

# Produção industrial de *Trichoderma*

*Gabriel Moura Mascarin*

*Aida Teresinha Santos Matsumura*

*Celson Alexandre Weiler*

*Nilce Naomi Kobori*

*Márcia Eloísa da Silva*

*Diouneia Lisiane Berlitz*

*Akio Santos Matsumura*

## Introdução

Produtos biológicos estão em crescente demanda no manejo de grandes culturas no Brasil e no mundo. Atualmente existem diferentes produtos microbianos registrados no Brasil, entre esses destaca-se o fungo pertencente ao gênero *Trichoderma* para o controle de patógenos radiculares ou habitantes do solo e substrato, e também da parte aérea das plantas.

Ampliações na produção de produtos biológicos devem ser cuidadosamente programadas e avaliadas nas indústrias, para que aumentos na produção de *Trichoderma* spp. para uso comercial não gerem problemas relacionados com a qualidade final das formulações, entre os quais a viabilidade dos conídios produzidos que é de suma importância ao sucesso da comercialização e aplicação desse fungo em programas de controle biológico de doenças de plantas (Lopes, 2009).

Condições nutricionais adequadas durante o crescimento da cultura e esporulação tendem a favorecer a acumulação de reservas endógenas apropriadas, de forma que os esporos recém-formados apresentem qualidades vantajosas ou adequadas (Jackson et al., 1997). É imprescindível, portanto, encontrar as combinações ideais dos fatores bióticos e abióticos envolvidos na produção de biomassa que resulte em maior rendimento de esporos ou outros propágulos de interesse, via fermentação sólida estática ou fermentação líquida submersa, sendo essas duas os principais métodos de produção massal desse fungo no Brasil e no mundo. A viabilidade econômica da produção massal de uma estirpe selecionada, bem como o desenvolvimento de um produto estável e duradouro, ou seja, formulação apropriada, são fatores-chave para o êxito do produto biológico (Leite, 2012).

*Trichoderma* spp., assim como a grande maioria dos outros microrganismos quimiotróficos, obtém energia estocada em ligações químicas de vários compostos, principalmente orgânicos, para crescerem e se multiplicarem. Logo, o fungo também requer fontes de carbono de origem mais complexa. Para o crescimento adequado de *Trichoderma* spp., é necessária uma série de fatores nutricionais, os quais são representados pelos elementos químicos C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, etc. Esses nutrientes assumem importância vital à manutenção do metabolismo celular primário e secundário, sendo responsáveis pela formação de material celular (ex: organelas, parede celular, membranas etc.) ou produtos (ex.: enzimas, metabólitos secundários, proteínas etc.) (Cochrane, 1958).

Carboidratos são referidos como fontes de carbono, apesar de eles também proverem hidrogênio e oxigênio. Proteínas e aminoácidos são importantes fontes de nitrogênio, embora fontes inorgânicas possam ser empregadas no crescimento de *Trichoderma* spp., tais como sais de amônio e nitratos (Danielson; Davey, 1973). As fontes orgânicas de nitrogênio também provêm carbono, oxigênio, hidrogênio e enxofre, que são os elementos estruturais dos componentes celulares e outros produtos. Há inúmeras opções de fontes de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas disponíveis na forma de matérias-primas de origem vegetal e animal e que são, na sua grande maioria, resíduos agroindustriais de baixo custo. Apesar da incrível variabilidade genética entre espécies e isolados de *Trichoderma* aliada à sua ampla diversidade nutricional e física para crescimento *in vitro*, é importante salientar que os estudos de otimização das condições ambientais e nutricionais para sua produção em larga escala devem ser conduzidos caso a caso.

Este capítulo tem por objetivo relatar, em linhas gerais, os principais sistemas de produção massal de *Trichoderma* spp. no Brasil e prover informações embasadas na ecofisiologia nutricional desse fungo, com relevância ao sucesso do seu cultivo pela fermentação sólida estática, bifásica ou líquida submersa.

### **Fermentação em Estado Sólido de *Trichoderma* spp.**

O processo de produção massal de um microrganismo visa à obtenção de um produto com características específicas de pureza, abundância em estruturas infectivas, viabilidade em armazenamento, economia na produção, conveniência na utilização e transporte, facilidade de aplicação e eficiência no controle do patógeno-alvo.

Os esporos constituem-se, essencialmente, em células envolvidas por parede celular que as protegem de condições ambientais adversas à sua germinação, garantindo assim a sobrevivência do fungo. Abordagens voltadas para a otimização de meios de cultura devem considerar não apenas o rendimento de esporos, mas também a qualidade dos mesmos, que inclui aspectos como tolerância à dessecação, estabilidade em uma preparação seca, e eficácia no controle biológico em si (Leite et al., 2012).

Nesse sentido, a produção industrial de *Trichoderma* spp. é realizada através de diferentes tipos de fermentação. O cultivo por meio da fermentação em estado sólido, também chamada fermentação semi-sólida ou fermentação em meio semi-sólido ou fermentação sólida estática, aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos na ausência de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à matriz sólida formando uma fina camada na superfície das partículas (Raimbault, 1998). Para Arora et al. (2017), a fermentação em estado sólido é a melhor opção para produção massal de biopesticidas, uma vez que o microrganismo vai crescer em substrato semelhante ao seu hábitat natural. O substrato selecionado deve considerar o tamanho das partículas (de 180  $\mu\text{m}$  a 1,4 mm), o grau de polimerização e cristalinidade, fatores físicos como temperatura, pH, atividade de água ( $a_w$ ) e aeração. Parâmetros como tipo e concentração de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, pH, umidade e temperatura representam variáveis operacionais determinantes no processo de fermentação em estado sólido (Singhania et al., 2010).

Estudos sobre fatores nutricionais, físicos, químicos e biológicos envolvidos no processo de esporulação não evidenciaram nenhum conjunto de parâmetros ótimos e gerais aplicáveis a uma determinada espécie de fungo, podendo inclusive estar relacionados aos requerimentos específicos de cada isolado dentro das espécies fúngicas de interesse (Steyaert et al., 2010). A presença ou ausência de luz exerce um efeito interativo com as exigências nutricionais na esporulação, e os demais estímulos abióticos combinados com diferentes condições resultam em sistemas de interação com as fontes de carbono disponíveis (Schmoll et al., 2010; Friedl et al., 2008).

A luz é muito importante para a esporulação de *Trichoderma* onde a maioria das espécies necessita de luz para o início da conidiogênese. *Trichoderma* é definido como fungo de “luz azul”, pois para a produção de conídios a energia luminosa pode variar desde o espectro próximo ao ultravioleta até o azul (320 - 500 nm). A etapa inicial da percepção da luz pelos fotorreceptores não depende da presença de oxigênio molecular e da temperatura. Mas é dependente do estado metabólico das células. As células mais jovens e metabolicamente mais ativas são mais sensíveis a presença de luz. Após a etapa inicial vem a fase de alterações fisiológicas e morfológicas e nessa fase a esporulação depende de processos oxidativos, sendo que a produção de esporos é inibida nas hifas que crescem na ausência de oxigênio. Ciclos alternados de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (fotoperíodo de 12 horas) são utilizados, pois assemelham-se mais às condições do ambiente natural. Cerca de 24 horas após o início do estímulo luminoso, inicia-se a fotoconidiação, enquanto a maturação dos conídios pode levar até 5 dias, dependendo da espécie (Steyaert et al., 2010; Casas-Flores; Herrera-Estrella, 2013; Steyaert et al., 2013).

