

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

EDGAR LOPES BALESTRI

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA PARA
DESENVOLVIMENTO DE *Trichoderma* spp. EM MEIO SUBMERSO A
PARTIR DE UM BIORREATOR *AIRLIFT* ALTERNATIVO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2015

EDGAR LOPES BALESTRI

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA PARA
DESENVOLVIMENTO DE *Trichoderma* spp. EM MEIO SUBMERSO A
PARTIR DE UM BIORREATOR *AIRLIFT* ALTERNATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental do Departamento Acadêmico de Ambiental – DAAMB - do Câmpus Campo Mourão da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

Co-orientador: Prof. Me. Cristian Coelho Silva

CAMPO MOURÃO

2015



TERMO DE APROVAÇÃO

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA PARA DESENVOLVIMENTO DE *Trichoderma* spp. EM MEIO SUBMERSO A PARTIR DE UM BIORREATOR *AIRLIFT* ALTERNATIVO

por

EDGAR LOPES BALESTRI

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 04 de Dezembro de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

Prof. Me. Cristian Coelho Silva

Prof. Dra. Cristiane Kreutz

Prof. Dra. Fernanda Peres Ramos

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia Ambiental.

Dedico esse meu trabalho aos meus
pais, irmão, avós, tios e primos por toda
paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, sabedoria, inteligência, benção e proteção.

À meus pais, Odemilson e Regina, que tenho tanto orgulho e admiração, pelo exemplo e ensinamentos preciosos. Agradeço por sempre me apoiarem em minhas escolhas e pela minha ótima formação como pessoa.

À minha família, que sempre me apoiou e acreditou em meu potencial e ao meu irmão Edmilson, pelo companheirismo e incentivo.

Aos Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno e ao Msc. Cristian Coelho Silva pela orientação, compreensão, paciência e também pela amizade.

A banca avaliadora composta pela Prof^a Dra. Cristiane Kreutz e Prof^a Dra. Fernanda Peres Ramos pelo aceite do convite e por todas as sugestões.

Aos demais professores que contribuíram para minha formação acadêmica, pelos ensinamentos e conhecimentos passados.

Aos amigos, Bob, Bolinha, Matheus e Neto que estiverem presentes em toda minha formação, nos momentos de dificuldades e também nas festas. E também à minha namorada Nadine pela compreensão e paciência comigo.

Enfim, a todos que me apoiaram e incentivaram por essa nova etapa em minha vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

As fecuárias são indústrias processadoras de mandioca para obtenção de amido. Há diversas unidades instaladas no Estado do Paraná com destaque para a mesorregião noroeste que contém maior concentração desses empreendimentos. Esse cenário contribui para a geração de uma grande quantidade de águas residuárias poluentes, principalmente a manipueira. O trabalho tem por objetivo avaliar a efetividade de manipueira como meio de cultura alternativo em diferentes concentrações utilizando o *Trichoderma* spp. cultivado em um biorreator *airlift* alternativo. A manipueira foi coletada de uma indústria mandiocueira no município de Araruna-PR. Com isso definiu-se três diferentes concentrações desse efluente como forma de substrato para cultivo do fungo *Trichoderma* spp. Esse fungo foi concedido por uma empresa que o produz para fins comerciais, constituindo de $1,1 \times 10^{11}$ UFC.mL⁻¹. Primeiramente preparou-se o pré inóculo de 400 mL, onde 10 mL são do fungo *Trichoderma* spp. e o restante dos substratos propostos. Após 72 horas em mesa *shaker*, o pré inóculo pôde ser introduzido no biorreator *airlift* alternativo de volume útil 5 litros. Novamente, após 72 horas no biorreator esse produto gerado foi retirado. O biorreator apresenta material de PVC, com altura de 70 cm, utilizando um compressor e pedra difusora ambos de aquário para aspersão do ar. Já a temperatura esteve sob efeito de uma de cartucho de 100 *watts*. Foram testadas três diferentes concentrações, 50 mL.L⁻¹; 125 mL.L⁻¹ e 175 mL.L⁻¹, de manipueira como substrato, e através de testes comparativos e teste de unidades formadoras de colônias, pôde constatar a presença de 1×10^6 a $1,2 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ no biorreator *airlift* alternativo e posteriormente avaliá-los. Com uma faixa de pH entre 5,6 a 4,8. Oxigênio dissolvido apresentou de 6,4 a 0,55 mg.L⁻¹. A temperatura permaneceu em torno de 28 ± 1 . Não houve diferença de crescimentos entre as concentrações, sendo assim recomenda-se o uso da concentração 175 mL.L⁻¹ devido a manipueira ser um passivo ambiental.

Palavras-chave: Passivo Ambiental; Efluente; Resíduos Industriais.

ABSTRACT

The starch manufacturers are processing of manioc industries to obtain starch. There are several units installed in Paraná State and northwest middle region containing higher concentration. This scenario contributes to the generation of a large amount of polluting residual waters, especially manipueira. The study aims to evaluate the effectiveness of cassava as alternative culture in different concentrations using *Trichoderma* spp. grown in an alternative airlift bioreactor. The manipueira was collected of a cassava industry in the municipality of Araruna-PR. With this set up three different concentrations of the effluent as a substrate for cultivation of *Trichoderma* spp. This fungus has been granted by a company that produces for commercial purposes and may find the presence of $1,1 \times 10^{11}$ UFC.mL⁻¹. Firstly it must prepared the pre inoculum of 400 mL, 10 mL which is the fungus *Trichoderma* spp. and the remainder of the proposed substrates. After 72 hours in shaker table, the pre inoculum can be introduced in alternative airlift bioreactor working volume of 5 liters. Again, after 72 hours in the bioreactor this product generated will be removed. The bioreactor produce PVC material, height 70 cm, with a supercharger and diffuser both of aquarium for air spraying. Already the temperature, it was under the effect of a cartridge resistance 100 watts. The three different concentrations were tested, 50 mL.L⁻¹; 125 mL.L⁻¹ and 175 mL.L⁻¹, of cassava as a substrate, and through comparative tests and testing colony forming units, was able to establish the presence of the 1×10^6 $1,2 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ the alternative airlift bioreactor and then evaluate them. With a pH range between 5.6 the 4.8. Dissolved oxygen showed a range from 6.4 to 0.55 mg L⁻¹. Since the temperature was controlled by a variable resistor of a cartridge, which remained around 28 ± 1 . There was no difference in growth between the concentrations, so we recommend the use of 175 mL.L⁻¹ concentration due to manipueira be an environmental liability.

Keywords: Environmental Liability; Effluent; Industrial Waste.

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1: Concentração de manipueira (mL.L^{-1}) apresentando seu crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. | 27 |
| Gráfico 2: Crescimentos vegetativos (UFC.mL^{-1}) de todos ensaios realizados no biorreator <i>airlift</i> | 28 |
| Gráfico 3: Valores de pH em relação ao tempo de todos experimentos realizados..... | 30 |
| Gráfico 4: Valores de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) em relação ao tempo de todos experimentos realizados..... | 31 |
| Gráfico 5: Valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) em relação ao tempo de todos experimentos realizados..... | 32 |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 14 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 14 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 15 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 6 CONCLUSÃO | 34 |
| REFERENCIAS..... | 35 |

1 INTRODUÇÃO

Com o grande crescimento da população, a indústria alimentícia necessita aumentar sua produção podendo gerar problemas ambientais, tornando o ambiente urbano cada vez mais degradado. Devido a isso os impactos de contaminação do ar, solo e água possuem grande significância nos meios físico, biótico e socioeconômico.

Uma dessas principais indústrias é da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família Euphorbiaceae, nativa da América tropical. Os principais países que a cultivam estão localizados na África, Ásia, Oceania e América Latina. É uma fonte de alimento rico em calorias e carboidratos (SOUZA et al., 2010).

Na industrialização da mandioca os impactos são gerados a partir da entrada da matéria prima, com a lavagem das raízes, que gera efluente e assim descarrega-se no corpo hídrico com ou sem tratamento. Outro efluente gerado é a partir da prensagem da massa de mandioca ralada, denominada manipueira. Esse subproduto contém, em sua composição, uma porcentagem dos diferentes constituintes das raízes, tais como o amido, os sais minerais, as proteínas e os glicosídeos cianogênicos (ERNANDES; DEL BIANCHI; MORAES, 2014).

