

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA CENTRO  
DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**

**PRODUÇÃO DE CONÍDIOS POR *Trichoderma asperellum*  
VIA FERMENTAÇÃO LÍQUIDA SUBMERSA**

**ANA LUÍZA FONTES PEIXOTO**

**CRUZ DAS ALMAS - BA**

**MAIO – 2023**

# **PRODUÇÃO DE CONÍDIOS POR *Trichoderma asperellum* VIA FERMENTAÇÃO LÍQUIDA SUBMERSA**

**ANA LUÍZA FONTES PEIXOTO**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Leilane Silveira DÁvila

Co-Orientador 1: Dr Leandro De Souza  
Rocha


Co-Orientador 2: Dr<sup>a</sup> Flávia Melo Moreira

**CRUZ DAS ALMAS - BA**


**MAIO – 2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E  
BIOLOGICASBACHAREL EM ENGENHARIA AGRONÔMICA**


**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE  
CONCLUSÃO DE CURSO DE ANA LUIZA FONTES PEIXOTO**

Documento assinado digitalmente  
 LEILANE SILVEIRA D AVILA  
Data: 04/06/2023 20:19:59-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dr<sup>a</sup> Leilane Silveira  
DÁvilaUniversidade Federal do Recôncavo  
da Bahia  
(Orientadora)

Documento assinado digitalmente  
 THATYANE PEREIRA DE SOUSA  
Data: 02/06/2023 19:17:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Thatyane Pereira de Sousa  
UEMA

Documento assinado digitalmente  
 YASMIN KESSIA ARAUJO LOPES  
Data: 04/06/2023 20:15:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ms. Yasmin Késsia Araújo Lopes  
UFRB

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção, por ter colocado força e confiança, no meu coração para lutar até alcançar esta grande meta na minha vida.

Minha eterna gratidão vai para pessoas muito importantes em minha vida, que partiram antes de eu ter a oportunidade de compartilhar este momento, primeiramente, minha mãe Dolane Patrícia (in memoriam) que sempre estará presente em meu coração e em minhas lembranças. Seu amor, carinho e dedicação foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Aos meus avós Dalva e Humberto (in memoriam) que sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar meus sonhos. Sempre serão lembrados e amados! Aos meus familiares, amigos e colegas de estudo, que estiveram ao meu lado durante todo o curso, compartilhando conhecimentos, experiências e desafios. Agradeço por todos os momentos de descontração, colaboração e amizade que vivemos juntos.

Levarei para toda minha vida!

Agradeço também a minha nova família construída durante essa trajetória, em especial ao meu namorado Raí, que esteve ao meu lado nos momentos difíceis, me dando amor, carinho e incentivo os quais foram fundamentais para me manter motivada e perseverante, as minhas cunhadas Carol e Paula que me acolheram e me apoiaram durante todo o processo.

Gostaria de estender também meu agradecimento, a UFRB e a EMBRAPA pelo apoio concedido todos esses anos e pela oportunidade de realizar este trabalho de conclusão de curso.

A minha orientadora Profa. Leilane pela orientação, sempre a disposição, e aos meus Co-orientadores Flávia e Leandro que me acompanharam durante todo esse processo e me receberam de braços abertos, compartilhando seus conhecimentos e experiências comigo.

Mais uma vez, expresso minha sincera gratidão a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

**Muito obrigada!!**

## RESUMO

### PRODUÇÃO DE CONÍDIOS POR *Trichoderma asperellum* VIA FERMENTAÇÃO LÍQUIDA SUBMERSA

Produtos à base de *Trichoderma* spp. são amplamente utilizados na agricultura, seja para promoção do crescimento de plantas e/ou manejo de doenças. A produção de biomassa de um agente de biocontrole em larga escala é um desafio para a indústria de biológicos. Neste sentido, fermentação líquida é uma estratégia interessante. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o meio de cultura ideal para produção de conídios de *Trichoderma asperellum* (CNPMF1007), viabilizando sua produção em cultura submersa. O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, e disposto em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 x 2 x 2) com três repetições. Os tratamentos consistiram em meios de cultura (Meio Martin [MM], Meio Nutriente [MN], e meios constituídos de resíduos à 30% [AA30] e 50% [AA50]); níveis de agitação (constante [CO] e periódica [PE]); fotoperíodos (0 hora escuro [ES] e 12 horas de luz [LZ]). Os ensaios foram realizados em erlenmeyers contendo 200 ml do meio de cultura líquido e 10 ml da suspensão de inóculo ( $1 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) mantidos sob temperatura ambiente. As avaliações foram realizadas em três dias após a inoculação do *Trichoderma* no meio estabelecido e, então, avaliou-se o número de conídios (NC), em microscópio, e viabilidade dos propágulos através das unidades formadoras de colônias, UFC mL<sup>-1</sup>. Os meios de cultura, nível de agitação e fotoperíodo influenciaram significativamente a produção de NC e UFC de *Trichoderma asperellum* (CNPMF1007), sendo a agitação PE e fotoperíodo LZ que estimulou maior produção de NC e UFC, esse comportamento também foi pertinente para o meio de cultura AA50 ( $6,2 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) e ( $4,5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) que destacou-se em comparação aos demais, não havendo flutuação entre as quantidades de conídios produzidos e os viáveis.

Palavras-chave: controle biológico, produção de biomassa, meio de cultura.

