

## ENSAIOS PRELIMINARES SOBRE RESÍDUOS INDUSTRIAIS LÍQUIDOS COMO MEIO DE CULTURA PARA *TRICHODERMA HARZIANUM*

ARTUR KENZO DEZOTTI<sup>1</sup>, ALEXANDRE MORAES CARDOSO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Graduado em Licenciatura em ciências biológicas, Bolsista PIBIT, IFSP, Câmpus Barretos, kenzodezotti@gmail.com

<sup>2</sup> Docente do IFSP- Campus Barretos, Avenida C 1 nº 250, amcardoso@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.12.02.00-1 Microbiologia Aplicada

**RESUMO:** O fungo do gênero *Trichoderma* é um dos agentes de controle biológico mais utilizado na agricultura, cuja produção de esporos é realizada industrialmente em meio sólido. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o teste de viabilidade de um meio nutritivo a partir de resíduo industrial do processo de envasamento de milho e líquido oriundo de silagem de milho, como meios líquidos para produção de *Trichoderma harzianum* e avaliar o crescimento de conídios *in vitro* comparados com o meio de cultura ideal para o fungo. Portanto, o parâmetro que se analisou foi a concentração de esporos, que é um dos testes mais utilizados para analisar a qualidade de produtos à base de *Trichoderma* sp. em meio líquido. Foram realizados ensaios em erlenmeyers com 72 horas de fermentação, a quantificação do número de conídios foi realizada com auxílio da Câmara de Neubauer e microscópio óptico. Observou-se dentre os meios estudados que alguns apresentaram concentração acima de  $5 \times 10^7$  conídios/ml. Pelos resultados obtidos, concluiu-se que os meios alternativos testados proporcionaram crescimento de *T. harzianum*, dando início á estudos para aprimorar a viabilidade dos meios líquidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Trichoderma harzianum*; fermentação líquida; resíduo industrial.

### PRELIMINARY TESTS ON LIQUID INDUSTRIAL WASTE AS A CULTURE MEDIA FOR *TRICHODERMA HARZIANUM*

**ABSTRACT:** The fungus of the genus *Trichoderma* is one of the most widely used biological control agents in agriculture, whose spore production is carried out industrially in a solid medium. Thus, the objective of this work was to study the viability test of a nutrient medium from industrial waste from the corn filling process and liquid from corn silage, as liquid media for the production of *Trichoderma harzianum* and to evaluate the growth of conidia in compared to the ideal culture medium for the fungus. Therefore, the parameter that was analyzed was the concentration of spores, which is one of the most used tests to analyze the quality of products based on *Trichoderma* sp. in liquid medium. Tests were carried out in erlenmeyers with 72 hours of fermentation, the quantification of the number of conidia was performed with the aid of the Neubauer Chamber and an optical microscope. Among the studied media, it was observed that some had a concentration above  $5 \times 10^7$  conidia / ml. From the results obtained, it was concluded that the alternative media tested provided growth of *T. harzianum*, initiating studies to improve the viability of liquid media.

**KEYWORDS:** *Trichoderma harzianum*; liquid fermentation; industrial waste.

### INTRODUÇÃO

A utilização de resíduos de origem vegetal se apresenta como um meio promissor para a produção industrial de bioprodutos voltados para o controle biológico, agregando assim um valor considerável ao resíduo e se tornando uma fonte de renda secundária para o produtor (TAVARES et al., 1998). A utilização desses microrganismos também se apresenta como uma das soluções para o

desperdício de alimentos (WOLNA-MARUWKA et al., 2017), visto que tal desperdício pode alcançar 30% da produção até o consumo (FAO, 2017).

Os fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os fungos mais explorados no mundo devido ao potencial industrial, biotecnológico e um rápido crescimento em diversos substratos além de não apresentarem patogenicidade ao homem e ao meio ambiente (REZENDE, 2017). São altamente interativos na raiz, no solo promovendo crescimento vegetal e auxiliando na captação de nutrientes do solo pelas plantas (HARMAN et al., 2004).

Visto que no âmbito mundial verifica-se que as pesquisas com *Trichoderma* se intensificam rapidamente (PINTO et al., 2011). Este trabalho tem como foco a espécie *Trichoderma harzianum*, que é amplamente utilizada pela indústria no controle biológico de doenças e nematoides em uma grande variedade de culturas (BETTIOL et al, 2012).