Os problemas ambientais causados pela disposição inadequada deste resíduo são devido a sua elevada concentração de demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Os valores de DBO da manipueira variam de 14.000 mg.L⁻¹ até 34.000 mg.L⁻¹. Esse dado de quantidade de DBO, fornecido pelas indústrias, é contrastante, devido às diferentes diluições às quais é submetida, durante o processo de beneficiamento das raízes (FERREIRA et al., 2001). Devido a isso, se tem a necessidade de utilizar a manipueira, por ser um passivo ambiental, em outras fontes alternativas.

Há um significado especial quando se leva em consideração a viabilidade econômica dessa substância, tendo visto ser um resíduo da indústria e possuir elevado valor agregado. Estes fatos sugerem o potencial de aplicação industrial para cultivo de microrganismos. A fim de reduzir os custos de produção para tornar o produto competitivo ao mercado, o uso de resíduos industriais como meio de cultura é uma alternativa aceitável, já que a matéria-prima representa um dos principais custos no processo.

O *Trichoderma* spp. são fungos micorrízicos os quais têm a capacidade de se associar com raízes de plantas proporcionando ganhos em sobrevivência e produtividade. Outra característica é a sua utilização preventiva contra outros fungos, como o *Fusarium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Verticillium*, *Pythium* entre outros.

Esse gênero de fungos apresentam capacidade reprodutiva, rápido crescimento, habilidade de sobreviver sob condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, alta agressividade contra fungos fitopatogênicos, habilidade em promover o crescimento vegetal e ativar seus mecanismos de defesa. Assim, possuem sucesso como agentes de controle biológico (RIBEIRO, 2009).

Atualmente, produtos utilizados no dia a dia como produtos farmacêuticos, químicos e alimentos são obtidos através de processos fermentativos. Esses produtos podem ser gerados a partir do metabolismo primário ou secundário, juntamente com o aumento de biomassa, enzimas e proteínas. No caso de microrganismos aplicáveis na agricultura é necessário o aumento da biomassa e conseqüentemente o aumento celular (NEVES, 2003).

Para cultivo de microrganismos necessita de biorreatores, como do tipo *airlift*, cujas suas forças de cisalhamento são baixas e permite que o micélio continue preservado. O biorreator *airlift* pode ter circulação interna ou externa, e é de construção fácil e barata, principalmente pela ausência do sistema mecânico de agitação (ROSSI, 2006).

Biorreatores têm por objetivo a produção de um único microrganismo que tenha uma finalidade e valor comercial. Deve-se atender a melhor configuração, material, aeração e circulação para a melhor produção. Esses biorreatores vêm sendo utilizados também na produção da biomassa de microalgas.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia do departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão, com objetivo de avaliar a efetividade da manipueira coletada no município de Araruna-PR, como meio de cultura alternativo em diferentes concentrações, utilizando o *Trichoderma* spp. cultivado em um biorreator *airlift* alternativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a efetividade da manipueira como meio de cultura alternativo em diferentes concentrações utilizando o *Trichoderma* spp. cultivado em um biorreator *airlift* alternativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as diferentes concentrações de manipueira como meio de cultura, através do crescimento fúngico;
- Monitorar os parâmetros de pH, temperatura e oxigênio dissolvido do biorreator;
- Quantificar as unidades formadoras de colônias.
- Mensurar a produtividade do biorreator *airlift* alternativo;

3 REVISÃO DA LITERATURA

Biorreatores são equipamentos que tem como função converter matérias-primas em produtos utilizando microrganismos, células animais, vegetais ou enzimas. Microrganismos e células devem estar constantemente envolvidos num ambiente adequado na tentativa de prover condições ótimas de crescimento. Essas condições envolvem pH, oxigênio, temperatura e substrato principalmente (ROSSI, 2006).

Os biorreatores comumente utilizados no cultivo de microrganismos são do tipo *airlift*. Apresenta como vantagem o uso do ar para agitação e aeração do meio de cultura, tornando o meio homogêneo, extremamente importante para a eficiência do biorreator. O ar é injetado pelo fundo do equipamento, promovendo a circulação do meio de cultura, em um sentido do fundo para cima, através do tubo interno central (MENNA, 2010). Biorreatores *airlift* possuem duas zonas diferentes, nas quais seu volume de líquido é dividido e somente uma das zonas recebe a injeção de ar. A região de fluxo ascendente da mistura gás-líquido é denominada *riser*, e a que contém o fluxo descendente, *downcomer*. Sendo assim, a homogeneização é realizada por esse processo (CERRI, 2009).

Esse equipamento se destaca devido sua simplicidade de projeto e construção, versatilidade, fácil operação, baixa possibilidade de contaminação, baixo consumo de energia e altas taxas de transferência de massa e calor. E suas principais aplicações são no cultivo de microrganismos e culturas celulares, além da possibilidade desse equipamento haver potencial para tratamento de resíduos (PEDROSO, 2003).

O gênero *Trichoderma* é um fungo comumente encontrado no solo e de grande importância ecológica, pois participa da decomposição e mineralização da matéria orgânica. Possui rápido crescimento, sendo assim uma grande vantagem como agente para biocontrole, já que possui grande eficiência como fungicida natural (SAITO et al. 2009).

Esses fungos são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças. O *Trichoderma* pode interagir com o patógeno de diversas maneiras, tais

como antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação ou indução de defesa do hospedeiro (GAUCH, 1996).

Trichoderma spp., fungos saprófitos muito comuns na rizosfera, têm recebido atenção como agente de biocontrole, devido seu potencial como agente patogênico de outros microrganismos presentes no solo. Os mecanismos pelos quais os isolados de *Trichoderma* controlam populações patogênicas na rizosfera têm sido estudados. Recentes progressos na purificação e identificação de metabólitos de *Trichoderma* levaram à noção de que, na maioria dos casos, o processo antagônico baseia-se na produção de antibióticos e ou enzimas associado com possível competição de nutrientes na rizosfera (YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999).

Espécies de *Trichoderma* agem como hiperparasitas competitivos e metabólitos antifúngicos produzindo enzimas hidrolíticas às quais possuem a capacidade de alteração da estrutura celular, como granulação, lise e desintegração do citoplasma celular quando são encontrados em organismos com os quais interagem (EZZIYYANI et al., 2004).

Os fungos retiram os nutrientes necessários para sobreviver de substratos, o qual podem ser o húmus do solo, restos de cultura, plantas vivas, etc. As hifas ramificam-se em todas as direções no substrato, formando o micélio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Fungos filamentosos podem reproduzir-se assexuadamente pela fragmentação de suas hifas ou sexuadamente pelo cruzamento de dois núcleos diferentes, de uma mesma espécie de fungo. Além disso, tanto a reprodução sexuada quanto a assexuada em fungos ocorrem pela formação de esporos. O ciclo assexual é o mais comum entre os fungos, pois pode ser repetido várias vezes durante a estação de crescimento, enquanto o ciclo sexual ocorre somente uma vez por ano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012)

A maioria dos fungos tem um estágio de esporo que contém um núcleo haplóide, que possui uma série de cromossomos. Os esporos, ao germinar, produzem uma hifa que também contém núcleos haplóides. A hifa produz novamente esporos haplóides ou pode fundir-se com uma outra hifa para formar um núcleo diplóide, denominado zigoto, que contém duas séries de cromossomos. O gênero *Trichoderma* pertencem ao filo ascomiceto que normalmente seus esporos assexuais são conídios produzidos em longas cadeias a partir do conidióforo. O termo conídio significa pó, e esses esporos são facilmente liberados da cadeia

formada no conidióforo ao menor contato e flutuam no ar como poeira. Um ascósporo se origina da fusão do núcleo de duas células que podem ser morfológicamente similares ou diferentes. Esses esporos são produzidos em uma estrutura em forma de saco conhecida como asco (MADIGAN et al., 2010).

Para desenvolvimento de microrganismos há exigências nutricionais para que não falte nutrientes e para obter-se um ótimo crescimento. A composição do meio de cultura deve apresentar água, carbono, nitrogênio, e alguns tipos de sais minerais para crescimento e esporulação. Além disso, deve-se haver o controle dos parâmetros de pH, oxigênio dissolvido e temperatura (ERNANDES, 1998).

Quando se fala em desenvolvimento de microrganismos em escala industrial é necessário obter-se uma fonte de alimento alternativa, de modo que, seja barato e eficiente. Mesmo não sendo puros e padronizados quanto aos meios de escala industrial (PASTORE, 2010).

