



TAMIRES APARECIDA DUARTE DE SOUZA

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DE
Simplicillium lanosoniveum POR MEIO DA FERMENTAÇÃO
LÍQUIDA SUBMERSA**

**LAVRAS-MG
2023**

TAMIRES APARECIDA DUARTE DE SOUZA

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DE *Simplicillium*
lanosoniveum POR MEIO DA FERMENTAÇÃO LÍQUIDA SUBMERSA**

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

Prof. Dr. Wagner Bettiol
Orientador

Prof. Dr. Gabriel Moura Mascarin
Co-orientador

**LAVRAS-MG
2023**

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

Souza, Tamires Aparecida Duarte de.
Otimização dos parâmetros fermentativos de *Simplicillium*
lanosoniveum por meio da fermentação líquida
submersa/Tamires Aparecida Duarte de Souza. - 2023.
57 p.

Orientador(a): Wagner Bettiol.
Coorientador(a): Gabriel Moura Mascarin.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.
Bibliografia.

1. *Simplicillium*. 2. Multiação. 3. Bioinsumos. I. Bettiol, Wagner. II.
Mascarin, Gabriel Moura. III. Título.

TAMIRES APARECIDA DUARTE DE SOUZA

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DE *Simplicillium lanosoniveum* POR MEIO DA FERMENTAÇÃO LÍQUIDA SUBMERSA

OPTIMIZATION OF FERMENTATION PARAMETERS OF *Simplicillium lanosoniveum* THROUGH SUBMERGED LIQUID FERMENTATION

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

APROVADA em 18 de Janeiro de 2023.

Dr. Wagner Bettiol

Embrapa Meio Ambiente

Dr. Gileno Vieira Lacerda Júnior

Embrapa Meio Ambiente

Dr. Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros UFLA

Prof. Dr. Wagner Bettiol
Orientador

Prof. Dr. Gabriel Moura Mascarin
Co-orientador

**LAVRAS – MG
2023**

A Deus e à minha família,
meu alicerce, minha
motivação,
meu porto seguro.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sob todas dificuldades esteve ali, sempre me mostrando que posso ser mais forte e perseverante do que eu imaginava, fazendo com que um problema pudesse ser uma brilhante solução.

À minha família, que sempre me apoiou em todo processo, sendo meu porto seguro em todos aspectos e mesmo com saudades me incentivando a ser melhor no que estava fazendo. Ao meu pai, por sempre me falar em alto e bom tom que posso chegar a lugares nunca imaginados por mim. Aos meus queridos irmãos Mario Gabriel e Tâмили, por ficarem até tarde ao meu lado escrevendo, espero ser um bom exemplo de irmã mais velha para vocês. Em especial à minha querida mãe Genalda a qual me espelho muito como mulher de garra, fé e amor, obrigada por sempre me apoiar. Ao meu querido esposo Alisson por todo incentivo e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, ensinamentos dos quais levarei para toda a vida, por toda paciência e, principalmente, por seu incentivo.

Ao Dr. Gabriel Moura Mascarin, pela co-orientação, apoio e ensinamentos adquiridos nesse processo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia e todos seus funcionários, pela oportunidade de realizar meu sonho e por todo aprendizado ao longo dessa caminhada. Principalmente, aos professores que contribuíram com as disciplinas no meu aprendizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos e recursos para execução do projeto.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade e apoio concedidos para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Aos funcionários da Embrapa Meio Ambiente: Abrahão, Ana Carolina, Barba, Celinha, Elke Vilela, Neusa Domingos e Rosely Nascimento, pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos adquiridos no decorrer do mestrado: Ana Clara, Ana Reina, Aline, Bruno, Elisa Góis, Gabriela Gontijo, Gabriela Maria, Gileno Lacerda, José Manoel, João Ventura, Kelvin, Luana Gilio, Luana Katherine, Lucas Guedes e Peterson Nunes, vocês foram essenciais.

À minha querida e eterna Dara.

Enfim, agradeço a todos que tornaram esse sonho realidade.

RESUMO

Simplicillium lanosoniveum é um agente de biocontrole considerado de multiação, pois reconhecidamente seus isolados são parasitas de ferrugens, apresentam atividade antibacteriana, antifúngicas e antivirais, além do controle de pragas de plantas. Contudo, apesar de ser observado com frequência nas condições de campo, seu uso comercial é ainda bastante limitado, podendo ser o processo fermentativo um dos problemas para a sua baixa disponibilidade no mercado. Para que haja viabilidade de produção é essencial obter um elevado número de propágulos. A busca por meios de cultura alternativos na fermentação líquida, bem como métodos de produção, é uma necessidade para viabilizar o seu uso em larga escala. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o processo produtivo de propágulos de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 por meio da composição nutricional na fermentação líquida submersa. Para avaliar o efeito da relação C:N e o tempo ideal da fermentação em função do tempo na produção de propágulos de *Simplicillium* foi utilizado, no início dos estudos, o meio basal proposto por Jackson et al. (1997), com diferentes proporções da relação C:N (50:1; 30:1 e 10:1), glicose mono-hidratada como fonte de carbono e o extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Para esse meio basal foi inicialmente avaliado o tempo de fermentação (48; 72; 96 horas após inoculação). A influência da aeração foi avaliada utilizando volumes finais diferentes (100 mL e 60 mL) nos Erlenmeyers. A partir desta etapa, em todos os estudos subsequentes a produção de propágulos foi avaliada no 3º dia e contabilizadas a produção de conídios submersos e microescleródios e determinadas as unidades formadoras de colônias (UFC) e a biomassa. Diferentes fontes de nitrogênio foram avaliadas em mistura com glicose mono-hidratada como principal fonte de carbono. Após a seleção das fontes, foram avaliados os efeitos das fontes de carbono combinadas com as fontes de N selecionadas. O efeito do pH inicial e da densidade de inóculo da pré-cultura também foram avaliados. Também foram avaliadas a capacidade do isolado de *S. lanosoniveum* CMAA-1143 em solubilizar fosfato e degradar quitina, sendo observado que o fungo não solubilizou fosfato, mas degradou a quitina. Após a seleção dos melhores meios foi avaliada a cinética de crescimento dos propágulos produzidos com determinação do pH durante seis dias. A relação C:N que apresentou maior produção de conídios foi a 50:1 com carbono total de 36 g L⁻¹. O pH inicial não influenciou na produção de conídios. A combinação entre as fontes de C e N estabeleceram uma produção de 2,37 x 10⁹ conídios mL⁻¹ e 1,64 x 10⁴ microescleródios mL⁻¹. A aeração foi estabelecida para 250 rpm e densidade de inóculo da pré-cultura para 1 x 10⁴ conídios mL⁻¹. Considerando os benefícios entregues pela fermentação líquida submersa como o menor tempo de fermentação, elevada produção de propágulos, flexibilização dos componentes do meio de cultura, e demais benefícios, os resultados do processo fermentativo de *S. lanosoniveum* CMAA-1143, do presente estudo, podem colaborar com a indústria de biocontrole instalada no Brasil.

Palavras-chave: Fermentação; produção; multiação; mercado.

ABSTRACT

Simplicillium lanosoniveum is a biocontrol agent considered multi-action, as its isolates are known to be parasites of rust, have antibacterial, antifungal and antiviral activity, in addition to controlling plant pests. However, despite being frequently observed under field conditions, its commercial use is still quite limited, and the fermentation process may be one of the problems for its low availability in the market. For production viability, it is essential to obtain a high number of propagules. The search for alternative culture media in liquid fermentation, as well as production methods, is a necessity to enable its use on a large scale. Thus, the present work aimed to optimize the production process of *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 propagules through the nutritional composition in submerged liquid fermentation. To evaluate the effect of the C:N ratio and the ideal fermentation time as a function of time on the production of *Simplicillium* propagules, the basal medium proposed by Jackson et al. (1997), with different proportions of the C:N ratio (50:1; 30:1 and 10:1), glucose monohydrate as a carbon source and yeast extract as a nitrogen source. For this basal medium, the fermentation time was initially evaluated (48; 72; 96 hours after inoculation). The influence of aeration was evaluated using different final volumes (100 mL and 60 mL) in Erlenmeyer flasks. From this stage on, in all subsequent studies the production of propagules was evaluated on the 3rd day and the production of submerged conidia and microsclerotia was counted and the colony forming units (CFU) and biomass were determined. Different nitrogen sources were evaluated in mixture with glucose monohydrate as the main carbon source. After selecting the sources, the effects of the carbon sources combined with the selected N sources were evaluated. The effect of initial pH and preculture inoculum density were also evaluated. The ability of the isolate of *S. lanosoniveum* CMAA-1143 to solubilize phosphate and degrade chitin was also evaluated, and it was observed that the fungus did not solubilize phosphate, but degraded chitin. After selecting the best media, the growth kinetics of the propagules produced was evaluated by determining the pH for six days. The C:N ratio that showed the highest production of conidia was 50:1 with a total carbon of 36 g L⁻¹. The initial pH did not influence the production of conidia. The combination of C and N sources established a production of 2,37 x 10⁹ conidia mL⁻¹ and 1,64 x 10⁴ microsclerotia mL⁻¹. Aeration was set to 250 rpm and preculture inoculum density to 1 x 10⁴ conidia mL⁻¹. Considering the benefits delivered by submerged liquid fermentation such as shorter fermentation time, high production of propagules, flexibility of the culture medium components, and other benefits, the results of the fermentation process of *S. lanosoniveum* CMAA-1143, of the present study, can collaborate with the biocontrol industry installed in Brazil.

Keywords: Fermentation; production; multi-action; market.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Simplicillium lanosoniveum* CMAA 1143 com cinco dias de fermentação líquida (aumento de 200x). Conídios submersos (A); Microescleródio (B); Colônia de *S. lanosoniveum* em BDA (frente) (C) e em BDA (verso) (D).....20
- Figura 2** - Avaliação da solubilização de fosfato de cálcio pelo isolado de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143. Testemunha (A); Isolado de *S. lanosoniveum* CMAA-1143 (B).41
- Figura 3** - Detecção de degradação de quitina pelo isolado *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143. Testemunha (A); Isolado de *S. lanosoniveum* CMAA-1143 formando halo (B). 41
- Figura 4** - Curva de crescimento de *Simplicillium lanosoniveum* em meio líquido otimizado (brewer's exl + glicose) para produção de conídios. Número de conídios produzidos (A); número de microescleródios (B); pH do meio líquido (C). 42
- Figura 5** - Curva de crescimento de *Simplicillium lanosoniveum* em meio líquido otimizado para produção de microescleródios (protenose + maltodextrina). Número de conídios produzidos (A); número de microescleródios (B); pH do meio líquido (C). 43

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com diferentes relações C:N a partir de glicose mono-hidratada e extrato de levedura..... | 24 |
| Tabela 2 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com diferentes níveis de aeração. | 25 |
| Tabela 3 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com diferentes fontes de nitrogênio combinadas com glicose mono-hidratada como principal fonte de carbono. | 26 |
| Tabela 4 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com diferentes fontes de nitrogênio combinadas com glicose mono-hidratada como principal fonte de carbono. | 26 |
| Tabela 5 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com brewer's exl como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção de conídios submersos..... | 28 |
| Tabela 6 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com proteína de milho com levedura inativa como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção de microescleródios. | 28 |
| Tabela 7 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com protenose como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção mediana de ambos propágulos. | 29 |
| Tabela 8 - Efeito do pH e da densidade pré-cultura na fermentação líquida submersa de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 | 30 |
| Tabela 9 - Efeito da composição do meio de cultura na produção de conídios submersos e microescleródios de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 em função do tempo de 24, 48 e 72 horas de fermentação (extrato de levedura e glicose mono-hidratada). | 34 |
| Tabela 10 - Produção de conídios submersos de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 em função da aeração. | 35 |
| Tabela 11 - Fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com diferentes fontes de nitrogênio combinadas com glicose mono-hidratada como principal fonte de carbono. | 36 |
| Tabela 12 - Fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com brewer's exl (T8) como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono visando a produção de conídios submersos. | 37 |
| Tabela 13 - Fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com proteína de milho com levedura inativa (T10) como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção de microescleródios..... | 38 |
| Tabela 14 - Fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com protenose (T3) como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção de conídios e microescleródios. | 39 |
| Tabela 15 - Fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com diferentes pH iniciais..... | 39 |
| Tabela 16 - Fermentação líquida de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 com diferentes densidades de pré-cultura. | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro
BDA – Batata Dextrose Ágar
BR - Brewer's exl
C – Carbono
CMAA – Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental
DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado
EL – Extrato de Levedura
HP - Hidrolisado proteico
HY - Hilyses
HY1 – Hy-yest 101
HY4 – Hy-yest 412
ITS – Internal transcribed spacer
LY – Lyscell
mL - Mililitro
Mm – Milímetro
N – Nitrogênio
NBRIP - National botanical research institute's phosphate
PH – Pharmamedia
pH – Potencial hidrogeniônico
PM – Proteína de milho com levedura inativa
PR – Protenose
RPM – Rotação por minuto
SY – Star-yest
GL – Glicose mono-hidratada
RU – Rumel
mg - Miligramas
MT – Maltodextrina
SO – Sorbitol
MA – Maltose
SA - Sacarose
UFC - Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 Controle biológico de doenças de plantas..... | 17 |
| 2.2 Fermentação líquida ou submersa..... | 18 |
| 2.3 O gênero <i>Simplicillium</i> | 19 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 3.1 Isolado e manutenção das culturas..... | 23 |
| 3.2 Composição do meio para fermentação líquida submersa do isolado de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 e produção de propágulos em função do tempo de avaliação e relação C:N | 23 |
| 3.3 Influência da aeração na produção de conídios submersos e microescleródios por <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143..... | 25 |
| 3.4 Efeito das fontes de nitrogênio e carbono na produção de conídios submersos por <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143..... | 26 |
| 3.5 Efeito do pH e da densidade pré-cultura na fermentação líquida submersa de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143..... | 30 |
| 3.6 Detecção da solubilização de fosfato e degradação de quitina pelo isolado de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143..... | 31 |
| 3.7 Cinética de crescimento de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 | 32 |
| 4. Análise estatística..... | 32 |
| 5. RESULTADOS | 33 |
| 5.1 Efeito da composição do meio para fermentação líquida submersa de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 na produção de propágulos em função do tempo de avaliação | 33 |
| 5.2 Influência da aeração na produção de conídios submersos e microescleródios de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143..... | 33 |
| 5.3 Efeito das fontes de nitrogênio e carbono na produção de propágulos de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 | 35 |
| 5.3.1 Efeito das fontes de nitrogênio | 35 |
| 5.4 Efeito das fontes de carbono na produção de conídios submersos e microescleródios | 37 |
| 5.4.1 Efeito das fontes de carbono combinadas com brewer's exl (T8) como principal fonte de nitrogênio na produção de conídios submersos | 37 |
| 5.4.2 Efeito das fontes de carbono na produção de conídios submersos combinadas com proteína de milho com levedura inativa (T10) como principal fonte de nitrogênio. | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 5.4.3 Efeito das fontes de carbono na produção de conídios submersos combinada com a protenose (T3) como principal fonte de nitrogênio | 38 |
| 6. Efeito do pH e da densidade pré-cultura na fermentação líquida submersa de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 no meio com protenose + maltodextrina .. | 38 |
| 6.1 Efeito pH inicial | 38 |
| 6.2 Efeito da densidade de pré-cultura | 39 |
| 7. Solubilização de fosfato e degradação de quitina do isolado <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 | 40 |
| 8. Cinética de crescimento de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> CMAA-1143 | 41 |
| 9. DISCUSSÃO | 44 |
| 10. CONCLUSÃO | 48 |
| 11. REFERÊNCIAS | 49 |

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas químicos têm sido a principal ferramenta de manejo de pragas e doenças de plantas ao longo de décadas (LONDRES, 2011). No entanto, nos últimos anos, essa técnica tem sido contestada devido aos efeitos adversos à saúde humana e animal e ao ambiente (BETTIOL et al., 2009). O emprego de pesticidas químicos tem acarretado na eliminação de inimigos naturais e também na seleção de pragas e patógenos resistentes, aumentando os custos de produção e ainda gerando dúvidas sobre sua aplicabilidade (MORAES, 2019). Em contrapartida, o controle biológico é uma das alternativas que se destaca no mercado, apresentando inúmeros pontos positivos para o manejo integrado de pragas e doenças (KOBORI et al., 2015; LOPES et al., 2019), sem causar problemas de contaminação.