A água apresenta papel de destaque na fermentação estado sólido, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (Gervais; Molin, 2003). Na fermentação estado sólido, a água está relacionada a dois parâmetros: o primeiro se refere à umidade, que diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio; o segundo, a atividade de água ( $a_w$ ), que é a quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato afetando diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos. O nível de umidade varia de acordo com o ecossistema formado entre o microrganismo e o substrato. Baixos níveis de umidade levam à inibição do crescimento microbiano e, conseqüentemente, à ineficiente utilização do substrato. Em contrapartida, o excesso de umidade resulta na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam a respiração microbiana (Hölker et al., 2004).

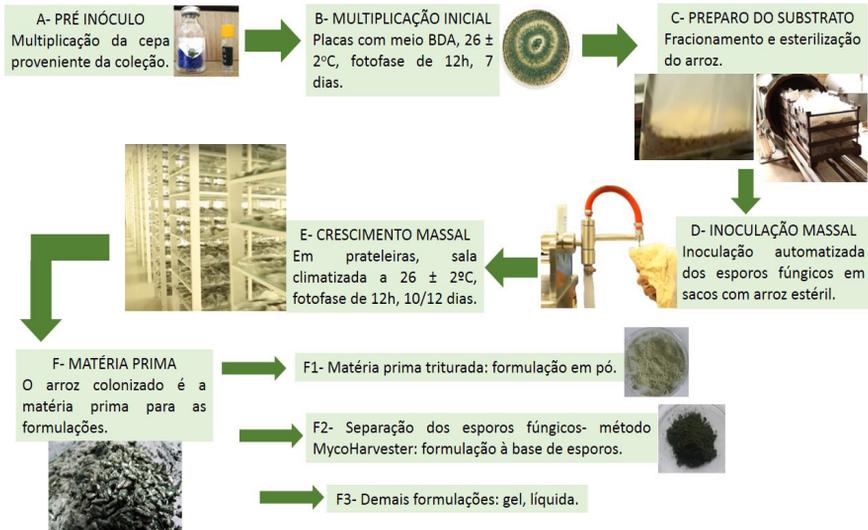
Grande parte das técnicas desenvolvidas para a produção de fungos entomopatogênicos no Brasil consiste no uso de cereais ou grãos pré-cozidos como substrato, principalmente arroz, a qual foi iniciada no final da década de 1960 sendo esta técnica transferida para a produção massal de *Trichoderma* spp. Durante as décadas seguintes, adaptações no sistema tornaram o processo mais prático e a produção mais eficiente (Lopes, 2009).

A grande maioria dos materiais viáveis para a biotransformação e utilizados como substratos são os grãos de arroz, milho, trigo, sorgo, milheto, farelos, cascas (Hewavitharana et al., 2018; Sargin et al., 2013; Cavalcante et al., 2008), por apresentarem como principais componentes a celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, além de vitaminas e minerais.

A produção massal em substrato sólido deve iniciar com a multiplicação de cada cepa proveniente da coleção (estoque), as quais podem ser preservadas desidratadas (liofilizadas) e criopreservadas em nitrogênio líquido, ou sob ultracongelamento (-80 °C) para assegurar a manutenção de características morfológicas, fisiológicas e genética das mesmas. Segundo Sandhya et al., (2005) a concentração inicial do inóculo, em relação à quantidade de substrato utilizado, é um importante fator biológico, necessário para garantir a fermentação do meio, acelerar a colonização do substrato e não esgotar os nutrientes necessários para o desenvolvimento pleno do microrganismo.

A multiplicação para obtenção do inóculo inicial é realizada em placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) com meio comercial de batata-dextrose-ágar (BDA), as quais são mantidas em câmara de crescimento do tipo B.O.D., à temperatura de  $26 \pm 2$  °C, UR > 60%, com 12 horas de fotofase durante a 7 dias (Figura 1A e 1B). A próxima etapa é o fracionamento do arroz em sacos de polipropileno (40 x 25 cm), preenchendo 1/3 do volume total, sendo em seguida esterilizados durante 25 minutos a 120 °C (1 atm) (Figura 1C). Nesse substrato é realizada a inoculação mecanizada de uma suspensão a  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> de *Trichoderma* spp. oriunda da multi-

plicação do inóculo inicial (Figura 1D). Esse material permanece horizontalmente em salas climatizadas a  $26 \pm 2$  °C, 12 horas de fotofase por um período de 10 a 12 dias, para a obtenção do maior índice de desenvolvimento e esporulação do fungo no arroz (Figura 1E).



**Figura 1.** Processo de produção massal de *Trichoderma* spp. em substrato sólido.

Fonte: Aida Terezinha Santos Matsumura.

Além da fermentação estado sólido, pode-se realizar a fermentação através do processo bifásico, onde o fungo é produzido inicialmente em meio líquido seguido de meio sólido. Nesse processo ocorre alta produção de biomassa através do cultivo em meio líquido e após a produção de conídios estáveis e hidrofóbicos no meio sólido (Jenkins; Goettel, 1997). Nesta fermentação aspectos como o tempo de produção da fonte de inóculo em meio líquido, quantidade da fonte de inóculo transferida ao meio sólido e compatibilidade dos substratos envolvidos podem determinar o incremento da produção (Machado et al., 2013; Moraes et al., 2014).

Na fermentação bifásica descrita por Santos (2017) o meio líquido utilizado foi à base de glicose e extrato de levedura contendo  $45 \text{ g L}^{-1}$  de fonte de carbono e  $36 \text{ g L}^{-1}$  de fonte de nitrogênio. Na pesquisa mencionada, 10 mL de suspensão fúngica a  $5,0 \times 10^6$  conídios/mL com 0,05% de Tween® 80 foi inoculada em 90 mL de meio líquido em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos são então acondicionados à 28 °C em mesa agitadora orbital a 325 rpm sendo homogeneizados manualmente e diariamente para evitar crescimento micelial e esporulação nas paredes do frasco. Após incubação de 3 dias, este meio com  $> 1,0 \times 10^8$  propágulos

mL<sup>-1</sup> é inoculado em substratos sólido (arroz e/ou farelos) e materiais inertes (suportes de esporulação e crescimento). Após inoculação, os sacos são incubados a 25 ± 2 °C, UR 70 ± 10% e fotofase de 12 horas, durante 10 dias. Após esse período de incubação, os conídios são extraídos do substrato por lavagem em água.

Após a finalização do processo de multiplicação massal, a matéria prima composta de arroz colonizado por fungo deverá passar pelo processo de secagem em estufa a 28±2 °C com circulação forçada de ar. Após a secagem, a matéria-prima pode ser processada através de diferentes tecnologias: (i) processo de trituração mecânica dos grãos de arroz colonizados com o fungo, resultando na formulação em pó (Figura 1 F1); (ii): separação dos esporos fúngicos através da metodologia de MycoHarvester, resultando na formulação à base de esporos secos (Figura 1 F2); (iii): processo de lavagem da matéria prima resultando em formulações à base de gel ou líquidas. Neste contexto da fermentação sólida usando arroz pré-cozido, o produto final é a obtenção de conídios aéreos de *Trichoderma* para formulação e comercialização. Apesar de *Trichoderma* também produzir clamidósporos em substratos sólidos, esta produção é muito baixa e pouco explorada em produtos comerciais, sendo inexistente no Brasil.