Sendo assim, como fonte de carbono podem ser utilizados melaços de cana e de beterraba, amido de cereais, raízes ou tubérculos. Como fonte de nitrogênio o principal substrato é o farelo de soja, água da prensagem do milho e caseína hidrolisada (ERNANDES, 1998).

A mandioca (*Manihot esculenta*) tem origem latino-americana e sua produção está voltada para o consumo humano e pecuário. Devido ser uma planta de fácil adaptação, é extremamente cultivada em áreas onde outras espécies amiláceas não se desenvolvem com a mesma facilidade. A mandioca é um produto muito consumido no Brasil podendo ser utilizado diretamente para o consumo ou destinada para a indústria na fabricação de farinha ou fécula (PASTORE, 2010).

O processo de produção de farinha de mandioca caracteriza-se pela importância no setor agroindustrial e também social, pois necessita de grande mão de obra no campo, por consequência gera um número relevante de emprego e por ser um dos principais produtos de alto poder energético para boa parte da população do país. A mandioca é grande responsável pela economia de comunidades tradicionais indígenas que possuem métodos de produção diferentes para obter seu produto final, sendo um prato muito típico da sua culinária (CORDEIRO, 2006).

Durante as etapas de processamento da mandioca, diversos tipos de resíduos são gerados, tanto sólidos como líquidos. Estes materiais podem causar danos ambientais, pois são altamente poluentes, gerados em grande quantidade, o

que é acentuado pelo fato das indústrias se concentrarem numa certa região ou município.

Os efluentes líquidos do processamento da mandioca são: água da lavagem de raízes, onde se encontra grande quantidade de sólidos suspensos; água vegetal ou manipueira, forma-se na prensagem da mandioca ralada para obtenção do produto, nesse efluente apresentam substâncias solúveis do tubérculo, inclusive a linamarina, responsável pela liberação de cianeto; e por fim a água de extração da fécula, formada na concentração do leite de amido, e geralmente é reciclada no processo (FEIDEN, 2000).

Manipueira é um resíduo gerado em grande quantidade durante a produção de farinha de mandioca. Os principais nutrientes presentes nos resíduos de mandioca são açúcares (sacarose, glucose, frutose e maltose), nitrogênio e sais minerais. O processamento de uma tonelada de raiz produz cerca de 200 a 300 litros de manipueira, e devido esse efluente apresentar a linamarina, torna-se agressivo ao meio ambiente pela grande quantidade de cianeto total quanto pela carga orgânica (CASSONI, 2008).

A composição da manipueira contém quantidade significativa de todos os macros e micronutrientes apontados como importantes no processo de desenvolvimento de microrganismos (COSTA, 2005). Além disso, foram constatados em diferentes estudos, diferentes concentrações de componentes (Tabela 1).

Tabela 1: Composição da manipueira por diversos autores.

| Componente | Maróstica Jr. et al (2007) | Nitschke et al (2003) | Damasceno et al (1999) | Costa (2005) | Ponte (1992) | (continua) |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| | | | | | | Leonel et al (1995) |
| Sólidos Totais (g/L) | 60,0 | 62,0 | 62,0 | | | |
| DQO (g/L) | 53,4 | 55,8 | 60 | 60 | | |
| Amido (%) | | | | | | 5,71 |
| Açúcares não red. (g/l) | 39,5 | 41,45 | 58,18 | 34,51 | | 34,2 |
| Sacarose (g/l) | | | | 24,5 | | |
| Açúcares red. (g/l) | 20,1 | 23,3 | 20,2 | | | 29,3 |
| Glicose (g/L) | | | | 7,6 | | |
| Frutose (g/L) | | | | 4,2 | | |
| Nitrogênio Total (g/L) | 1,72 | 2,08 | 1,6 | 0,6 | 0,43 | 1,42 |

| Componente | (conclusão) | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| | Maróstica Jr. et al (2007) | Nitschke et al (2003) | Damasceno et al (1999) | Costa (2005) | Ponte (1992) | Leonel et al (1995) |
| NO3 (mg/l) | | | | 5,2 | | |
| Fósforo (mg/L) | 369 | 245 | 83,3 | 161,3 | 256,5 | 293 |
| Potássio (mg/L) | 3640 | 3472 | 895 | 2900 | 1853,5 | 2650 |
| Cálcio (mg/L) | 236 | 293 | 184 | 122,8 | 227,5 | 220 |
| Magnésio (mg/L) | 438 | 519 | 173 | 366,8 | 405 | 340 |
| Enxofre (mg/L) | 61,4 | 154 | 38 | 69 | 195 | 74 |
| Ferro (mg/L) | 2,72 | 7,8 | 8 | 5,6 | 15,3 | 7,6 |
| Zinco (mg/L) | 3,01 | 2,8 | 4,5 | 1,1 | 4,2 | 3,2 |
| Manganês (mg/L) | 3,46 | 1,7 | 1,5 | 4,1 | 3,7 | 3,9 |
| Cobre (mg/L) | 1,11 | 1 | 0,75 | 0,7 | 11,5 | 0,9 |
| Boro (mg/L) | | | | 0,3 | 5 | |

Fonte: Adaptado de Barros, 2007

Os principais nutrientes presentes no resíduo da mandioca são açúcares e sais minerais. O descarte inadequado deste resíduo provoca problemas ambientais devido à sua alta carga orgânica porém, é um substrato muito atraente para processos biotecnológicos. Há trabalhos que utilizam a manipueira como substrato para produção de biossurfactante (NITSCHKE; PASTORE, 2004).

Este resíduo, geralmente é descarregado no ambiente, ocasionado problemas ambientais, devido possuir grande carga de materiais orgânicos dispersos e em solução, fazendo com que ocorra a redução de oxigênio na água com danos às formas aeróbias de vida (WOSIACKI; CEREDA, 2002).

Por ser um passivo ambiental dentro da indústria mandioqueira e de difícil tratamento, há a importância de se criar novas alternativas para reaproveitamento desse efluente, como substrato para desenvolvimento de microrganismo em meio líquido.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Coletou-se o efluente de uma indústria mandioqueira, situada no município de Araruna-PR. Acondicionada em recipiente de vidro e armazenada em geladeira durante o período em que essa não seja utilizada, devido a distância que a manipueira se encontrava do laboratório.

Os microrganismos do gênero *Trichoderma* foi concedido por uma empresa que o produz para fins comerciais, acondicionado em embalagem plástica. Segundo a empresa responsável pôde constatar a presença de $1,1 \times 10^{11}$ UFC.mL⁻¹ da amostra do produto.

Os meios foram compostos por manipueira em diferentes concentrações e de melaço de cana de açúcar com concentração fixa. Realizou-se três bateladas, com as seguintes concentrações de manipueira: 50 mL.L⁻¹; 125 mL.L⁻¹ e 175 mL.L⁻¹. A concentração definida de melaço foi de 15g.L⁻¹ em todas bateladas.

Foram realizadas triplicatas para cada concentração de manipueira estudada. Para preparo do pré inóculo foram inoculados 10 mL dos fungos em 400 mL de cada um dos meios de cultura estudados e autoclavados a 121°C por 20 minutos. Assim esses meios foram a mesa *shaker* por 72 horas a 150 rpm. Este pré inóculo foi preparado para ser utilizado no cultivo dos fungos dentro do biorreator *airlift*.

Também realizou-se triplicatas para cada concentração de manipueira a ser cultivado no biorreator. O inóculo desenvolveu em biorreator *airlift* alternativo de volume útil de 5 litros. Introduziu-se o meio de cultura correspondente ao volume de 5 litros, água e por fim o pré inóculo. O cultivo foi de em 72 horas sem interrupção de agitação.

O biorreator *airlift* (Figura 1) com circulação interna, possui a seguinte configuração: tubo interno de PVC com diâmetro 50 mm x 54 cm de altura; tubo externo de PVC com diâmetro 100 mm x 70 cm de altura, tripé de aço inox com 4 cm de altura e 2 tampas cap de 100 mm. A alimentação, controle de pH, entrada de ar e exaustão foram feitos furos na tampa superior e mangueira de silicone de 4mm fora utilizada. O biorreator possui volume útil de 5 litros. A dispersão do ar no interior do biorreator utilizou-se uma pedra difusora e um compressor Atman modelo A230. Os

gases de exaustão foram tratados por um *airlock* contendo álcool 70°. Para fazer a total vedação das tampas superior e inferior utilizou-se *o-rings* elásticas.