## SUMMARY

### PRODUCTION OF CONIDIA BY *Trichoderma asperellum* VIA SUBMERGED LIQUID FERMENTATION

*Trichoderma* spp.-based products are widely used in agriculture, either for promoting plant growth and/or disease management. Large-scale production of a biocontrol agent is a challenge for the biological industry. In this sense, liquid fermentation is an interesting strategy. Thus, the objective of this work was to investigate the ideal culture medium for the production of *Trichoderma asperellum* (CNPMF1007) conidia, enabling its production in submerged culture. The experiment was conducted in the Embrapa Cassava and Fruits Phytopathology laboratory, and arranged in a completely randomized design, in a factorial scheme (4 x 2 x 2) with three repetitions. The treatments consisted of culture media (Martin Medium [MM], Nutrient Medium [MN], and media composed of 30% [AA30] and 50% [AA50] residues); agitation levels (constant [CO] and periodic [PE]); photoperiods (0 hours of darkness [ES] and 12 hours of light [LZ]). The assays were carried out in Erlenmeyer flasks containing 200 mL of liquid culture medium and 10 mL of the inoculum suspension ( $1 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup>) kept at room temperature. The evaluations were performed three days after *Trichoderma* inoculation in the established medium, and then the number of conidia (NC) was evaluated under a microscope, and the viability of the propagules was evaluated through colony-forming units, CFU mL<sup>-1</sup>. Culture media, agitation level, and photoperiod significantly influenced the production of NC and CFU of *Trichoderma asperellum* (CNPMF1007), with PE agitation and LZ photoperiod stimulating higher production of NC and CFU. This behavior was also pertinent for the AA50 culture medium ( $6.2 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>) and ( $4.5 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>) highlighted in comparison to the others, with no fluctuation between the amounts of conidia produced and viable ones.

Keywords: biological control, biomass production, culture medium.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1: Mecanismos de ação de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos e produção de compostos relacionados à promoção de crescimento em plantas. (Adaptado de Konappa et al., 2020)..... 11**

**Figura 2: Número de conídios (NC) e unidade formadora de colônia (UFC) de *Trichoderma asperellum* em função do fator agitação constante (CO) e periódico (PE) (A) e fotoperíodo luz e escuro (B), três dias após inoculação ..... 18**

**Figura 3: Heatmap de unidade formadora de colônia (UFC) e número de conídios (NC) de *Trichoderma asperellum* em função dos fatores meio de cultura, agitação e fotoperíodo, três dias após inoculação.....20**

## Sumário

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	9
<b>2.0 REVISÃO DE LITERATURA</b>	10
<b>2.1 <i>Trichoderma asperellum</i> e seu potencial como agente de biocontrole</b>	10
<b>2.2 Produtos biológicos versus insumos químicos</b>	12
<b>2.3 Produção em larga escala de fungos</b>	13
<b>2.4 Alternativas a fermentação sólida do <i>Trichoderma</i></b>	13
<b>2.5 Otimização dos parâmetros de fermentação para aumentar a produção de <i>Trichoderma asperellum</i></b>	14
<b>2.6 Produção “on farm” de <i>Trichoderma</i></b>	15
<b>3.0 OBJETIVOS</b>	15
<b>3.1 Geral</b>	15
<b>3.2 Específicos</b>	16
<b>4.0 METODOLOGIA</b>	16
<b>5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	17
<b>6.0 CONCLUSÕES</b>	21
<b>7.0 REFERÊNCIAS</b>	21



## 1.0 INTRODUÇÃO

*Trichoderma asperellum* é um fungo filamentosso encontrado no solo, que tem sido amplamente estudado por suas propriedades de biocontrole (ATANASOVA et al., 2021). Sua ação sobre os patógenos varia desde a competição por nutrientes, produção de antibióticos, substâncias voláteis e não voláteis, à produção de enzimas hidrolíticas (LIMA JÚNIOR, 2015; MOREIRA et al., 2021). Além do potencial como agente de biocontrole, algumas espécies desse gênero, como *Trichoderma asperellum*, interagem com as plantas introduzindo resistências a fatores bióticos e abióticos e são responsáveis por promover crescimento das plantas devido a produção de fitohormônios e solubilização de nutrientes, como fósforo (P), ferro (Fe) e zinco (Zn) (RUBIO et al., 2012; MOREIRA et al., 2021).

A demanda por agentes de controle biológico vem crescendo no Brasil e no mundo, nos últimos anos (TEIXEIRA et al., 2010) devido ao aumento da preocupação com a sustentabilidade e a segurança alimentar, além da crescente busca por alternativas aos agrotóxicos convencionais. Dessa forma, espécies do gênero *Trichoderma* tem se mostrado como uma alternativa eficiente e sustentável aos fungicidas químicos, contribuindo para a redução do uso de agroquímicos e para a promoção da agricultura sustentável (HARAN et al., 2020). Propágulos de *Trichoderma* podem ser produzidos em fermentação líquida ou sólida (SRIRAM; ROOPA; SAVITHA, 2011; PANAHIAN; RAHNAMA; JAFARI, 2012.).

Atualmente, a produção massal desse antagonista é feita, principalmente, por fermentação em meio sólido (MUNOZ et al., 1995; SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2007; LOPES, 2009; MACHADO et al., 2012;), utilizando-se grãos de arroz, milho, sorgo, trigo ou em fubá de milho (SINGH et al., 2007) em que o fungo coloniza esses substratos e produz conídios aéreos. Entretanto a fermentação sólida, apresenta limitações, quanto ao tempo, custo e volume de propágulos produzidos, para atender a demanda de produção industrial desse bioagente.

Para isso, estudos envolvendo, o processo de fermentação líquida, fazem-se necessários, para obtenção de características desejáveis à produção massal comercial e para viabilizar a produção de conídios de *Trichoderma* em cultura submersa, beneficiando, assim, a produção, a comercialização e a utilização de

produtos à base desse bioagente. A fermentação líquida permite controle da produção e tempo de processo, ocupa menor espaço e menos mão de obra, além de permitir o controle sobre o nível de contaminação, redução dos custos de produção, consequentemente, o preço final do produto para o agricultor, facilitando, assim, a produção abundante de propágulos viáveis (RODRIGUES et al., 2021). Porém, a esporulação do *Trichoderma* por esse tipo de fermentação ainda constitui um desafio, principalmente devido à dificuldade de induzir a produção de conídios submersos.