As estimativas projetam que o mercado global de biopesticidas atingirá US\$ 11,3 bilhões de dólares em 2027, sendo que em 2022 foi de US\$ 5,5 bilhões de dólares, com uma taxa anual de crescimento de 15,6% entre 2022 a 2027 (MARKETS and MARKETS, 2022). Uma ampla expansão de uso dos bioprotetores está ocorrendo em todo o mundo. No Brasil, a área sob controle biológico de pragas e doenças com inimigos naturais e antagonistas foi superior a 30 milhões de hectares em 2017 (BUENO et al., 2020). A importância do controle biológico no Brasil pode ser avaliada considerando-se a progressão do número de produtos biológicos registrados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que em agosto de 2011 era de 27, passando para mais de 400 em março de 2022. Esses dados indicam a importância crescente dos biopesticidas no agronegócio brasileiro. De acordo com a indústria nacional de produção de agentes de controle biológico, em 2018 ocorreu um crescimento de 70% nas vendas de sua recente história.

Simplicillium lanosoniveum é um exemplo de microrganismo modelo de multiação, pois atua como entomopatógeno (GAMS, 1988) e micoparasita em ferrugens das plantas. Em *Phakopsora pachyrhizi*, quando em condições controladas, *Simplicillium* suprimiu, em até quatro vezes, a formação de uredínias em soja, resultando em menor esporulação do patógeno (WARD et al., 2012). Além disso, *Simplicillium* atua por hiperparasitismo em *Aecidium elaeagni-latifoliae*, que causa ferrugem em *Elaeagnus latifolia* (BAISWAR et al., 2014). *Simplicillium* também apresenta atividade antibacteriana e antifúngica devido à produção de metabólitos. Também controla o mofo cinzento de tomate (*Solanum lycopersicum*) e ginseng

(*Panax ginseng*) (DANG et al., 2014; SHIN et al., 2017). Além das propriedades antifúngicas e antibacterianas, também tem propriedades antivirais a partir dos metabólitos secundários (LIANG et al., 2016, 2017).

As espécies de *Simplicillium* têm um alto valor ecológico e econômico para biocontrole e compostos bioativos (TAKATA et al., 2013; YAN et al., 2015; HYDE et al., 2019) e na remediação por acúmulo de metais tóxicos (SBARAINI et al., 2021). As espécies pertencentes a este gênero são consideradas de alto potencial no controle biológico, pois possuem um amplo espectro de hospedeiros e substratos, fator importante do ponto de vista comercial no segmento de bioinsumos (CHEN et al., 2008; ZHANG et al., 2017; GOMES et al., 2018; CROUS et al., 2018; LIU & CAI, 2012; NONAKA et al., 2013; WARD et al., 2011; WARD et al., 2012; ZHAO et al., 2013; LIANG et al., 2016).

Para que haja viabilidade dos agentes de controle biológico é essencial obter um elevado número de propágulos infecciosos para a aplicação nos tratamentos inundativos, principalmente na aplicação foliar, devido às áreas de plantio serem consideravelmente grandes (MASCARIN; JARONSKI, 2016).

A produção massal de agentes de biocontrole pode ser realizada via fermentação sólida, líquida ou bifásica. Na fermentação sólida é utilizado grãos de cereais como fonte de substrato de crescimento. Na fermentação bifásica o inóculo para produção de conídios aéreos em meios sólidos é obtido por meio da fermentação líquida, processo que é comumente utilizado pelas indústrias (MASCARIN et al., 2010). No entanto, a fermentação sólida estática apresenta obstáculos do ponto de vista industrial como: custo elevado dos substratos à base de cereais, grande demanda de mão de obra, alta chance de contaminações, dificuldade de automação, período elevado de fermentação e uma certa restrição no controle das condições nutricionais e ambientais da fermentação (SANTOS et al., 2021).

Na fermentação líquida submersa o tempo de cultivo é reduzido maximizando ganhos econômicos e produtivos. Ao contrário da sólida, permite o controle dos nutrientes contidos no meio de cultura, como vitaminas, sais, fontes de C:N, pouco uso de mão de obra. Além disso permite flexibilizar a manipulação do ambiente físico durante o processo fermentativo, bem como obter propágulos de interesse como os blastosporos, microescleródios e clamidósporos (JACKSON et al., 2010; MASCARIN et al., 2015, 2019; ORTIZ-URQUIZA et al., 2010). Essas características são fundamentais para a viabilidade de uma produção massal de fungos filamentosos

usados como agentes de biocontrole (CARVALHO et al., 2018; MASCARIN et al., 2019).

Estudos com a fermentação líquida submersa têm demonstrado a viabilidade dos conídios produzidos com tolerância às condições adversas, o que é visto como promissor do ponto de vista comercial (REZENDE et al., 2020). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de *Simplicillium lanosoniveum* por meio da composição nutricional no processo fermentativo líquido submerso.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Controle biológico de doenças de plantas

O controle biológico tem recebido maior visibilidade nos dias atuais para o controle de doenças de plantas, seja em pré ou pós-colheita e, principalmente, em casos onde a resistência às doenças e o controle químico estão indisponíveis (COLLINGE et al., 2022). O controle biológico de doenças de plantas é caracterizado pelo controle direto ou indireto de fitopatógenos por um antagonista ou até mesmo por um grupo de antagonistas (COOK; BAKER, 1983). Esse organismo considerado benéfico é denominado como agente de controle biológico (JENSEN et al., 2016; TRONSMO et al., 2020). Recentemente, foi proposto o termo de bioprotetores em substituição ao termo biopesticidas. Esse termo é mais amplo podendo incluir o uso de extratos não vivos e produtos naturais (STENBERG et al., 2021). O controle biológico viabiliza estratégias no manejo integrado de pragas as quais têm como foco a redução do uso de pesticidas químicos. Além disso, tem-se a possibilidade de exercer efeito mais específico do que a maioria dos pesticidas químicos disponíveis no mercado e ainda não deixa resíduos nocivos no ambiente.

A maioria dos benefícios do uso de agentes de biocontrole está ligada à capacidade de um determinado organismo ser capaz de penetrar na planta doente ou afetar o patógeno alvo de uma maneira que um produto químico muitas vezes não pode. A resistência a um pesticida químico, por exemplo, é bastante minimizada com a aplicação de um agente de controle biológico (COLLINGE et al., 2022).

Na década de 80 o controle biológico já era visto como uma estratégia de redução nas perdas de culturas com doenças. Alguns desses exemplos foi destacado por Papavizas (1981), que destacava o uso de práticas agrícolas, como a rotação de culturas, o enterramento de culturas infectadas e a fertilização com adubação orgânica, permitindo que houvesse tempo para o trabalho biológico dos microrganismos antagonistas. Os agentes de controle biológico incluem fungos, bactérias, oomicetos e vírus (COLLINGE et al., 2022). Esses organismos podem ser isolados do solo, principalmente de solos supressivos às doenças, e também em associação com as plantas tanto na filosfera, como na rizosfera ou endosfera (JORGENSEN et al., 2020).

Segundo JENSEN et al. (2017), existem quatro principais modos de ação ao controle biológico de doenças de plantas: o primeiro é a competição por recursos como oxigênio, carbono, nitrogênio e entre outros; o segundo é a antibiose, onde o agente de

controle biológico inibe o patógeno por meio da liberação de metabólitos secundários tóxicos; o terceiro é o parasitismo, onde o antagonista explora o patógeno como alimento e; o quarto é a resistência induzida, que é a interação de um agente de controle biológico via indução de mecanismos de defesa da planta contra patógenos invasores. Além desses mecanismos citados um quinto pode ser considerado para o controle de doenças que é a promoção do crescimento das plantas, o que consequentemente resultará numa melhor absorção de nutrientes conferindo na planta a capacidade de resistir a um patógeno (COLLINGE et al., 2022).

2.2 Fermentação líquida ou submersa

Na fermentação em estado sólido os microrganismos se desenvolvem em um ambiente sem a presença de água livre ou com um conteúdo muito baixo (SOCCOL et al., 2017). Já a fermentação líquida submersa é um processo do qual os microrganismos desenvolvem-se em elevado teor de água livre. A fermentação submersa apresenta vantagens no processo fermentativo como: controle do pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas solúveis em água, controle de nutrientes do meio, como vitaminas, sais e relação C:N, além de permitir a separação de biomassa após a fermentação (MASCARIN et al., 2022). Essas características são vantajosas quando comparadas com a fermentação sólida (FARINAS, 2015).

A fermentação líquida em biorreatores com agitação mecânica permite uma produção elevada e mais padronizada dos propágulos de interesse num espaço físico relativamente pequeno e num período relativamente curto, possibilitando o controle da contaminação (MASCARIN et al., 2015; HARMAN et al., 1991; LOUREIRO et al., 2003).

Diferentemente da fermentação líquida, a fermentação sólida é um processo considerado trabalhoso com elevado risco de contaminação, acarretando alto custo de produção (JACKSON et al., 2003). Além disso, a relação C:N é de grande importância na fermentação líquida, visto que meios com elevado teor de carbono e com deficiência em nitrogênio propiciam maior produção de conídios (LEITE et al., 2003). Diversos autores têm avaliado fonte de C e N no desenvolvimento de meios de cultura para a fermentação líquida (VICCINI et al., 2007; LEITE et al., 2003; ZHANG et al., 2015; CARVALHO et al., 2018). A substituição dos componentes nutricionais por um substrato considerado complexo, viável economicamente e acessível, é indispensável

quando se almeja a redução de custos na elaboração do meio de cultivo (JACKSON et al., 1997).

Outra vantagem exclusiva da fermentação submersa é sua versatilidade na produção diversificada de propágulos, tais como: conídios submersos, blastosporos, micélios, clamidósporos e microescleródios (ORTIZ-URQUIZA et al., 2010; JACKSON et al., 2010; MASCARIN et al., 2015; MASCARIN et al., 2022). Na fermentação submersa existe uma facilidade de recuperação do produto, devido a automação do processo e a disponibilidade dos componentes de baixo custo, tornando o método mais econômico e vantajoso para a produção de agentes de biocontrole (JACKSON et al., 1997; KLEESPIES; ZIMMERMANN, 1992).

2.3 O gênero *Simplicillium*

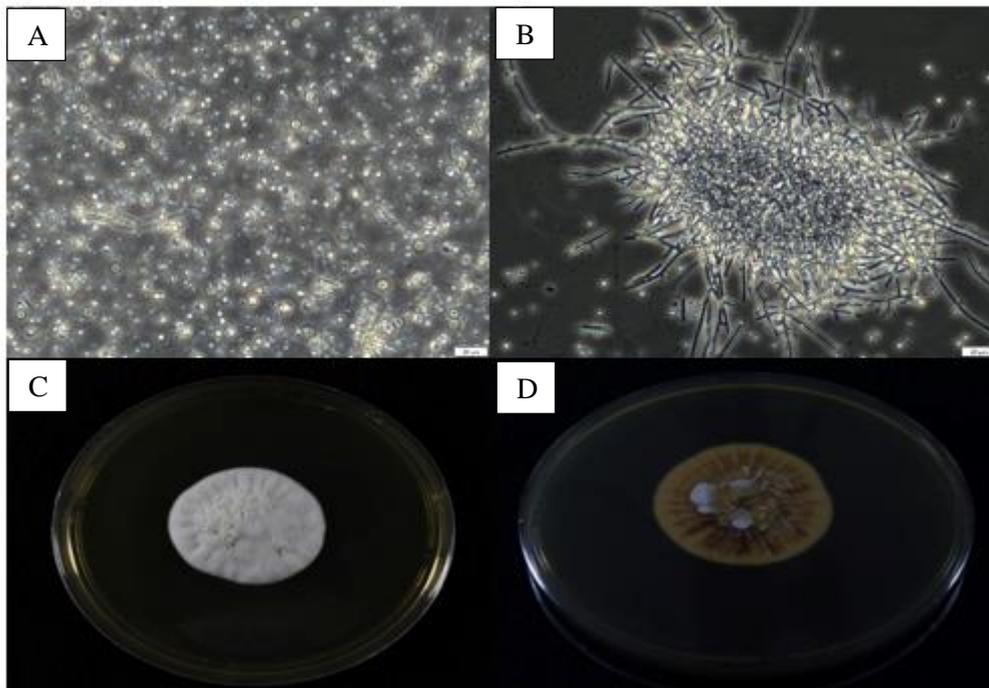
O gênero *Simplicillium* era anteriormente classificado como parte do grupo de *Verticillium*, devido à produção de conidióforos prostados segundo a classificação realizada por Gams (1971). Mais tarde, com base em dados moleculares, a maior parte das espécies de *Verticillium* foram classificadas como membro em Clavicipitaceae, enquanto as espécies de *Simplicillium* formaram um grupo monofilético separado dos outros táxons descritos nesta família (ZARE et al., 2000; GAMS & ZARE 2001; SUNG et al., 2001; ZARE & GAMS, 2001).

