

Crescimento de isolados de *Trichoderma sp.* em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio

Growth of *Trichoderma sp.* isolates on different nitrogen sources and concentrations

Michelly Elen Leal Menezes¹; Katia Lisana Nascimento²; Roselene Erlo³; Eliane S. Brito⁴; Ernando Ferreira Mota⁵; Carlos Gava⁶

Resumo

Sabendo-se que o meio de produção pode influenciar significativamente na qualidade dos propágulos, este trabalho é a primeira etapa na definição de metodologia de produção e objetivou definir o efeito de fontes e doses de compostos nitrogenados sobre o crescimento de isolados de *Trichoderma spp.*, potenciais agentes de controle de doenças. Inicialmente, avaliou-se seu efeito sobre o crescimento micelial em meio sólido e verificou-se um maior alongamento da hifa e menor densidade do micélio quando comparado ao meio padrão, o BDA ¼. Em cultivo em meio líquido, houve uma interação significativa das fontes e doses de N utilizadas. O crescimento micelial foi maior utilizando-se nitrato de amônio (NH₄NO₃) quando comparado a extrato de levedura e observou-se um comportamento linear no crescimento fúngico nas doses utilizadas.

Palavras-chave: *Trichoderma sp.*, fermentação líquida, controle biológico.

¹Bióloga, CNPq/Embrapa Semi-Árido, Cx. Postal 23, 56302-970, Petrolina-PE; ²Estudante de Biologia, Bolsista FACEPE/Embrapa Semi-Árido; ³Química de Alimentos, Bolsista CNPq; ⁴Eng^a Agr^a, Estudante de Doutorado, Bolsista CAPES/Embrapa Semi-Árido; ⁵Estudante de Biologia, Assistente da Embrapa Semi-Árido; ⁶Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Semi-Árido; gava@cpatsa.embrapa.br

Introdução

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos filamentosos, mesofílicos pertencente à ordem Hypocreales, freqüentemente encontrados no solo onde exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do parasitismo e/ou antibiose, bem como por hiperparasitismo (Martins-Corder & Melo, 1998). Este gênero é um dos mais estudados entre os fungos filamentosos devido ao seu grande potencial de aplicação do ponto de vista industrial e biotecnológico (Samuels, 1996).

Recentemente, os processos de fermentação binários, que compreendem uma etapa em meio líquido e uma segunda em meio semi-sólido, têm possibilitado maior produtividade de propágulos de agentes de controle biológico para a formulação (Alzugaray, 2007). O crescimento microbiano resulta da resposta metabólica dos microorganismos às condições ambientais e maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio inorgânico sob a forma de nitrato ou amônia em adição à utilização de grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados (Carlile & Watkinson, 1997). O equilíbrio de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, vitaminas e micronutrientes são fatores decisivos para o crescimento e esporulação dos microorganismos (Silva & Melo, 1999).

Assim, faz-se necessário otimizar as condições de fermentação nas duas etapas, buscando maior biomassa na primeira etapa e maior produção de conídios. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e a produção de biomassa de isolados de *Trichoderma* expostos a diferentes fontes e concentrações de N, no intuito de otimizar a produção destes isolados como agentes de controle biológico.

Material e Métodos

Nos estudos realizados, foram utilizados quatro isolados: *Trichoderma harzianum* LCB 47, *T. viride* LCB 48, *T. koningi* LCB 49 e *T. polysporum* LCB 50, os quais são mantidos em meio de cultura sob refrigeração na coleção de microorganismos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-Árido, Petrolina - PE.

Foram avaliados dois meios de cultura derivados do meio salino básico (BSM) – CaCl_2 0,8 g.L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g.L⁻¹, K_2SO_4 1,4 g.L⁻¹, KH_2PO_4 0,2 g.L⁻¹, soluções traço de microelementos e FeEDTA 0,1 g.L⁻¹, adicionados de 0, 10, 50, 100 e 200 mg.L⁻¹ de NH_4NO_3 e 0, 20, 50, 100 e 200 mg.L⁻¹ de extrato de levedura.

No primeiro experimento, discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura BDA com conídios dos respectivos isolados foram transferidos para placas de Petri contendo os meios de cultura e, a seguir, foram incubadas em BOD a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. As medições do crescimento micelial foram realizadas a cada 24 h até a completa colonização da placa. O experimento foi montado em um esquema fatorial com 4 isolados x (2 fontes de nitrogênio x 5 doses) + 1 meio padrão (BDA), em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para fins de comparação foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura BDA $\frac{1}{4}$.