A utilização de resíduos como substrato para produção de *Trichoderma* em fermentação líquida tem se mostrado uma alternativa viável, econômica e sustentável, já que os resíduos agroindustriais possuem alto teor de nutrientes, que podem ser utilizados pelo *Trichoderma* como fonte de carbono e energia. Além disso, a utilização de resíduos como substrato para a produção de *Trichoderma* em fermentação líquida pode reduzir os custos de produção e diminuir o impacto ambiental, uma vez que esses materiais seriam descartados (MARIANO et al., 2020). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o meio de cultura ideal para produção de conídios de *Trichoderma asperellum* (CNPMPF1007), viabilizando sua produção em cultura submersa.

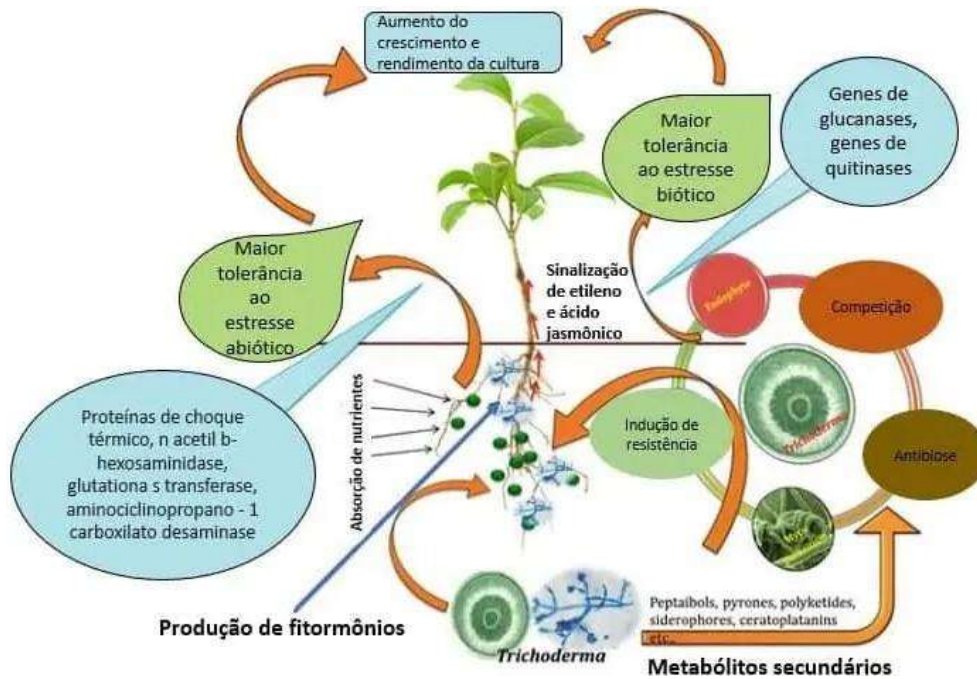
## **2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 *Trichoderma asperellum* e seu potencial como agente de biocontrole**

*Trichoderma asperellum* é um fungo filamentosos encontrado no solo, que tem sido amplamente estudado por suas propriedades de biocontrole (ATANASOVA et al., 2021). Essa espécie de *Trichoderma* é capaz de antagonizar outros fungos patogênicos e estimular o crescimento de plantas. Além disso, *Trichoderma asperellum* tem sido apontado como uma alternativa promissora para a redução do uso de fungicidas químicos na agricultura, contribuindo para a sustentabilidade do sistema e a segurança alimentar. (HARMAN et al. 2004)

Os mecanismos de biocontrole de *Trichoderma asperellum* incluem a competição por nutrientes e espaço, a produção de enzimas e metabólitos secundários tóxicos aos patógenos, e a ativação do sistema de defesa das plantas (VINALE et al., 2008). A capacidade de produzir esses metabólitos secundários é

particularmente relevante, uma vez que muitos deles têm atividade antifúngica e podem ser utilizados para controlar diversas doenças em diferentes culturas agrícolas.



**Figura 1.** Mecanismos de ação de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos e produção de compostos relacionados à promoção de crescimento em plantas. Fonte: adaptado de Konappa et al., 2020.

O *Trichoderma spp.* também têm sido utilizado em culturas de grãos, como milho, arroz e trigo, para o controle de patógenos que afetam a germinação das sementes e o crescimento das plantas. Por exemplo, em um estudo com arroz, o uso de *Trichoderma spp.* foi capaz de reduzir significativamente a incidência de podridão de raiz e aumentar a produção de grãos (MUNIR et al., 2016).

Essa espécie é capaz de colonizar as raízes das plantas e induzir resistência contra estresses bióticos e abióticos (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2014). Assim, o uso desse agente de biocontrole é uma estratégia promissora para o manejo integrado de doenças em sistemas agrícolas, contribuindo para a redução dos impactos ambientais e para a segurança alimentar (SINGH et al., 2016).

Além do seu potencial como agente de biocontrole, o *Trichoderma asperellum* pode ser utilizado como promotor de crescimento vegetal. Os mecanismos mais relatados envolvem: solubilização de P, Fe e Zn, disponibilidade de nutrientes e síntese de fitormônios (MOREIRA et al., 2021). Dessa forma, sua utilização pode contribuir para a melhoria da produtividade e qualidade das culturas agrícolas.

Devido a tantos benefícios, a aplicação de *Trichoderma* em sistemas agrícolas é eficaz para o controle de doenças, contribuindo para o aumento da produtividade e qualidade dos cultivos, além de ser uma alternativa viável e eficaz para a redução do uso de insumos químicos na agricultura (ROY et al., 2019).

## **2.2 Produtos biológicos versus insumos químicos**

A utilização excessiva de pesticidas químicos é um problema crescente em todo o mundo, gerando preocupação ambiental e de saúde humana (QAMAR et al., 2020). Por outro lado, o controle biológico tem sido cada vez mais utilizado como uma alternativa ao uso de produtos químicos, com o objetivo de reduzir o impacto negativo no meio ambiente e na saúde humana. A utilização de *Trichoderma* como alternativa aos produtos químicos convencionais tem se destacado por sua eficiência no controle de doenças de plantas e por ser uma opção mais segura e sustentável para o meio ambiente (KREDICS et al., 2003).

