

AVALIAÇÃO DE SUBSTRATOS LOCAIS PARA PRODUÇÃO DE *Trichoderma harzianum* PARA USO EM CONTROLE BIOLÓGICO

Scarlet Isabelle Machado PEREIRA¹
Rosalee Albuquerque COELHO NETTO²

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ² Orientador CSAS/INPA²

INTRODUÇÃO

Espécies de *Trichoderma* são conhecidas como agentes de biocontrole tanto de patógenos habitantes do solo, como fungos e nematóides, como de patógenos causadores de doenças foliares. Apesar dos resultados favoráveis com o uso de diversas espécies de *Trichoderma* para controle biológico, há pouca disponibilidade de inóculo para os agricultores utilizarem em seus plantios. Arroz tem sido o substrato mais usado para produção massal de *Trichoderma*, porém, tem custo relativamente elevado. Este estudo objetiva identificar e avaliar substratos locais, ou facilmente obtidos localmente, e de baixo custo, bem como a umidade mais favorável nesses substratos para produção de *Trichoderma harzianum* para uso em biocontrole.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia (INPA) em Manaus, AM. Foram preparadas nove combinações de substratos misturados dois a dois. Com base na relação C:N de cada substrato (Tabela 1) foram definidas as proporções de cada componente na mistura de modo que a proporção C:N se aproximasse de 40:1 que é considerada ótima para produção de *Trichoderma* (Steyaert *et al.* 2010). Para o cálculo utilizou-se a fórmula de Gomes *et al.* (2001), utilizada, originalmente, para o cálculo de proporção de componentes de pilhas de composto:

$$PMRC = \frac{(30 \times Nn) - Cn}{Cc - (30 \times Nc)}$$

Onde: PMRC: partes de material rico em C; Nn: teor de N do material rico em N; Cn: teor de C do material rico em N; Cc: teor de C do material rico em C; Nc: teor de N do material rico em C.

Testaram-se misturas dos substratos: 1. Casca e entrecasca de macaxeira (*Manihot esculenta* Crantz), 2. Resíduo de cervejaria (bagaço de malte (*Hordeum vulgare* L.) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen), 3. BAINHA DE PALMITO DE PUPUNHEIRA (*Bactris gasipaes* Kunth), 4. Farelo de arroz (*Oryza sativa* L); 5. Casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Mayer) e 6. Grãos de arroz (testemunha). Os resíduos foram secos em estufa a 60 °C, por 24 horas e antes das misturas os resíduos 1, 3 e 5 foram triturados em moinho de faca.

Para avaliar a colonização das misturas de substratos utilizou-se o isolado de *Trichoderma harzianum* Rifai, INPA 1334, armazenado na coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA, utilizado com sucesso no controle de podridão de Sclerotium em pimentão (Coelho Netto, *et al.*, 2013).

Transferiram-se porções de 100 g das misturas dos substratos e do arroz para sacos de polipropileno (30 x 15 cm) contendo na boca um anel de cano de PVC (40 mm de largura x 38,1 mm de diâmetro) preso com uma liga de borracha e fechado com um tampão de algodão para permitir a troca gasosa com o ambiente (Lohmann *et al.*, 2007). Os grãos de arroz umedecidos com 10 mL de água e as misturas de resíduos com as umidades descritas na Tabela 2 foram autoclavados por dois dias consecutivos, por 20 minutos (120 °C e 1 atm de pressão) e, após o resfriamento,

transferiu-se, em câmara asséptica, um disco de colônia de *T. harzianum* (0,5 cm de diâmetro), cultivada em BDA, por trinta dias. Incubou-se o conteúdo dos sacos em laboratório sob temperatura aproximada de 27 °C por 15 dias, sob iluminação contínua fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares de 40w localizadas 50 cm acima dos sacos. Em dias alternados procedeu-se o revolvimento do conteúdo dos sacos para uniformizar o crescimento do fungo no substrato. Após este período retirou-se, de cada saco, uma amostra de 1 g que foi utilizada para quantificação da esporulação do fungo em câmara de Neubauer, após diluição em série (Alfenas e Mafia, 2008). Para as determinações das concentrações de conídios das suspensões utilizou-se microscópio óptico, 250x ou 400x. A umidade que proporcionou maior esporulação para cada substrato (Tabela 2) foi avaliada em três repetições. O experimento teve delineamento inteiramente casualizado com três repetições e dez tratamentos (misturas de substratos e testemunha). A média do número de colônias de *Trichoderma* em cada substrato foram transformadas em $\log x+1$ e submetidas a análise de variância e a teste de separação de médias (Tukey), Tabela 3.