O objetivo dentro do presente trabalho foi testar de viabilidade de um meio nutritivo a partir de resíduo industrial do processo de envasamento de milho enlatado para a criação em meio líquido de *Trichoderma harzianum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização do fungo

Com relação à espécie que foi utilizada como modelo nos teste *in vitro*, foi escolhida uma cepa de *Trichoderma harzianum*, cujo manejo e pesquisa têm resultado em diferentes produtos. Outro fator importante que influenciou na escolha foi o fato da experiência acumulada pela empresa parceira, a facilidade de seu cultivo *in vitro* tanto para fins experimentais quanto em escala comercial. Outro fator positivo refere-se à estabilidade das culturas preservadas adequadamente em coleções, além de um ciclo clonal relativamente curto (LUCON, 2014). O fungo *Trichoderma harzianum* utilizados neste estudo foi advinda da empresa parceira, Biocontrol, localizada em Sertãozinho, São Paulo, Brasil, na qual já possuiu e produz produtos à base do mesmo, logo não se faz necessária à análise taxonômica do material (figura 1).



**Figura 1: cepa de *Trichoderma harzianum***

### Caracterização dos meios de cultivo

Para se analisar os meios ao qual o *T. harzianum* foi inoculado utilizou-se como controle o meio líquido YDP (15 g de extrato de levedura; 40 g de dextrose; 15 g de peptona; 1 litro H<sub>2</sub>O destilado), (HARUN; LIU; DANQUAH, 2011). Tal meio foi intitulado de líquido Ideal e possuía um pH de aproximadamente 5,7.

Como líquidos testes foram utilizados dois meios de cultura: o líquido residual advindo do processo de envasamento de milho enlatado, tal meio possuía somente partes de milho e água utilizada para a lavagem do milho, intitulado de Resíduo, o líquido utilizado atualmente é descartado pela indústria, utilizando-se somente as partes sólidas e possuía um pH aproximado de 4,33.

Além do líquido advindo do processo de envasamento de milho enlatado, também foi utilizado o líquido resultante do processo de ensilagem das partes sólidas do milho que foi descartado pela indústria Só Frutas, intitulado de Chorume, tal líquido apresentou um pH de aproximadamente 3.9.

## Inoculação

Inicialmente a colônia foi mantida à temperatura ambiente por 50 minutos, posteriormente foi realizada a hidratação do substrato com água destilada até o concentrado atingisse  $1 \times 10^8$  conídios/ml (PINTO et al., 2011), conforme se é utilizado na indústria.

Em cada frasco de 250 ml foram colocados 100 ml de cada um dos meios, que foram previamente esterilizados em autoclave por trinta minutos a  $121^\circ \text{C}$ . Após a aclimatização dos meios, os erlenmeyers foram levados em câmara de fluxo laminar para serem inoculados. Em cada erlenmeyer foi inoculado 5 ml do isolado de *Trichoderma harzianum*.

## Crescimento em meio líquido

Após a inoculação, os frascos foram acondicionados em agitador orbital a  $25^\circ \text{C}$  e sem a presença de luz solar, onde permaneceram sob agitação constante durante 72 horas. Foi estabelecida a velocidade de rotação em 150 RPM e a quantificação do número de conídios foi realizada ao fim da incubação (MASCARIN et al., 2019).

## Contagem de conídios

O parâmetro analisado foi a concentração de conídios por volume, um método quantitativo em que se faz a contagem do número de conídios com auxílio de uma Câmara de Neubauer em microscópio óptico e se encontra dentro da metodologia para controle de qualidade de produtos de *Trichoderma* utilizada pela EMBRAPA (BETTIOL et al., 2012).

Amostras dos meios de cultura foram contabilizadas com auxílio de uma Câmara de Neubauer (hemacitômetro) e microscópio óptico. O resultado das contagens é resultado do cálculo realizado segundo metodologia descrita pela EMBRAPA (BETTIOL et al., 2012), ao qual parte do inoculo é coletado e diluído para determinar o número de conídios e se utiliza a equação 1 para cada repetição:

$$\text{Conídios/mL} = \{[(\text{Campo 1} + \text{Campo 2})/2] \times 2,5 \times 10^5\}$$

$$\text{Sendo: Campo 1} = (\text{E1} + \text{E2} + \text{E3} + \text{E4} + \text{E5})/5 \text{ e Campo 2} = (\text{E1} + \text{E2} + \text{E3} + \text{E4} + \text{E5})/5$$

### Equação 1

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três tratamentos (Ideal, Resíduo e Chorume) com oito repetições cada. As médias das contagens dos conídios de todas as repetições dos três tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados da quantificação de conídios realizada com câmara de Neubauer nos meios líquidos Ideal, Resíduo e Chorume após 72 horas de fermentação.

**Tabela 1. Quantificação de conídios de *Trichoderma harzianum* em ensaios com meios líquidos Ideal, Resíduo e Chorume após 72 hrs de fermentação em cada uma das datas.**

Tratamentos	Experimento 1- 16/08	Experimento 2- 18/10
Ideal	$26,68 \times 10^7 \pm 2,58^a$	$26,80 \times 10^7 \pm 0,85^a$
Resíduo	$12,26 \times 10^7 \pm 2,12^b$	$17,93 \times 10^7 \pm 0,73^b$
Chorume	$4,56 \times 10^7 \pm 0,22^c$	$5,88 \times 10^7 \pm 0,40^c$
F	32,51	231,73
CV (%)	38,42	11,56

Este ensaio foi inoculado com 5 ml de *T. harzianum* à  $10^8$  conídios/ml. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si dentro do Teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). Para efeito da análise foram transformados em  $(X+0,5)^2$  significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Observa-se pelos resultados da Tabela 1 que no experimento u m realizado no dia 16/08, que os três meios apresentaram diferenças significativas entre si em nível de 5% de probabilidade, sendo o

meio Ideal tendo a maior concentração de conídios entre os meios estudados neste experimento e o meio Chorume apresentou o pior dentre os três meios.