Recentemente, com base em análises filogenéticas multigênicas, *Simplicillium* foi incluído à família Cordycipitaceae (Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes) (SUNG et al., 2007; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016; WIJAYAWARDENE et al., 2018). Posicionando o gênero *Simplicillium* como a primeira linhagem divergente na família Cordycipitaceae (KEPLER et al., 2017). Posteriormente, dez novas espécies, como *Simplicillium chinense* (LIU & CAI, 2012), *Simplicillium aogashimaense*, *Simplicillium cylindrosporum*, *Simplicillium minatense*, *Simplicillium subtropicum*, *Simplicillium sympodiophorum* (NONAKA et al., 2013), *Simplicillium lanosoniveum* var. *tianjinensis* (DONG et al., 2014), *Simplicillium calcicola* (ZHANG et al., 2017), *Simplicillium coffeanum* (GOMES et al., 2018) e *Simplicillium filiforme* (CROUS et al., 2018) foram adicionadas ao gênero *Simplicillium*, com base na análise filogenética e análises de dados de ITS e forte semelhança morfológica.

Sua conexão sexuada-assexuada foi estabelecida com *Simplicillium lanosoniveum* ligada a um *Torrubiella* sp. (ZARE & GAMS, 2001). Atualmente,

Simplicillium é composto por 12 espécies (CHEN et al., 2019). Filogeneticamente o gênero *Simplicillium* é associado a *Cordyceps* (SUNG et al., 2007) e pode ser facilmente confundido com as características morfológicas de *Lecanicillium*, pois são semelhantes, resultando em frequentes erros de classificação. Com o uso combinado da filogenia e da morfologia este gênero pode ser distinguindo claramente dos demais (SUNG et al., 2007; KOUVELIS et al., 2008). O gênero *Simplicillium* é distinguido dos demais pela ausência de ramificação verticilada, tendo como parte fiálides solitárias, bem discretas, aculeadas e estreitas, onde surgem as hifas aéreas, conídios curto-elipsoidais a subglobosos ou obclavados, e ligados em cabeças globosas ou cadeias imbricadas e cristais comumente presentes no ágar (ZARE & GAMS 2001).

Figura 1 - *Simplicillium lanosoniveum* CMAA 1143 com cinco dias de fermentação líquida (aumento de 200x). Conídios submersos (A); Microescleródio (B); Colônia de *S. lanosoniveum* em BDA (frente) (C) e em BDA (verso) (D).



Fonte: Da autora (2021).

Fungos pertencentes ao gênero *Simplicillium* possuem um amplo espectro de hospedeiros e substratos, pois podem ser encontradas como endófitas de plantas, no solo, em calcário, em madeira ou rocha em decomposição, bem como em insetos, tecidos de plantas, fungos, nematoides, unhas humanas e, até mesmo, na água do mar (CHEN et al., 2008; ZHANG et al. 2017; GOMES et al., 2018; CROUS et al., 2018; LIU & CAI, 2012; NONAKA et al., 2013; WARD et al., 2011; WARD et al., 2012;

ZHAO et al., 2013; LIANG et al., 2016).

Há registros de micoparasitismo por algumas espécies do gênero *Simplicillium* (WARD et al., 2011; WARD et al., 2012; ZHAO et al., 2013; FERNANDES & BITTENCOURT, 2008). Um exemplo clássico são as cepas de *S. lanosoniveum* que são isoladas de folhas de soja infectadas com o patógeno da ferrugem da soja *Phakopsora pachyrhizi*, sendo as mesmas responsáveis por suprimir o desenvolvimento de uredínia de *P. pachyrhizi* (WARD et al., 2012). Na Índia, cepas de *S. lanosoniveum* mostraram hiperparasitismo em *Aecidium elaneagni-latifoliae*, agente causal da ferrugem em *Elaeagnus latifolia* (BAISWAR et al., 2014). Essa característica se deve à presença de compostos bioativos com perfil antifúngico, antibacteriano e exopolissacarídeos isolados de *S. lanosoniveum* (YU et al., 2013; FUKUDA et al., 2014; XING et al., 2016; DONG et al., 2018).

Em estudo conduzido por Liu et al. (2022), *S. lanosoniveum* DT06 sintetizou um antibiótico que inibiu *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, determinadas espécies de *Simplicillium* foram descritas como entomopatogênicas, como é o caso de *Simplicillium lamellicola*, que diminui o tempo médio de sobrevivência de várias espécies de carrapatos, também parasita os cistos e ovos de nematoides (GAMS, 1988), exerce patogenicidade em pulgões, cochonilhas e aranhas (CHEN et al., 2017; BISCHOFF & WHITE, 2004; GAMS & ZARE, 2003; POLAR et al., 2005), possui atividade antibacteriana e antifúngica pela produção de metabólitos antibacterianos, como manosil lipídios (DANG et al., 2014) e controla o mofo cinzento do tomateiro e do ginseng (DANG et al., 2014; SHIN et al., 2017). *Simplicillium obclavatum* tem a capacidade de produzir múltiplas xilanases e endoglucanases que têm potencial para serem usadas em biocombustíveis, ração animal e aplicações na indústria de alimentos (ROY et al., 2013), além da descoberta de peptídeos lineares e cíclicos com propriedades antifúngicas e antivirais a partir dos metabólitos secundários (LIANG et al., 2016, 2017).

Estudos mostraram que as espécies de *Simplicillium* têm alto valor ecológico e econômico para uso em biocontrole e na produção de compostos bioativos (TAKATA et al., 2013; YAN et al., 2015; HYDE et al., 2019), como alcalóides (FUKUDA et al., 2014), peptídeos (LIANG et al., 2016; 2017; DAI et al., 2018), dicetopiperazina (YAN et al., 2015), xilanases (ROY et al., 2013), antraquinonas (HUANG et al., 2015) e antibióticos (TAKATA et al., 2013; DONG et al., 2018) com potencial de aplicação na medicina humana (UCHIDA et al., 2019), na remediação por acúmulo de metais

tóxicos (SBARAINI et al., 2021), além de ocorrer em uma ampla gama de nichos ecológicos. Suas atividades antimicrobianas e a entomopatogenicidade exercida são relevantes para que *Simplicillium* tenha elevado potencial como um agente de controle biológico (LIM et al., 2014; WARD et al., 2012; ZHAO et al., 2013; CHEN et al., 2017; SKAPTSOV et al., 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente (22°43’36” S e 47°00’59” W), localizado no município de Jaguariúna, São Paulo.

3.1 Isolado e manutenção das culturas

No estudo foi utilizado o isolado de *Simplicillium lanosoniveum* BRM 32489 (CMAA-1143), obtido de pústulas de ferrugem do cafeeiro, em Serra Negra, SP, Brasil, e depositado na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente. O isolado foi reativado em placas de Petri (90 x 15 mm, Pleion[®]), contendo 20 mL de meio de batata-dextrose-ágar (BDA, Difcon[®]) por 10 dias, a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Para preservação, colônias esporuladas foram cortadas em fragmentos de 5 mm de diâmetro, acondicionadas em criotubos contendo 1,5 mL de solução esterilizada de água e glicerol a 20% (v/v) duplamente autoclavados e armazenados a -80 °C.

A partir das culturas estoque foi realizada a inoculação em placas de Petri contendo BDA, conforme descrito acima. Suspensões de conídios foram obtidas a partir da lavagem das placas com 10 mL de uma solução esterilizada de polissorbato 80a 0,04% (Tween 80 Sigma[®]) e calibradas em hemocitômetro (Brightline Improved Neubauer, New Optik[®], Brasil) e microscópio óptico com aumento de 400× (Leica Microsystems GmbH[®]).

3.2 Composição do meio para fermentação líquida submersa do isolado de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 e produção de propágulos em função do tempo de avaliação e relação C:N

Para os ensaios em fermentação líquida foi utilizado um meio basal que contém, por litro: KH₂PO₄, 2,0 g; CaCl₂.2H₂O, 0,4 g; MgSO₄.7H₂O, 0,3 g; FeSO₄.7H₂O, 0,05 g; CoCl₂.6H₂O, 37 mg; MnSO₄.H₂O, 16 mg; ZnSO₄.7H₂O, 14 mg; tiamina, riboflavina, pantotenato, niacina, piridoxamina, ácido tioico, 500 µg cada e ácido fólico, biotina, vitamina B 12, 50 µg cada (JACKSON et al., 1997). O pH do meio foi ajustado para 6.0 antes do processo de autoclavagem pela adição de uma solução de 0,1 mol L⁻¹ HCl ou 0,1 mol L⁻¹ de NaOH. Diferentes concentrações de glicose (Sigma-Aldrich[®], Cotia, SP, Brasil) e extrato de levedura (HIMEDIA[®]; Mumbai, Índia) compõem os meios para estudar os efeitos

das relações C:N de 50:1; 30:1 e 10:1 e carbono total de 8 e 36 g L⁻¹ (JACKSON; JARONSKI, 2009) (Tabela 1). Os cálculos das concentrações de carbono e da relação C:N para glicose (40%) e extrato de levedura (40% de C e 10,90% de N) foram baseadas nas especificações do fabricante.

Frascos Erlenmeyers foram utilizados em triplicata para cada tratamento e o experimento foi repetido duas vezes no tempo. Todas as culturas foram crescidas com 100 mL de meio em Erlenmeyers (Bellco Glass, Vineland, NJ, EUA) de 250 mL e três defletores basais, os quais permitiam trocas gasosas com o ambiente e foram incubados a 28 °C e 250 rpm em uma incubadora com agitador rotativo (SOLAB[®], SL-223/F-E). Os frascos foram agitados manualmente uma vez ao dia para impedir o crescimento micelial no interior de sua parede. A inoculação foi realizada a partir de suspensões de conídios, conforme descrito no item anterior; ajustado para chegar na concentração final de 1×10^7 conídios mL⁻¹ no meio. As avaliações foram feitas no 2º, 3º e 4º dia de fermentação. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com diferentes relações C:N a partir de glicose mono-hidratada e extrato de levedura.

| Tratamento | Carbono (g L ⁻¹) | Relação C:N | Glicose (g L ⁻¹) | Extrato de levedura (g L ⁻¹) |
|------------|------------------------------|-------------|------------------------------|--|
| T1 | 8 | 10:1 | 0,80 | 7,34 |
| T2 | 8 | 30:1 | 0,27 | 2,45 |
| T3 | 8 | 50:1 | 0,16 | 1,47 |
| T4 | 36 | 10:1 | 3,60 | 33,03 |
| T5 | 36 | 30:1 | 1,20 | 11,01 |
| T6 | 36 | 50:1 | 0,72 | 6,61 |

Fonte: KOBORI et al. (2015).

No 2º, 3º e 4º dias após a inoculação dos meios líquidos foram retiradas alíquotas de 1 mL para quantificar a produção de conídios submersos e microescleródios. A câmara Neubauer (Brightline Improved Neubauer, New Optik[®], Brasil) foi utilizada para a contagem dos esporos em aumento de 400× na diluição 10⁻⁴ sob microscópio de luz com contraste de fase (Leica Microsystems GmbH[®]). Para a quantificação de microescleródio uma alíquota de 100 µL na diluição 10⁻¹ da cultura líquida foi depositada em uma lâmina e sobreposta por uma lamínula de 24 x 50 mm e contada microscopicamente com aumento de 10× (JACKSON; JARONSKI, 2009).

3.3 Influência da aeração na produção de conídios submersos e microescleródios por *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

Para a avaliação do efeito da aeração na produção de conídios e microescleródios, a concentração da pré-cultura foi ajustada para 5×10^7 conídios mL⁻¹ com auxílio de hemocitômetro. A pré-cultura foi obtida por meio do crescimento do fungo em Erlenmeyers de 250 mL e três defletores basais os quais permitiam trocas gasosas com o ambiente, incubados a 28 °C e 250 rpm em uma incubadora com agitador rotativo (SOLAB®, SL-223/F-E). O meio utilizado para avaliar esse parâmetro foi o meio 6 apresentado na Tabela 1, que obteve a maior produção de conídios. Nos Erlenmeyers os componentes dos meios foram adicionados em volumes diferentes, contudo mantendo os volumes totais de 100 mL e 60 ml de meio (Tabela 2), o qual permitiu avaliar a influência da aeração sob a produção de conídios e microescleródios de *S. lanosoniveum*.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com diferentes níveis de aeração.

| Tratamento | T1 | T2 | T3 | T4 |
|--|-------|-------|-------|-------|
| Relação C:N | 30:1 | 50:1 | 30:1 | 50:1 |
| Carbono total (g L ⁻¹) | 8 | 36 | 8 | 36 |
| Extrato de levedura (g L ⁻¹) | 0,24 | 0,66 | 0,24 | 0,66 |
| Glicose 25% (mL ⁻¹) | 7,02 | 33,36 | 7,02 | 33,36 |
| Inóculo (mL ⁻¹) | 10 | 10 | 6 | 6 |
| Meio basal (mL ⁻¹) | 50 | 50 | 30 | 19,98 |
| H ₂ O (mL ⁻¹) | 32,74 | 5,98 | 16,74 | 0 |
| Total (mL ⁻¹) | 100 | 100 | 60 | 60 |

Fonte: Da autora (2021).

No 3º dia de fermentação foi retirada uma alíquota de 1 mL das respectivas culturas para avaliar a produção de conídios submersos, microescleródios, UFC e biomassa. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), repetido duas vezes no tempo com quatro repetições.

3.4 Efeito das fontes de nitrogênio e carbono na produção de conídios submersos por *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

Culturas líquidas de *S. lanosoniveum* CMAA-1143 foram cultivadas em meios de cultura como descrito anteriormente com diferentes fontes de nitrogênio e carbono. As seguintes fontes de nitrogênio foram avaliadas: extrato de levedura (10,9% N; 40,0% C Acumedia, NEOGEN®); o farelo dealgodão (9,92% N; 49,3% C Pharmamedia®, AMD, EUA); farelo de milho (9,6% N; 50,0% C Protenose, Ingredion®, Mogi Mirim, SP); levedura autolizada (7,02% N e 47,1% C Lyscell®, ICC Brasil); hy-yeast 101® (7,99% N e 48,6% C); hy-yeast 412 (11,6% N e 43,1% C); star-yeast (6,96% N e 47,9% C); brewer's exl (8,35% N e 48,8% C); levedura hidrolisada (6,9% N; 47,6% C Hilyses®, ICC Brasil); proteína de milho com levedura inativa (8,32% N; 50,0% C) hidrolisado proteico (12% N) (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com diferentes fontes de nitrogênio combinadas com glicose mono-hidratada como principal fonte de carbono.

| Tratamentos | T1 (EL) | T2 (PH) | T3 (PR) | T4 (LY) | T5 (101) |
|------------------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|
| Proporção C:N | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 |
| Carbono total (g L ⁻¹) | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Nitrogênio (g L ⁻¹) | 0,66 | 0,72 | 0,75 | 1,02 | 0,9 |
| Glicose 25% (mL ⁻¹) | 33,36 | 32,42 | 32,25 | 31,16 | 31,62 |
| Inóculo (mL ⁻¹) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Meio basal (mL ⁻¹) | 19,98 | 20,86 | 21 | 21,82 | 21,48 |
| Total (mL ⁻¹) | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 4 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com diferentes fontes de nitrogênio combinadas com glicose mono-hidratada como principal fonte de carbono.

| Tratamentos | T6 (412) | T7 (SY) | T8 (BR) | T9 (HY) | T10 (PM) | T11 (HP) |
|------------------------------------|----------|---------|---------|---------|----------|----------|
| Proporção C:N | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 |
| Carbono total (g L ⁻¹) | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Nitrogênio (g L ⁻¹) | 0,62 | 1,03 | 0,86 | 1,04 | 0,86 | 0,6 |
| Glicose 25% (mL ⁻¹) | 33,32 | 31,04 | 31,79 | 31,04 | 31,67 | 36 |
| Inóculo (mL ⁻¹) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Meio basal (mL ⁻¹) | 20,06 | 21,93 | 21,35 | 21,92 | 21,47 | 17,4 |

| | | | | | | |
|---------------------------|----|----|----|----|----|----|
| Total (mL ⁻¹) | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
|---------------------------|----|----|----|----|----|----|

Fonte: Da autora (2021).

