies de contorno geradas a partir dos modelos apresentados pelas equações, podem ser observadas na Figura 4A,

com o valor máximo para concentração de conídios fora da região estudada, apesar de no delineamento P&B ter indicado um valor negativo do efeito do pH. A faixa de valores durante a DCCR deveria tender mais para a direita, abrangendo valores de pH um pouco maiores. Observando a superfície de contorno para UFC (Figura 4B) a região ótima do pH representada entre 3 e 4 e fotoperíodo de 12 horas e 24 horas, está dentro da faixa de valores estudada. Já na Figura 4C, com maiores valores de pH, ocorreu um aumento na biomassa fúngica.

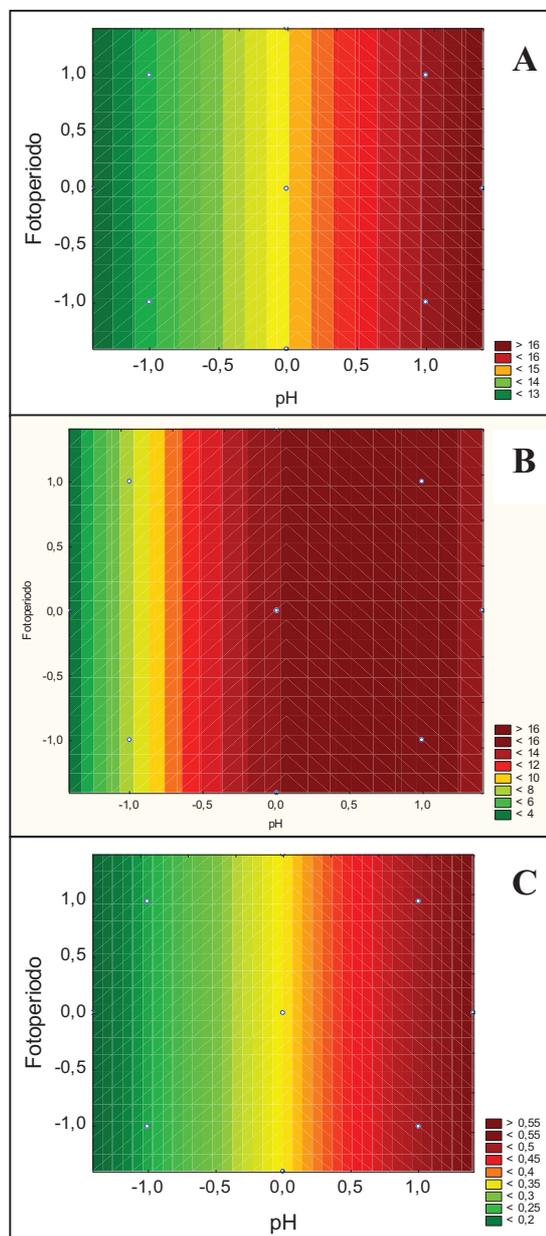


Figura 4 Superfícies de contorno geradas pelo modelo proposto, (A) concentração de conídios mL⁻¹, (B) para UFC e (C) biomassa fúngica seca

4.4 *Scaleup*: produção massal de conídios em fermentador de bancada

O meio de cultura utilizado no biorreator de bancada foi o que apresentou o melhor resultado durante a otimização em Shaker, seguindo o DCCR. Após sete dias no Biorreator, os valores de concentração de conídios mL^{-1} , UFC mL^{-1} e biomassa/100g, foram de $6,75 \times 10^6$, $1,50 \times 10^6$ e 0,63g, respectivamente.

4.5 Dinâmica de crescimento foliar do fungo *Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro

Após os 10 dias de incubação em BOD, foi observado que, nas duas concentrações de conídios mL^{-1} (10^6 e 10^5) do fungo *C. rosea*, o crescimento foi considerado satisfatório, ocupando praticamente toda a área dos discos de folhas (Gráfico 4). Nos tratamentos em que foram aplicadas água esterilizada e a testemunha (sem inoculação), não foi observado crescimento de qualquer microrganismo.

4.6 Capacidade antagônica de *Clonostachys rosea* à *Botrytis cinerea*

No teste de capacidade antagônica, nas duas concentrações de 10^6 e 10^5 conídios mL^{-1} , *C. rosea* suprimiu quase que totalmente a esporulação do patógeno (Gráfico 4).

