

INFLUÊNCIA DE MATÉRIA ORGÂNICA NO CRESCIMENTO DOS FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS *PISOLITHUS TINCTORIUS* E *THELEPHORA TERRESTRIS*¹

WAGNER BETTIOL² e TASSO LEO KRÜGNER³

RESUMO - Foram avaliados os efeitos dos extratos aquosos de lodo de esgoto, torta de filtro, esterco de curral e acículas de *Pinus* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1.000 ppm e 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 20% (v/v) em MMN-agar (meio de Melin - Norkrans, modificado por Marx), sobre o crescimento micelial dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris*. Nas concentrações inferiores a 1% não houve efeito significativo de todos os extratos sobre o crescimento dos fungos. Em concentrações superiores a 1.000 ppm o extrato de acículas de *Pinus* reduziu o crescimento tanto de *P. tinctorius* como *T. terrestris*. Lodo de esgoto reduziu o crescimento de *P. tinctorius* nas concentrações acima de 1.000 ppm. O crescimento de *T. terrestris* foi também diminuído por lodo de esgoto, mas só em concentrações acima de 3%. Torta de filtro não afetou o crescimento de *P. tinctorius* em qualquer concentração e esterco de curral somente a 20%, reduzindo-o. Esterco de curral e torta de filtro diminuíram o crescimento de *T. terrestris* em concentrações acima de 4%.

Termos para indexação: extratos aquosos, lodo de esgoto, torta de filtro, esterco de curral, *Pinus*.

INFLUENCE OF ORGANIC MATTER ON THE GROWTH OF THE ECTOMYCORRHIZAL FUNGI *PISOLITHUS TINCTORIUS* AND *THELEPHORA TERRESTRIS*

ABSTRACT - The effects of water extracts of sewage sludge, filter cake, manure and pine needle mulch on the mycelial growth of *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris* were evaluated at the concentrations of 1, 10, 100 and 1.000 ppm and 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 and 20% (v/v) in MMN-agar (Melin-Norkrans medium, modified by Marx). There was no significant effect of the organic matters tested at concentrations below 1%. At concentrations above 1.000 ppm, pine needle mulch decreased the growth of both fungi tested. Sewage sludge reduced the growth of *P. tinctorius* at concentrations above 1.000 ppm. Growth of *T. terrestris* was also reduced by sewage sludge, but at concentrations higher than 3%. Filter cake had no effect on *P. tinctorius*, whereas manure reduced growth of this fungus at 20% only. Filter cake and manure decreased growth of *T. terrestris* at concentrations higher than 4%.

Index terms: water extracts, sewage sludge, filter cake, corral manure, *Pinus*.

INTRODUÇÃO

Entre os vários fatores que podem afetar o desenvolvimento de ectomicorrizas em mudas de *Pinus* infectadas com fungos específicos, como *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris*, encontra-se a matéria orgânica do substrato de cultivo. Este efeito depende, em grande parte, da fonte de matéria orgânica e do seu teor (Bettiol 1984).

Uma das formas de atuação da matéria orgânica sobre os microorganismos é através da liberação de

substâncias presentes nos seus extratos, como, por exemplo, os ácidos orgânicos e os compostos fenólicos. Burges & Latter (1960) verificaram que os ácidos húmicos são fontes de alimento e energia para muitos microorganismos. Foram isolados por Mathur & Paul (1966) e Neelakantan et al. (1970), representante dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Streptomyces*, que podiam ter os ácidos húmicos como única fonte de carbono. No entanto, McLoughlin & Kuster (1972) verificaram que a fração húmica não influi na respiração e crescimento de *Candida utilis*.

Entre os fungos ectomicorrízicos, o *Pisolithus tinctorius* foi estudado por Tan & Nopamornbodi (1979), que avaliaram o efeito de ácidos fúlvicos no seu desenvolvimento. Esses autores verificaram que 3.200 ppm de ácido fúlvico em MMN, com

¹ Aceito para publicação em 26 de março de 1986.

Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor.

² Eng. - Agr., M.Sc., em Agron., Dep. de Fitopat., ESALQ/USP, Caixa Postal 09, CEP 13400 Piracicaba, SP.

³ Prof. - Adjunto, Dep. de Fitopat., ESALQ.

pH 4 e 7, inibia o fungo, enquanto 320, 640 e 1.600 ppm estimulavam o crescimento radial das colônias. Avaliando o peso de matéria seca, notaram um incremento em relação à testemunha para as concentrações de 320, 640 e 1.600 ppm de ácido fúlvico no meio mantido a pH 7, sendo que em pH 4 apenas 640 ppm de ácido fúlvico superou a testemunha. Esses autores sugerem que os ácidos fúlvicos, sendo produtos da decomposição, estão presentes nos solos em soma maior que os açúcares. Portanto, se forem utilizados como fonte de alimento por determinados microorganismos, esses são menos suscetíveis à competição do que aqueles que somente se utilizam de açúcares.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do extrato de lodo de esgoto, esterco de curral, torta de filtro e acículas de *Pinus* sobre o crescimento micelial de *P. tinctorius* e *T. terrestris* em meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados 185 de *P. tinctorius* e 201 de *T. terrestris* obtidos de *Pinus taeda*, cedidos pelo Dr. Donald H. Marx, do Instituto para Pesquisa e Desenvolvimento de Micorrizas, Athens, Georgia, EUA, foram empregados como fungos-testes. O inóculo utilizado estava em pleno desenvolvimento em MMN (Marx 1969), com 20 dias de incubação a 26°C, no escuro. Discos de 0,5 cm de diâmetro da extremidade da colônia foram retirados e transferidos para o centro das placas com os respectivos substratos, num total de cinco repetições (placas) por tratamento. As placas foram incubadas por 20 dias a 26°C no escuro. O crescimento foi avaliado através de medição do diâmetro da colônia.

Extratos das matérias orgânicas estudados (Tabela 1) foram obtidos por autoclavagem durante uma hora, a 120°C e filtragem em algodão com auxílio de bomba de vácuo. Antes da autoclavagem, as matérias orgânicas foram misturadas com água na proporção 1:1 (v/v).

Vários ensaios foram conduzidos, todos eles com MMN como meio. Nos ensaios 1 e 4 os extratos foram acrescentados ao meio de cultura nas proporções 5, 10, 15 e 20% (v/v). Nos ensaios 2 e 5, os extratos foram acrescentados ao meio de cultura nas proporções de 1, 2, 3 e 4% (v/v); e nos ensaios 3 e 6, nas proporções 1, 10, 100 e 1.000 ppm. Em todos os ensaios, a acidez foi corrigida para pH 6,0 antes de sua esterilização por autoclavagem.

RESULTADOS

No ensaio 1, o lodo de esgoto e as acículas de *Pinus* em todas as concentrações (5, 10, 15 e 20%)

apresentaram uma forte inibição ao crescimento micelial de *P. tinctorius*, quando comparadas com a testemunha (Tabela 2). Também foi observada inibição de *P. tinctorius* pelo esterco de curral na maior concentração, sendo as demais concentrações semelhantes à testemunha. A torta de filtro não influenciou o crescimento micelial do fungo.

Para todas as concentrações testadas no ensaio 2 (1, 2, 3 e 4%), tendo como fontes esterco de curral e torta de filtro, exceção da dose 1% desta última, não foi encontrada diferença significativa no crescimento micelial de *P. tinctorius* (Tabela 3). No entanto, lodo de esgoto e acículas de *Pinus* inibiram o crescimento, mas com menor intensidade que nas doses empregadas no ensaio 1.