Com relação a produtividade e impacto ambiental, os produtos biológicos apresentam uma eficácia semelhante ou até superior aos insumos químicos, com a vantagem de reduzir a poluição ambiental e preservar a biodiversidade (ROY et al., 2019).

Os produtos biológicos são eficazes no controle de doenças e apresentaram vantagens em relação aos insumos químicos, como a redução de resíduos químicos nos alimentos e a preservação da qualidade do solo (GOPALAKRISHNAN et al., 2019). O uso de produtos biológicos pode aumentar a produtividade das culturas, reduzir o custo de produção e melhorar a qualidade dos alimentos, assim como também, pode promover a biodiversidade e reduzir a contaminação do solo e da água. (SINGH et al., 2019).

### **2.3 Produção em larga escala de fungos**

A produção em larga escala de fungos é uma área de grande interesse na biotecnologia, com aplicações em diversos setores, como a produção de alimentos, medicamentos, produtos químicos e bioenergia. A otimização do processo de produção é fundamental para aumentar a produtividade e reduzir os custos (NAIR et al., 2021).

Um dos principais desafios na produção em larga escala de fungos é o controle das condições de cultivo, como temperatura, pH, oxigenação e agitação, que podem influenciar no crescimento e metabolismo dos fungos. A utilização de biorreatores pode ser uma alternativa eficiente para controlar essas variáveis e aumentar a produção de biomassa fúngica (SILVA et al., 2020).

A seleção de linhagens de fungos com alta produtividade e adaptadas às condições de cultivo também é um fator importante na produção em larga escala. A engenharia genética pode ser uma ferramenta útil para desenvolver linhagens de fungos com características desejáveis, como maior resistência a estresses ambientais e maior produção de metabólitos (ZHAO et al., 2021).

A produção em larga escala de fungos é uma área em constante evolução, com potencial para oferecer soluções inovadoras e sustentáveis em diversos setores. A otimização do processo de produção, o controle das condições de cultivo e a seleção de linhagens adequadas são aspectos fundamentais para aumentar a produtividade e reduzir os custos, tornando essa tecnologia mais competitiva e acessível.

O gênero *Trichoderma* tem sido multiplicado em larga escala via fermentação sólida, predominantemente, em arroz parboilizado, havendo rendimento de  $2,5 \times 10^{11}$  esporos/g (PUJOL et al., 2017).

### **2.4 Alternativas a fermentação sólida do *Trichoderma***

A fermentação sólida de *Trichoderma* é uma técnica amplamente utilizada na produção de enzimas e compostos bioativos. No entanto, a busca por alternativas a essa técnica vem sendo objeto de estudo de diversos pesquisadores.

Uma alternativa é a fermentação líquida, que utiliza meio líquido em vez de substrato sólido para o crescimento do fungo. Para a produção em larga escala são

necessários ajustes nas condições de cultivo para maximização da produção de biomassa e metabólitos secundários com atividade antifúngica (LI et al., 2021).

A fermentação líquida tem várias vantagens em relação à fermentação sólida, incluindo menor custo de produção, maior controle de processos e menor geração de resíduos. Além disso, a fermentação líquida pode ser facilmente escalada para produção em grande escala, o que é importante para a produção comercial de enzimas (CHENG et al., 2017).

O uso de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de enzimas por *Trichoderma* em fermentação líquida. Os resultados mostraram que a fermentação líquida foi capaz de produzir uma série de enzimas, incluindo celulases, xilanases, proteases e amilases. (ZHANG et al., 2015).

Outra alternativa é a utilização de bioreatores para a produção de enzimas por *Trichoderma*. A utilização de um bioreator de alimentação contínua resultou em maior produção de celulase por *Trichoderma* em comparação com a fermentação sólida (ZHANG et al., 2014).

## **2.5 Otimização dos parâmetros de fermentação para aumentar a produção de *Trichoderma asperellum*.**

A produção de *Trichoderma asperellum* por fermentação é um processo complexo que envolve a interação de diversos parâmetros, tais como pH, temperatura, agitação e concentração de nutrientes. Para aumentar a produção dessa espécie fúngica por fermentação, é fundamental otimizar esses parâmetros (FARIA et al. 2019).

A otimização dos parâmetros de fermentação é um dos principais desafios para a produção em larga escala de *Trichoderma asperellum*. A temperatura ótima para o crescimento desse fungo é de 28°C, enquanto o pH ideal varia de 5,5 a 6,0. Além disso, a agitação do meio de fermentação deve ser controlada para evitar a formação de agregados fúngicos e garantir a homogeneização do meio (FARIA et al., 2019). Outro fator importante é a concentração de nutrientes no meio de fermentação. O balanço nutricional, principalmente entre carbono (C), nitrogênio (N) e P influencia diretamente no crescimento e esporulação do fungo (MUKHERJEE et al., 2012;

SANTOS et al., 2016).

## **2.6 Produção “on farm” de *Trichoderma***

A produção on farm de *Trichoderma* é uma técnica utilizada para produzir este fungo benéfico em grande escala, para uso na agricultura como agente de controle biológico tem sido cada vez mais adotada pelos agricultores como uma estratégia de controle de doenças e pragas nas lavouras. Essa prática se tornou muito interessante para os produtores que desejam reduzir o uso de agrotóxicos, uma vez que o *Trichoderma* é capaz de controlar diversas doenças que afetam as plantas, além de promover o crescimento vegetal e melhorar a qualidade dos frutos (HARMAN et al., 2006).

Constitui de uma alternativa viável e econômica para a aquisição de produtos comerciais e pode ser facilmente realizada pelos agricultores com poucos recursos e equipamentos simples (SINGH et al., 2018), porém envolve a criação de um ambiente adequado para o crescimento do fungo, com substratos, condições de temperatura e umidade controladas.