Quando a empresa utiliza mais de uma espécie e ou diferentes isolados de *Trichoderma* spp., os mesmos devem ser cultivados separadamente e a mistura será feita somente na etapa de formulação do produto final. A formulação final do produto deve manter a estabilidade e aumentar a sobrevivência dos esporos durante o armazenamento, transporte e seu estabelecimento a campo.

O rendimento na produção de conídios de *Trichoderma* spp. está relacionado às espécies utilizadas no processo produtivo resultando em variações nas taxas de rendimento, além da influência das características nutricionais e físicas dos diferentes substratos sólidos empregados como fontes de carbono, nitrogênio e matriz para prover suporte físico e aeração (Tabela 1).

**Tabela 1.** Rendimento na produção massal de diferentes espécies de *Trichoderma* cultivados em substratos sólidos variados.

Isolado	Rendimento	Substrato	Referência
CEN 287- <i>T. harzianum</i>	1,6 x 10 <sup>8</sup> conídios mL <sup>-1</sup>	Arroz	Muniz et al., 2018
CEN 288- <i>T. harzianum</i>	2,6 x 10 <sup>8</sup> conídios mL <sup>-1</sup>	Arroz	Muniz et al., 2018
CEN 289- <i>T. harzianum</i>	1,4 x 10 <sup>8</sup> conídios mL <sup>-1</sup>	Arroz	Muniz et al., 2018
CEN 290- <i>T. harzianum</i>	2,5 x 10 <sup>8</sup> conídios mL <sup>-1</sup>	Arroz	Muniz et al., 2018
CEN 316- <i>T. harzianum</i>	0,5 x 10 <sup>8</sup> conídios mL <sup>-1</sup>	Arroz	Muniz et al., 2018
<i>T. harzianum</i>	2,1 a 5,8 10 <sup>8</sup> esporos g <sup>-1</sup>	Arroz	Cavalcante et al., 2008
<i>T. harzianum</i>	2,3 a 7,4 10 <sup>8</sup> esporos g <sup>-1</sup>	Farelo de milho	Cavalcante et al., 2008
<i>T. harzianum</i>	5,1 a 28,3 10 <sup>8</sup> esporos g <sup>-1</sup>	Farelo de trigo	Cavalcante et al., 2008
<i>T. viride</i>	1,8 a 5,7 10 <sup>8</sup> esporos g <sup>-1</sup>	Arroz	Cavalcante et al., 2008

continua...

Tabela 1. Continuação

Isolado	Rendimento	Substrato	Referência
<i>T. viride</i>	2,3 a 6,8 $10^8$ esporos $g^{-1}$	Farelo de milho	Cavalcante et al., 2008
<i>T. viride</i>	1,9 a 24 $10^8$ esporos $g^{-1}$	Farelo de trigo	Cavalcante et al., 2008
<i>T. koningii</i>	2,3 a 5,7 $10^8$ esporos $g^{-1}$	Arroz	Cavalcante et al., 2008
<i>T. koningii</i>	1,1 a 6,1 $10^8$ esporos $g^{-1}$	Farelo de milho	Cavalcante et al., 2008
<i>T. koningii</i>	2,8 a 8,8 $10^8$ esporos $g^{-1}$	Farelo de trigo	Cavalcante et al., 2008
<i>T. polysporum</i>	1,4 a 4 $10^8$ esporos $g^{-1}$	Arroz	Cavalcante et al., 2008
<i>T. polysporum</i>	0,1 a 2,6 $10^8$ esporos $g^{-1}$	Farelo de milho	Cavalcante et al., 2008
<i>T. polysporum</i>	1,7 a 6,5 $10^8$ esporos $g^{-1}$	Farelo de trigo	Cavalcante et al., 2008
<i>T. harzianum</i> EGE-K38	1 x $10^{10}$ esporos $g^{-1}$	Farelo de trigo	Sargin et al., 2013
<i>T. harzianum</i> EGE-K38	9,2 x $10^9$ esporos $g^{-1}$	Farelo de Arroz	Sargin et al., 2013
<i>T. harzianum</i> EGE-K38	4 x $10^8$ esporos $g^{-1}$	Semente de algodão	Sargin et al., 2013
<i>T. harzianum</i> EGE-K38	5 x $10^8$ esporos $g^{-1}$	Bagaço de uva	Sargin et al., 2013
<i>T. harzianum</i> EGE-K38	2,8 x $10^8$ esporos $g^{-1}$	Serragem	Sargin et al., 2013
<i>T. harzianum</i> EGE-K38	3,6 x $10^7$ esporos $g^{-1}$	Casca de noz	Sargin et al., 2013
<i>T. viride</i>	6,5 x $10^4$ UFC $mL^{-1}$	Pó de coco	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. viride</i>	6 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Pó de serra	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. viride</i>	5 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Arroz	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. asperellum</i>	5,5 x $10^4$ UFC $mL^{-1}$	Pó de coco	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. asperellum</i>	4,5 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Pó de serra	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. asperellum</i>	3,5 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Arroz	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. harzianum</i>	6,5 x $10^4$ UFC $mL^{-1}$	Pó de coco	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. harzianum</i>	5,5 x $10^4$ UFC $mL^{-1}$	Pó de serra	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. harzianum</i>	4,5 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Arroz	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. longibrachiatum</i>	7 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Pó de coco	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. longibrachiatum</i>	6 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Pó de serra	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. longibrachiatum</i>	6,5 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Arroz	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. virens</i>	7 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Pó de coco	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. virens</i>	6,5 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Pó de serra	Hewavitharana et al., 2018
<i>T. virens</i>	6 x $10^6$ UFC $mL^{-1}$	Arroz	Hewavitharana et al., 2018

Em relação ao armazenamento, apesar de não existir uma padronização nas metodologias de avaliação, as empresas aferem a qualidade de seus produtos por basicamente três critérios: contagem de esporos (mínimo de  $1 \times 10^8$  conídios  $g^{-1}$ ), germinação (mínimo de 85%) e viabilidade (mínimo de  $8,5 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$ ). A vida de prateleira dos produtos varia de 30 a 180 dias em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) e 180 a 360 dias em geladeira ou câmara fria (4 a 6 °C) (Morandi; Bettiol, 2009).

Todo processo de fabricação deve passar por um controle de qualidade e seguir as normas de boas práticas de fabricação, sendo acompanhado pelo sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) visando à garantia, efetividade e eficácia do controle dos

perigos à produção. Paralelo ao processo de produção, faz-se necessário o desenvolvimento de um rigoroso procedimento de controle de qualidade, o que permitirá acompanhar qualquer variação ou contaminação que possa ocorrer durante o processo de produção e posterior armazenamento do produto.

Esse controle de qualidade visa garantir a concentração, a pureza, a viabilidade, a determinação taxonômica (no caso de diferentes espécies) para a manutenção das características desejadas no produto final. Para garantir a qualidade final do produto, é necessário o monitoramento do processo desde a manutenção das cepas até seu estabelecimento a campo. O monitoramento do processo deve ser feito por pessoas aptas a detectar qualquer falha no processo produtivo. O controle de qualidade será abordado no capítulo 9.