No ensaio 3, com exceção da concentração 100 ppm de acículas de *Pinus*, os demais tratamentos não diferiram entre si. Às concentrações testadas neste ensaio (1, 10, 100 e 1.000 ppm), não houve influência das fontes de matéria orgânica sobre o crescimento micelial de *P. tinctorius* (Tabela 4).

Com relação a *T. terrestris*, verificou-se no ensaio 4, que, exceção feita à concentração de 5% do extrato de lodo de esgoto, que não diferiu do meio padrão, as demais fontes e concentrações mostraram efeito inibitório sobre o crescimento do fungo (Tabela 5). O efeito menos acentuado foi dado pelo esterco de curral. O efeito inibitório das matérias orgânicas foi diretamente proporcional às concentrações empregadas. Nas concentrações intermediárias testadas no ensaio 5 ocorreu ainda forte inibição dada pelas acículas de *Pinus*, enquanto as outras fontes de matéria orgânica não determinaram efeito significativo (Tabela 6). Não ocorreram efeitos significativos nas menores concentrações testadas, para todas as matérias orgânicas (Tabela 7).

DISCUSSÃO

Matérias orgânicas presentes em altas concentrações nos substratos para produção de mudas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* de modo geral colaboram para seu desenvolvimento, mas podem reduzir a formação de ectomicorrizas pelos fungos *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris* (Bettiol 1984). Tal fato pode ter relação com os resultados

ora obtidos, os quais evidenciam que o efeito inibitório dos extratos das matérias orgânicas no crescimento micelial de *P. tinctorius* e *T. terrestris* foi diretamente proporcional às concentrações empregadas.

A inibição dada pelo extrato das acículas de *Pinus* em concentrações superiores a 1.000 ppm no meio de cultura sobre o crescimento micelial de *P. tinctorius* e *T. terrestris* (Tabelas 2, 3, 5 e 6) pode ser devida à liberação em quantidades inibitórias de compostos fenólicos existentes nas acículas (Chen & Buijtenen 1980) durante a obtenção do extrato a quente. A liberação destes compostos talvez seja mais lenta quando aplicados no solo, o que pode justificar os resultados obtidos por Bettiol (1984), que não verificaram redução na formação de micorrizas por esses fungos até concentração de 10% de acículas no substrato. Este efeito inibitório das acículas, por sua vez, pode estar relacionado com a ausência de frutificações destes fungos em povoamentos adultos de *Pinus* que apresentam uma cobertura de acículas sobre

o solo, quando outras espécies de fungos, talvez mais adaptadas a estas condições, aparecem com maior frequência, como os pertencentes aos gêneros *Suillus* e *Scleroderma*. Nesta inibição, provocada pelo extrato de acículas, faz-se necessário chamar atenção para a concentração de chumbo na matéria orgânica (Tabela 1), podendo ser um fator responsável pela inibição.

O efeito inibitório do lodo de esgoto em concentrações superiores a 1.000 ppm (de extrato no meio de cultura) sobre o crescimento micelial de *P. tinctorius* e acima de 3% para *T. terrestris* pode ser devido à presença de elementos tóxicos em altas concentrações, como de cádmio, chumbo, cromo, níquel, zinco, cobre, manganês e ferro, entre outros, na composição do lodo (Tabela 1). Vários autores (Henderson 1960, Kendrick 1962) verificaram que alguns desses elementos inibem o crescimento de fungos. Bettiol (1984) verificaram que essa fonte de matéria orgânica causou acentuada inibição na formação de ectomicorrizas em mudas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* por *P. tinctorius* e *T. terrestris*.

TABELA 1. Caracterização química das matérias orgânicas testadas¹.