No entanto, é importante ressaltar que a eficácia do controle biológico depende da escolha criteriosa da espécie ou cepa de *Trichoderma*, da sua adaptação às condições edafoclimáticas da região e da sua aplicação na dose e momento correto (SHORESH et al., 2010; HARMAN et al., 2010). Portanto, a produção on farm de *Trichoderma* requer conhecimento técnico e cuidados específicos, mas pode trazer grandes benefícios para a agricultura e para a sociedade como um todo, ao promover a produção de alimentos mais saudáveis e sustentáveis.

## **3.0 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar a caracterização quantitativa de *Trichoderma asperellum*, CMF1007, produzido em substrato líquido, os quais são necessários para otimizar a produção “on farm” do *Trichoderma* e com isso estimular a expansão da multiplicação do defensivo biológico no Brasil.

### 3.2 Específico

- Avaliar se os meios de cultura estimularam maior número de conídios (NC) e a viabilidade dos mesmos através das unidades formadoras de colônias, expressas em UFC ml<sup>-1</sup>;
- Avaliar se os níveis de agitação estimularam maior número de conídios (NC) e a viabilidade dos mesmos através das unidades formadoras de colônias, expressas em UFC ml<sup>-1</sup>;
- Avaliar se o fotoperíodo estimulou maior número de conídios (NC) e a viabilidade dos mesmos através das unidades formadoras de colônias, expressas em UFC ml<sup>-1</sup>;

### 4.0 METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura, município de Cruz das Almas, Bahia. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 x 2 x 2), com três repetições. Os tratamentos consistiram em quatro meios de cultura (Meio Martin [MM], Meio Nutriente [MN], e meios constituídos de resíduos à 30% [AA30] e 50% [AA50]); dois estados de agitação (constante [CO] e periódica [PE]); dois estados de fotoperíodo (0 hora escuro [ES] e 12 horas de luz [LZ]). O resíduo, oriundo do aproveitamento da água de arroz parboilizado, numa relação 2:1 (água: arroz; v:v) foi diluído com água nas concentrações 30% e 50%.

Para a produção do inóculo, o isolado de *Trichoderma asperellum*, CMF1007, foi cultivado em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) por sete dias em BOD à 25 °C e fotoperíodo de 12 h. A partir dessas placas, foi preparada a suspensão de conídios ajustada em câmara de Neubauer para 1 x 10<sup>8</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. A suspensão foi utilizada como inóculo inicial nos ensaios de fermentação em meio líquido.

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers contendo 200 ml do meio de cultura líquido de acordo ao tratamento e 10 ml da suspensão de inóculo. Os pH dos meios de cultura foram mensurados antes da inoculação fúngica, correspondendo à MM (6,3), MN (6,8), AA30 (6,99) e AA50 (6,8). Todos os erlenmeyers foram mantidos à temperatura ambiente, 25 °C, e em agitação orbital a 160 rpm, no tratamento



“agitação constante”, para o tratamento agitação periódica foi realizada agitação após 3 dias da inoculação. Foram avaliados o número de conídios (NC) e a viabilidade dos mesmos através das unidades formadoras de colônias, expressas em UFC ml<sup>-1</sup>. Essas avaliações foram realizadas 3 dias após inoculação.

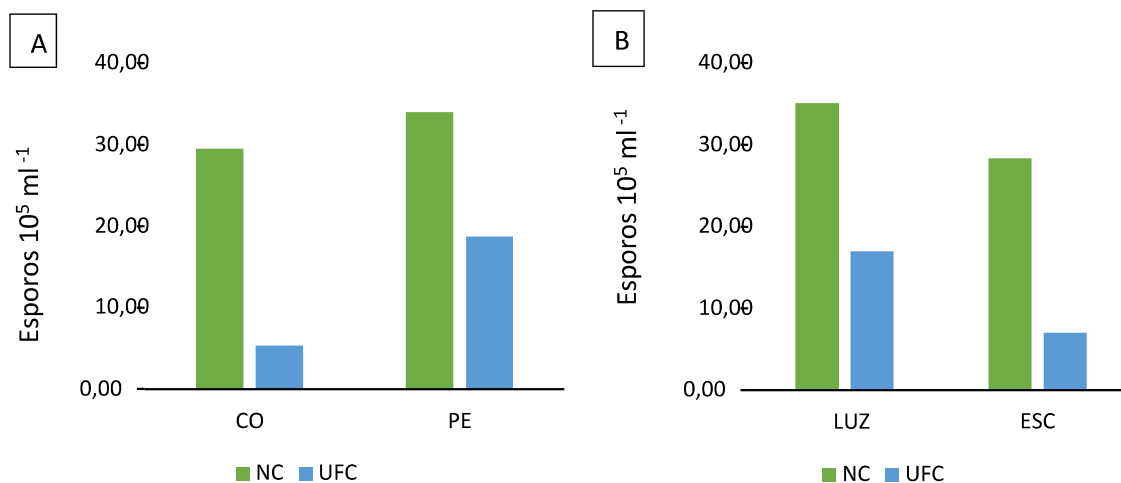
Para quantificação do NC e da UFC, retirou-se alíquotas do meio estabelecido com *Trichoderma*. A primeira quantificação foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio de luz. A última, utilizou-se placas contendo meio BDA. 100 µL da suspensão previamente preparada da diluição seriada foi plaqueada mantida por 48 horas a 25 °C ± 2 e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada através da contagem das colônias do fungo, a olho nu, após o período de incubação.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) empregando-se o programa estatístico R (R Development Core Team, 2017).