Já a temperatura estava sob efeito de um termostato juntamente ligado a uma resistência de cartucho de 100 watts, com o intuito de aquecer o meio quando necessário em uma temperatura entre 28 ± 1 °C.

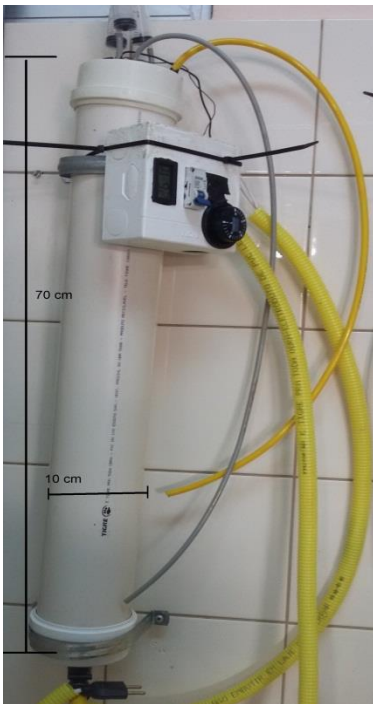


Figura 1: Biorreator airlift alternativo, de material PVC.

Fonte: Autoria Própria.

Já os parâmetros, temperatura, oxigênio dissolvido e pH, foram acompanhados por meio da sonda multi-paramétrica da marca YSI modelo 6920 V2 com intervalos de 12 em 12 horas, totalizando 7 períodos para cada cultivo (pré e inóculo).

A metodologia seguida para contagem de UFC é baseada em protocolo específico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2012 (EMBRAPA). A técnica de diluição seriada (Figura 2) consiste em acrescentar 10 ml do produto a ser testado em 90 ml de diluente, (corresponde a diluição 10^{-1}), em seguida coloca-se o tubo no agitador de tubos a fim de homogeneizar a conteúdo, em seguida transfere-se com o auxílio de uma micropipeta e ponteiros esterilizados 1 ml de

suspensão para o segundo tubo (corresponde a diluição 10^{-2}), descartando a ponteira em seguida. Realizada as diluições seriadas em solução salina, pipeta-se 100 μ L em placas contendo meio de cultura BDA+Triton X-100. E por fim, as placas são incubadas em estufa BOD sem luz por 72 horas e depois fazer a contagem, por meio de um contador de colônias.

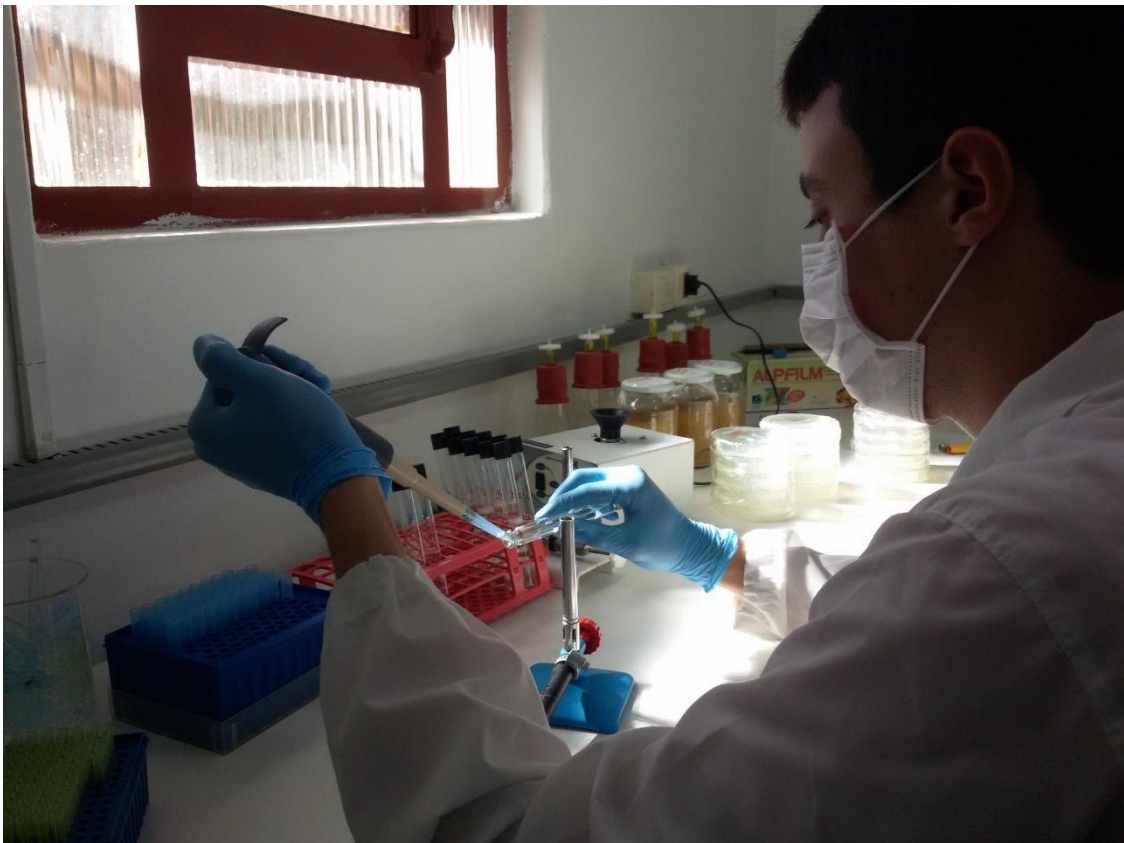


Figura 2: Técnica de diluição seriada
Fonte: Autoria Própria.

Os resultados obtidos no ensaio de cultivo de *Trichoderma* spp. foram submetidos à análise de variância não paramétrica de *Kruskal Wallis* (Anova não Paramétrica) com teste *a posteriori* de *Dunnet* com nível de significância de 5%. Para isso utilizou-se o *software* BIOESTAT 5.0. Ainda foi realizado um teste t para uma amostra, utilizando todos os valores de crescimento a fim de comparar com dados de referência da literatura específica. Também utilizou o Teste t ($p > 5\%$) com todos os crescimentos das concentrações utilizadas. E por fim os resultados dos

parâmetros também foram submetidos à análise de regressão, verificando o melhor modelo de ajustamento de curvas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um meio de cultura adequado é de extrema importância para a produção vegetativa de fungos em meios líquidos, e sua composição sempre deve haver fontes de nitrogênio, carbono e minerais (BARBOSA et al., 2004). No meio de cultura alternativo estudado, foram testadas diferentes concentrações de manipueira, a fim de avaliar sua efetividade e suprir as necessidades dos microrganismos.

A partir do teste de Unidades Formadoras de Colônias, foi possível analisar o crescimento vegetativo do pré inóculo (Tabela 1), sendo esse crescimento fundamental para o processo de cultivo no biorreator. A concentração dos fungos está dividida em cada concentração de substrato.

Tabela 1: Crescimento vegetativo (UFC.mL⁻¹) de *Trichoderma* spp. presente no pré inóculo produzido pelas diferentes concentrações de manipueira.

| CONCENTRAÇÃO | ENSAIO 1 | ENSAIO 2 | ENSAIO 3 |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 50 mL.L⁻¹ | 4,6x10 ⁸ | 7,8X10 ⁷ | 3,6X10 ⁸ |
| 125mL.L⁻¹ | 5,6X10 ⁸ | 5,2X10 ⁸ | 5,4X10 ⁸ |
| 175mL.L⁻¹ | 1,2X10 ⁹ | 4,5X10 ⁸ | 6,2X10 ⁸ |

Com esses resultados, pode-se comprovar a efetividade da manipueira como meio de cultura, visto que o maior crescimento foi de 1,2x10⁹ UFC.mL⁻¹, superando substratos de meio de cultura semi sólido, havendo 15 g.L⁻¹ de glucose de milho e 5 g.L⁻¹ de farinha de soja, para produção de *Bacillus thuringiensis tolworthi*, onde o meio de cultura foi previamente fervido e agitado constantemente, obteve-se um crescimento máximo de 3,8x10⁸ UFC.mL⁻¹ (VALICENTE; ZANASI, 2005).