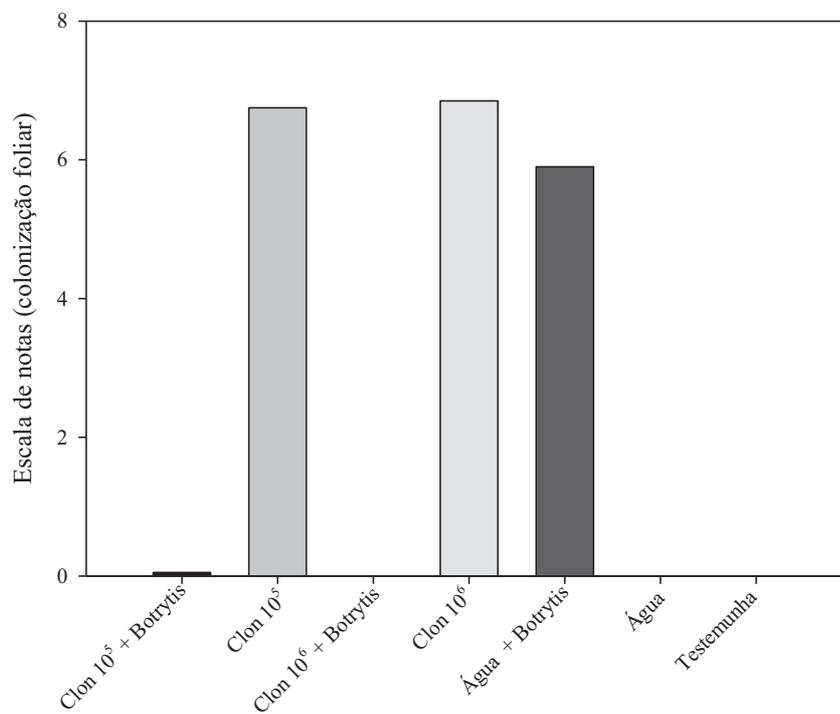


Gráfico 4 Colonização de *Clonostachys rosea* e esporulação de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de morangueiro tratados com *Clonostachys rosea*

5 DISCUSSÃO

A produção em grande escala é necessária para viabilizar a utilização agrícola de um agente de controle biológico. Apesar de poucos relatos na literatura, Frier et al. (1999) e Viccini (2004), observaram que tanto em fermentação líquida, quanto em fermentação sólida, a produção de conídios é abundante. No presente trabalho, foi otimizado o meio de cultura líquido e as condições que favorecem a maior produção de conídios do fungo *C.rosea*.

Um meio de cultura adequado também é considerado importantíssimo para o sucesso da produção de conídios/espores de diversos fungos em meio líquido, e sua composição deve sempre conter fontes de carbono, nitrogênio e minerais (ALVES, 1998). No meio estudado no presente trabalho, foram testadas duas fontes de carbono para a escolha da que incrementasse a produção de conídios de *C. rosea*. As fontes de carbono utilizadas foram a dextrose/glicose e a sacarose. Os resultados demonstraram que com dextrose se obteve o melhor desempenho para a produção de conídios, tendo seu máximo de produção em $1,49 \times 10^7$ conídios mL^{-1} , enquanto com sacarose a produção foi de $7,30 \times 10^6$ conídios mL^{-1} . Portanto, com um incremento de 48,99%. Thomas, Khachatourians e Ingledeew (1987) testaram diferentes fontes de carbono e verificaram que o uso da glicose aumentou a produção de conídios do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em meio líquido.

Para a realização dos testes, foi usada a metodologia de planejamento de experimentos, uma excelente ferramenta estatística, que permite avaliar a interferência das variáveis em todo o processo e as interações entre as mesmas, além de reduzir substancialmente o número de ensaios e os custos durante todo o experimento (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Durante o delineamento composto central foram otimizadas as condições de cultivo do *C. rosea*. Foi observado durante esse delineamento que o pH foi a variável que teve maior influência em

todo o processo, pois com os valores 3,71 e 4,0 foram obtidos os melhores resultados e, na faixa de 2 e 2,3, mais ácida, a produção de conídios foi quase nula, contrário aos relatos feitos por Sun et al. (2013), que observaram a maior produção de conídios de *C. rosea* em faixas de pH mais neutras.

Os resultados também demonstraram que o fungo *C. rosea* não é tão dependente de iluminação para sua reprodução e multiplicação, pois com apenas 4h a produção foi de $1,22 \times 10^7$ conídios mL⁻¹, próxima a de maior valor, que tinha como fotoperíodo 12h de luz ($1,78 \times 10^7$ conídios mL⁻¹). Testes de viabilidade por microgotas foram realizados e os resultados mostraram que o crescimento do fungo *Clonostachys rosea* em meio líquido não interferiu nas taxas de germinação, ficando sempre acima dos 90%.