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fatores meios de cultura, nível de agitação e fotoperíodo influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção de NC e UFC de *Trichoderma asperellum*. No geral, a agitação PE estimulou maior produção de NC e UFC,  $3 \times 10^6$  e  $2 \times 10^6$ , do que a agitação CO,  $3 \times 10^6$  e  $5 \times 10^5$ , respectivamente, médias variando entre 87% e 29% (Figura 2). A agitação PE manteve a uniformidade do meio de cultura, sem afetar a estrutura do fungo, favorecendo a produção e o desenvolvimento de conídios submersos, permitindo assim, uma distribuição mais eficiente de nutrientes e oxigênio nas culturas líquidas. Por outro lado, a agitação CO pode prejudicar a uniformidade do meio e afetar negativamente a estrutura do fungo, resultando em menor produção de conídios (HEDAYATNIA et al., 2017)

Além disso, a agitação PE proporciona momentos de repouso para as células fúngicas, permitindo que elas se recuperem e se desenvolvam melhor, durante esses períodos de repouso, as células fúngicas podem concentrar-se na síntese de proteínas e outras moléculas necessárias para o seu crescimento e desenvolvimento, o que pode levar a uma maior eficiência na produção de conídios (YANG et al., 2020). Diferentemente da agitação CO, que pode causar um estresse constante nas células fúngicas.



**Figura 2.** Número de conídios (NC) e unidade formadora de colônia (UFC) de *Trichoderma asperellum* em função do fator agitação constante (CO) e periódico (PE) (A) e fotoperíodo luz e escuro (B), três dias após inoculação.

Esse comportamento também foi pertinente para o fotoperíodo, em que a LZ (3 x 10<sup>6</sup>) favoreceu a produção de conídios, quando comparado ao ES (2 x 10<sup>6</sup>). Esse resultado está associado a um breve pulso de luz, o qual desencadeia a conidiação, levando à produção de anéis de conídios concêntricos em resposta à alternância dos ciclos de luz-escuro, isso se deve ao fato de que a luz promove a diferenciação celular, aumentando a produção de compostos orgânicos e de oxigênio, e com isso afeta o metabolismo celular, revelando assim a notoriedade da luz em seu processo de produção massal de conídios (STEYAERT; WELD; STEWART, 2010).

Vários fatores abióticos são apontados por influenciar a conidiogênese de *Trichoderma* spp., incluindo os níveis de carbono e nitrogênio, e o pH do meio. Este último influencia tanto a conidiação quanto a morfologia das colônias de *Trichoderma*, cuja natureza exata dessa influência não é conhecida (STEYAERT; WELD; STEWART, 2010). No presente estudo, os pH dos diferentes meios de cultura foram semelhantes, variando entre 6,3 a 6,9.

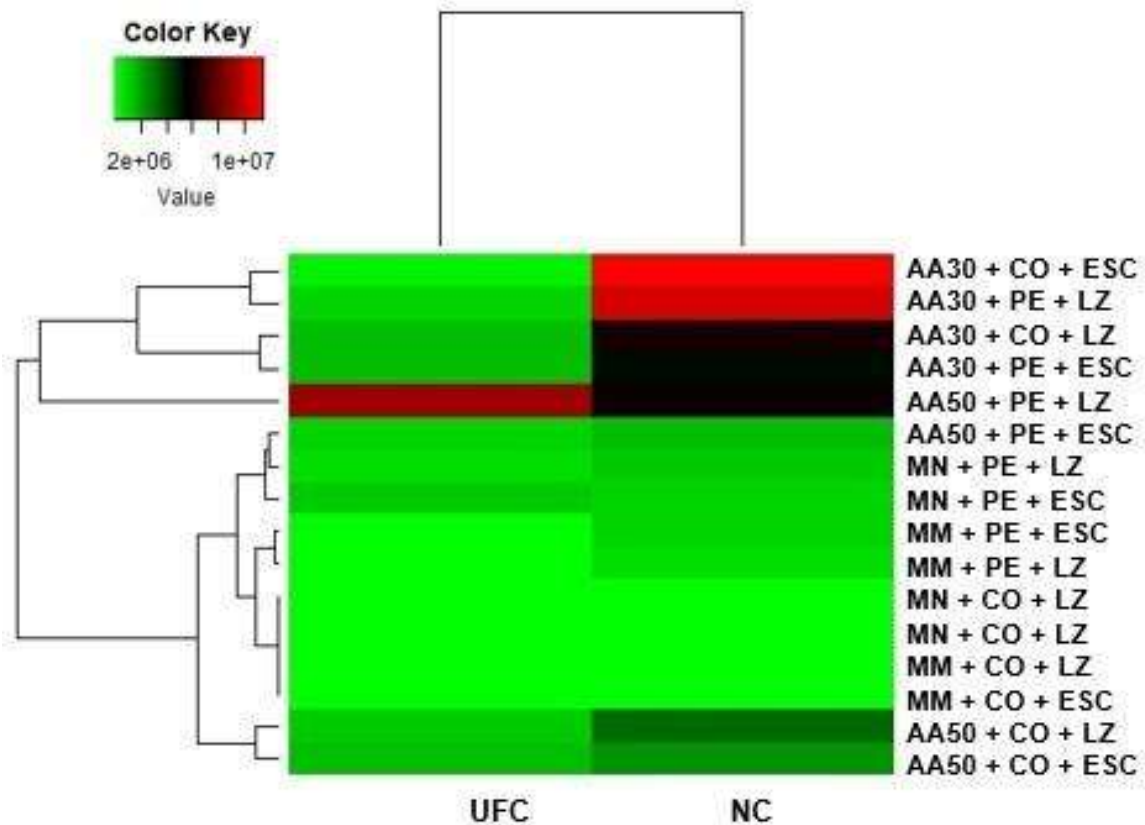
O pH próximo da neutralidade favorece a atividade enzimática e a absorção de nutrientes pelas células fúngicas, o que leva a uma maior produção de biomassa e consequentemente, maior produção de conídios (PEIYING et al., 2019)

Com relação aos meios de cultura, AA50 e AA30 se destacaram em comparação aos demais, não havendo flutuação entre as quantidades de conídios produzidos e os viáveis. Em contrapartida, *Trichoderma* crescido nos meios MN e MM apresentaram as menores médias de NC e UFC (Figura 2). Os níveis de carbono e nitrogênio nos meios de cultura são fatores limitantes a conidiação. Para a multiplicação de *Trichoderma*, utiliza-se, geralmente, fontes de carbono de baixa degradabilidade (ex.: amido), arroz, fubá de milho, trigo, sorgo, entre outros (GAO et al., 2007).