Como fontes de carbono foram testadas: glicose mono-hidratada (41,6% C Dinâmica[®], Indaiatuba, SP, Brasil), maltodextrina (45,2% C Ingredion[®], São Paulo, SP, Brasil), melão de cana-de-açúcar (34,9% C e 2,12% N Rumel[®], São Paulo, SP, Brasil), sorbitol (43,1% C Ingredion[®], Mogi Guaçu, SP, Brasil), maltose (44,6% C Merse[®], Campinas, SP, Brasil) e sacarose (42% C Synth[®], Diadema, SP, Brasil) (Tabela 5, 6 e 7).

Tabela 5 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com brewer's exl como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção de conídios submersos.

| Tratamentos | T1 (GL) | T2 (RU) | T3 (MT) | T4 (SO) | T5 (MA) | T6 (SA) |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Proporção C:N | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 |
| Carbono total (g L ⁻¹) | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Nitrogênio (g L ⁻¹) | 0,86 | 0,68 | 0,86 | 0,86 | 0,86 | 0,86 |
| Glicose 25% (mL ⁻¹) | 31,8 | 37,41 | 28,13 | 29,50 | 28,51 | 26,54 |
| Inóculo (mL ⁻¹) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Meio basal (mL ⁻¹) | 21,35 | 15,9 | 25 | 23,63 | 24,62 | 26,6 |
| Total (mL ⁻¹) | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 6 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com proteína de milho com levedura inativa como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção de microescleródios.

| Tratamentos | T1 (GL) | T2 (RU) | T3 (MT) | T4 (SO) | T5 (MA) | T6 (SA) |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Proporção C:N | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 |
| Carbono total (g L ⁻¹) | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Nitrogênio (g L ⁻¹) | 0,86 | 0,69 | 0,86 | 0,86 | 0,86 | 0,86 |
| Glicose 25% (mL ⁻¹) | 31,67 | 37,30 | 28,02 | 29,40 | 28,40 | 25,90 |
| Inóculo (mL ⁻¹) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Meio basal (mL ⁻¹) | 21,46 | 16,00 | 25,10 | 23,73 | 24,72 | 27,24 |
| Total (mL ⁻¹) | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 7 - Composição dos meios de cultura para fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com protenose como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção mediana de ambos propágulos.

| Tratamentos | T1 (GL) | T2 (RU) | T3 (MT) | T4 (SO) | T5 (MA) | T6 (SA) |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Proporção C:N | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 |
| Carbono total (g L ⁻¹) | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Nitrogênio (g L ⁻¹) | 0,75 | 0,64 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| Glicose 25% (mL ⁻¹) | 32,25 | 37,74 | 28,54 | 30 | 29 | 26,28 |
| Inóculo (mL ⁻¹) | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Meio basal (mL ⁻¹) | 21 | 15,62 | 25 | 23,32 | 24,33 | 27 |
| Total (mL ⁻¹) | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Fonte: Da autora (2021).

O meio padrão para esta etapa do estudo teve como parâmetros fixos a razão de C:N e concentração total de carbono, ambos avaliados na etapa anterior. Os cálculos para se obter a mesma razão C:N e concentração total de carbono utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram baseadas na determinação química elementar dos teores de C e N nesses ingredientes, realizado pelo laboratório de Biogeoquímica da Embrapa Meio Ambiente. No final deste experimento foi determinada qual fonte de C:N foi a mais adequada para a produção dos propágulos de *S. lanosoniveum* CMAA-1143. No 3º dia após fermentação foram retiradas alíquotas 1 mL de ambos experimentos para quantificar a produção de conídios submersos e microescleródios. Câmara de Neubauer foi utilizada para a contagem dos conídios em aumento de 400× sob microscópio de luz com contraste de fase e para quantificação de microescleródio, 100 µL da cultura líquida na diluição 10⁻¹ foi depositada em uma lâmina e sobreposta por uma lamínula de 24 x 50 mm e contada microscopicamente com aumento de 10× (JACKSON; JARONSKI, 2009).

Após a retirada das alíquotas da suspensão de conídios, com o restante do volume contido nos Erlenmeyers foram avaliados o pH final do meio ao final do processo fermentativo e transferidos para um filtro de papel e mantido em estufa a 50 °C ± 2 até peso constante. Após a secagem, os papéis de filtro foram pesados e pela sua diferença de massa com a tara (filtro de papel seco) foi determinada a biomassa seca (REZENDE et al., 2020). Ambos experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e repetido duas vezes no tempo.

3.5 Efeito do pH e da densidade pré-cultura na fermentação líquida submersa de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

O efeito de diferentes pHs e densidades de pré-cultura foram avaliados na produção de conídios submersos e microescleródios de *S. lanosoniveum* CMAA-1143. Nesta etapa o meio T3 (protenose + maltodextrina), do passo anterior foram definidos como mais vantajosos e acondicionados aos diferentes tratamentos (Tabela 8). Para avaliação da influência do pH inicial em *S. lanosoniveum* CMAA-1143, culturas líquidas em Erlenmeyers (Bellco Glass, Vineland, NJ, EUA) de 250 mL e três defletores basais foram preparadas como descrito anteriormente com diferentes variações de pH inicial no meio, ajustados antes do processo de autoclavagem pela adição de uma solução de 0,1 mol L⁻¹ HCl para acidificar ou 0,1 mol L⁻¹ de NaOH para alcalinizar o meio.

Em seguida foi ajustada a concentração da pré-cultura a 5 x 10⁷ conídios mL⁻¹, com hemocitômetro e os Erlenmeyers foram incubados a 28 °C e 250 rpm em uma incubadora com agitador rotativo (SOLAB®, SL-223/F-E). Os tratamentos com variação somente de densidade de pré-cultura mantiveram o valor de pH inicial ajustado para 6,0. As densidades foram calibradas com hemocitômetro. No 3º dia após início da fermentação foram retiradas amostras para avaliar a produção de conídios submersos, microescleródios, pH final e biomassa como descrito no tópico anterior. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e repetidos duas vezes no tempo cada.

Tabela 8 - Efeito do pH e da densidade pré-cultura na fermentação líquida submersa de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

| Tratamentos | T1 | T2 | T3 |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH inicial | 3,5 | 6,0 | 8,5 |
| Densidade pré-cultura | 1x10 ⁴ | 1x10 ⁵ | 1x10 ⁶ |
| Relação C:N | 50:1 | 50:1 | 50:1 |
| Carbono total (g L ⁻¹) | 36 | 36 | 36 |
| Protenose (g L ⁻¹) | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| Maltodextrina 25% (mL ⁻¹) | 28,54 | 28,54 | 28,54 |
| Inóculo (mL ⁻¹) | 6 | 6 | 6 |
| Meio basal (mL ⁻¹) | 24,71 | 24,71 | 24,71 |
| Total (mL ⁻¹) | 60 | 60 | 60 |

Fonte: Da autora (2021).

3.6 Detecção da solubilização de fosfato e degradação de quitina pelo isolado de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

Para verificar o potencial do isolado de *S. lanosoniveum* em solubilizar fosfato, um disco de 5 mm contendo estruturas dos fungos foi depositado no centro de uma placa de Petri contendo o meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) (10 g de glicose; 5g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 5g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 15 g de ágar por litro com pH 7,0, de acordo com NAUTIYAL, 1999), com 0,1% de Triton X100 (Synth[®], Diadema, SP, Brasil). As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C por 10 dias e fotoperíodo de 12:12 h. Foi avaliada a formação de um halo de hidrólise claro ao redor das colônias para confirmar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio.

A detecção de degradação de quitina foi determinada a partir da quitina de casca de camarão comercial (Sigma, Saint Louis, USA) pelo método de Roberts e Selitrennikoff (1988) com modificações e suplementado o meio de quitinase como única fonte de carbono. A hidrólise ácida da quitina foi realizada em com ácido clorídrico (HCl) por agitação constante usando um agitador magnético a 4 °C (refrigerador) durante a noite, que foi seguido por extração de quitina coloidal em 2.000 ml de neutralização com etanol 95% gelado mantido a 26 °C durante a noite. Posteriormente, foi centrifugado a 3000 rpm por 20 min a 4 °C. O sedimento foi lavado com água destilada esterilizada por centrifugação a 3000 rpm por 5 min a 4 °C até que o etanol fosse completamente removido. A quitina coloidal obtida apresentou uma consistência pastosa macia com 90 - 95% de umidade e foi armazenada a 4 °C até uso posterior.

O meio para detecção de quitinase foi preparado adicionando 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de ácido cítrico mono-hidratado, 15 g de ágar, 200 µl de Tween-80, 4,5 g de quitina coloidal úmida, 0,15 g de roxo de bromocresol e 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 4,7 antes da autoclavagem. A seguir foi esterilizado a 121 °C durante 15 min. Ainda morno o meio de cultura foi vertido em placas de Petri e deixado solidificar. Discos de 5 mm de diâmetro das colônias dos isolados a serem testados quanto à atividade de quitinase foram transferidos para placas de Petri contendo meio para detecção de quitinase e incubados a 25 ± 2 °C. Foram observados quanto à formação de zonas coloridas ao redor da colônia. O halo de degradação de quitina foi medido com paquímetro e os resultados expressos em mm. O experimento foi realizado com dez réplicas biológicas. Todos as placas foram avaliadas no 10º dia após incubação.

3.7 Cinética de crescimento de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

Após a seleção dos melhores meios, foi avaliada a cinética de crescimento dos propágulos produzidos por *S. lanosoniveum* CMAA-1143, por meio da produção de conídios submersos, microescleródios e variação do pH durante o processo fermentativo. Para esta avaliação o isolado foi crescido como descrito anteriormente. A concentração da pré-cultura foi ajustada para 5×10^7 , com seis repetições de cada tratamento. Uma alíquota de 1 mL de cada frasco foi coletada após 24; 48; 72; 96; 120 e 168 horas do início da fermentação para estimar a produção dos propágulos. Este ensaio foi realizado duas vezes no tempo.

4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software estatístico RStudio[®]. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk, para avaliar quanto à normalidade e distribuição dos dados. Quando necessário, os dados foram transformados em log₁₀. As médias obtidas foram avaliadas estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados referentes a cinética de crescimento foram avaliados por regressão.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da composição do meio para fermentação líquida submersa de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 na produção de propágulos em função do tempo de avaliação

Nas primeiras 24 horas de fermentação, a produção de conídios por *Simplicillium* foi semelhante nas diferentes relações de C:N e carbono total. Nas primeiras 24 horas da fermentação a maior produção de conídios submersos ocorreu no tratamento T2, que corresponde à relação C:N 30:1 e C total de 8 g L⁻¹, apresentando produção de conídios (7,76 x 10⁸ conídios mL⁻¹). Para microescleródios, a maior produção foi no tratamento T5, que corresponde à proporção C:N 30:1 e C total 36 g L⁻¹, com 3,67x10² microescleródios mL⁻¹ (Tabela 9).

No período de 48 horas de fermentação o tratamento T6, que corresponde à relação C:N 50:1 e C total de 36 g L⁻¹, foi o que produziu a maior quantidade de conídios (1,08 x 10⁹ conídios mL⁻¹). Já, para microescleródios foi o tratamento T2, correspondente à relação C:N 30:1 e C total de 8 g L⁻¹, que apresentou maior média de 3,42 x 10³ microescleródios mL⁻¹ (Tabela 9).

Com 72 horas de fermentação o T6 foi o que produziu a maior quantidade de conídios submersos (1,91 x 10⁹ conídios mL⁻¹) e para a produção de microescleródios foi o T2 com produção de 3,13 x 10³ microescleródios mL⁻¹ (Tabela 9). Desta forma, para o período de 72 h de fermentação o T6 foi o meio selecionado para etapa posterior em relação à produção de conídios e o T2 para produção de microescleródios.

5.2 Influência da aeração na produção de conídios submersos e microescleródios de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

Após definir a relação C:N e a concentração de C, bem como o tempo de avaliação ideal na etapa anterior, foi avaliada a influência da aeração na produção de propágulos de *Simplicillium* e o pH final da fermentação. Para a produção de conídios submersos o tratamento T3 (relação C:N 30:1 C = 8 g L⁻¹ e volume final de 60 mL⁻¹) apresentou a maior média com 1,79 x 10⁹ conídios mL⁻¹, não havendo diferença estatística entre os tratamentos. Para unidades formadoras de colônias (UFC) os tratamentos T3 (C:N 50:1, C = 8 g L⁻¹, volume final 60 mL⁻¹) e T4 (C:N 50:1, C = 36 g L⁻¹, volume final 60 mL⁻¹) produziram em média 1,43 e 1,46 x 10⁹ UFC mL⁻¹, não havendo diferença estatística entre os tratamentos.

Para a produção de microescleródios o tratamento T1 (relação C:N 30:1, C = 8 g L⁻¹, volume final 100 mL⁻¹) apresentou a produção média de 1,54 x 10³ microescleródios mL⁻¹, mas semelhante estatisticamente aos demais tratamentos. Na produção de biomassa o T4 diferiu estatisticamente de todos os demais tratamentos, com produção de 41,4 mg mL⁻¹. O pH final foi semelhante para todos os meios e condições estudadas (Tabela 10).

Nesta etapa o tratamento T4 foi definido como mais vantajoso para a próxima etapa do estudo, visto que a produção de conídios submersos, UFC e biomassa, mesmo sem diferença estatística, apresentaram as maiores médias.