Leite et al. (2003) relataram que meios ricos em carbono e com deficiência em nitrogênio tendem a produzir maior quantidade de conídios para os fungos entomopatogênicos *Beauveria brassiana* e *Metarhizium anisopliae*. No presente trabalho, estatisticamente a relação entre as dosagens de carbono e nitrogênio não foram consideradas significativas durante o delineamento P & B 12, mas foi observado que o melhor resultado na produção de conídios foi a relação de 200:1 (duzentas partes de carbono e uma de nitrogênio), concordando com o relatado pelo autor.

Relatos na literatura descrevem a importância do glicerol na produção massal de fungos agentes de biocontrole (HALLSWORTH; MAGAN, 1995; JIN; TAYLOR; HARMAN, 1996; SRIRAM; ROOPA; SAVITHA, 2011). Watanabe et al. (2006) testaram a tolerância dos propágulos de *Trichoderma asperellum* a dessecação e observaram que os produzidos em fermentação sólida apresentaram maior tolerância à dessecação em relação aos produzidos em meio líquido. Sriram, Roopa e Savitha (2011) afirmaram que o uso do glicerol, mesmo diminuindo a atividade da água no meio, aumentou o tempo de prateleira de formulações à base de *Trichoderma harzianum*. Em nossos estudos, a adição

do glicerol no meio de cultura foi considerada não significativa estatisticamente e apresentou efeito negativo na produção de conídios de *C. rosea*, apenas aumentando os valores de biomassa seca nos tratamentos com seu uso. Esses estudos poderão ser feitos ou adaptados futuramente, sugerindo seu uso nas etapas de formulação.

O uso de biorreatores modernos possibilita o controle de diversos parâmetros em todo o processo, como: temperatura, pH, agitação, pressão, oxigênio dissolvido e aeração. Jakubíková et al. (2006) relataram que a aeração é um dos fatores críticos em fermentadores para a produção de conídios, observando também a necessidade de suplementação com oxigênio para a manutenção de níveis requeridos. Nos ensaios realizados no presente trabalho, o pH e a agitação não foram passíveis de controle, e as formas de manter algum nível de aeração foram através da proporção de meio de cultura/volume nos *erlenmeyers* (2,5:1) e agitação (160 rpm). Nos testes para validação dos resultados em biorreator, valores diferentes dos testes preliminares foram observados. O pH das amostras foram medidos após os sete dias e foi observado um valor de 7,73, muito acima do valor inicial ajustado (4,0). Esse valor demonstra o porquê do decréscimo da concentração de conídios e acréscimo na biomassa, pois nos testes preliminares foi demonstrado a grande influência da variável pH em todo o processo e que o aumento do pH diminui a produção de conídios e aumenta a de biomassa

A produção do fungo *C. rosea* em biorreatores não afetou sua capacidade de colonização e de antagonismo a *B. cinerea* em discos de morangueiro. Mesmo com sua aplicação em diferentes concentrações, a presença de *B. cinerea* foi praticamente nula, concordando com os dados da literatura, em que diferentes isolados de *C. rosea* foram eficientes na supressão à esporulação do *B. cinerea* em folhas de roseiras e morango (VALDEBENITO-SANHUENZA et al., 1997). Nobre et al. (2005) relataram que o mecanismo de

competição por nutrientes é o principal mecanismo de antagonismo de *C. rosea* a *B. cinerea*, em tecidos de folhas senescentes.

Sun et al.(2013) estudaram a produção de clamidósporos de *C. rosea* em meio líquido. Esses autores verificaram uma produção de 1×10^8 clamidósporos mL⁻¹, valores superiores aos registrados em nosso trabalho, que foi focado na produção de conídios, demonstrando ser preciso a continuidade dos estudos, buscando novas fontes de nutrientes e parâmetros que possam influenciar no aumento da produção de conídios do fungo *Clonostachys*.

6 CONCLUSÕES

A produção de conídios do fungo *Clonostachys rosea* em meio líquido é possível.

A variável pH é a que tem maior influência em todo o processo de produção de conídios.

A máxima produção de conídios foi nas condições de pH 4,0 e 12h de luz.

Os conídios de *C. rosea* produzidos em meio líquido apresentam altos índices de germinação e não afetou a capacidade antagônica do *C. rosea* à *Botrytis cinerea*.

A dextrose fonte de carbono incrementa a produção de conídios em comparação à sacarose.

REFERÊNCIAS

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-380.

BARNETT, H. L.; LILLY, V. G. A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. **Mycologia**, New York, v. 54, p. 72-79, 1962.

BUCHS, J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.7, n. 2, p.91-98, Mar. 2001.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.24, p.270-276, 1939.