O tipo de meio utilizado influencia a produção de conídios por um agente, sendo que meios de baixa degradabilidade estimulam a produção de estruturas, devido à disponibilidade de nutrientes para o agente. Isso ocorre porque a produção de conídios é uma estratégia reprodutiva utilizada pelo *Trichoderma* para garantir a dispersão e a colonização de novos ambientes.

Isso explica o fato dos meios de cultura confeccionado a partir dos resíduos da fermentação sólida em arroz, AA50 e AA30, estimularem maior produção de conídios submersos e viáveis em fermentação líquida.

A utilização de meios líquidos apresenta uma alternativa viável para a produção on-farm de agentes biológicos, no qual visa a produção em larga escala através de sistemas fermentativos altamente eficientes, que permitem um controle mais rigoroso das condições de cultivo, tais como temperatura, pH e agitação. Além disso, a produção em meios líquidos resulta, geralmente, em altas concentrações de células viáveis e de estruturas de dispersão.



**Figura 3.** Heatmap de unidade formadora de colônia (UFC) e número de conídios (NC) de *Trichoderma asperellum* em função dos fatores meio de cultura, agitação e fotoperíodo, sete dias após inoculação.

A melhor formulação para a produção de *Trichoderma asperellum* sob fermentação líquida foi AA50 sob agitação periódica e fotoperíodo 12 horas (Figura 3). Entretanto, esses resultados não foram superiores a fermentação sólida-estática ( $2,2 \times 10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>). O presente trabalho evidencia o aproveitamento total de resíduos durante a produção de *Trichoderma asperellum*, em que tanto o cereal arroz quanto a água utilizada no processo de umedecimento são utilizados.

## 6.0 CONCLUSÕES

O meio de cultura AA50 sob agitação periódica e fotoperíodo de 12 horas estimulou maior produção de conídios viáveis de *Trichoderma asperellum* em fermentação líquida. Contudo, os resultados não superaram aos obtidos por fermentação sólida-estática.

## 7.0 REFERÊNCIAS

ATANASOVA, L., LEIBINGER, W., KNAPP, B. A., & ZEILINGER, S. Comparative genomics reveals *Trichoderma asperellum* as a phylogenetically distinct and highly versatile mycoparasitic fungus. **Frontiers in microbiology**, 12, 642620.2021.

CHENG, Y., ZHENG, X., ZHUANG, W., CUI, F., & YU, S. Solid-state fermentation vs. submerged fermentation for the production of mushroom polysaccharides: a review. **Bioengineering**, 4(1), 8. 2017.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., CORTÉS-PENAGOS, C., & LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 165(2), 897-904. 2014.

FARIA, J. R., ET AL. Optimization of culture conditions for the production of *Trichoderma asperellum* T76-2 using a response surface methodology. **Biotechnology Reports**, 23, e00352. 2019.

FARIA, L. M.; GUIMARÃES, L. H. S.; FARIA, R. S.; SANTOS, L. A.; FURTADO, G. F.; OLIVEIRA, F. A. Importância da agitação e aeração em cultivos de *Trichoderma* spp. para produção em larga escala. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 7, p. 40330-40339, 2019.

GAO, X. ET AL. Production of biocontrol agent *Trichoderma harzianum* using molasses and its efficacy against wilt disease of pistachio. **Journal of Plant Pathology**, v. 89, n. 3, p. 363-369, 2007.

GOPALAKRISHNAN, S., SATHYA, A., VIJAYABHARATHI, R., & VARSHNEY, R. K. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. **Biotech**, 5(3), 355-377. 2015.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. *Trichoderma* for sustainable agriculture. **International Journal of Biological Control**, v. 66, n. 4, p. 535-542, 2020.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. *Trichoderma* – application, mode of action, and potential for controlling plant diseases. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.). *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Vol. 2. **Formatex Research Center**, 2020. p. 1157-1168.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VARGAS, W. A.; KERNS, P.; CHEN, Y.; REESE, E. T. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 1-11, 2006.

HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I., & LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, 2(1), 43-56. 2004.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, 96(2), 190-194. 2006.

HEDAYATNIA, S., NASR ESFAHANI, M., & ZAMANI, A. Influence of submerged culture conditions on conidia production of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Plant Protection Research**, 57(2), 123-130. 2017.

LIMA JÚNIOR, E. A. *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole de patógenos em plantas. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

LOPES, F. M. T. Produção de esporos de *Trichoderma harzianum* Rifai em meio de cultura sólido e líquido. 2009. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

LI, Y., GUO, J., CHEN, L., CHEN, Y., & HUANG, T. Optimization of *Trichoderma asperellum* fermentation parameters and evaluation of the antifungal activity of the fermentation products. **BioResources**, 16(2), 3557-3571. 2021

MACHADO, S. L. O.; COAN, A. I.; SANTOS, C. M. Produção de inóculo de *Trichoderma* spp. em meio líquido para o controle biológico de doenças de plantas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, n. 1, p. 115-123, 2012.

MARIANO, R. L. R. et al. Uso de resíduos agroindustriais como substrato para produção de *Trichoderma* spp. em fermentação líquida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 24, n. 10, p. 733-738, 2020.

MOREIRA, D. K. M.; SOARES, M. A.; SOUSA, T. N.; FARIAS, M. F.; SOUZA, I. O. Biocontrole de fitopatógenos por *Trichoderma* spp.: mecanismos de ação e aplicações. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 15, n. 2, p. 1536-1552, 2021.

MOREIRA, L. R. S.; SOUZA, R. M.; SILVA, G. F.; FREITAS-SILVA, O.; MONTEIRO, R. T. R.; COSTA, M. D. S.; SANTOS, F. F.; SANTOS, S. S.; SANTOS, V. L. S.; SILVA, K. B.; ARAÚJO, E. F. Emergent sources of *Trichoderma* spp.: Biology and industrial applications. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 799, 2021.