Tabela 9 - Efeito da composição do meio de cultura na produção de conídios submersos e microescleródios de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 em função do tempo de 24, 48 e 72 horas de fermentação (extrato de levedura e glicose mono-hidratada).

| Tempo | Tratamentos | Conídios mL ⁻¹ | Microescleródios mL ⁻¹ |
|----------|-------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 24 horas | T1 | 3,23E+08a | 3,33E+01a |
| | T2 | 7,76E+08a | 1,25E+03a |
| | T3 | 1,92E+08a | 2,33E+02a |
| | T4 | 1,98E+08a | 2,50E+02a |
| | T5 | 1,31E+09a | 3,67E+02a |
| | T6 | 3,65E+08a | 1,00E+03a |
| | C.V (%) | 4,89 | 31,4 |
| 48 horas | T1 | 1,86E+08b | 3,83E+02b |
| | T2 | 5,83E+08ab | 3,42E+03a |
| | T3 | 4,06E+08ab | 2,50E+02b |
| | T4 | 3,87E+08ab | 4,00E+02b |
| | T5 | 5,74E+08ab | 4,67E+02b |
| | T6 | 1,08E+09a | 2,15E+03ab |
| | C.V (%) | 3,2 | 42,26 |
| 72 horas | T1 | 1,93E+08b | 1,67E+02b |
| | T2 | 7,24E+08ab | 3,13E+03a |
| | T3 | 4,43E+08b | 3,50E+02b |
| | T4 | 8,98E+08ab | 2,33E+02b |
| | T5 | 7,38E+08ab | 8,33E+01b |
| | T6 | 1,91E+09a | 1,33E+03ab |
| | C.V (%) | 3,36 | 45,42 |

Legenda: T1 = 10:1, C total 8 g L⁻¹; T2 = 30:1, C total 8 g L⁻¹; T3 = 50:1, C total 8 g L⁻¹; T4 = 10:1, C total 36 g L⁻¹; T5 = 30:1, C total 36 g L⁻¹; T6 = 50:1, C total 36 g L⁻¹. **Fonte:** Dados da autora (2023). (*) 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 microescleródios foram transformados em log 10.

Tabela 10 - Produção de conídios submersos de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 em função da aeração.

| Tratamentos | Conídios mL ⁻¹ | UFC mL ⁻¹ | Microescleródios mL ⁻¹ | Biomassa (mg mL ⁻¹) | pH final |
|-------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------|
| T1 | 1,16E+09a | 1,03E+09a | 1,54E+03a | 2,8c | 4,4a |
| T2 | 1,55E+09a | 1,21E+09a | 6,25E+02ab | 18,4b | 4,2a |
| T3 | 1,79E+09a | 1,43E+09a | 4,63E+02ab | 6,9c | 4,4a |
| T4 | 1,71E+09a | 1,46E+09a | 4,13E+02b | 41,4a | 4,4a |
| C.V (%) | 56,31 | 41,32 | 26,63 | 41,88 | 6,23 |

Legenda: T1 = 30:1, 8 g L⁻¹, volume final 100 mL⁻¹; T2 = 50:1, 36 g L⁻¹, volume final 100 mL⁻¹; T3 = 30:1, 8 g L⁻¹, volume final 60 mL⁻¹; T4 = 50:1, 36 g L⁻¹, volume final 60 mL⁻¹. **Fonte:** Dados da autora (2023). (*) 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 microescleródios foram transformados em log 10.

5.3 Efeito das fontes de nitrogênio e carbono na produção de propágulos de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

5.3.1 Efeito das fontes de nitrogênio

Nesta etapa foi avaliado o efeito de diferentes fontes de nitrogênio, combinadas com glicose mono-hidratada como principal fonte de carbono, na produção de conídios submersos, UFC, microescleródios e biomassa, bem como no pH final na fermentação (Tabela 11). Nos passos anteriores foram definidas as condições básicas para a fermentação (relação C:N 50:1, C total 36 g L⁻¹ e 60 mL⁻¹ de volume final), variando, nesta fase, somente as fontes de nitrogênio.

Para a produção de conídios submersos de *Simplicillium* no tratamento T8, cuja fonte de nitrogênio foi o brewer's ex1, a produção média ($3,02 \times 10^9$ conídios mL⁻¹) foi a maior, contudo, estatisticamente semelhante aos tratamentos 2, 3, 4 e 5 (Tabela 11). Também é importante observar que todos os demais tratamentos apresentaram produção entre $1,09$ e $1,70 \times 10^9$ conídios mL⁻¹. Quando avaliada a UFC novamente foi o tratamento T8 que se destacou com média de $2,80 \times 10^9$ ufc mL⁻¹, diferindo dos tratamentos 1, 9, 10 e 11, mas semelhante aos demais (Tabela 11). Para microescleródios os tratamentos T10 com proteína de milho e o T11 contendo hidrolisado proteico apresentaram as maiores produções com $1,08 \times 10^4$ e $1,24 \times 10^4$ microescleródios mL⁻¹, respectivamente.

Na produção de biomassa o tratamento T11 com hidrolisado proteico diferiu estatisticamente de todos os demais tratamentos, com 101,15 mg mL⁻¹. A protenose (T3) foi considerada também adequada fonte de N, pois é uma fonte de nitrogênio considerada barata para a indústria de fermentação, bem como por não diferir da produção de conídios do T8.

Quanto aos valores de pH final houveram diferenças estatísticas entres os tratamentos, mas todos na faixa entre 4,0 a 4,7 (Tabela 11).

De acordo com os resultados com as fontes de N o meio à base de brewer's exl (T8) + glicose mono-hidratada foi definido como o mais indicado para a obtenção de conídios submersos de *Simplicillium*, enquanto que para microescleródios o meio contendo a proteína de milho com levedura inativada (T10) + glicose mono-hidratada foi considerado o mais adequado. O meio protenose (T3) + glicose mono-hidratada apresentou um comportamento intermediário na produção de ambos os propágulos. Todas as três fontes de nitrogênios foram utilizadas na etapa seguinte do processo fermentativo.

Tabela 11 - Fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com diferentes fontes de nitrogênio combinadas com glicose mono-hidratada como principal fonte de carbono.

| Tratamentos | Conídios mL ⁻¹ | UFC mL ⁻¹ | Microescleródios mL ⁻¹ | Biomassa (mg mL ⁻¹) | pH final |
|-------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------------|------------------------------------|----------|
| T1 (EL) | 1,40E+09bc | 1,13E+09b | 1,02E+03c | 29,4de | 4,1bc |
| T2 (PH) | 2,38E+09ab | 2,13E+09ab | 9,50E+02c | 54,1bc | 4,5ab |
| T3 (PR) | 2,31E+09abc | 2,29E+09ab | 9,47E+03ab | 28,8de | 4,2bc |
| T4 (LY) | 2,32E+09abc | 2,18E+09ab | 7,17E+02c | 57,1b | 4,7a |
| T5 (101) | 2,25E+09abc | 2,01E+09ab | 2,63E+03c | 27,8e | 4,3abc |
| T6 (412) | 1,66E+09bc | 1,60E+09ab | 5,22E+03bc | 31,7de | 4,5ab |
| T7 (SY) | 1,70E+09bc | 2,19E+09ab | 1,28E+03c | 30,2de | 4,5abc |
| T8 (BR) | 3,02E+09a | 2,80E+09a | 4,97E+03bc | 32,9cde | 4,5abc |
| T9 (HY) | 1,51E+09bc | 1,49E+09b | 1,25E+03c | 49,3bcd | 4,7a |
| T10 (PM) | 1,09E+09c | 1,02E+09b | 1,08E+04ab | 35,3cde | 4,0c |
| T11 (HP) | 1,16E+09bc | 1,12E+09b | 1,24E+04a | 101,15a | 4,3abc |
| C.V (%) | 35,02 | 36,56 | 12,75 | 25,45 | 5,25 |

Legenda: T1 (EL) = Extrato de levedura; T2 (PH) = Pharmamedia; T3 (PR) = Protenose; T4 (LY) = Lyscell; T5 (101) = Hy-yeast 101; T6 (412) = Hy-yeast 412; T7 (SY) = Star-yeast; T8 (BR) = Brewer's exl; T9 (HY) = Hylises; T10 (PM) = Proteína de milho com levedura inativa; T11 (HP) = hidrolisado protéico. **Fonte:** Dados da autora (2023). (*) 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 microescleródios foram transformados em log 10.

5.4 Efeito das fontes de carbono na produção de conídios submersos e microescleródios

5.4.1 Efeito das fontes de carbono combinadas com brewer's exl (T8) como principal fonte de nitrogênio na produção de conídios submersos

Para avaliar o efeito das fontes de carbono na produção de propágulos de *Simplicillium*, as fontes de nitrogênio, selecionadas na etapa anterior, foram combinadas com as respectivas fontes de carbono. O tratamento T1 com glicose apresentou a maior média para a produção de conídios submersos, UFC e microescleródios ($2,37 \times 10^9$ conídios mL⁻¹, $2,23 \times 10^9$ ufc mL⁻¹ e $3,17 \times 10^3$ microescleródios mL⁻¹, respectivamente). O pH dos meios variou de 4,1 a 4,7 (Tabela 12).

A fonte de nitrogênio brewer's exl combinada com a glicose mono-hidratada (T1) apresentou os maiores rendimentos de conídios submersos, propágulo de interesse nesta etapa do estudo dos processos fermentativos.

Tabela 12 - Fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com brewer's exl (T8) como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono visando a produção de conídios submersos.

| Tratamentos | Conídios mL ⁻¹ | UFC mL ⁻¹ | Microescleródios mL ⁻¹ | Biomassa (mg mL ⁻¹) | pH final |
|-------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------|
| T1 (GL) | 2,37E+09a | 2,23E+09a | 3,17E+03a | 35,8a | 4,1b |
| T2 (RU) | 1,28E+09b | 8,31E+08c | 1,00E+02c | 22,6a | 4,2ab |
| T3 (MT) | 1,86E+09ab | 1,67E+09b | 1,23E+03b | 23,2a | 4,2b |
| T4 (SO) | 1,93E+09ab | 1,54E+09b | 1,18E+03bc | 34,5a | 4,7a |
| T5 (MA) | 1,91E+09ab | 1,64E+09b | 8,00E+02bc | 38,4a | 4,4ab |
| T6 (SA) | 1,55E+09b | 1,22E+09bc | 1,28E+03b | 27,2a | 4,5ab |
| C.V (%) | 20,67 | 20,31 | 49,79 | 48,46 | 6,51 |

Legenda: T1 (GL) = Glicose mono-hidratada; T2 (RU) = Rumel; T3 (MT) = Maltodextrina; T4 (SO) = Sorbitol; T5 (MA) = Maltose; T6 (SA) = Sacarose. **Fonte:** Dados da autora (2023). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (**)

5.4.2 Efeito das fontes de carbono na produção de conídios submersos combinadas com proteína de milho com levedura inativa (T10) como principal fonte de nitrogênio.

Nesta etapa a fonte de nitrogênio à base de proteína de milho foi combinada com as fontes de carbono, avaliadas anteriormente, na produção de propágulos. Exceto às fontes maltodextrina e sacarose que produziram na faixa de $7,38 \times 10^8$ e $9,54 \times 10^8$ conídios mL⁻¹, as demais fontes produziram de $1,09$ a $1,45 \times 10^9$ conídios mL⁻¹ (Tabela 13), sendo o tratamento T2 com rumel que apresentou a maior produção. Para a produção de microescleródios a com maltodextrina foi a que apresentou o maior valor diferindo de rumel e sorbitol. Para a produção de biomassa não foram observadas diferenças estatísticas.

Tabela 13 - Fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com proteína de milho com levedura inativa (T10) como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção de microescleródios.

| Tratamentos | Conídios mL ⁻¹ | UFC mL ⁻¹ | Microescleródios mL ⁻¹ | Biomassa (mg mL ⁻¹) | pH final |
|-------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------|
| T1 (GL) | 1,15E+09ab | 6,52E+08a | 4,00E+03ab | 24,4a | 4,9cd |
| T2 (RU) | 1,45E+09a | 8,11E+08a | 1,00E+02b | 19,0a | 6,1a |
| T3 (MT) | 9,54E+08ab | 8,47E+08a | 8,80E+03a | 25,1a | 5,1bc |
| T4 (SO) | 1,35E+09ab | 1,14E+09a | 2,42E+03b | 23,7a | 5,2b |
| T5 (MA) | 1,09E+09ab | 1,04E+09a | 4,50E+03ab | 21,6a | 5,0b |
| T6 (SA) | 7,38E+08b | 6,86E+08a | 3,72E+03ab | 25,7a | 4,9d |
| C.V (%) | 35,31 | 35,17 | 19,65 | 54,24 | 2,01 |

Legenda: T1 (GL) = Glicose mono-hidratada; T2 (RU) = Rumel; T3 (MT) = Maltodextrina; T4 (SO) = Sorbitol; T5 (MA) = Maltose; T6 (SA) = Sacarose. **Fonte:** Dados da autora (2023). (*) 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 microescleródios foram transformados em log 10.

5.4.3 Efeito das fontes de carbono na produção de conídios submersos combinada com a protenose (T3) como principal fonte de nitrogênio

Não houve diferença estatística entre os tratamentos, no entanto, o sorbitol propiciou a maior média em relação às demais fontes, com $2,57 \times 10^9$ conídios mL⁻¹. Para UFC não foram verificadas diferenças estatísticas entre as fontes, sendo que a maltodextrina foi a que apresentou o maior valor ($1,97 \times 10^9$ UFC mL⁻¹). A maior produção de microescleródios também foi com maltodextrina ($1,64 \times 10^4$ microescleródios mL⁻¹) (Tabela 14). Com os resultados apresentados nesta etapa a combinação de protenose + maltodextrina (T3) foi definida como a mais adequada para ambos os propágulos de interesse.

6. Efeito do pH e da densidade pré-cultura na fermentação líquida submersa de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 no meio com protenose + maltodextrina

6.1 Efeito pH inicial

O meio escolhido para esta etapa foi a combinação de protenose + maltodextrina, visto que apresentou a maior produtividade de ambos propágulos de interesse. Os valores de pH final foram avaliados ao longo do processo fermentativo. Não foram observadas diferenças na produção de conídios submersos e UFC (Tabela 15). Para microescleródios, o pH inicial ajustado para 8,5 foi o que

apresentou a maior produção ($4,98 \times 10^3$ microescleródios mL^{-1}), diferindo estatisticamente do pH 3,5 (Tabela 15). Para produção de biomassa não houve diferença estatística entre os tratamentos. Quando o pH inicial foi maior (6 e 8,5) ocorreu redução do mesmo no final do processo produtivo, mas se manteve praticamente igual quanto o pH inicial foi de 3,5 (Tabela 15). O pH de 8,5 foi considerado como o adequado para continuidade nas etapas posteriores devido a maior produção de microescleródios.