FERNANDES, M.; MORANDI, M. A. B. **Seleção de isolados de *Clonostachys rosea* para o biocontrole de *Botrytis cinerea* em rosas e morangos**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2006. 38 p. (Documentos, 62).

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2006. 130f. Dissertação (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FRIER, C. et al. **Development of *G. roseum* isolate IK726**. Copenhagen: Miljøprojekt, 1999. 463 p.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. **Microbiology**, New York, v.141, n. 5, p.1109-1115, May 1995.

JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, p.180-187, May 1997.

JAKUBÍKOVÁ, L. et al. Conidiation of *Trichoderma atroviride* isolate during submerged fermentation in a laboratory Stirred-Tank Fermenter. **Folia Microbiologica**, Praha, v.51, n.3, p. 209-213, 2006.

JIN, X.; TAYLOR, G.; HARMAN, E. Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, Guildford, v. 7, n. 93, p. 267-274, June 1996.

JOUNG, J.; BLASKOVITZ, R. Role of ammonium nitrate in morphological differentiation of *Aspergillus niger* in a submerged culture. **Developments in Industrial Microbiology**, Washington, v. 26, p. 487-494, 1985.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control**, Guildford, v.24, n. 24, p.82-89, June 2002.

LEITE, L.G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Livroceres, 2003. 92 p.

LEWIS, J.A.; PAPAVIDAS, G.C. Production of chlamydospore and conidia by *Trichoderma* spp. liquid and solid growth media. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.15, p. 351-357, 1983.

LI, J. et al. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 4, p. 925-929, Apr. 2006.

MILL, P. The nature of the interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, London, v.35, p. 61-68, 1964.

MORANDI, M. A. B. et al. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, p. 77-83, Apr. 2007.

MORANDI, M.A.B.; SUTTON, J.C.; MAFFIA, L.A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n.5, p. 439-448, 2000.

MOREIRA, G.M. **Caracterização de espécies de *Clonostachys* e avaliação do parasitismo a *Botrytis cinerea***. 2012. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

NOBRE, S.A.M. et al. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v.34, n.2, p.132-143, 2005.

OLIVEIRA, S.M.C. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos**. 2000. 45f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

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

PENG, G.; SUTTON, J.C. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.13, n.3, p.247-257, 1991.

PENG, G.; SUTTON, J. C.; KEVAN, P. G. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 14, n. 2, p. 114-129, 1992.

RAO, C.H.S. et al. Modeling and optimization of fermentation factors for enhancement of alkaline protease production by isolated *Bacillus circulans* using full-forward neural network and genetic algorithm. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.104, n. 3, p. 889-898, Mar. 2008.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

SILVA, A.R.Z. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de fitase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando subprodutos agrícolas para aplicação como aditivo na alimentação de aves e suínos**. 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

SOPER, R.S.; WARD, M.G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAVIDAS, C.G. (Ed.). **Biological control in crop production**. New York: Allanheld & Osmun, 1981. p.161-180.

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

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

SUN, M.H. et al. Effects of culture conditions on spore types of *Clonostachys rosea* 67-1 in submerged fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.58, p.318-324, Nov. 2013.

SURGEONER, G. **Pest management research: plant program**. Ontario: University of Guelph, 1998. 62 p. (Presented to the Agricultural Research of Ontario, 1).

SUTTON, J. C. et al. A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 4, p. 316-328, 1997.

SUTTON, J. C.; PENG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 6, p.615-621, Feb. 1993.

THOMAS, K.C.; KHACHATOURIANS, G.G.; INGLEDEW, W.M. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.33, n.1, p.12-20, 1987.

TOLEDO, A.V. et al. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 92, n. 1, p.7-10, May 2006.

VALDEBENITO-SANHUENZA, R.M. et al. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 69-73, mar. 1997.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.35, n. 1, p.3-14, July 2004.

VICCINI, G. **Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rosea*: um biopesticida para a cultura do morangueiro**. 2004. 132f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring. In: ROUSSOUS, S. et al. (Ed.). **Advances in solid-state fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 5-22.

WATANABE, S. et al. Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 34, n.4, p.375-379, 2006.

WYNN-WILLIAMS, D.D. Simulation of seasonal changes in microbial activity of maritime Antarctic peat. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 14, p. 1-12, 1982.

XUE, A. G. Biological control of pathogens causing root rot complex in Weld pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 3, p. 329-335, 2003.

YU, H.; SUTTON, J. C. Effectiveness of bumblebees and honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry to control *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Guildford, v.10, p.113-122, July 1997.

ZHAO, M.L. et al. A potential virulence factor involved in fungal pathogenicity: serine-like protease activity of nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 19, p.217-234, 2005.