Em um segundo experimento, utilizou-se os mesmos meios de cultura descritos anteriormente, sem a adição de ágar. Inicialmente, foi obtida uma suspensão de conídios de *Trichoderma spp.* a partir de placas de Petri, contendo meio BDA $\frac{1}{4}$. Para fermentação, foram utilizados frascos de vidro contendo 25 mL de meio de cultura ao qual adicionou-se 100 μL de uma suspensão de $1,0 \times 10^5$ conídios. mL^{-1} . Após a inoculação, os frascos foram colocados em mesa agitadora orbital TE-145 (Tecnal), em agitação a 120 r. p. m. numa sala com temperatura controlada a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. A avaliação do crescimento foi realizado em três intervalos de tempo (4, 6 e 10 dias), determinando-se a biomassa micelial obtida após filtração dos meios de cultura em papel de filtro previamente pesado.

Resultados e Discussão

Avaliando o efeito de fontes e doses de nitrogênio no crescimento em meio sólido, verificou-se um rápido crescimento micelial dos isolados (Fig. 1). Não se verificou diferença significativa no comportamento dos isolados com relação ao alongamento do micélio. No entanto, houve interação significativa entre as fontes de nitrogênio e as doses utilizadas. Aos dez dias após a inoculação, todos os isolados alcançaram um diâmetro de colônia superior ao demonstrado em meio BDA em meio de cultivo contendo a dose mais baixa de nutriente, verificado em contraste ortogonal pelo teste de F ($F_{1,39} = 17,1$; $P = 0,0017$). Quando comparado com o meio BDA, verificou-se visualmente uma menor densidade de micélio à superfície do meio BSM em detrimento das concentrações e fontes de N avaliadas ($F_{1,39} = 4,05$; $P = 0,029$), com maior desenvolvimento obtido em meio contendo nitrato de amônio como única fonte de nitrogênio.

74 Crescimento de isolados de *Trichoderma sp.* em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio

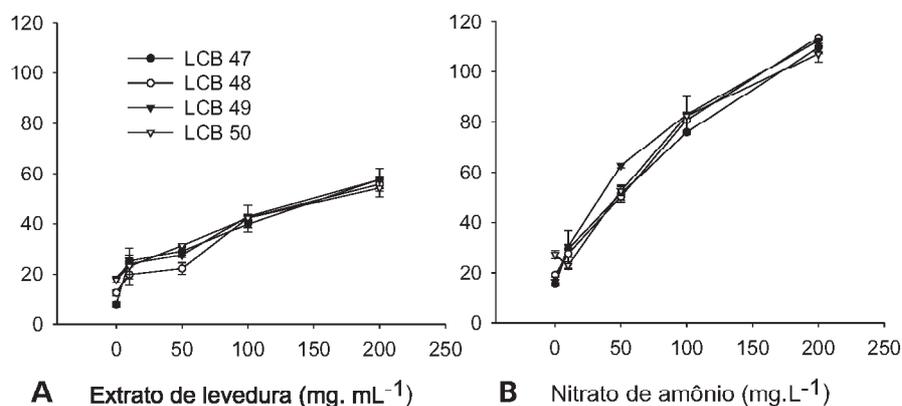


Fig. 1. Crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. (média \pm desvio padrão) medido pelo diâmetro das colônias (mm) crescidas em meio sólido BSM acrescido de diferentes doses e fontes de nitrogênio - extrato de levedura (A) e nitrato de amônio (B) -, ao décimo dia de incubação a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Na fermentação em meio líquido, não se verificou diferença significativa na produção de massa micelial entre os isolados ($F_{3;39} = 0,805$; $P = 0,499$). A massa de micélio produzida apresentou interação significativa com as doses e fontes de nitrogênio, com valores superiores para a fonte inorgânica (Fig. 2). Este comportamento difere do esperado, já que em outros fungos filamentosos o crescimento é superior em meios de cultura contendo fontes orgânicas de nitrogênio (Silva & Melo, 1999).

Independentemente da fonte, os isolados apresentaram produção de pigmento de coloração amarelada nas doses muito baixas de nitrogênio. Segundo Rangel & Roberts (2007), os fungos apresentam respostas metabólicas a estresses ambientais que podem resultar no acúmulo de compostos que venham a alterar sua composição bioquímica, adequando-o ao ambiente em que se encontra. Segundo estes autores, pode se verificar o acúmulo de açúcares, proteínas e metabólitos secundários não usuais em função de estresses nutricionais e/ou ambientais.