Tabela 14 - Fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com protenose (T3) como principal fonte de nitrogênio combinada com diferentes fontes de carbono, visando a produção de conídios e microescleródios.

| Tratamentos | Conídios mL^{-1} | UFC mL^{-1} | Microescleródios mL^{-1} | Biomassa (mg mL^{-1}) | pH final |
|-------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------|
| T1 (GL) | 1,46E+09a | 1,18E+09ab | 5,97E+03bc | 13,8c | 4,8d |
| T2 (RU) | 1,55E+09a | 8,46E+08b | 8,50E+02c | 53,3a | 5,8a |
| T3 (MT) | 2,32E+09a | 1,97E+09a | 1,64E+04a | 21,2bc | 5,1c |
| T4 (SO) | 2,57E+09a | 1,82E+09a | 2,30E+03c | 22,3bc | 5,4b |
| T5 (MA) | 2,18E+09a | 1,30E+09ab | 1,02E+03c | 28,0b | 5,0cd |
| T6 (SA) | 1,72E+09a | 1,38E+09ab | 8,82E+03b | 20,9bc | 5,1c |
| C.V (%) | 38,6 | 37,98 | 54,61 | 28,66 | 2,47 |

Fonte: Dados da autora (2023). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (**)

Tabela 15 - Fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com diferentes pH iniciais.

| Tratamento | Conídios mL^{-1} | UFC mL^{-1} | Microescleródios mL^{-1} | Biomassa (mg mL^{-1}) | pH final |
|------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------|
| T1 pH 3,5 | 2,43E+09a | 1,73E+09a | 7,00E+02c | 38,5a | 3,8b |
| T2 pH 6,0 | 1,93E+09a | 1,84E+09a | 2,23E+03ab | 29,7a | 4,6a |
| T3 pH 8,5 | 1,65E+09a | 1,41E+09a | 4,98E+03a | 22,8a | 4,9a |
| C.V (%) | 28,96 | 30,2 | 8,96 | 19,08 | 6,04 |

Fonte: Dados da autora (2023). (*) 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 microescleródios e biomassa foram transformados em log 10.

6.2 Efeito da densidade de pré-cultura

Para produção de conídios submersos, UFC e biomassa não houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo que para microescleródios o tratamento T1 apresentou a maior produção (5,85

$\times 10^3$ microescleródios mL^{-1}) (Tabela 16). A densidade de 1×10^4 conídios mL^{-1} foi considerada a adequada, por ser a mais econômica. Nesta etapa o pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 como anteriormente, devido ao ensaio ter sido realizado antes da avaliação do efeito do pH.

Tabela 16 - Fermentação líquida de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 com diferentes densidades de pré-cultura.

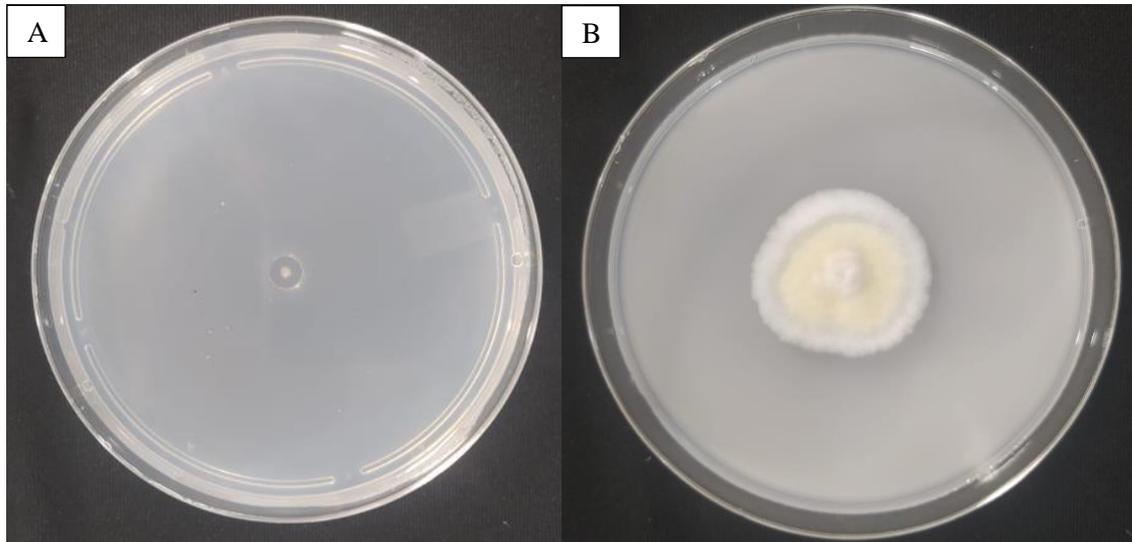
| Tratamentos | Conídios mL^{-1} | UFC mL^{-1} | Microescleródios mL^{-1} | Biomassa (mg mL^{-1}) | pH final |
|-------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------|
| T1 | 1,30E+09a | 6,12E+08a | 5,85E+03a | 38,5a | 4,6a |
| T2 | 1,63E+09a | 7,66E+08a | 3,33E+03ab | 29,7a | 4,5a |
| T3 | 1,70E+09a | 9,63E+08a | 1,62E+03b | 22,8a | 4,6a |
| C.V (%) | 3,56 | 3,56 | 57,76 | 19,08 | 6,19 |

Legenda: T1 = 1×10^4 c mL^{-1} ; T2 = 1×10^5 c mL^{-1} ; T3 = 1×10^6 c mL^{-1} . **Fonte:** Dados da autora (2023). (*) 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, UFC e biomassa foram transformados em log 10.

7. Solubilização de fosfato e degradação de quitina do isolado *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

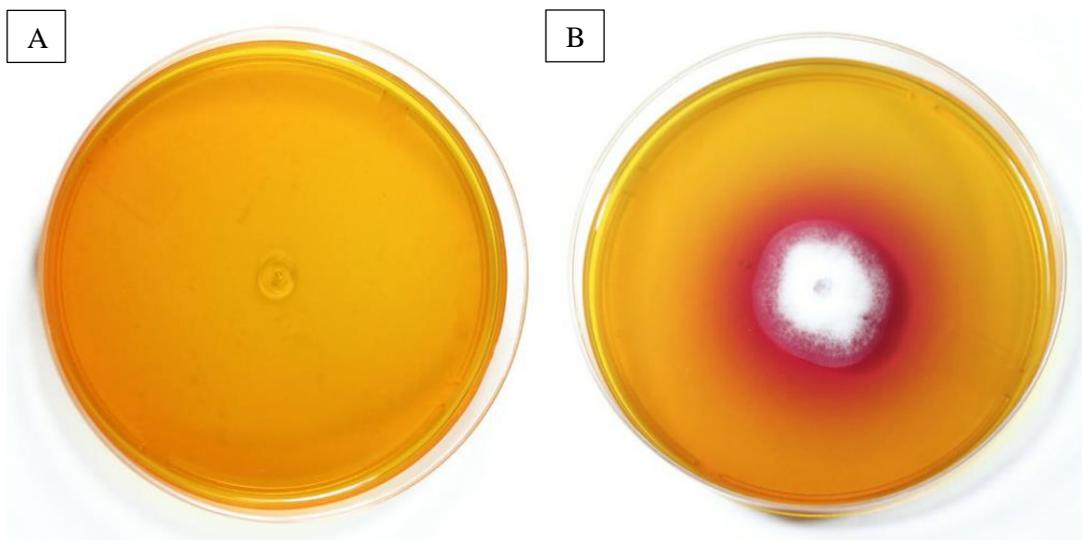
Não foram verificados halos que evidenciassem a solubilização de fosfato de cálcio pelo isolado de *S. lanosoniveum* CMAA-1143 (Figura 2). Em relação à degradação de quitina pelo isolado de *S. lanosoniveum* CMAA-1143 todas as réplicas apresentaram formação de zonas coloridas ao redor da colônia. O halo médio da degradação de quitina foi de 40,48 mm (Figura 3).

Figura 2 - Avaliação da solubilização de fosfato de cálcio pelo isolado de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143. Testemunha (A); Isolado de *S. lanosoniveum* CMAA-1143 (B).



Fonte: Da autora (2022).

Figura 3 - Detecção de degradação de quitina pelo isolado *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143. Testemunha (A); Isolado de *S. lanosoniveum* CMAA-1143 formando halo (B).



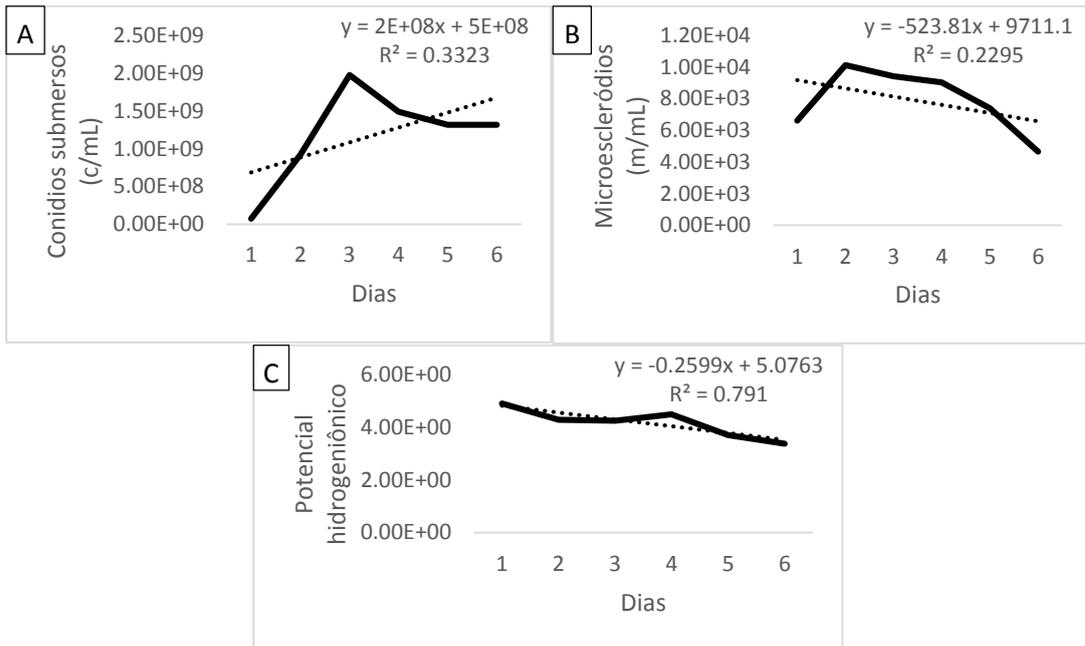
Fonte: Ventura, J. (2022).

8. Cinética de crescimento de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143

O meio brewer's exl + glicose (Figura 4) foi selecionado para produção de conídios submersos e o meio protenose + maltodextrina (Figura 5) foi selecionado visando a produção de ambos propágulos. Os dois meios foram avaliados quanto sua curva de crescimento. Na cinética de crescimento referente a brewer's exl + glicose, a produção de conídios foi de $1,98 \times 10^9$ conídios mL⁻¹ no terceiro dia de fermentação. Após esse período ocorreu uma diminuição na produção de conídios.

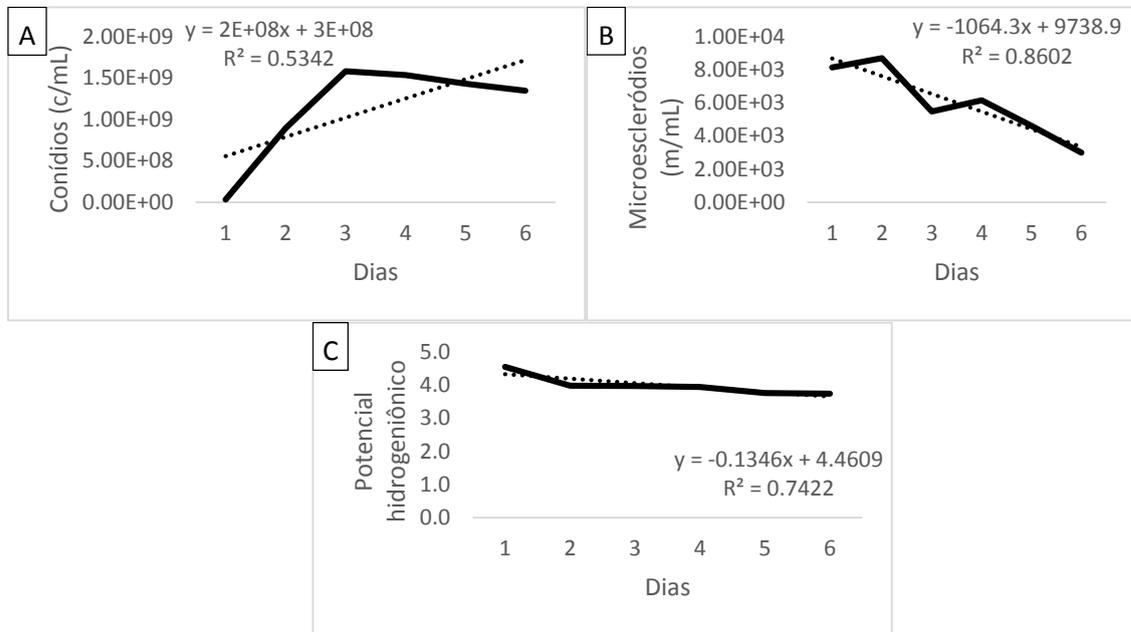
A maior produção de microescleródios foi observada no segundo dia ($1,01 \times 10^4$ microescleródios mL⁻¹) em seguida ocorreu decréscimo de produção. O pH no fermentador foi iniciado 4,9 e no sexto dia caiu para 3,4.

Figura 4 - Curva de crescimento de *Simplicillium lanosoniveum* em meio líquido otimizado (brewer's exl + glicose) para produção de conídios. Número de conídios produzidos (A); número de microescleródios (B); pH do meio líquido (C).



Fonte: Dados da autora (2022).

Figura 5 - Curva de crescimento de *Simplicillium lanosoniveum* em meio líquido otimizado para produção de microescleródios (protenose + maltodextrina). Número de conídios produzidos (A); número de microescleródios (B); pH do meio líquido (C).



Fonte: Dados da autora (2022).

No terceiro dia de fermentação do meio contendo protenose + maltodextrina pelo *Simplicillium* a produção de conídios submersos foi em média de $1,58 \times 10^9$ conídios mL^{-1} , seguido de uma queda na produtividade e posterior estabilidade na produção. Para microescleródios, o segundo dia foi o apresentou a maior produção média ($8,70 \times 10^3$ microescleródios mL^{-1}), ocorrendo redução do número de propágulos nos dias posteriores. O pH foi iniciado a 4,5 e no sexto foi de 3,7.

9. DISCUSSÃO

A fermentação líquida é caracterizada por viabilizar a produção de microrganismos a nível comercial, reduzindo os riscos de contaminação e facilitando o processo produtivo com elevado número de propágulos em um menor tempo de fermentação quando comparado com o cultivo sólido (REZENDE et al., 2020). No presente trabalho foi demonstrado que a *Simplicillium* pode ser obtido via fermentação líquida, com alta concentração de conídios e também com produção de microescleródios. Com os meios e as condições de fermentação em três dias se obteve a concentração na faixa de 1 a 3×10^9 conídios mL^{-1} e de até $1,6 \times 10^4$ microescleródios mL^{-1} (Tabelas 11 e 14). Essas quantidades podem ser consideradas adequadas para os meios utilizados, relativamente de baixo custo, tempo e condições de fermentação. Existem relatos, como o de Maganhoto (2020) de produção de $7,87 \times 10^8$ conídios mL^{-1} por *Clonostachys rosea* e de Kobori et al. (2015) com produção na faixa de 10^9 conídios mL^{-1} de *Trichoderma harzianum*.