Tabela 1. Teores de carbono, nitrogênio e relação C:N de resíduos agrícolas e industriais encontrados no Amazonas.

Resíduo	C (%)	N (%)	C:N	Referência
1 Casca e entrecasca de raízes de macaxeira	28,8	0,3	96/1	Ricci <i>et al.</i> 2006
2 Resíduo de cervejaria	52,8	4,4	12/1	Ricci <i>et al.</i> 2006
3 Bainha de palmito de pupunheira	40,97	0,33	124/1	Sales-Campos <i>et al.</i> ,2010
4 Farelo de arroz	38,38	1,76	21/1	Montovani <i>et al.</i> ,2012.
5 Casca de tucumã	51,35	5,18	10/1	Kleinlein, 2010.
6 Serragem	85,6	0,1	865/1	Ricci <i>et al.</i> 2006

Tabela 2. Composição das nove misturas de resíduos por componente (g) e quantidade de água (mL).

Resíduos	Quantidade dos resíduos (g) por misturas de substratos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Serragem	48,71	14,52	55,55						
Resíduos de cervejaria	51,29			67,94			70,14		
Farelo de arroz		85,48			68,50			44,75	
Casca de tucumã			44,45			73,40			74,87
Bainha de palmito de pupunheira				32,06	31,50	26,60			
Casca de macaxeira							29,86	55,25	25,13
Água (mL)	40	30	25	40	40	20	40	40	20

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram testadas duas umidades para cada mistura para que fosse selecionada a que proporcionava a melhor esporulação, usando a que foi mais favorável e descartando as demais, elaborando assim, outro experimento utilizando a umidade escolhida anteriormente para que fosse realizado o teste de médias e variância sobre os dados obtidos.

Observa-se na Tabela 4 que a esporulação de *T. harzianum* nas misturas: (5) bainha de palmito de pupunheira + farelo de arroz + 40 ml de água, (8) casca de macaxeira + farelo de arroz +40 ml de água foi superior à obtida nas outras misturas e na testemunha, arroz. As demais misturas propiciaram esporulação de *T. harzianum* inferior ou equivalente a

do arroz. As misturas 9-Casca de macaxeira + casca de tucumã +20 mL de água e 6-Bainha de palmito de pupunha + casca de tucumã +20 mL de água propiciaram a menor esporulação do fungo. Serragem é um substrato barato, fácil de obter e bastante utilizado para multiplicação de fungos seja para produção de enzimas (Acharya *et al.* 2008), seja para produção de spaw (produção de semente-inóculo) para o cultivo de fungos comestíveis (Royse, 1985) em mistura com fontes de nitrogênio. Apesar de serragem ser um substrato barato, fácil de se obter e bastante utilizado para multiplicação de fungos seja para produção de enzimas (Acharya *et al.* 2008), seja para produção de spawn (semente-inóculo) para o cultivo de fungos comestíveis (Royse, 1985) sempre acrescida de fontes de nitrogênio. No presente trabalho, a serragem não foi um bom substrato para produção de *T. harzianum*. No entanto, como não foi possível saber a madeira de origem da serragem utilizada no estudo, a utilização da serragem não pode ser descartada, pois, o crescimento micelial varia, dependendo da espécie da árvore que deu origem à mesma (Ohga, 2000). Casca de mandioca já foi utilizada para produção de enzimas por fungos e, dependendo da espécie de fungo cultivada, tanto pode ser considerada um bom substrato (Sani *et al.*, 1992) ou um substrato fraco (Oliveira *et al.*, 2006).

Tabela 3. Análise de variância.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	9	1,61709	0,17968	77,1585**
Resíduo	10	0,02329	0,00233	
Total	19	164038		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

FV = Fonte de variação; GL = Grau de liberdade; SQ = Soma de quadrado; QM = Quadrado médio; F = Estatística do teste F.

Tabela 4. Número de conídios de *Trichoderma harzianum* com teste de separação de média Tukey por g de mistura e umidade de resíduos agrícolas e industriais após 15 dias de cultivo em laboratório.