MUKHERJEE, P. K., ET AL. Production of *Trichoderma* spp. by solid-state fermentation: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, 43(4), 1061-1071. 2012.

MUNIR, I., ZHANG, X., XIE, X., LIU, D., JIANG, D., & WANG, X. *Trichoderma* spp. improve growth, yield and grain quality of aerobic rice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 96(11), 3825-3832. 2016

MUNOZ, J. E.; JIMENEZ, T.; MATEOS, F.; LARA, J. Fungal biomass production on solid state fermentation of agricultural residues and agroindustrial by-products. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 2-3, p. 133-141, 1995.

NAIR, R. B., NAMBIAR, R. B., & JAYAPRAKASH, N. S. Optimization of large scale fungal production: An overview. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 34, 102103. 2021.

PANAHIAN, M.; RAHNAMA, M.; JAFARI, A. Production of *Trichoderma harzianum* conidia in a new solid-state bioreactor based on agro-industrial waste. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 75-87, 2012.

PEIYING, H., ZHIGANG, C., & TIANHONG, W. Effect of pH on the growth and sporulation of *Trichoderma viride* in submerged culture. **Biological Agriculture & Horticulture**, 35(1), 36-44. 2019.

PUJOL, M., RUIZ-DUEÑAS, F. J., HERRERO-JIMÉNEZ, M. J., MARTÍNEZ, M. J., MARTÍNEZ, A. T., & MORALES, M. Oxidative degradation of triclosan by *trametes versicolor* laccase and unspecific peroxidase. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(14), 12991-13004. 2017.

QAMAR, W., SULTANA, V., & SULTANA, S. Biological control of plant diseases: The way towards sustainable agriculture. **Journal of Plant Interactions**, 15(1), 67-74. 2020.

RODRIGUES, L. ET AL. Produção de inóculo de Trichoderma em fermentação líquida: efeito da fonte de carbono. **Ciência Rural**, v. 51, n. 2, e20190546, 2021.

ROY, A., SAHA, S., & SARKAR, S. Comparative evaluation of biological and chemical inputs on yield and quality of tomato under protected cultivation. **Journal of Plant Nutrition**, 42(10), 1207-1222. 2019.

RUBIO, M. B.; HERMANSEN, P. B.; MARGARIA, C. A.; JENSEN, B.; KOLLERUP, F.; JENSEN, D. F. Selection and identification of biocontrol agents against *Rhizoctonia solani* in lettuce. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 2, p. 367-375, 2012.

SANTOS, C., ET AL. Carbon and nitrogen sources optimization on *Trichoderma asperellum* Bisset (T-014) biomass production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 47(2), 326-334. 2016.

SHORESH, M., & HARMAN, G. E. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. **Plant physiology**, 153(4), 1741-1753. 2010.

SILVA, S. S., OLIVEIRA, C. P., RIBEIRO, L. P., MONTEIRO, R. A., MENDES, G. V., & ALMEIDA, R. V. Use of bioreactors for large-scale production of fungal biomass. In **Fungi in Biotechnology** (pp. 261-284). Springer, Cham. 2020.

SINGH, A. ET AL. Submerged spore production of *Trichoderma* strains: influence of medium, pH, agitation and temperature. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 658-670, 2018.

SINGH, M., GUPTA, R., & UPADHYAY, R. G. On-farm production of *Trichoderma*: A sustainable alternative for plant disease management. **Indian Phytopathology**, [71(4), 336-345. 2018.

SINGH, R., KUMAR, A., & LAL, R. Biological products: A viable option for sustainable agriculture. In **Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects** (pp. 157-168). Springer, Singapore. 2019.

SINGH, R. P., JHA, P. N., & JHA, P. N. The role of *Trichoderma* in sustainable agriculture. **Reviews in Agricultural Science**, 4, 1-15. 2016.

SINGH, R. P.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, P. K. Mass production of *Trichoderma harzianum* for the control of chickpea wilt. **Archives of Phytopathology and Plant [Protection**, v. 40, n. 3, p. 189-197, 2007.



SRIRAM, S.; ROOPA, L.; SAVITHA, B. Production and optimization of *Trichoderma viride* spores in solid state fermentation using agricultural residues. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 15, n. 3, p.437-442, 2011.

STEYAERT, J. M., WELD, R. J., & STEWART, A. Growth and conidiation responses of *Trichoderma harzianum* isolates to light of different wavelengths. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 101(2), 71-76. 2010

TEIXEIRA, M.A.; RESENDE, R.S.; GUIMARÃES, J.A. Controle biológico de pragas: uma alternativa sustentável. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 3, n. 2, p. 129-141, 2010.

KREDICS, L., ANTAL, Z., DÓCZI, I., MANCZINGER, L., KEVEI, F., NAGY, E., ... & VÁGVÖLGYI, C. Clinical importance of the genus *Trichoderma*: a review. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 50(2-3), 105-117. 2003.  
VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L., RUOCCO, M., WOO, S. L., & LORITO, M. *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. **Natural Product Reports**, 25(3), 393-411. 2008.

YANG, J., HUANG, Z., XIE, J., WANG, X., & LIU, L. Enhanced production of chlamydospores in submerged cultures of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* by regulating agitation speed. **Journal of Basic Microbiology**, 60(5), 453-461. 2020.

ZHANG, F., XU, H., LIU, X., ZHANG, X., & XU, Z. Continuous feeding of substrate to enhance cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Bioresource technology**, 155, 39-44. 2014.

ZHANG, F., LIU, X., XU, H., WANG, Y., ZHANG, X., & XU, Z. Comparison of solid-state and submerged fermentation of *Trichoderma reesei* for the production of cellulase using corn stover as a carbon source. **Industrial Crops and Products**, 67, 61-68. 2015.

ZHAO, X., LI, J., & YUAN, Y. Genome editing of filamentous fungi for efficient industrial production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 105(3), 821-833. 2021.