A fonte de nitrogênio é um dos componentes mais caros do meio de cultura para a fermentação líquida (KOBORI et al., 2015). No presente estudo avaliando 11 fontes de nitrogênio foram selecionadas duas (brewer's exl e a protenose) consideradas de baixo custo e que apresentaram elevada produção das estruturas de *Simplicillium* (Tabelas 11, 12 e 14). Kobori et al. (2015) comprovou a eficiência do caroço de algodão, com elevado teor de nitrogênio e relativamente barato, sendo eficiente na produção de estruturas de *Trichoderma harzianum*. Essa fonte de N também foi avaliada no presente estudo e, mesmo sendo eficiente, não foi selecionada devido aos custos de importação.

Assim como para *Simplicillium*, diferentes níveis da relação carbono e nitrogênio foram avaliados e a proporção de 50:1 em *Clonostachys rosea*, que promoveu elevada produção de propágulos, igualmente para *Simplicillium* (Tabela 9). O desenvolvimento de uma relação C:N desenvolvida especificamente para um isolado é considerado um fator crucial na fermentação líquida, visto que ela é a principiante do processo pelo qual um determinado isolado expressara seu potencial produtivo a nível massal (KHALIL; SHAH; NAEEM, 1985).

Segundo Jaronski e Jackson (2012), a relação carbono nitrogênio é de grande importância, como parte do meio de cultura líquido, na produção das estruturas de interesse dos agentes de biocontrole. Além disso, é responsável direta pelos custos dos meios de cultivo destes bioagentes e da qualidade dos propágulos formados (OTTATI-DE-LIMA et al., 2010). Diversos autores demonstram que as condições nutricionais como fontes de carbono em conjunto com a relação C:N do meio de cultura influenciam diretamente no crescimento e esporulação de vários fungos utilizados no controle biológico de pragas e de doenças (KHALIL; SHAH; NAEEM, 1985; SCHISLER et al. 1991; JACKSON & SCHISLER 1992; JACKSON

& JARONSKI, 2009; THOMAS et al., 1987; ENGELKES et al., 1997; ELSON et al., 1998; GAO, 2011; KOBORI et al., 2015; MAGANHOTO, 2020). No presente estudo, as quantidades de carbono e nitrogênio, bem como as respectivas combinações entre eles interferiram significativamente na produção de *S. lanosoniveum*. Neste estudo foram selecionadas como fonte de nitrogênio para a produção de conídios submersos a brewer's exl + glicose com produção média de $2,37 \times 10^9$ conídios mL⁻¹; e para a produção de microescleródios a combinação protenose + maltodextrina com produção $1,64 \times 10^4$ microescleródios mL⁻¹. Não somente as fontes desses nutrientes, mas também a combinação das fontes é de grande importância na produção nas estruturas dos bioagentes em fermentação líquida, como demonstrado por Gao (2011) para *Beauveria bassiana*. Também para *Simplicillium* foi demonstrada esta importância (Tabelas 12 a 14).

Simplicillium lanosoniveum não foi dependente do pH do meio de cultura para a produção de conídios submersos (Tabela 15). Também Carvalho et al. (2018) e Maganhoto (2020) verificaram comportamento semelhante para *Clonostachys rosea*. Em estudo realizado por Carvalho et al. (2018), *C. rosea* apresentou seu pico produtivo dos propágulos nos primeiros dias de fermentação, seguido de uma acidificação do pH nos últimos dias de avaliação, fato semelhante ocorrido para *S. lanosoniveum* (Figuras 4 e 5) que apresentou pico produtivo elevado de propágulos até o terceiro dia, seguido da estabilização da produção e acidificação do meio no sexto dia.

Um fato importante é que em todas as etapas do processo fermentativo de *S. lanosoniveum* houve a formação de microescleródios, sendo considerada a possibilidade de aplicações dessas estruturas no solo visando ao controle de doenças transmitidas por patógenos habitantes do solo, onde seria mais adequado que a aplicação de conídios (KOBORI et al., 2015). A maior concentração de microescleródios obtida foi de $1,64 \times 10^4$ microescleródios mL⁻¹ (Tabela 14) utilizando 36 g L⁻¹ de carbono total e a protenose como fonte de nitrogênio. Para *T. harzianum*, Kobori et al. (2015) obtiveram $4,8 \times 10^4$ microescleródios mL⁻¹ utilizando meios com 36 g L⁻¹ de carbono total e farelo de algodão como fonte de nitrogênio.

A aeração é um dos fatores limitantes na fermentação (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006) e em conjunto com a agitação é responsável por uniformizar o ar e a temperatura no meio de cultura, possibilitando o processo fermentativo (OKAFOR, 2007). Rezende et al. (2020) avaliaram a influência da aeração no cultivo líquido de *Trichoderma*, utilizando a velocidade de rotação do Shaker em 160 rpm, com a adição de volume final de meio de 100 mL em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL. Tais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças estatísticas na produção de propágulos deste bioagente. Para *Simplicillium*

lanosoniveum a velocidade de agitação em Shaker de 250 rpm com volumes finais de 60 e 100 mL não interferiram na produção de conídios, mas interferiram na de microescleródios e biomassa total (Tabela 10).

A quitina é um polímero composto por resíduos de N-acetilglicosamina ligados através de ligações β - (1-4), que é comumente encontrada no exoesqueleto de artrópodes, na parede celular de fungos e em nematóides (MERZENDOFER & ZIMOCH, 2003). O isolado de *Simplicillium* demonstrou atividade quitinolítica frente ao meio seletivo a base quitina, formado um halo médio degradante de 40,48 mm (Figura 3), o que pode ser considerado uma característica relevante pois demonstra sua ação de micoparasitismo, frente a esse grupo citado.

A compreensão das demandas nutricionais de um determinado microrganismo e otimização do processo fermentativo, seja pelos parâmetros físicos ou químicos, são indispensáveis para que haja a viabilidade de um produto para o mercado de bioinsumos (GAO, 2011; PENG et al., 2014). Materiais derivados de subprodutos agroindustriais tem se destacado na fermentação líquida submersa, pois podem ser adquiridas facilmente no mercado, fator considerado de grande importância para viabilização em escala industrial (MASCARIN et al., 2018; IWANICKI et al., 2020).

Considerando os benefícios entregues pela fermentação líquida submersa como: menor tempo de fermentação, elevada produção de propágulos, flexibilização dos componentes do meio de cultura, controle da contaminação durante o processo fermentativo e demais benefícios, os resultados do processo fermentativo de *S. lanosoniveum* CMAA-1143 do presente estudo podem colaborar com a indústria de biocontrole instalada no Brasil. Assim, os resultados apresentados no presente estudo indicam que o isolado de *Simplicillium* CMAA-1143 apresenta resultados satisfatórios para indústria de biocontrole, pela produção dos propágulos de conídios submersos e microescleródios, além de sua elevada produção, por ser agente de multiação, fatores dos quais são indispensáveis para ser um agente potencial entre os que já estão sendo lançados no mercado de bioinsumos.

Associado a isso, as próximas etapas do presente estudo será definir os parâmetros para que a produção em biorreator de bancada alcance tais rendimentos apresentados anteriormente neste trabalho, bem como testes para uma possível formulação. Além disso, o isolamento e identificação dos metabólitos produzidos por *Simplicillium* serão avaliados. Outro objetivo é a produção de dois biopesticidas distintos a base de *Simplicillium*: um para conídios e microescleródios visando a aplicação na parte aérea da planta, agindo diretamente no filoplano e possibilitando a aplicação no solo ou até mesmo em restos culturais, controlando patógenos habitantes do solo; e o segundo com todos micropropágulos produzidos por *Simplicillium*

(hifas, conídios submersos e microescleródios). Resultando em dois produtos possíveis a serem lançados no mercado exercendo capacidade antagonista a patógenos de solo/parte aérea e até mesmo em pragas agrícolas presente no campo.

10. CONCLUSÃO

- A relação C:N que apresentou maior produção de conídios para o isolado de *Simplicillium lanosoniveum* CMAA-1143 foi a 50:1 com carbono total de 36 g L⁻¹. A relação C:N 30:1 com carbono total de 8 g L⁻¹ é o mais indicado para a produção de microesclerodios.
- O tempo de fermentação de 72 horas é o que apresenta a maior estabilidade na produção de propágulos.
- A aeração não é um fator determinante na produção de conídios submersos de *S. lanosoniveum*.
- A combinação de duas fontes de carbono e nitrogênio é a mais adequada para a produção de conídios de *Simplicillium*. Brewer's ex1 + glicose é a fonte indicada como adequada para a produção de conídios submersos de *S. lanosoniveum*. A combinação protenose + maltodextrina é a indicada para a produção de microescleródios.
- O pH inicial não influenciou na produção de conídios. No entanto, quando ajustado para 8,5 houve aumento da produção de microesclerodios de *Simplicillium*.
- A densidade de pré-cultura não maximizou a produção de conídios de *Simplicillium*.
- O isolado de *S. lanosoniveum* CMAA 1143 possui atividade quitinolítica.

REFERÊNCIAS

- BAISWAR, P.; NGACHAN S. V.; RYMBAI, H.; CHANDRA, S. *Simplicillium lanosoniveum*, a hyperparasite on *Aecidium elaeagni-latifoliae* in India. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 9, p. 1-5, 2014.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.17, p. 111-147, 2009.
- BISCHOFF, J. F.; WHITE, J. F. *Torrubiella piperis* sp. nov. (Clavicipitaceae, Hypocreales), a new teleomorph of the *Lecanicillium* complex. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 89-94, 2004.
- BUENO, V. H. P.; PARRA, J. R. P.; BETTIOL, W.; VAN, L. J. C. Biological control in Brazil. In: van LENTEREN, J.C.; BUENO, V. H. P.; LUNA, M. G.; COLMENAREZ, Y.C. (Eds.). **Biological control in Latin America and the Caribbean: its rich history and bright future**. Wallingford: CABI. v. 1, p. 78-107, 2020.
- CARVALHO, A. L.; REZENDE, L. C.; COSTA, L. B.; ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, B.; PINTO, Z. V.; MORANDI, M. A. B.; MEDEIROS, F. H. V.; BETTIOL, W. Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation. **Biological Control**, v. 118, p. 16–25, 2018.
- CHEN R. S.; HUANG, C.C.; LI J.C.; TSAY, J.G. Evaluation of characteristics of *Simplicillium lanosoniveum* on pathogenicity to aphids and in vitro antifungal potency against plant pathogenic fungi. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 3, p. 2454-1850, 2017.
- CHEN, R. S.; HUANG, C. C.; LI, J. C.; TSAY, J. G. First report of *Simplicillium lanosoniveum* causing brown spot on *Salvinia auriculata* and *S. molesta* in Taiwan. **Plant Disease**, v. 92, p. 1589-1589, 2008.
- CHEN, W.; LIU, C.; HAN, Y. F.; LIANG, J. D.; TIAN, W. Y.; LIANG, Z. Q. Three novel insect-associated species of *Simplicillium* (Cordycipitaceae, Hypocreales) from Southwest China. **MycoKeys**, v. 58, p. 83–102. 2019.
- COLLINGE, D. B.; JENSEN, D. F.; RABIEY, M.; SARROCCO, S.; SHAW, M. W.; SHAW, R. H. Biological control of plant diseases—what has been achieved and what is the direction? **Plant Pathology**, v. 71, p. 1024-1047. 2022.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**, 1983.
- CROUS, P. W.; LUANGSA-ARD, J. J.; WINGFIELD, M. J.; CARNEGIE, A. J.; HERNÁNDEZ-RESTREPO, M.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z. Fungal Planet description sheets: 785–867. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 41, p. 238-417, 2018.
- DAI, Y.; LIN, Y.; PANG, X.; LUO, X.; WANG, J.; ZHOU, X.; LIU, Y. Peptides from the soft coral-associated fungus *Simplicillium* sp. SCSIO41209. **Phytochemistry**, v. 154, p. 56-62,

2018.

DANG, L. Q.; SHIN, T. S.; PARK, M. S.; CHOI, Y. H.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; KIM, J. C. Antimicrobial activities of novel mannosyl lipids isolated from the biocontrol fungus *Simplicillium lamellicola* BCP against phytopathogenic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p. 3363-3370, 2014.

DONG, Q. L.; LIN, T. Y.; XING, X. Y.; CHEN, B.; & HAN, Y. Identification of a symbiotic fungus from blue-green alga and its extracellular polysaccharide. **Letters in Applied Microbiology**, v.58, p. 303-310, 2014.

DONG, Q.; DONG, R.; XING, X.; LI, Y. A new antibiotic produced by the cyanobacterium-symbiotic fungus *Simplicillium lanosoniveum*. **Natural Product Research**, v.32, p.1348-1352, 2018.

ELSON, M. K.; SCHISLER, D. A.; JACKSON, M.A. Carbon-to-nitrogen ratio, carbon concentration, and amino acid composition of growth media influence conidiation of *Helminthosporium solani*. **Mycologia**, v. 98, p. 406–413, 1998.

ENGELKES, C. A.; NUCLO, R. L.; FRAVEL, D. R. Effect of carbon, nitrogen, and carbon-to-nitrogen ratio on growth, sporulation and biocontrol efficacy of *Taloromyces flavus*. **Phytopathology**, v. 87, p. 500–505, 1997.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.

FUKUDA, T.; SUDOH, Y.; TSUCHIYA, Y.; OKUDA, T.; IGARASHI, Y. Isolation and biosynthesis of preussin B, a pyrrolidine alkaloid from *Simplicillium lanosoniveum*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 813-817, 2014.

GAMS, W. A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 123-148, 1988.

GAMS, W. *Cephalosporium*-artige schimmelpilze (Hyphomycetes). v. 1, p. 1-262, 1971.

GAMS, W.; ZARE, R. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. **Nova Hedwigia**, v. 1, p. 329-337, 2001.

GAMS, W.; ZARE, R. A taxonomic review of the Clavicipitacean anamorphs parasitizing nematodes and other microinvertebrates. In *Clavicipitacean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, and Cultural Impacts* (Eds) WHITE JR., J. F.; BACON, C. W.; HYWEL-JONES, N. L.; SPATAFORA, J. W. **Mycology**, v. 19, p. 17–73, 2003.

GAO, L. A novel method to optimize culture conditions for biomass and sporulation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* ibc1201. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.1574–1584, 2011.

GOMES A. A. M.; PINHO D. B.; CARDEAL Z. L.; MENEZES H. C.; DE QUEIROZ M. V.; PEREIRA O. L. *Simplicillium coffeanum*, a new endophytic species from Brazilian coffee plants, emitting antimicrobial volatiles. **Phytotaxa**, v. 333, p. 188-198, 2018.

HARMAN, G. E.; JIN, X.; STASZ, T. E.; PERUZZOTTI, H.; LEOPOLD, A. C.; TAYLOR, A. G. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological Control**, v. 1, p. 23- 28. 1991.