Os dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa) mostram o total de produtos registrados no Brasil. São considerados produtos de baixa toxicidade os biológicos, microbiológicos, semioquímicos, bioquímicos, extratos vegetais ou de uso na agricultura orgânica. Para o ano de 2019, do total de 1.210 defensivos, apenas 1,4% se caracterizam como produtos biológicos sendo menos de 1% de produtos destinados à agricultura orgânica.

Produtos registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e (Agrofit, c2003), como fungicidas ou nematicidas incluem as espécies de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma stromaticum* e *Trichoderma koningiopsis*.

Nesse contexto, as diferentes formulações destes fungicidas e nematicidas registrados no Brasil à base de *Trichoderma* spp. se distribuem em WP: pó-molhável; WG: grânulos dispersíveis; SC: suspensão concentrada; EC: concentrado emulsionável. Devido à diversidade de condições climáticas, alvos e preferência de mercado, um único microrganismo poderá ser formulado de maneiras distintas para atender a diferentes mercados. Assim, existe disponível para consultas o índice de códigos e as denominações das diferentes formulações, segundo a terminologia ABNT NBR 12679/2018 (Associação..., 2013). Adicionalmente, a norma ABNT NBR 8510/2018 rege sobre as características físicas de cada tipo de formulação (Associação..., 2013).

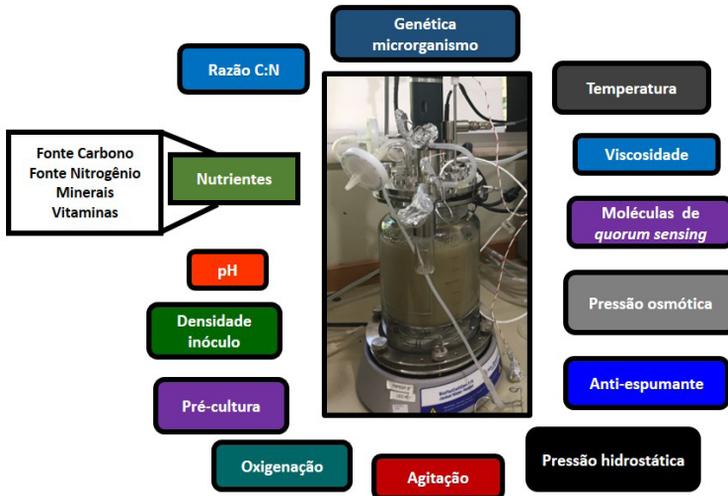
### Fermentação Líquida Submersa de *Trichoderma* spp.

A fermentação líquida submersa é um método amplamente difundido e utilizado na produção de biomassa microbiana, enzimas e metabólitos secundários de microrganismos com múltiplas funções e aplicações nos setores veterinário, farmacêutico, alimentício e agrícola. Tradicionalmente, a fermentação microbiana consiste em um processo anaeróbico, sem presença de oxigênio, baseado na transformação de substratos orgânicos em moléculas mais simples com baixa geração de energia na forma de ATP e baixa produção de biomassa celular. A fermentação aeróbica, ao contrário, envolve um processo de fosforilação oxidativa na pre-

sença de oxigênio que ocorre durante a respiração celular, gerando alta produção de energia e de biomassa microbiana. Este tipo de fermentação na presença de oxigênio é, portanto, o principal bioprocessamento visando à produção massal de biomassa de microrganismos benéficos, que também são aeróbicos facultativos, para exploração como agentes de controle biológico.

Os componentes de um meio líquido para fermentação de *Trichoderma* spp. demandam nutrientes classificados em fontes de carbono e nitrogênio, componentes inorgânicos (sais minerais) e vitaminas, de acordo com a função no meio de cultivo. Em ordem de grandeza e exigência ao crescimento de *Trichoderma* spp., carbono, oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e enxofre são os nutrientes exigidos em maiores concentrações nesta ordem (Zabriskie et al., 2008).

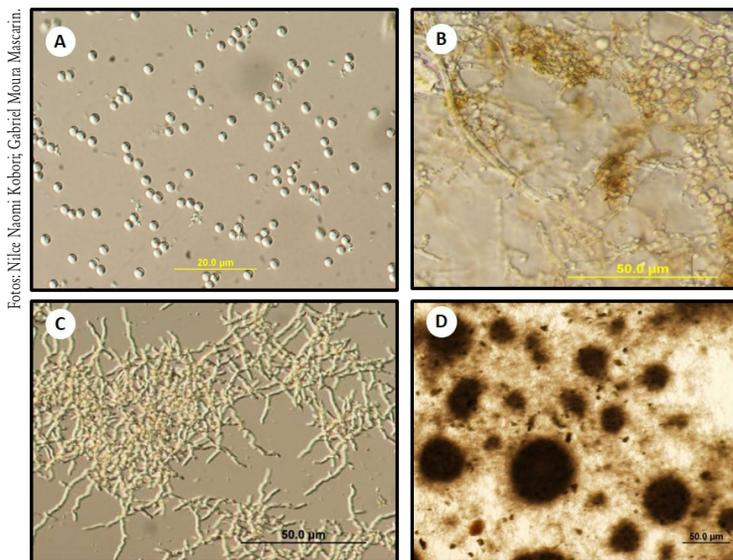
A composição nutricional do meio de cultura líquido bem como os fatores físicos do ambiente de produção exerce uma forte influência na formação, rendimento e qualidade dos propágulos cultivados durante a fermentação líquida. Os principais fatores que podem impactar de forma significativa nas culturas líquidas de *Trichoderma* spp. estão indicados na Figura 2.



**Figura 2.** Fatores físicos, químicos, genéticos e nutricionais que afetam as variáveis de crescimento de *Trichoderma* sob cultivo submerso em biorreatores com agitação mecânica.

Fonte: Gabriel Moura Mascarin.

No sistema de fermentação líquida submersa, é possível produzir diferentes propágulos de *Trichoderma* spp., diferentemente da fermentação em estado sólido em que apenas conídios e micélio são geralmente obtidos. Portanto, a fermentação líquida submersa confere excelente versatilidade ao desenvolvimento de diferentes propágulos fúngicos, tais como conídios submersos, micélio, microescleródios e clamidósporos, conforme ilustrados na Figura 3.



**Figura 3.** Exemplos de propágulos submersos de *Trichoderma harzianum* (cepa T-22) produzidos sob cultivo líquido. A) Conídios submersos, B) Clamidósporos, C) Micélio e D) Microscleródios (notar a pigmentação escura dessas estruturas).

A Tabela 2 mostra as principais diferenças e aplicações desses diferentes propágulos de *Trichoderma* em comparação com os conídios aéreos, sendo que a fermentação líquida submersa leva uma grande vantagem no quesito tempo de cultivo, que geralmente é mais curto do que no sistema de fermentação em estado sólido.

**Tabela 2.** Rendimentos e tempos de produção de diferentes propágulos de *Trichoderma* spp. para uso como ingrediente ativo em produtos comerciais.