Para produção de *Trichoderma* spp. em meios submersos, o meio de cultivo que proporcionou a maior produção de conídios em isolados, foi o meio de levedura inativada, que é obtido a partir da fermentação da cana de açúcar. Apresentando uma produção máxima de conídios.mL⁻¹ de 1,2 x 10⁸ (HADDAD, 2014).

Após inoculação no biorreator, a aeração era suspensa a partir da baixa concentração de oxigênio dissolvido, em uma faixa de 1 mg.L⁻¹, e assim realizava

novamente o teste de Unidades Formadoras de Colônias para analisar o crescimento dos fungos no biorreator (Tabela 2) e constatar se o produto está em concentração ideal para aplicação.

Tabela 2: Crescimento vegetativo (UFC.mL⁻¹) de *Trichoderma* spp. presente no inóculo produzido em biorreator *airlift* alternativo pelas diferentes concentrações de manipueira.

| CONCENTRAÇÃO | ENSAIO 1 | ENSAIO 2 | ENSAIO 3 |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 50 mL.L⁻¹ | 3,7x10 ⁸ | 1,1x10 ⁹ | 1,5x10 ⁷ |
| 125mL.L⁻¹ | 1x10 ⁹ | 1x10 ⁶ | 1,2x10 ⁸ |
| 175mL.L⁻¹ | 3,9x10 ⁸ | 5,3x10 ⁷ | 1,2x10 ⁹ |

Evidencia-se a produtividade do biorreator, pois nesse equipamento obteve um crescimento máximo de 1,2x10⁹ UFC.mL⁻¹, se comparado a literatura relacionada. Para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira, utilizando um fermentador Piloto, de volume útil 40 litros, constatou a presença máxima de 2,3x10⁹ UFC.mL⁻¹, observada em 24 horas (BARROS, 2007).

Com isso, pôde-se confirmar a efetividade do equipamento e das concentrações de manipueira utilizadas, uma vez que apresentou crescimento dos fungos pós inoculação com rendimento nas diferentes concentrações do meio alternativo.

A produção de Unidades Formadoras de Colônias no biorreator *airlift* alternativo variou de 1x10⁶ a 1,2x10⁹ UFC.mL⁻¹, diante dos ensaios propostos. Porém houve o crescimento de outra colônia morfológicamente diferente do gênero *Trichoderma* (Figura 3), pois essas apresentam características de rápido crescimento, preenchendo toda a placa, logo após alguns dias de incubação, além disso, a colônia torna-se branca de aspecto cotonoso, passando a verde claro e posteriormente a verde escuro com bordas brancas (SANTIN, 2008).

Realizou-se um repique dessas colônias para identificar as colônias corretas para fazer a quantificação (Figura 4).

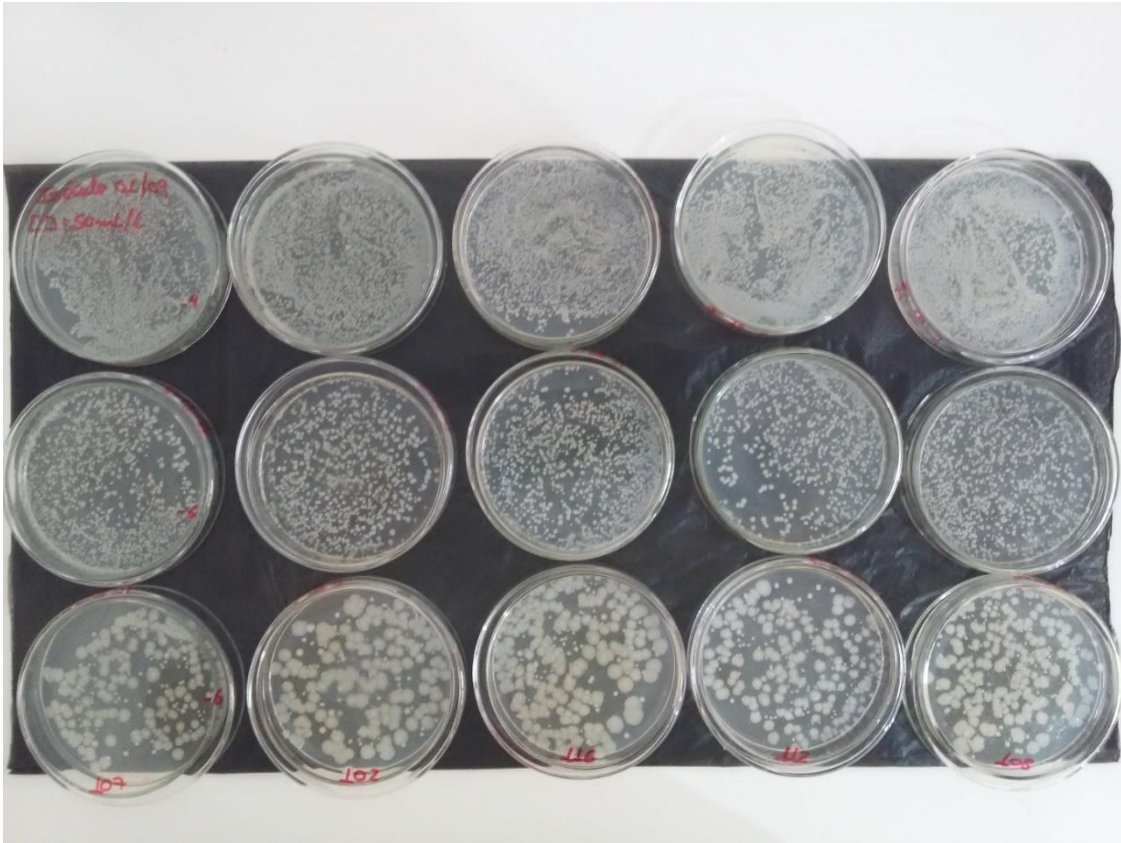


Figura 3: Placas com BDA+Triton X-100, havendo dois tipos de colônias morfológicamente diferentes.

Fonte: Aatoria Própria.



Figura 4: Colônias de *Trichoderma* spp.

Fonte: Aatoria Própria.

Testou-se as diferentes concentrações de manipueira quanto ao crescimento de UFC's. Pôde-se verificar que não há diferença de crescimento de UFC's nas diferentes concentrações estudadas, pois o teste de *Kruskal-Wallis* resultou em um valor de $p=0,6703$; $H= 0,8$ e graus de liberdade= 2 (Gráfico 1). Assim afirma-se que os crescimentos nos plaqueamentos são igualmente eficientes independente da concentração de substrato em teste.

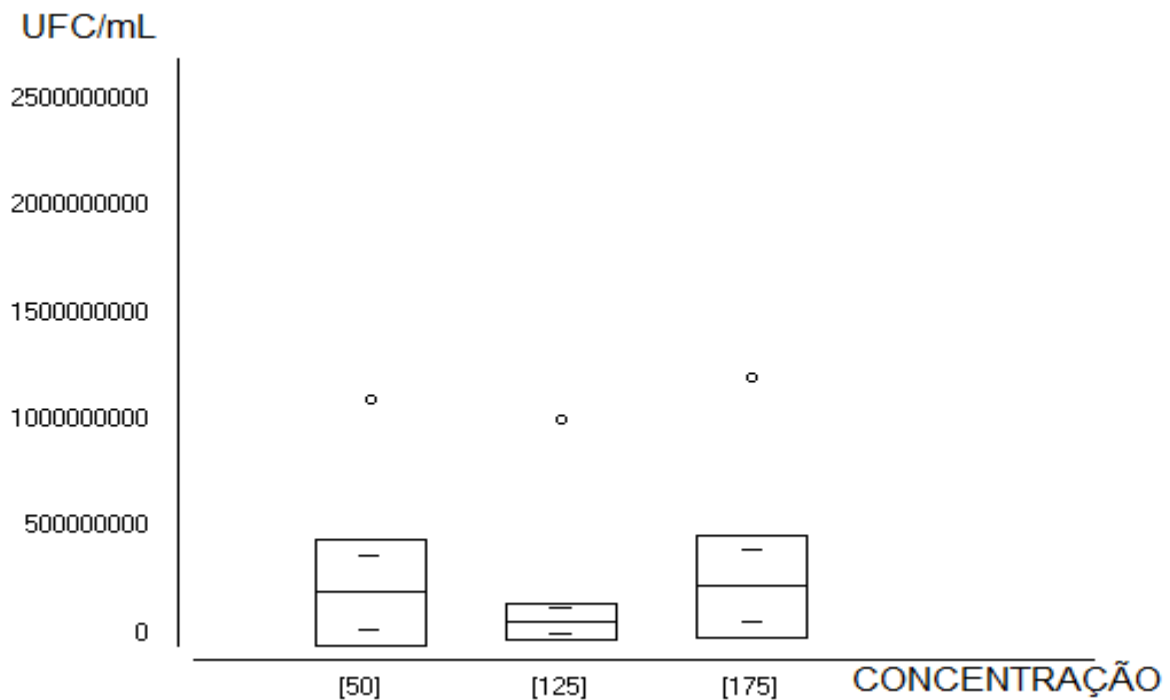


Gráfico 1: Concentração de manipueira (mL.L⁻¹) apresentando seu crescimento de *Trichoderma spp.*

Ao mesmo tempo, comprova-se através das médias aritméticas que os dados são diferentes numericamente, mas não estaticamente, onde as médias aritméticas apresentam valores próximos (Tabela 3).