Substrato	N. de conídios/mL
1 - serragem + resíduo de cervejaria + 40 ml de água	3,56 x 10 ⁶ c
2- serragem + farelo de arroz + 30 ml de água	3,72 x 10 ⁶ bc
3 -serragem + casca de tucumã + 25 ml de água	3,58 x 10 ⁶ c
4-bainha de palmito de pupunha + resíduos de cervejaria + 40 ml de água	3,57 x 10 ⁶ c
5 -bainha de palmito de pupunha + farelo de arroz + 40 ml de água	43,2 x 10 ⁶ a
6-bainha de palmito de pupunha + casca de tucumã + 20 ml de água	3,36 x 10 ⁶ d
7-casca de macaxeira+ resíduo de cervejaria + 40 ml de água	3,63 x 10 ⁶ c
8 -casca de macaxeira+ farelo de arroz + 40 ml de água	41,6 x 10 ⁶ a
9-casca de macaxeira + casca de tucumã + 20 ml	3,54 x 10 ⁶ cd
10 -arroz + 15 ml	3,84 x 10 ⁶ b

CV% = 1,29

Neste trabalho a bainha de palmito de pupunha + farelo de arroz e casca de macaxeira + farelo de arroz foram os melhores substratos para o cultivo de *T. harzianum*. A bainha de palmito é um substrato abundante na indústria de conserva que é descartado. Para aproveitamento desse resíduo tem sido sugerida a compostagem (Teixeira *et al.*, 2005; Fermino *et al.*, 2010). Outras utilizações desse resíduo, como na produção de inóculo para controle biológico, devem

ser estimuladas farelo de arroz e resíduo de cervejaria, utilizados como fonte de nitrogênio, são substratos da fácil obtenção localmente e utilizados na alimentação animal (Silva *et al.*, 2010; Brochier e Carvalho, 2009; Bermudes e Peixoto, 1997).

CONCLUSÃO

Trichoderma pode ser produzido de forma massal em substratos facilmente encontrados localmente de forma mais eficiente do que em grãos de arroz, o substrato tradicional. Pequenas empresas podem multiplicar e fornecer agentes de controle biológico utilizando resíduos de baixo custo, podendo assim atender à necessidade dos agricultores.

REFERÊNCIAS

- Acharya, P.B; Acharya, D.K.; Modi, H.A.2008. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *African Journal of Biotechnology*, 7(22): 4147-4152.
- Alfenas, A.C.; Mafia, R.G. 2008. *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa, Editora UFV. 382 p.
- Bermudes, R.F.; Peixoto, R.R. 1997. Avaliação do farelo de arroz na alimentação de bezerros da raça holandês. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 2: 391-395.
- Brochier, M.A.; Carvalho, S. 2009. Aspectos ambientais, produtivos e econômicos do aproveitamento de resíduo úmido de cervejaria na alimentação de cordeiros em sistema de confinamento. *Ciência Agrotécnica*, 33(5): 392-399.
- Coelho Netto, R.A.; Ferreira, A.A.B.; Noda, H. 2013. Manejo da podridão-de-*Sclerotium* em pimentão em um argisolo no Amazonas. *Acta Amazonica*, 43: 315-322.
- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. 1995. *Basic plant pathology methods*.2 ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 448 p.
- Faria, B.P.; Silva, J.N.; Rodrigues, A.Q.; Teixeira, P.D.; Melo, L.Q.; Costa, S.F.; Rocha, M.F.M.; Pereira, A.A. 2011. Processamento da casca de mandioca na alimentação de ovinos: desempenho, características de carcaça, morfologia ruminal e eficiência econômica. *Revista brasileira de zootecnia*, 40(12): 2929 – 2937.
- Fermino, M.H.; Gonçalves, R.S.; Battistin, A.; Silveira Jr, P.; Busnello, A.C.; Trevisam, M. 2010. Aproveitamento dos resíduos da produção de conserva de palmito como substrato para plantas. *Horticultura Brasileira*, 28: 282-286.
- Didonet, A.A. 2012. *O mercado de um produto florestal não madeireiro e o resíduo sólido gerado pela sua comercialização: o caso do tucumã (Astrocaryum aculeatum G. Mey) nas feiras de Manaus*. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional e Pesquisas na Amazônia. Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais, 67 p.
- Royse, D.J. 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom *Mycologia*, 77 (5): 756-762.
- Galletti, S.; Burzi, P.L.; Cerato, C.; Marinello, S.; Sala, E. 2008. *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. *BioControl*, 53: 917–930.
- Gomes, T.C.A.; Silva, J.A.M.; Silva, M.S.L. 2001. *Preparo de composto orgânico na pequena propriedade rural*. Instruções técnicas da Embrapa semi-árido, 53ª Edição.
- IRGA. 2008. Farelo de arroz: uma nova visão. (<http://www.irga.rs.gov.br/index.php?action>). Acesso em: 01/08/2015.
- Lohmann, T.R.; Pazuch, D.; Stangarlin, J.R.; Selzlein, C.; Nacke, H. 2007. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 2(2): 1665-1668.
- Kleinlein, W.A. 2010. *Caracterização Energética de Biomassas Amazônicas*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Engenharia Mecânica, 63 p.
- Montovani, T.R.D; Meirelles, L.D.P.; Valle, S.J; Linde, G.A.; Colauto, N. B.2012. Formulação de substratos na produção de biomassa micelial e de lacase *Pleurotus ostreatus*. *Semina: Ciências Agrárias*, 5: 1681-1692.
- Radwan, M.A.; Farrag, S.A.A.; Abu-Elamayem, M.M.; Ahmed, N.S. 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, 56: 58–62.
- Ricci, M.S.F.; Neves, M.C.P.; Nannetti, A.N.; Moreira, C.F.; Aguiar-Menezes, E.L.; Silva, E.; Caixeta, I.F.; Araújo,