HUANG, Z.; YAN, S. Z.; CHEN, S. L. Otimização das condições de fermentação de *Simplicillium obclavatum* YX016 para produção de antraquinonas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 7, n. 3, 2015.

HYDE, K. D.; XU, J.; RAPIOR, S.; JEEWON, R.; LUMYONG, S.; NIEGO, A. G. T.; STADLER, M. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v. 97, p. 1-136, 2019.

IWANICKI, N. S. A.; MASCARIN, G. M.; MORENO, S. G.; EILENBERG, J.; DELALIBERA, JR. I. Growth kinetic and nitrogen source optimization for liquid culture fermentation of *Metarhizium robertsii* blastospores and bioefficacy against the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1-13, 2020.

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

JACKSON, M. A.; CLIQUET, S.; ITEN, L. B. Media and fermentation processes for therapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, p. 23– 33, 2003.

JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. In: ROY, H. E. (Ed). **The ecology of fungal entomopathogens**, v. 1, p. 129-145. 2010.

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

JACKSON, M. A.; MCGUIRE, M. R.; LACEY, L. A.; WRAIGHT, S. P. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, v. 101, p. 35–41, 1997.

JAKUBÍKOVÁ, L.; FARKAS, V.; KOLAROVA, N.; NEMCOVIC, M. Conidiation of *Trichoderma atroviride* isolate during submerged cultivation in a laboratory stirred-tank fermenter. **Folia Microbiology**, v. 51, p. 209–213. 2006.

JENSEN, D. F.; KARLSSON, M.; SARROCCO, S.; VANNACCI, G. Biological control using microorganisms as an alternative to disease resistance. In: COLLINGE, D. B. (Ed.). **Plant Pathogen Resistance Biotechnology**, v. 1, p. 341–363, 2016.

JENSEN, D. F.; KARLSSON, M.; LINDAHL, B. D. Fungal–fungal interactions: from natural ecosystems to managed plant production, with emphasis on biological control of plant diseases. In: DIGHTON, J.; WHITE, J. F. (Eds.) **The fungal community – its organization and role in the ecosystem**, v. 1, p. 549– 562. 2017.

JORGENSEN, H. J. L.; COLLINGE, D. B.; ROJAS, E. C.; LATZ, M. A. C.; MANZOTTI, A.; NTANA, F.; JENSEN, B. Plant endophytes. In: **Encyclopaedia of life sciences**, v. 1, p. 028-893, 2020.

KEPLER, R. M.; LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; QUANDT, C. A.; SUNG, G. H.; REHNER, S. A.; SHRESTHA, B. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*). **IMA Fungus**, v. 8, p. 335-353, 2017.

KHALIL, S. K.; SHAH, M. A.; NAEEM, M. Estudos de laboratório sobre a compatibilidade do fungo entomopatogênico *Verticillium lecanii* com certos pesticidas. **Agris**, v. 13, p. 329-334, 1985.

KLEESPIES, R. G.; ZIMMERMANN, G. Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture. **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, p. 127-135, 1992.

KOBORI, N. N.; MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 119, p. 179-190, 2015.

KOUVELIS, V. N.; SIALAKOUMA, A.; TYPAS, M. A. Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. **Mycological Research**, v. 112, p. 829-844, 2008.

FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p. 71-93, 2008.

LEITE, L. G.; BATISTA-FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. Produção de fungos entomopatogênicos. **Livrocere**s, v. 1, p. 92, 2003.

LIANG, X.; NONG, X. H.; HUANG, Z. H.; QI, S. H. Antifungal and antiviral cyclic peptides from the deep-sea-derived fungus *Simplicillium obclavatum* EIODSF 020. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 5114-5121, 2017.

LIANG, X.; ZHANG, X. Y.; NONG, X. H.; WANG, J.; HUANG, Z. H.; QI, S. H. Eight linear peptides from the deep-sea-derived fungus *Simplicillium obclavatum* EIODSF 020. **Tetrahedron**, v. 72, p. 3092-3097, 2016.

LIM, S. Y.; LEE, S.; KONG, H. G.; LEE, J. Entomopathogenicity of *Simplicillium lanosoniveum* isolated in Korea. **Mycobiology**, v. 42, p. 317-321, 2014.

LIU, F.; CAI, L. Morphological and molecular characterization of a novel species of *Simplicillium* from China. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 33, p. 137-144, 2012.

LIU, X.; XING, X.; DONG, Q.; LIU, W.; LI, W. Efficient removal of nitrogen/phosphorous by mix-cultivation of *Haematococcus pluvialis* and *Simplicillium lanosoniveum* in wastewater supplemented with NaHCO₃. **Biochemical Engineering Journal**, v. 182, p. 108433, 2022.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rede Brasileira de Justiça Ambiental, v. 1, 2012. Disponível em: <<https://br.boell.org/sites/default/files/agrotoxicos-no-brasil-mobile.pdf>> Acesso em: 09 de Jan de 2022.

LOPES, F. G.; MOREIRA, J. N.; SILVA, M. G.; DE MELO, P. D.; BRUNET, D. M. do N. Diagnóstico do uso de agrotóxicos nos PISG e PIVAS, PB. **Agroecologia no Semiárido**, v. 1, p. 21–31, 2019.

LOUREIRO, E. S.; BATISTA-FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, J. E. M. Viabilidade de conídios e blastósporos de *Sporothrix insectorum* (Hoog & Evans) armazenados em diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 89-91. 2003.

MAGANHOTO, N. H. **Otimização dos parâmetros para fermentação líquida submersa de *Clonostachys rosea***. (Dissertação em Agronomia/Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras. Lavras. MG. 2020.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S.; HYDE, K. D.; JONES, E. B., MCKENZIE, E. H. C.; BHAT, J. D.; DAYARATHNE, M. C.; WIJAYAWARDENE, N. N. Families of sordariomycetes. **Fungal Diversity**, v. 79, p. 1-317, 2016.

MARKETS and MARKETS. Mercado de biopesticidas por tipo (bioinseticidas, biofungicidas, bionematicidas e bioherbicidas), fonte (microbianos, bioquímicos e insetos benéficos), modo de aplicação, formulação, aplicação de safra e região – previsão global para 2025. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticidas-267.html>>. Acesso em: 14 de Jun de 2022.

MASCARIN, G. M.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinose*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 753-761, 2010.

MASCARIN, G. M.; SILVA, A. V. R.; SILVA, T. P.; KOBORI, N. N.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. *Clonostachys rosea*: Production by submerged culture and bioactivity against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bemisia tabaci*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 851-000, 2022.

MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DUNLAP, C. A.; DELALIBERA JÚNIOR, Í. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 6653–6665, 2015.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1–26, 2016.

MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; DELALIBERA, JR. Í. Nitrogen sources affect productivity, desiccation tolerance and storage stability of *Beauveria bassiana* blastospores. **Jornal de microbiologia aplicada**, v. 124, n. 3, p. 810-820, 2018.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA JR, Í.; FERNANDES, E. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46–53, 2019.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória.** IPEA. Brasília. 2019. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf> Acesso em: 22 Abr 2022.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, p. 265-270, 1999.

NONAKA, W. K.; KAIFUCHI, S.; ŌMURA, S.; MASUMA, R. Five new *Simplicillium* species (*Cordycipitaceae*) from soils in Tokyo, Japan. **Mycoscience**, v. 54, p. 42-53, 2013.

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

ORTIZ-URQUIZA, A.; GARRIDO-JURADO, I.; BORREGO, A.; QUESADA-MORAGA, E. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). **Pest management science**, v. 66, p. 725–735, 2010.

OTTATI-DE-LIMA, E. L.; BATISTA – FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; GASSEN, M. H.; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, A. M. B.; ZAPPELLINI, L. O. Produção semi-sólida de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 651-659, 2010.

PAPAVIZAS, G.C. Biological control in crop production. **Beltsville symposia in agricultural research.** Allanheld, Osmun, 461 p. 1981.

PENG, Y.; HE, Y.; WU, Z.; LU, J.; LI, C. Screening and optimization of low-cost medium for *Pseudomonas putida* Rs-198 culture using RSM. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1229–1237, 2014.

POLAR, P.; KAIRO, M. T.; PETERKIN, D.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. A. Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. **Vector-Borne & Zoonotic Diseases**, v. 5, p. 276-284, 2005.

REZENDE, L. C.; CARVALHO, A. L.; COSTA, L. B.; ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, B.; SILVA, L. G.; PINTO, Z. V.; MORANDI, M. A. B.; MEDEIROS, F. H. V.; MASCARIN, G. M.; BETTIOL, W. Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1–14, 2020.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Microbiology**, v. 134, p. 169-176, 1988.

ROY, S.; DUTTA, T.; SARKAR, T. S.; GHOSH, S. Novel xylanases from *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604: comparative analysis of production, purification and characterization of enzyme from submerged and solid state fermentation. **SpringerPlus**, v. 2, p. 1-10, 2013.

SANTOS, P. S.; ABATI, K.; MENDOZA, N. V. R.; MASCARIN, G. M.; JÚNIOR, I. D. Nutritional impact of low-cost substrates on biphasic fermentation for conidia production of the fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae*. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, p. 100-619, 2021.

SBARAINI, N.; TOMAZETT, M. V.; PENTERICHE, A. B.; GONÇALES, R. A.; CAMARGO, M. D. S.; BAILÃO, A. M.; STAATS, C. C. An efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method for *Simplicillium subtropicum* (Hypocreales: Cordycipitaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, 2021.

SCHISLER D. A.; JACKSON, M. A.; BOTHAST, R. J. Influence of nutrition during conidiation of *Colletotrichum truncatum* on conidial germination and efficacy in inciting disease in *Sesbania exaltata*. **Phytopathology**, v. 81, p. 587-590, 1991.

SHIN, T. S., YU, N. H., LEE, J., CHOI, G. J., KIM, J. C., & SHIN, C. S. Development of a biofungicide using a mycoparasitic fungus *Simplicillium lamellicola* BCP and its control efficacy against gray mold diseases of tomato and ginseng. **The Plant Pathology Journal**, v. 33, p. 337, 2017.

SKAPTSOV, M.; SMIRNOV, S.; KUTSEV, M.; UVAROVA, O.; SINITSYNA, T.; SHMAKOV, A.; MATSYURA, A. Pathogenicity of *Simplicillium lanosoniveum* to *Coccus hesperidum*. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 7, p. 689-691, 2017.

SOCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52-71, 2017.

STENBERG, J. A.; SUNDH, I.; BECHER, P. G.; BJÖRKMAN, C.; DUBEY, M.; EGAN, P. A.; FRIBERG, H.; GIL, J. F.; JENSEN, D. F.; JONSSON, M. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, p. 665-676, 2021.

SUNG G. H.; SPATAFORA J. W.; ZARE R.; HODGE K. T.; GAMS, W. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae. **Nova Hedwigia**, v. 72, p. 311-328, 2001.

SUNG, G. H.; HYWEL-JONES, N. L.; SUNG, J. M.; LUANGSA-ARD, J. J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J. W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, p. 5-59, 2007.

TAKATA, K.; IWATSUKI, M.; YAMAMOTO T.; SHIRAHATA, T.; NONAKA, K.; MASUMA, R.; HAYAKAWA, Y.; HANAKI, H.; KOBAYASHI, Y.; PETERSSON, G. A.; OMURA, S.; SHIOMI, K. Aogacillins A and B produced by *Simplicillium* sp. FKI-5985: new circumventors of arbekacin resistance in MRSA. **Organic Letters**, v. 15, p. 4678-4681, 2013.

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

TRONSMO, A.; COLLINGE, D. B.; ALABOUVETTE, C.; JENSEN, D. F. Biological control of plant diseases. In: TRONSMO, A. M.; D. B. COLLINGE, A.; DJURLE, L.; MUNK, J.; YUEN; TRONSMO, A. (Eds.) **Plant pathology and plant diseases**. v. 1, p. 289–306. 2020.

UCHIDA, R.; KONDO, A.; YAGI, A.; NONAKA, K.; MASUMA, R., KOBAYASHI, K.; TOMODA, H. Simpotentin, a new potentiator of amphotericin B activity against *Candida albicans*, produced by *Simplicillium minatense* FKI-4981. **The Journal of Antibiotics**, v. 72, p. 134-140, 2019.

VICCINI, G.; MANNICH, M.; CAPALBO, D. M. F.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.; MITCHELL, D. A. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. **Process biochemistry**, v. 42, p. 275–278, 2007.

WARD, N. A.; ROBERTSON, C. L.; CHANDA, A. K.; SCHNEIDER, R. W. Effects of *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, and its use as a biological control agent. **Phytopathology**, v. 102, p. 749-760, 2012.

WARD, N. A.; SCHNEIDER, R. W.; AIME, M. C. Colonization of soybean rust sori by *Simplicillium lanosoniveum*. **Fungal Ecology**, v. 4, p. 303-308, 2011.

WIJAYAWARDENE N. N.; HYDE, K. D.; LUMBSCH, H. T.; LIU, J. K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; EKANAYAKA, A. H.; TIAN, Q.; PHOOKAMSAK, R. Outline of ascomycota: 2017. **Fungal Diversity**, v. 88, p. 167-263, 2018.

XING, X. Y.; CHEN, J. Y.; DONG, Q. L.; GUAN, R. J.; YAN, S. Y. Optimization and kinetics analyses of exopolysaccharide production by *Simplicillium lanosoniveum*. **Science and Technology of Food Industry**, v. 37, p. 185-191, 2016.

YAN, B. F.; FANG, S. T.; LI, W. Z.; LIU, S. J.; WANG, J. H.; & XIA, C. H. A new minor diketopiperazine from the sponge-derived fungus *Simplicillium* sp. YZ-11. **Natural Product Research**, v. 29, p. 2013-2017, 2015.

YU, Y. T.; HE, S. H.; ZHAO, Q. M. Isolation and identification of matrine-producing fungal endophytes from *Sophora alopecuroides* in Ningxia. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 46, p. 2643-2654, 2013.

ZARE, R.; GAMS, W. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. **Nova Hedwigia**, v. 73, p. 1-50, 2001.

ZARE, R.; GAMS, W.; CULHAM, A. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. I. Phylogenetic studies using ITS sequences. **Nova Hedwigia**, v. 71, p. 465–480. 2000.

ZHANG, Y.; GAO, X.; LIU, J.; GE, Y. Pilot production of *Clonostachys rosea* conidia in a solid-state fermentor optimized using response surface methodology. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p. 772–778, 2015.

ZHANG, Z. F.; LIU, F.; ZHOU, X.; LIU, X. Z.; LIU, S. J.; & CAI, L. Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 39, p. 1-31, 2017.

ZHAO D.; LIU B.; LI L. Y.; ZHU X. F.; WANG Y. Y.; WANG J. Q.; DUAN Y. X.; CHEN L. J. *Simplicillium chinense*: a biological control agent against plant parasitic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, p. 980-986, 2013.