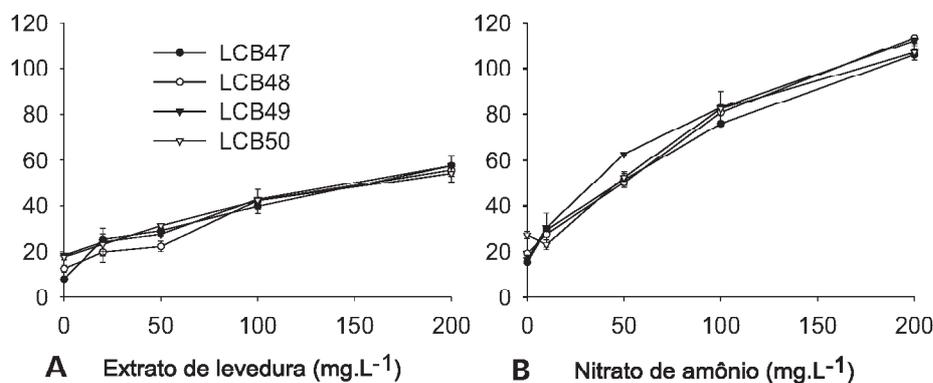


Fig. 2. Crescimento de isolados de *Trichoderma spp.* (média \pm desvio padrão) em fermentação em meio de cultura líquido em função de fontes - extrato de levedura (A) e nitrato de amônio (B) - e da concentração de compostos nitrogenados após dez dias de incubação em agitação orbital a 120 rpm a 28°C.

As equações de regressão apresentadas na Tabela 2 mostram que não se alcançou a máxima produtividade possível com as doses de N avaliadas. No entanto, com a continuidade dos estudos será avaliado, ainda, o efeito de um maior tempo de fermentação e a transferência da biomassa para condições de fermentação semi-sólida. As doses utilizadas deverão alcançar à máxima eficiência econômica da produção de conídios, ajustando-se a máxima produtividade e custo compatível.

Tabela 2. Equações de regressão linear do crescimento dos isolados de *Trichoderma spp.* em fermentação líquida em função da concentração de compostos nitrogenados em meio BSM.

Isolados	Extrato de Levedura		
	$\hat{y} = Y_0 + ax$	R ²	P
<i>T. harzianum</i> LCB 47	$\hat{y} = 15,63 + 0,211x$	0,92	0,0091
<i>T. koningii</i> LCB 48	$\hat{y} = 14,33 + 0,219x$	0,95	0,0040
<i>T. viride</i> LCB 49	$\hat{y} = 19,57 + 0,197x$	0,98	0,0012
<i>T. polysporum</i> LCB 50	$\hat{y} = 20,35 + 0,181x$	0,96	0,0030
Isolados	NH ₄ NO ₃		
	$\hat{y} = Y_0 + ax$	R ²	P
<i>T. harzianum</i> LCB 47	$\hat{y} = 24,27 + 0,4357x$	0,96	0,0033
<i>T. koningii</i> LCB 48	$\hat{y} = 24,31 + 0,4717x$	0,97	0,0016
<i>T. viride</i> LCB 49	$\hat{y} = 27,99 + 0,4582x$	0,93	0,0078
<i>T. polysporum</i> LCB 50	$\hat{y} = 27,57 + 0,4291x$	0,95	0,0053

Nos experimentos desenvolvidos, verificou-se que embora o micélio alcançasse grande crescimento, houve redução da densidade micelial na superfície do meio BSM sólido em detrimento da fonte e dose de nitrogênio e a fonte inorgânica de N apresentou maior produtividade de biomassa micelial em meio líquido.

Referências Bibliográficas

ALZUGARAY, R. Producción de entomopatógenos como objetivo estratégico del control de plagas. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10, 2007, Brasília, DF. **Inovar para preservar a vida**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 1 CD-ROM.

CARLILE, M.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, 1997. 460p.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. de. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 1-7, jan./abr. 1998.

RANGEL, D.; ROBERTS, D. W. In: X SICONBIOL: Inovar para preservar a vida. **Resumos...** Brasília, julho de 2007. CD-ROM.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 923-935, 1996.

SILVA, C. M. M. de S. **Biodegradação do fungicida carbendazim**. 1996. 86 f. il. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SILVA, C. M. M. de S.; MELO, I. S. Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria alternata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 499-503, 1999.