Propágulo	Forma de fermentação	Rendimento	Tempo de fermentação	Eficácia	Armazenamento <sup>1</sup>	Forma de aplicação
Conídios aéreos	Substrato sólido	$5 \times 10^8$ conídios g <sup>-1</sup> substrato	Variável (1-3 semanas)	Boa - Excelente	3 a 12 meses	Solo, parte aérea, sementes
Micélio	Fermentação sólida ou líquida	Muito variável (1 a 50 mg mL <sup>-1</sup> )	>1 dia	Regular - Boa	1 a 6 meses	Solo, parte aérea e sementes
Conídios submersos	Fermentação líquida	$1 \times 10^7$ a $2 \times 10^9$ conídios mL <sup>-1</sup>	3 a 10 dias	Regular - Boa	1 a 6 meses	Solo, parte aérea, sementes
Clamidósporos	Fermentação líquida	$1 \times 10^2$ a $2 \times 10^6$ clamidósporo mL <sup>-1</sup>	3 a 10 dias	Boa - Excelente	12 meses	Solo e sementes
Microscleródios	Fermentação líquida	$2 \times 10^2$ a $5 \times 10^4$ microscleródios mL <sup>-1</sup>	3 a 7 dias	Boa - Excelente	12 meses	Solo e sementes

<sup>1</sup>O tempo de prateleira dos propágulos de *Trichoderma* vai depender da espécie e isolado do fungo, bem como das condições nutricionais do meio de produção que impactam na sua qualidade e também nas condições de armazenamento (temperatura, tipo de embalagem, vácuo, umidade final dos propágulos, método de secagem e tipo de formulação).

Há inúmeros estudos entre as décadas de 1980 e 1990 que demonstram a viabilidade e facilidade em se produzir, principalmente, conídios submersos, micélio e clamidósporos de várias espécies de *Trichoderma* spp. em meios líquidos sob cultivo submerso utilizando ingredientes, muitas vezes, de baixíssimo custo, tais como levedo de cerveja e melão de cana, como é relato resumidamente a seguir. Um sistema de fermentação líquida para espécies de *Trichoderma* e *Gliocladium* foi desenvolvida por Papavizas et al., (1984) usando um garrafão plástico autoclavável de 20 L para escalonar a produção de *Trichoderma* em um volume útil de 7-10 L de caldo fermentando contendo conídios submersos. Um sistema de injeção de ar estéril por meio de compressores de aquário foi adaptado com filtros e tubulação a fim de fornecer oxigenação ao meio de cultivo líquido.

Neste sistema, o meio líquido utilizado foi composto de melão (3%) e levedo de cerveja (0,5%), o que proporcionou ao final de 10-15 dias de fermentação um rendimento máximo de  $3,2 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$  de biomassa fúngica seca de *T. harzianum*. Esta biomassa fúngica seca consistiu basicamente em conídios submersos, clamidósporos e micélio. Desses, clamidósporos foram aqueles que persistiram e sobreviveram por mais tempo após inoculação em solo, após formulação e secagem com pirofilita, um mineral filossilicato composto do hidróxido de silicato de alumínio. Mais adiante, Jin et al. (1991), resolveram modificar a atividade de água e, conseqüentemente, a pressão osmótica do meio líquido (RM8), composto por meio de Richard suplementado com suco de extratos vegetais chamado V8, para crescimento de *T. harzianum* a 30 °C e 150 rpm com o intuito de aumentar a sua produção de conídios submersos e tolerância à secagem a vácuo. Para isso, os autores usaram como osmólito o polímero polietileno glicol 200 (PEG 200) adicionado a 6% (v/v) ao meio RM8 gerando um potencial hídrico de -1,88 MPa. Esses mesmos autores verificaram que a adição de PEG 200 ao meio RM8 em fases mais iniciais do crescimento (0 ou 24 horas) da cultura líquida do fungo permitiu desencadear o processo de conidiogênese ou esporulação submersa mais precocemente. A produção máxima foi em torno de  $6 \times 10^8$  conídios submersos  $\text{mL}^{-1}$  em 84 h de cultivo e essas células apresentaram alto teor de trealose na sua massa seca, o que lhes conferiu uma maior tolerância à dessecação (Jin et al., 1991; Harman et al., 1991).

Em seguida, Jin et al. (1996) produziram conídios submersos de *T. harzianum* (cepa T-22) em meio modificado de RM8 adicionado de 9% de glicerol em um fermentador de bancada (1,5 L) a 32 °C com 50% de saturação de ar e agitação mecânica de 1000 rpm, cujo resultado revelou uma concentração final de  $1,1 \times 10^{11}$  conídios submersos  $\text{g}^{-1}$  de biomassa seca (conídios + micélio) em 68 h de cultivo, após inoculação do meio com pré-cultura líquida de 2 dias de idade. Novamente, esses conídios foram tolerantes à dessecação em função da alta pressão osmótica gerada pelo glicerol no meio de cultivo, conferindo às células esta qualidade fenotípica.

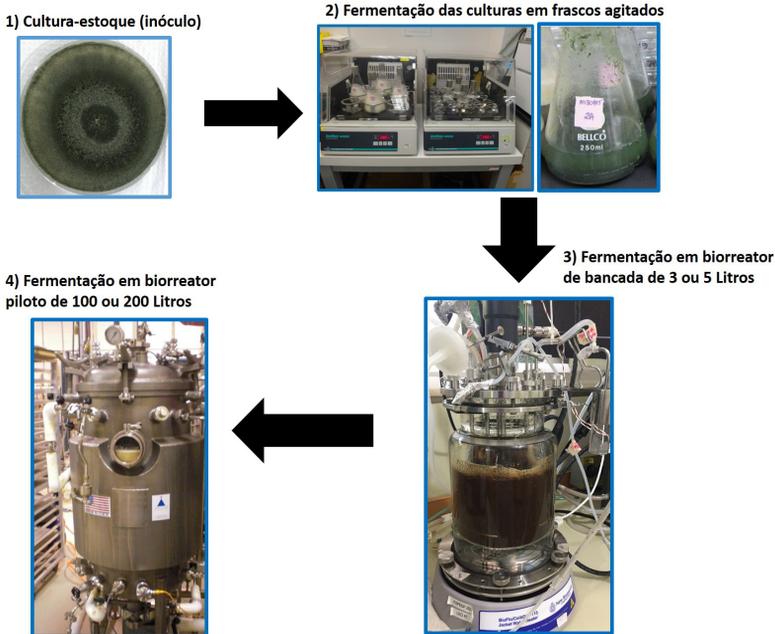
Em estudo realizado por Sriram et al. (2011), notou-se que a adição de glicerol ao meio líquido de produção de conídios submersos de *T. harzianum* conferiu um tempo de prateleira prolongado por até 12 meses sob armazenamento à temperatura ambiente com variação de 23 a 29 °C, o que é uma característica extremamente desejável em um bioproduto comercial. Outros trabalhos prévios que reportam esforços em otimizar a produção de conídios submersos de *Trichoderma* spp. não tiveram tanto sucesso, pois os rendimentos obtidos ficaram na faixa de 4,1 a 9,2 x 10<sup>7</sup> conídios submersos mL<sup>-1</sup> com até 3 dias de cultivo (Jakubikova et al., 2006; Syahiddin, 2007). Entretanto, as exigências nutricionais e ambientais requeridas ao crescimento em fermentação líquida podem variar consideravelmente entre espécies e cepas de *Trichoderma*, o que implica em estudos de otimização caso a caso.