Tabela 3: Valores das médias aritméticas (UFC.mL⁻¹) de cada concentração estudada.

| Concentração | Média Aritmética |
|------------------------|---------------------|
| 50 mL.L ⁻¹ | 4,9x10 ⁸ |
| 125 mL.L ⁻¹ | 3,7x10 ⁸ |
| 175 mL.L ⁻¹ | 5,4x10 ⁸ |

Como as concentrações de substratos se mostraram igualmente eficientes, realizou-se um teste t, para comparar todos os crescimentos obtidos com a concentração ideal de referência para aplicação do produto. A média utilizada para o teste t, foi de acordo com o estudo de Haddad (2014), onde foram testados o gênero *Trichoderma* para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco) e também na promoção de crescimento de soja. Com a concentração mínima de 1×10^7 conídios.mL⁻¹, houve uma eficiência de 94% de inibição a germinação do patógeno. Com a execução do teste t para uma amostra pôde-se constatar a média da população utilizada (linha azul) de 1×10^7 (Gráfico 2) e p bilateral igual a 0,0229, indicando que o as concentrações obtidas pela manipueira são superiores ao mínimo proposto por Haddad (2014) e portanto viáveis para aplicação.

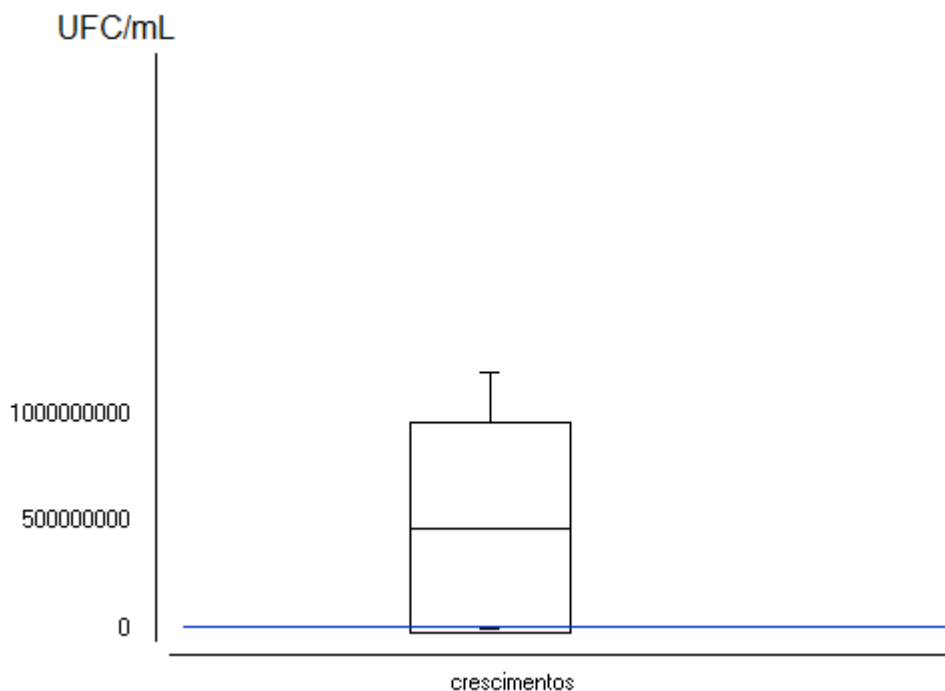


Gráfico 2: Crescimentos vegetativos (UFC.mL⁻¹) de todos ensaios realizados no biorreator airlift.

Visto que a concentração de 125mL.L⁻¹ foi a que houve menor crescimento, recomenda-se o uso da maior concentração testada, 175 mL.L⁻¹, assim pode-se dar uma característica a esse efluente, visto que nessa concentração foi atingido um

crescimento fúngico mínimo de $5,3 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ sendo ideal para aplicação do produto.

Para Júnior, Geraldine e Carvalho (2009) testando diferentes isolados do gênero *Trichoderma* em cultura do feijoeiro para combate de *Sclerotinia sclerotiorum*, resultando em um bom aproveitamento desses fungos com concentração de 2×10^7 conídios.mL⁻¹. Foram aplicadas durante o pré florescimento do feijoeiro 'Pérola' e durante a floração plena. Resultando em uma porcentagem de parasitagem dos fungos *Trichoderma* spp. sobre o mofo branco em faixa de 93%.

A interação da palhada de Braquiária junto com a aplicação de *Trichoderma harzianum* em culturas de soja, alcançaram ótima eficiência. Foram aplicados 0; 0,5; 1 e 1,5 L.ha⁻¹ do inóculo de *T. harzianum* com concentração de 2×10^9 UFC.mL⁻¹ em parcelas cultivadas com e sem Braquiária. Houve um aumento do número de escleródios de *S. sclerotiorum* parasitados por *Trichoderma harzianum* na presença de palhada, fazendo com que aumente a produção de soja devido à redução de incidência do mofo-branco (GÖRGEN et al., 2009).

Os valores de pH variaram entre 4,8 a 6,7, e ao passar do tempo os valores do meio decaem, (Gráfico 3). Esse fenômeno acontece devido a atividade do microrganismo, que está absorvendo aminoácidos, acumulando íons, excretando gás carbônico ou excretando íons H⁺ durante a geração de ATP (NEVES,2003). Com isso, testou-se os valores de pH para o melhor ajustamento de curvas, onde resultou em regressão geométrica (n=39; R²=74,35%; p<0,00001).

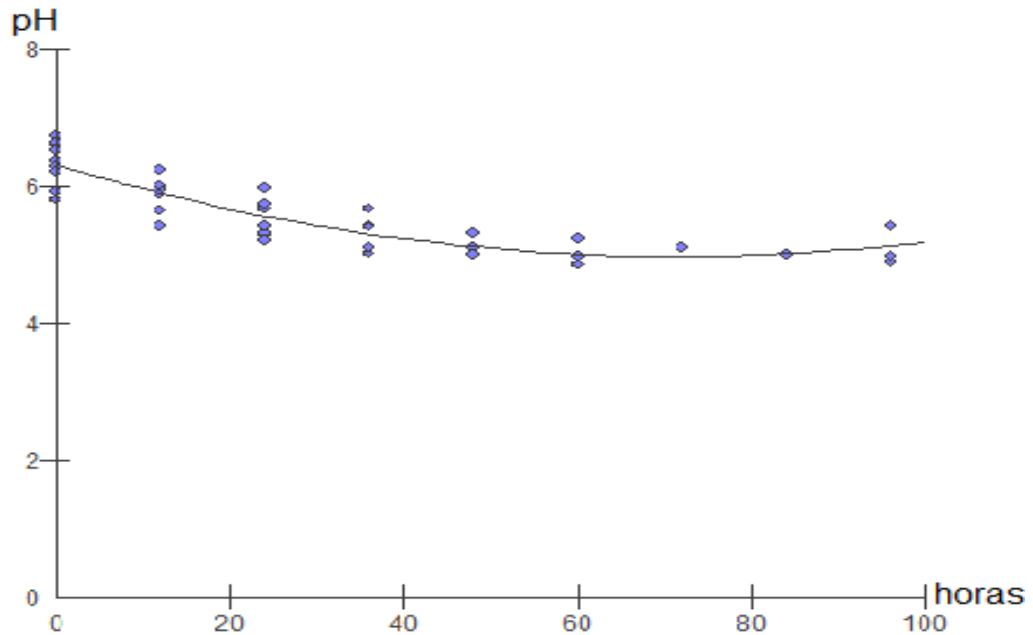


Gráfico 3: Valores de pH em relação ao tempo de todos experimentos realizados.