Conjuntamente na Tabela 1 temos o experimento dois realizado no dia 18/10, que os três meios apresentaram diferenças significativas entre si em nível de 1% de probabilidade, sendo o meio Ideal tendo a maior concentração de conídios entre os meios estudados neste experimento e o meio Chorume apresentou o pior dentre os três meios.

Apesar do alto coeficiente de variação, o resultado encontrado no experimento 1 corrobora com o experimento 2, mostrando diferenças significativas entre os meios estudados, portanto o meio Ideal possui a maior concentração de conídios e o meio Chorume obteve um resultado menor entre os três meios estudados neste experimento.

A pesquisa foi realizada para determinar a possibilidade de se usar, resíduos vegetais líquidos de indústria como meio de cultura para o crescimento e desenvolvimento do fungo *Trichoderma harzanium*, no qual é utilizado na agricultura como promotor de crescimento e atuarem como antagonistas de alguns fitopatógenos de importância econômica (WOLNA; MARUWKA, 2017). Os produtos comerciais encontrados no mercado e alguns estudos sobre criação deste microrganismo são comumente produzidos por fermentação em meio sólido (BETTIOL et al., 2012).

Entretanto, REZENDE et al (2017) frisa que para a produção em grande escala de *Trichoderma*, dentre outros microrganismos, a fermentação líquida apresenta vantagens se comparada com a produção em meio sólido, pois permite controlar o tempo de processo, apresenta maior eficiência no aumento das escalas de produção e necessita de menos mão de obra, além de maior controle sobre os níveis de contaminação, facilitando a produção abundante de biomassa.

Os resultados presentes neste trabalho mostram meios de cultura líquidos os quais não tiveram controle sobre algumas variáveis como pH, aeração, pressão, temperatura e oxigênio dissolvido. Variáveis as quais podem alterar os resultados (REZENDE, 2017), visto que a aeração é considerada um fator crítico nos cultivos em fermentadores é a aeração (HARMAN, 2004).

Outros trabalhos utilizando resíduos de indústria como meio de cultura líquido para crescimento de microrganismos, tal como Mascarin (2019) cita que cepas da mesma espécie de fungos podem mostrar diferentes resultados em meios idênticos. O que pode ser um indicativo para que o líquido Chorume que apresentou o pior resultado possa ser compatível com outra cepa ou outro organismo.

## CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que os meios alternativos testados proporcionaram crescimento de *T. harzanium* de forma relevante no caso do tratamento Resíduo, porém ainda é necessário se analisar se a utilização do mesmo é viável visto que não foram abordados a quantidade de conídios viáveis e unidades formadoras de colônias assim como indicado por Bettiol et al (2012).

## AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a empresa Biocontrol, por nos disponibilizar uma cepa de *Trichoderma harzanium* e nos auxiliar com a realização da pesquisa e a empresa Só Frutas, por nos disponibilizarem os resíduos para que a pesquisa pudesse ser realizada.

## REFERÊNCIAS

BETTIOL, W. et al. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente-Documentos (INFOTECA-E)**, 2012.

FAO, F. The future of food and agriculture—Trends and challenges. **Annual Report**, 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.

HARUN, R.; LIU, B.; DANQUAH, M. K. Analysis of process configurations for bioethanol production from microalgal biomass. **Progress in Biomass and Bioenergy Production. InTech**, p. 395–409, 2011.

MASCARIN, G. M. et al. Produção industrial de *Trichoderma*. **Trichoderma**, p. 255, 2019.

PINTO, Z. et al. **Metodologia para avaliação da qualidade de produtos biológicos à base de Trichoderma spp.** . In: EMBRAPA MEIO AMBIENTE-RESUMO EM ANAIS DE CONGRESSO (ALICE). Tropical Plant Pathology, Brasília, DF, v. 36, p. 488, ago. 2011. Suplemento ..., 2011

REZENDE, L. C. DE. Fermentação líquida como estratégia para produção massal de conídios de Trichoderma. 2017.

TAVARES, V. B. et al. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 722–725, 1998.

WOLNA-MARUWKA, A. et al. An assessment of adaptive and antagonistic properties of *Trichoderma* sp. strains in vegetable waste composts. **Archives of Environmental Protection**, v. 43, n. 4, p. 72–81, 2017.