Um dos trabalhos que, recentemente, foi considerado um divisor de águas na história da produção massal de *Trichoderma* spp. resgatou e aperfeiçoou o método de fermentação líquida submersa para manipular as condições nutricionais e ambientais durante o crescimento deste fungo, de forma a produzir propágulos usando um meio de baixo custo e com alta eficiência no processo, menor dependência de mão de obra e proporcionando uniformidade e qualidade ao produto final mediante controle mais rigoroso dos parâmetros fermentativos. Este trabalho, de cunho disruptivo, foi concretizado por meio de uma parceria entre um grupo de pesquisadores brasileiros e outro de pesquisadores norte-americanos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) de Peoria, Illinois, cujos resultados renderam um artigo e uma patente onde descrevem a composição e o processo produção via fermentação líquida submersa de um propágulo de resistência de *Trichoderma* denominado microescleródio (Kobori et al., 2015; Jackson et al., 2015 patente). Na natureza, não há relatos sobre a formação de microescleródios por *Trichoderma* até o presente momento, o que torna esta estrutura fúngica singular ao seu desenvolvimento induzido somente meio líquido artificial. No entanto, não é possível descartar a hipótese de que *Trichoderma* possa formar esta estrutura de resistência nos seus mais variados nichos ecológicos. Por definição, microescleródio é considerado uma estrutura pluricelular formado por células do pseudoparênquima e geralmente acompanhadas de pigmentação mais escura, ou simplesmente é formado por agregados de hifas compactadas com deposição de quitina e pigmentos durante sua maturação fisiológica, tornando-se uma estrutura densa e melanizada, semelhante a escleródios de fungos fitopatogênicos, porém numa escala micrométrica variando de 50 a 500 µm em tamanho (Jackson; Payne, 2016).

Geralmente, os fungos filamentosos, em especial aqueles com ação fitopatogênica, formam microescleródios para superar e sobreviver a condições nutricionais e ambientais desfavoráveis, oferecendo uma vantagem adaptativa. A descoberta da formação de microescleródios em espécies de *Trichoderma* spp. abre uma nova abordagem ao desenvolvimento de produtos mais persistentes no campo para aplicação via tratamento de sementes ou diretamente no

solo. Não obstante, há ainda carência de estudos comparando a bioeficácia e persistência entre microescleródios e conídios aéreos em condições de campo.

O processo de fermentação líquido submerso desenvolvido para *Trichoderma* spp. visa produzir rapidamente e de forma econômica propágulos estáveis denominados microescleródios para uso em controle de doenças de plantas e promoção do crescimento vegetal. Usando a fermentação líquida e condições nutricionais e ambientais apropriadas ao crescimento de *Trichoderma* spp. em biorreatores de 5 até 100 L de capacidade, foi possível otimizar sua produção chegando a rendimentos simultâneos de  $5-10 \times 10^6$  microescleródios  $L^{-1}$  e  $1-2 \times 10^{12}$  conídios submersos  $L^{-1}$  em apenas 3 dias de cultivo, com uso de pré-culturas líquidas de 3 dias de idade para inoculação (Figura 4).



**Figura 4.** Sequência da produção de biomassa de *Trichoderma* spp. por fermentação líquida submersa e o processo de escalonamento em biorreatores com agitação mecânica.

Fonte: Nilce Naomi Kobori; Gabriel Moura Mascarin.

O custo do meio líquido para atingir esses rendimentos de produção foi estimado em menos de 20 centavos de dólar norte-americano (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resultados e custo de produção de microescleródios de *Trichoderma harzianum* (cepa T-22) em fermentação líquida submersa usando um biorreator com agitação mecânica.

Atributos	Resultados
Custo do meio líquido de produção	<US\$0,20 L <sup>-1</sup>
Tempo curto de fermentação	3-4 dias
Altos rendimentos de microescleródios (MS)	1 x 10 <sup>8</sup> MS L <sup>-1</sup> , biomassa seca 30 g L <sup>-1</sup>
Tolerância à dessecação	90-100% após 24 horas de incubação
Excelente vida-de-prateleira	Mínimo de 12 meses a 4 °C e mínimo de 6 meses a 28 °C.
Eficácia de biocontrole	Excelente - conídios oriundos dos microescleródios são produzidos no próprio local em que são aplicados.

Fonte: Patente US9642372B2 - Jackson, Mascarin e Kobori, 2015.

Kobori et al. (2015) testaram diferentes concentrações de carbono total e variações da razão C:N em meios de cultivo. Os resultados revelaram que nos meios com menor razão C:N e baixo teor de carbono no meio (8 g L<sup>-1</sup>), ou seja meios pobres em nitrogênio e carbono, houve sempre uma maior produção de conídios submersos, cujo início da formação dessas células se dava geralmente no início do cultivo entre 24 a 36 horas. Ao contrário desta tendência, meios com maiores razões C:N e maior teor de carbono (36 g L<sup>-1</sup>) produziram tanto microescleródios quanto conídios submersos, porém em meios com razão C:N menores (30:1 e 10:1) induziram somente a formação de microescleródios em quantidades consideravelmente elevadas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Influência das variáveis concentração de glicose (g L<sup>-1</sup>), ácidos casamínicos (g L<sup>-1</sup>), carbono total (g L<sup>-1</sup>) e razão C:N na produção de microescleródios e conídios submersos de *Trichoderma harzianum* (cepa T-22) após 4 dias de cultivo líquido submerso em frascos agitados a 300 rpm e a 28 °C com escotofase total.

Meio líquido	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	Ácidos casamínicos (g L <sup>-1</sup> )	Carbono (g L <sup>-1</sup> )	Razão C:N	Conídio submerso (x10 <sup>10</sup> L <sup>-1</sup> )	Microescleródios (x10 <sup>8</sup> L <sup>-1</sup> )	Conídios produzidos em grânulos de MS (x10 <sup>10</sup> g <sup>-1</sup> )
1	10	10	8	10: 1	25,4 b <sup>†</sup>	0 b <sup>†</sup>	-
2	16,6	3,4	8	30: 1	32,1 ab	0 b	-
3	18	2	8	50: 1	15,8 c	0 b	-
4	45	45	36	10: 1	0 d	48,3 a	1,52 a <sup>†</sup>
5	75	15	36	30: 1	0 d	33,3 a	1,12 b
6	81	9	36	50: 1	49,9 a	25,8 a	0,99 c

Fonte: Kobori et al. (2015). <sup>†</sup>Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey-Kramer teste, P < 0,05).

Um fator de grande relevância para a indústria de biopesticidas é se os propágulos produzidos na fermentação líquida ou sólida de *Trichoderma* spp. são passíveis de secagem e estabilização para dar subsídio à formulação de um produto sólido com tempo de prateleira desejável de no mínimo 6 meses à temperatura ambiente (25-30 °C). Nesse contexto, outro resultado interessante gerado com essa pesquisa (Jackson et al., 2015 patente; Nilce N. Kobori, dados não publicados) foi a notável capacidade de esses propágulos submersos de *Trichoderma* se mostrarem recalcitrantes ao processo de secagem, necessário à obtenção de uma formulação sólida para posterior aplicação no solo ou em sementes. Uma das vantagens dos microescleródios é que estes são estruturas de resiliência com reserva nutricional suficiente para iniciar a germinação e produção *in situ* de uma grande quantidade de conídios aéreos, o que contribui para criar uma alta densidade de inóculo do fungo no solo ou na rizosfera das plantas tratadas.