Os fungos normalmente crescem melhor em ambientes em que o pH é próximo a 5, que é muito ácido para o crescimento da maioria das bactérias comuns (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O pH é uma das variáveis mais importantes para processos fermentativos, sendo um parâmetro que influencia no crescimento de microrganismos. Utilizando dextrose como fonte de carbono para cultivo do fungo *Clonostachys rosea*, apresentou valores 3,71 e 4 como melhores resultados, já com pH entre 2 e 2,3 a produção de conídios foi quase nula (CARVALHO, 2014).

Para concentrações de manipueira na produção de bioinseticidas a partir de *Bacillus thuringiensis israelenses*, houve uma variação de pH, uma pequena redução em todas as concentrações até cerca de 6 horas do processo fermentativo, a partir da qual há um aumento destes valores, até o final do processo, chegando a 8,4 (ERNANDES; DEL BIANCHI; MORAES, 2014).

Para os valores de oxigênio dissolvido foram verificados em uma faixa de 0,55 a 6,4 mg.L⁻¹. Os níveis de oxigênio dissolvido diminuía em relação ao tempo (Gráfico 4). Executou-se também esses valores para o melhor ajustamento de curvas, verificando também como regressão geométrica (n=39; R²=77,43%; p< 0,00001).

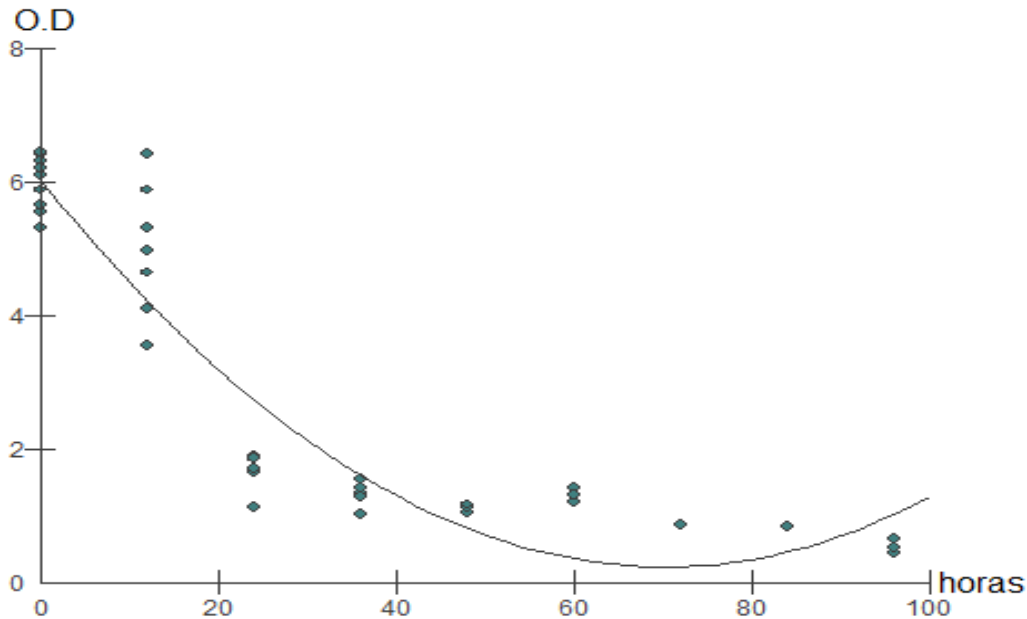


Gráfico 4: Valores de oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹) em relação ao tempo de todos experimentos realizados.

Espécies de *Trichoderma* podem sobreviver a condições anaeróbicas em estado vegetativo, mas esses fungos apresentam uma exigência absoluta de oxigênio para a esporulação (SULOVA; HRMOVÁ; FARKAŠ, 1990).

Em três diferentes volumes de ar para um biorreator *airlift*, constatou a alteração de oxigênio dissolvido para cultivo do fungo *Rhizopogon nigrescens*. Para 0,2 vvm de ar houve, o meio de cultura líquido apresentava 7,5 mg.L⁻¹ e após o décimo dia houve uma redução para 2,5 mg.L⁻¹. Para 0,36 vvm iniciou o processo em 7,5 mg.L⁻¹ e finalizou 6,2 mg.L⁻¹. E para 0,52 vvm de ar também começou com 7,5 mg.L⁻¹ e ao fim 4,4 mg.L⁻¹ (ROSSI, 2006). Diferentemente deste trabalho que os níveis de oxigênio dissolvido foram muito baixos, o que pôde diminuir a reprodução dos fungos.

Para a temperatura houve pouca variação e manteve-se na faixa de 28±1°C em todas bateladas realizadas (Gráfico 5). Apenas no início a temperatura apresenta na faixa de 31±1°C, pois processo de autoclavagem de substrato era realizado antes de inocular no biorreator. Realizou-se o teste estatístico de ajustamento de curvas e

verificou a regressão geométrica como melhor ajuste ($n=39$; $R^2=41,51\%$; $p<0,00001$).

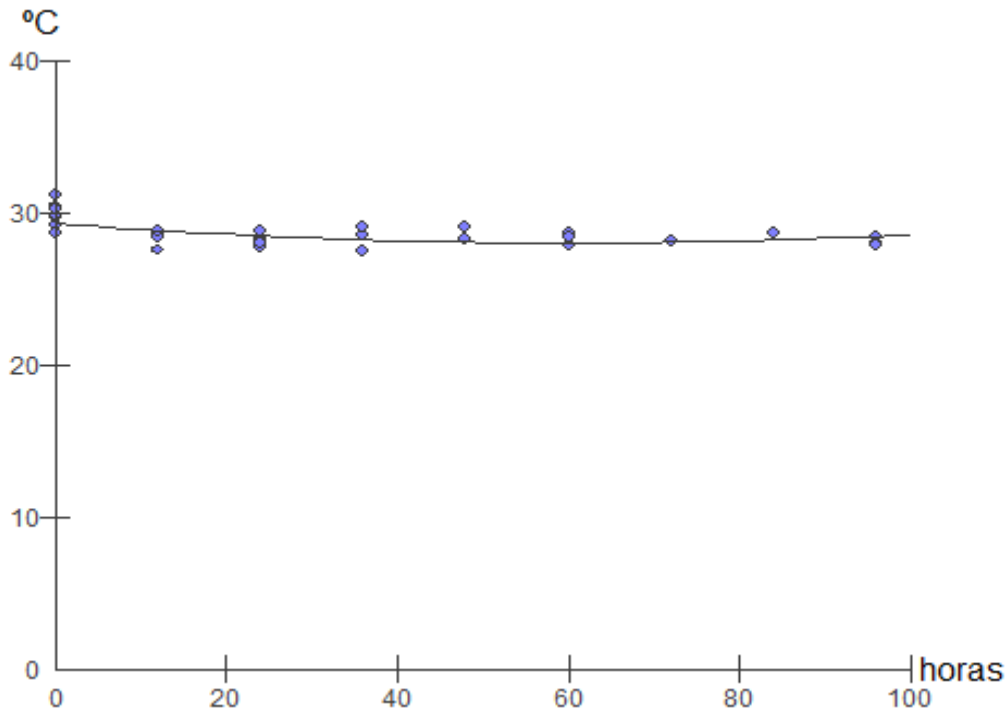


Gráfico 5: Valores de temperatura (°C) em relação ao tempo de todos experimentos realizados.

Para Casa et. al. (2007) verificaram que a temperatura próxima a 26°C proporcionou maior crescimento do micélio de *Stenocarpella macrospora*, sendo que a faixa ideal de temperatura situou-se entre 25 e 28°C. E a faixa de temperatura entre 30 e 35°C proporcionou a esporulação mais rápida e abundante para o fungo.

Considerando que no sistema de plantio direto a temperatura do solo é geralmente mais baixa que no plantio convencional, ocorre o beneficiamento da esporulação desses microrganismos normalmente, devido ao solo com palhada não atinja temperaturas superiores a 40°C. É provável que a palhada presente sobre o solo não atinja temperaturas superiores a 40°C, o que permite dizer que a esporulação destes organismos será ocorrida normalmente (CASA et al., 2007).