- J.B.S.; Leal, M.A.A.; Fernandes, M.C.; Almeida, P.S.; Pedini, S. 2006. Cultivo do café orgânico. *Embrapa Agrobiologia. Sistemas de Produção*, 2 – 2ª Edição. Versão eletrônica. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CafeOrganico_2ed/anexo03.htm. Acesso em: 04/03/2015.
- Romero-Arenas, O.; Rivera-Tapia, J.A.; Damián Huato, M.A.; Villareal Real, O.A.; Márquez Specia, M.; López Olguín F.J. 2013. Massive production of mexican strains of *Trichoderma* spp. in different agricultural substrates. *European Journal of Experimental Biology*, 3:73-79.
- Sahebani, N.; Hadavi, N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma barzianum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2016–2020.
- Saju, K.A., Anandaraj, M., Sarma, Y.R. 2002. On farm production of *Trichoderma barzianum* using organic matter. *Indian Phytopathology*, 55: 277-281.
- Sales-Campos, C. Araújo, M. L.; Minboni, M. T. A.; Andrade, M. C. N. 2010. Análise físico-química e composição nutricional da matéria-prima e de substrates pré e pós cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Interviência*, 35(1).
- Sani, A.; Awe, F.A.; Akinyanju, J.A. 1992. Amylase synthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* grown on cassava peel. *Journal of Industrial Microbiology*, 10(1): 55-59
- Silva, V.B.; Fonseca, C.E.M.; Morenz, M.J.F.; Peixoto, E.L.T.; Moura, E.S.; Carvalho, I.N.O. 2010. Resíduo úmido de cervejaria na alimentação de cabras. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(7): 1595-1599.
- Santos, E.F.; Carvalho, F.S.; Silva, J.C.G. 2009. Agroindústria da mandioca: o caminho para a sustentabilidade econômica dos beneficiadores do bairro Campinhos em Vitória da Conquista – BA. In: Congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural, Porto Alegre. Anais. Versão eletrônica. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/13/948.pdf>. Acesso em: 05/08/2015.
- SINDICERV. 2006. O mercado brasileiro para malte. (<http://www.sindicerv.com.br/mercado.php>.) Acesso em: 02/08/2015.
- Steyaert, J.M.; Weld, R.J.; Mendonza, M.A.; Stewart, A. 2010. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*, 156: 2887 – 2900.
- Teixeira, L.B.; Germano, V.L.C.; Oliveira, R.F. de ; Furlan Júnior, J. 2005. Processos de compostagem usando resíduos das agroindústrias de açaí e de palmito do açaizeiro. Circular Técnica, Embrapa, Belém, PA. Disponível em: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/7344>.
- Tonini, R.C.G.; Santos, F.; Ishikawa, N.K.; Tavares, L.B.B. 2007. Utilização de bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis*) Mart. Areaceae como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (2): 204-206.
- Vianna, N.F.R.; Costas, M.S.C.R. 1998. *O palmito de pupunha: do plantio à colheita*. Instrução prática 261; Campinas. CATI/SAA.