A Figura 5 ilustra o processo de secagem via aeração forçada em cabine hermética com duração de até 16 horas (secagem lenta) e secagem e recobrimento simultaneamente de sementes com microescleródios e conídios submersos via leito fluidizado, mostrando subseqüentemente a viabilidade tanto do fungo quanto das sementes após reidratação em meio ágar-água (Nilce N. Kobori, dados não publicados). Os microescleródios secos na forma de grânulos, quando reidratados adequadamente, são capazes de germinar em menos de 24 horas e, subseqüentemente, produzem uma grande quantidade de conídios usando suas próprias reservas nutricionais (detalhe na Figura 5B).

Na Tabela 4, após secagem lenta de microescleródios formulados com terra diatomácea a 7,5% peso/volume (p/v), observa-se uma elevada produção de conídios a partir dos grânulos sob reidratação durante 7 dias em meio ágar-água. Essa concentração na magnitude de  $10^{10}$  conídios por grama de grânulos de microescleródios de *Trichoderma* é muitas vezes superior às concentrações de conídios aéreos declaradas em rótulos de produtos comerciais registrados no Brasil.

No quesito armazenamento, formulações secas compostas por grânulos de microescleródios de *Trichoderma* se mantiveram viáveis por um período superior a 12 meses sob armazenamento a 4 °C, e foram capazes de aumentar a germinação e sobrevivência de plântulas de melão expostas ao inóculo do patógeno *Rhizoctonia solani*, fungo causador da doença *damping-off* em inúmeras espécies vegetais (Kobori et al., 2015; Jackson et al., 2015 patente).

O processo de fermentação líquida submersa descrito por Kobori et al. (2015) e patenteada por Jackson et al. (2015) teve por objetivo aumentar a eficiência, qualidade e reduzir os custos de produção em larga escala de microescleródios e conídios submersos de *Trichoderma*, atrelado à baixa contaminação e alto rendimento de biomassa final. Além disso, a fermentação submersa é totalmente compatível aos equipamentos de processamento pós-produção para

Fotos: Nilce Naomi Kobori; Gabriel Moura Mascarin.



**Figura 5.** Métodos de secagem de microescleródios e conídios submersos de *Trichoderma* após produção por fermentação líquida submersa. A) Secagem lenta em câmara com aeração forçada. B) Teste de viabilidade e produção de conídios pelos grânulos de microescleródios formulados com inerte argilo-mineral, após 7 dias sob reidratação em meio ágar-água (2% m/v (massa/volume)). C) Leito fluidizado de bancada para testes em escala piloto com controle de vazão de atomização da calda fermentada contendo microescleródios e/ou conídios submersos de *Trichoderma* sp. e controle da temperatura de secagem. D) Detalhe do tratamento via recobrimento de sementes de trigo usando o leito fluidizado de bancada (fotos à esquerda) e, em seguida na foto à direita, detalhe da germinação das sementes acompanhada do crescimento e proliferação de *Trichoderma* sp. em meio ágar-água.

beneficiamento, extração, secagem e formulação de *Trichoderma* spp., uma vez que usa os mesmos equipamentos da indústria de fermentação líquida de outros microrganismos.

Uma questão importante concerne à decisão de qual tipo de propágulo se pretende utilizar no biocontrole de fitopatógenos, o que dependerá também a forma de aplicação e sistema de produção da cultura de interesse. Entre clamidósporos, conídios e microescleródios, os dois últimos têm a capacidade de germinar em menos de 24 horas, logo esses propágulos são mais rápidos do que clamidósporos. Além disso, tanto conídios submersos quanto microescleródios produzidos em meio líquido são mais facilmente coletados para fins de processamento em formulações sólidas ou líquidas. Entretanto, microescleródios estabilizados em matrizes

inorgânicas, como terra diatomácea, na forma de grânulos secos (< 5% umidade final) têm proporcionado uma excelente vida de prateleira tanto em temperatura ambiente (mínimo de 6 meses) ou sob refrigeração a 4 °C (mínimo de 12 meses) (Jackson et al., 2015 patente; Kobori et al., 2015).

A avaliação da sobrevivência desses microescleródios em formulação granular é realizada mediante teste de germinação vegetativa (miceliogênica) seguida da produção de conídios (germinação esporogênica) por estas estruturas após reidratação por um período entre 7 a 10 dias a 28 °C em meio ágar-água (2% p/v) (Kobori et al., 2015). Em estudos não publicados, Kobori e colaboradores também verificaram que é possível realizar secagem rápida utilizando a técnica de atomização ou do inglês *spray drying* tanto de conídios submersos quanto de microescleródios produzidos em meio líquido. Esses mesmos autores também conseguiram concentrações de até  $2 \times 10^{12}$  conídios submersos L<sup>-1</sup> e  $5 \times 10^7$  microescleródios L<sup>-1</sup> em apenas 3 dias de fermentação líquida em biorreator de bancada de 5 L com adequada aeração e agitação (Kobori et al., em preparação). Uma patente de Israel de 1989 também relata uma produção de no máximo  $5 \times 10^{11}$  conídios submersos L<sup>-1</sup> de *T. harzianum* após 60 h de cultivos submersos em biorreatores de 500 L sob constante iluminação, temperatura entre 25 e 30 °C e pH inicial entre 5,8 e 7, utilizando uma composição de meio com fontes de carbono e nitrogênio complexas e de baixo custo (Tabachnik, 1989 - Patente US4837155A).

A desvantagem da fermentação líquida é o investimento inicial na compra de biorreatores sofisticados que permitem um controle sistemático dos parâmetros fermentativos; todavia este custo é diluído ou amortizado com o tempo de uso do equipamento e com as vantagens inerentes ao processo que traz economicidade, uniformidade entre lotes, rapidez e automação, aliados à facilidade de escalonamento industrial para fins de formulação e empacotamento.

Finalmente, vale salientar que a fermentação líquida submersa é um processo moderno e robusto, o qual continuará se aperfeiçoando nos mais variados sistemas de produção de microrganismos benéficos aplicados na agricultura. Devido às inúmeras vantagens em custo operacional, versatilidade em produzir rapidamente diferentes estruturas fúngicas de *Trichoderma*, somada à facilidade de automação e escalabilidade gerando vantagens competitivas em relação à fermentação sólida-estática, é indubitável e inevitável que haja uma tendência de as empresas de biopesticidas migrarem ou investirem nesta tecnologia a curto e médio prazo. A uniformidade e qualidade do produto final com atraente custo-benefício são inerentes a este bioprocessos e contribuirá com a expansão da adoção de *Trichoderma* e outros fungos benéficos na agricultura brasileira.

## Considerações Finais

Dentre os fungo as espécies de *Trichoderma* spp. são mais utilizadas comercialmente no Brasil (mais de 5 milhões de hectares tratados) com várias biofábricas produzindo dezenas de toneladas por semana de esporos deste fungo crescidos em grãos de cereais por fermentação em estado sólido, é seguro afirmar que existe uma oportunidade incrível de adotar esta tecnologia para desenvolver novas formulações comerciais à base de seus propágulos submersos.

No geral, existe uma ampla carência envolvendo pesquisa em tecnologia de produção massal de *Trichoderma* por fermentação líquida submersa, bem como de outros fungos filamentosos benéficos que são utilizados como biocontroladores de pragas e doenças de plantas no Brasil. As perspectivas esperadas com os avanços nestes estudos em parceria com o setor privado, composto pelas indústrias de biopesticidas microbianos, é a expansão e consolidação das tecnologias de fermentação para *Trichoderma* spp.