Para o gênero *Trichoderma* na esporulação em meio líquido concluiu-se que a temperatura de 30°C foi a que apresentou maior produção de conídios, superando a ordem de 10^7 conídios.mL⁻¹, e a temperatura de 25°C também produziu boa quantidade de conídios não diferindo estatisticamente de 30°C. Porém para a

temperatura de 15°C houve uma grande redução na produção de conídios na escala de 10 vezes menos (SILVA et al., 2012).

6 CONCLUSÃO

No experimento realizado, pode-se concluir que o resíduo, manipueira, pode ser usado como meio de cultura para produção em meio líquido de *Trichoderma* spp. em biorreator *airlift* alternativo. Sendo que, foram constatadas a presença desses microrganismos em todas as bateladas e concentrações testadas e apenas uma dessas não seria eficiente para aplicação.

De acordo com o teste estatístico realizado pôde afirmar que não há diferença de crescimentos nas três concentrações utilizadas, assim podemos utilizar a concentração de 175mL.L⁻¹, visto que é um resíduo agroindustrial, gerador de impactos ambientais e de baixo custo.

O uso do biorreator *airlift* alternativo foi viável, devido ao potencial de cultivo de microrganismos, porém recomenda-se uma melhora em sua configuração, para que a concentração de oxigênio dissolvido presente no meio abaixe lentamente e assim, aumentar o tempo de esporulação do microrganismo dentro do biorreator. Problemas com contaminantes também devem ser solucionados, como na aspersão de ar para dentro do biorreator que não havia tratamento.

Os parâmetros seguiram o previsto, visto que a redução do pH é comum devido ao processo de cultivo de microrganismos ser um processo fermentativo, e também para a redução de oxigênio dissolvido, pois a medida que o microrganismo cataboliza o alimento o oxigênio dissolvido diminui. Já a temperatura foi ajustada por meio do termostato, para a faixa de temperatura comum de cultivo dos fungos.

Assim para futuros trabalhos recomenda-se o melhoramento do biorreator *airlift* alternativo a fim de, aumentar o tempo de saturação de oxigênio dissolvido, e assim aumentar sua eficiência. Utilizar a manipueira como substrato para produção de microrganismos sem autoclavar, podendo haver uma maior economia em relação aos custos com preparo do substrato. E aplicação do produto em campo para comprovar a aplicabilidade desse gênero de fungos.

REFERENCIAS

BARBOSA, Aneli M.; CUNHA, Paulo D. T.; PIGATTO, Mariane M.; SILVA, Maria L. C. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Seminário de Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BARROS, Francisco F. C. **ESTUDO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO E AMPLIAÇÃO DE ESCALA NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Bacillus subtilis* EM MANIPUEIRA**. 2006. 117f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CARVALHO, André L. A. **Produção massal do fungo *Clonostachys rosea* em meio líquido**. 2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CASA, Ricardo T.; REIS, Erlei M.; ZAMBOLIM, Laércio; MOREIRA, Eder N. Efeito da temperatura e de regimes de luz no crescimento do micélio, germinação de conídios e esporulação de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.137-142, 2007.

CASSONI, Vanessa. **Valorização de resíduo de processamento de farinha de mandioca (manipueira) por acetificação**. 2008. 90 f. Tese (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2008

CERRI, Marcel O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. 2009. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

CORDEIRO, Gustavo Q. **Tratamento de manipueira em reator anaeróbio compartimentado**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2006.

COSTA, Giselle A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações.** 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Metodologia para a viabilidade de conídios – unidade formadora de colônia.** 2012. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, 2012.

ERNANDES, Samara. **Estudos da utilização de sangue de abatedouros como substrato fermentativo para produção de *Bacillus thuringiensis* por fermentação submersa.** 1998. 81 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 1998.

ERNANDES, Samara; DEL BIANCHI, Vanildo; MORAES, Iracema O. Comparative Studies of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis Metabolism in Different Concentrations of Cassava Flour Processing Waste Based Media. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 5, p. 978-983, out. 2014.

EZZIYYANI, Mohammed.; SÁNCHEZ, Consuelo P.; AHMED, Sid; REQUENA, Maria E.; CANDELA, María E. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). **Anales de Biología.** Espanha, v. 26, p. 35-45, 2004.

FEIDEN, Armin. **Tratamento de águas residuárias de indústria de fécula de mandioca através de biodigestor anaeróbico com separação de fases em escala piloto.** 2000. 90 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2000.

FERREIRA, Waldemar de A.; BOTELHO, Sonia M.; CARDOSO, Eloísa M. R.; POLTRONIERI, Marli C. **Manipueira: um adubo orgânico em potencial.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001.

GAUCH, Fritz. **Micoparasitismo de espécies de *Pythium* com oogônio equinulado e o controle de *Pythium ultimum* Trow causador de tombamento de mudas, em hortaliças.** 1996. 94 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 1996.

GÖRGEN, Claudia A.; NETO, Américo N. S.; CARNEIRO, Luciana C.; RAGAGNIN, Vilmar; JUNIOR, Murillo L. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.12, p.1583-1590, 2009.

HADDAD, Patrícia E. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Meloidogyne incognita* em soja e produção em meios líquidos.** 2014. 102 f. Dissertação (Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo 2014.

JÚNIOR, Murillo L.; GERALDINE, Alaerson M.; CARVALHO, Daniel D. C. Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum. **Circular Técnica 85**. EMBRAPA, 2009, Santo Antônio de Goiás-GO.

MADIGAN, Michael T; MARTINKO, John M.; DUNLAP, Paul V., CLARK David P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. XXXII, p.1128.

MENNA, Sérgio R. O. **Modelagem de um biorreator do tipo airlift para cultivo de microrganismos.** 2010. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2010.

NEVES, L. C. M. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando ‘*Saccharomyces cerevisiae*’ W303-181.** 2003. 158 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2003.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Glaucia M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 35, n.1-2, p. 81-85, 2004.

PASTORE, Neivair S. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e Concentração de sacarose na produção de ácido Cítrico por *Aspergillus niger* usando manipueira como Substrato**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

PEDROSO, Paula R. F. **Produção de Vinagre de Maçã em Biorreator *Airlift***. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) –Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

RIBEIRO, Tanara S. **O fungo *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos: dificuldades e perspectivas**. 2009. 35f. Monografia (Especialista em Tecnologias Inovadoras no Manejo Integrado de Pragas e Doenças de Plantas) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ROSSI, Márcio J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift**. 2006. 188 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SAITO, Larissa R.; SALES, Livia L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, Rafael; RAMOS, Moisés S.; REFFATTI, T. Aspects of the effects of the fungus *Trichoderma* spp. in biocontrol of pathogens of agricultural crops. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 2, n. 3, p. 203-208, 2009.

SANTIN, Rita C. M. **Potencial do Uso dos Fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no Biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2008. 91f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SILVA, Jéssica O. E.; SANTOS, Natalia F.; VIEIRA, Bernardo A.; MORANDI, Marcelo A. B. Efeito da temperatura e fotoperíodo na esporulação de *Trichoderma*

em meio líquido. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6, 2012, Jaguariúna. **Anais...** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 1 CD ROM. Nº 12406.

SOUZA, Myrne J. L.; VIANA, Anselmo E. S.; MATSUMOTO, Sylvana N.; VASCONCELOS, Ramon C.; SEDIYAMA, Tocio; MORAIS, Otoniel M. Características agronômicas da mandioca relacionadas à interação entre irrigação, épocas de colheita e cloreto de mepiquat. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 45-53, 2010.

SULOVÁ, Zdena; HRMOVÁ, Mária; FARKAŠ, Vladimír. Photostimulated oxygen uptake in *Trichoderma viride*. **Journal of General Microbiology**. Tchecoslováquia, v. 136, n. 11, p. 2287–2290, 1990.

TRABULSI, Luiz R.; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2008. 760 p.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. XXVIII, p. 934.

VALICENTE, Fernando H.; ZANASI, Rodrigo F. Uso de meio alternativos para produção de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis*. **Circular Técnica 60**. EMBRAPA, 2005, Sete Lagoas-MG.

WOSIACKI, Gilvan; CEREDA, Marney P. Valorização dos resíduos do processamento de mandioca. **Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra**, v. 8, n. 1, p. 27-43, 2002.

YEDIDIA, Iris; BENHAMOU, N.; CHET Ilan. Induction of defense response in cucumber plants (*Cucumis sativus*L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**. EUA, v.65, p. 1061–1070, 1999.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91145/>
Acesso em: 14 set. 2015