No aspecto biotecnológico, formulações de biopesticidas devem visar a competitividade econômica frente aos produtos químicos, o que está diretamente relacionado com a eficiência do processo produtivo, a otimização e utilização de matérias-primas de qualidade e com preço acessível. Além disso, a proteção e manutenção da viabilidade do princípio ativo visando à persistência e à eficácia em campo. Outro aspecto relevante de bioformulações é a especificidade dos microrganismos que, na visão ambiental, de saúde do trabalhador e ainda não residual ao consumidor, é extremamente favorável.

## Referências

- AGROFIT: consulta aberta. Brasília, DF: MAPA, c2003. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: mar. 2019.
- ARORA, A.; KAUR, P.; KUMAR, M.; SAINI, V. Production of Biopesticides Namely *Trichoderma viride* and *Beauveria bassiana*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 10, n. 26, p. 1-7, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 8510**: Agrotóxicos e afins – Características físicas. Rio de Janeiro, 2018b. 10 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12679**: Agrotóxicos e afins – Produtos técnicos, concentrados técnicos e formulações – Terminologia. Rio de Janeiro, 2018a. 10 p.
- CASAS-FLORES, S.; HERRERA-ESTRELLA, A. The influence of light on the biology of *Trichoderma*. In: MUKHERJEE, P. K. et al. (Eds.). *Trichoderma: biology and applications*. [S. l.]: CAB International, 2013. p. 43-66.
- CAVALCANTE, R. S.; HELDER, L. S.; PINTO, G. A. S.; GAVA, C. A. T.; RODRIGUES, S. Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. **Food Bioprocess Technology**, v. 1, p. 100-104, 2008.
- COCHRANE, F. W. **Physiology of Fungi**. New York: Wiley, 1958. 524 p.
- DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, n. 5, p. 505-515, 1973.

- FRIEDL, M. A.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. **Applied Environmental Microbiology**, n. 74, p. 245-250, 2008.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.
- HARMAN, G. E.; JIN, X.; STASZ, T. E.; PERUZZOTTI, G.; LEOPOLD, A. C.; TAYLOR, A. G. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological Control**, n. 1, p. 23-28, 1991.
- HEWAVITHARANA, N.; KANNANGARA, S. D. P.; SENANAYAKE, S. P. Isolation, Identification and Mass production of five *Trichoderma* spp. on Solid and Liquid Carrier Media for Commercialization. **International Journal of Applied Science and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 285-293, 2018.
- HÖLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advances of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.
- JACKSON, A. M.; WHIPPS, J. M.; LYNCH, J. M. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 180-187, 1997.
- JACKSON, M. A.; MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N. *Trichoderma microsclerotia and methods of making*. US Patent 9642372, 2015. 16 p.
- JACKSON, M. A.; PAYNE, A. R. Liquid culture production of fungal microsclerotia. In: GLARE, T. R.; MORAN-DIEZ, M. E. (Eds.). **Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer Science Business Media, 2016. p. 71-83.
- JAKUBIKOVA, L.; FARKS, V.; KOLAROVA, N.; NEMCOVIC M. Conidiation of *Trichoderma atroviridae* isolate during submerged cultivation in laboratory stirred-tank fermenter. **Folia Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 209-213, 2006.
- JENKINS, N. E.; GOETTEL, M. S. Methods for mass-production of microbial control agents for grasshoppers and locusts. In: GOETTEL, M. S.; JOHNSON, L. (Eds.). **Microbial control of grasshoppers and locusts**. [Berkeley]: Entomological Society of Canada, 1997. p. 37-48. (Memoirs of the Entomological Society of Canada, n. 171).
- JIN, X.; HARMAN, G. E.; TAYLOR, A. G. Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials. **Biological Control**, v. 1, p. 237-243, 1991.
- JIN, X.; TAYLOR, A. G.; HARMAN, G. E. Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, v. 7, p. 267-274, 1996.
- 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, n. 4, p. 179-190, 2015.
- LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. (Eds.). **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2012. 92 p.
- LOPES, R. B. A indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de Microorganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, p. 15-28.
- MACHADO, A. C. R.; MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C. Crop optimization and pre-steps standardization to get a *Bipolaris euphorbiae*-based bioherbicide. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 392-399, 2013.
- MORAES, C.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, A. C. R.; BARBOSA, J. C., MOCHI, D. A. Production of a bioherbicide agent in liquid and solid medium and in a biphasic cultivation system. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 255-264, 2014.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.
- MUNIZ, P. H. P. C.; PEIXOTO, G. H. S.; TEIXEIRA, M. P. M.; MELLO, S. C. M.; CARVALHO, D. D. C. Produção de conídios em substrato sólido e colonização superficial por *Trichoderma harzianum*. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 4, p. 40-44, out/dez. 2018.
- PAPAVIZAS, G. C.; DUNN, M. T.; LEWIS, J. A.; BEAGLE-RISTAINO, J. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. **Phytopathology**, v. 74, n. 10, p. 1171-1175, 1984.

- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 1, n. 3, 1998.
- SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2689-2694, 2005.
- SANTOS, P. S. **Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)**. 2017. 72 p. Tese (Doutorado em Ciências: Entomologia)- Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba.
- SARGIN, S.; GEZGIN, Y.; ELTEM, R.; VARDAR, F. Micropropagule production from *Trichoderma harzianum* EGE-K38 using solid-state fermentation and a comparative study for drying methods. *Turkish Journal of Biology*, v. 37, p. 139-146, 2013.
- SCHMOLL, M.; ESQUIVEL-NARANJO, E. U.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* in the light of day - Physiology and development. *Fungal Genetics and Biology*, n. 47, p. 909-916, 2010.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDET, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 541-549, 2010.
- SRIRAM, S.; ROOPA, K. P.; SAVITHA, M. J. Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium. *Crop Protection*, v. 30, p. 1334-1339, 2011.
- STEAERT, J. M.; WELD, R. J.; MENDOZA, A.; KRYŠTOFVÁ, S.; ŠIMKOVIC, M.; VAREC'KA, L.; STEWART, A. Asexual development in *Trichoderma*: from conidia to chlamydozoospores. In: MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; SINGH, U. S.; MUKHERJEE, M.; SCHMOLL, M. (Eds.). *Trichoderma*: biology and applications. [S. l.]: CAB International, 2013. p. 87-109.
- STEAERT, J. M.; WELLS, R. J.; STEWART, A. Isolate-specific conidiation in *Trichoderma* in response to different nitrogen sources. *Fungal Biology*, n. 114, p. 179-188, 2010.
- SYAHIDDIN, D. S. Spore Production by biocontrol agent *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation: effect of agitation and aeration. *Journal Rekamaya Kimia dan Lingkungan*, v. 6, n. 2, p. 71-76, 2007.
- TABACHNIK, M. **Method of growing *Trichoderma*** - US 4837155 A - Israel, 1989. 5 p.
- ZABRISKIE, D. W.; ARMIGER, W. B.; PHILLIPS, D. H.; ALBANO, P. A. **Trader's guide to fermentation media formulation**. Memphis: Traders protein, 2008. 60 p.