Determinações (base seca)	Lodo de esgoto	Esterco de curral	Torta de filtro	Acícula de <i>Pinus</i>
pH água	5,0	6,2	5,9	4,6
Matéria orgânica (%)	17,6	22,8	56,4	71,7
Carbono total (%)	9,8	12,6	31,3	39,8
Carbono Oxidável (%)	6,4	9,3	25,0	32,2
Enxofre total (% S)	0,81	0,17	< 0,001	0,16
Nitrogênio total (% N)	0,42	0,74	0,73	0,91
Fósforo total (% P ₂ O ₅)	2,3	0,81	1,2	0,18
Potássio total (% K ₂ O)	0,37	0,42	0,69	0,09
Cálcio (% Ca)	1,8	0,73	1,5	1,1
Magnésio (% Mg)	0,67	0,27	0,21	0,14
Alumínio (% Al)	6,0	2,5	3,6	1,7
Chumbo (%)	0,084	0,0052	0,14	1,1
Ferro (%)	4,9	1,6	2,6	2,0
Cádmio (ppm)	8,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Cobalto (ppm)	20	1,5	3,0	9,5
Cobre (ppm)	1.274	46	85	26
Cromo (ppm)	565	15	15	5,0
Sódio (ppm)	600	450	150	-
Manganês (ppm)	510	365	619	800
Níquel (ppm)	570	4,5	3,0	1,0
Zinco (ppm)	2.948	90	100	115

¹ Análises realizadas no Laboratório de Análises Químicas do CEFER/IPT, São Paulo, SP.

TABELA 2. Efeito de fontes e concentrações de extrato (v/v) de matéria orgânica sobre o crescimento micelial (cm) de *Pisolithus tinctorius* em meio de MMN (Ensaio 1).

Fonte de matéria orgânica	Concentração (%) do extrato de matéria orgânica no meio ¹				Médias
	5	10	15	20	
Testemunha (MMN)	7,6 a				
Lodo de esgoto	A 4,9 bc Y AB	B 3,1 de Y A	B 2,9 e w B	B 3,3 de z C	3,6 C
Esterco de curral	7,0 a x A	7,8 a x A	6,2 ab Y A	4,8 bc Y A	6,5 B
Torta de filtro	7,6 a x AB	7,1 a x AB	7,8 a x A	7,6 a x B	7,5 A
Acículas de <i>Pinus</i>	4,0 cde Y	3,8 cde Y	4,1 cd z	3,2 de z	3,8 C
Médias	5,9 X	5,5 XY	5,3 Y	4,7 Z	

¹ Médias seguidas de mesma letra, médias de concentrações dentro de fontes com letras iguais sobre as mesmas e médias de fontes dentro de concentrações com letras iguais sob as mesmas não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$ e os valores foram obtidos da média de cinco repetições.

TABELA 3. Efeito de fontes e concentrações de extrato (v/v) de matéria orgânica sobre o crescimento micelial (cm) de *Pisolithus tinctorius* em meio de MMN (Ensaio 2).

Fonte de matéria orgânica	Concentração (%) do extrato de matéria orgânica no meio ¹				Médias
	1	2	3	4	
Testemunha (MMN)	7,7 a				
Lodo de esgoto	A 6,1 cdef Y A	B 4,9 g z A	AB 5,4 gf Y A	AB 5,4 fg Y A	5,5 C
Esterco de curral	7,1 abc x A	7,3 ab x A	7,2 ab x A	7,5 ab x A	7,3 A
Torta de filtro	6,6 bcde xy A	7,2 ab x AB	6,9 abcd x A	6,9 abcd x B	6,9 A
Acículas de <i>Pinus</i>	6,1 cdef Y	5,8 efg Y	6,1 cdef Y	5,3 fg Y	5,8 B
Médias	6,5 X	6,3 X	6,4 X	6,3 X	

¹ Médias seguidas de mesma letra, médias de concentrações dentro de fontes com letras iguais sobre as mesmas e médias de fontes dentro de concentrações com letras iguais sob as mesmas não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$ e os valores foram obtidos da média de cinco repetições.

TABELA 4. Efeito de fontes e concentrações de extrato (v/v) de matéria orgânica sobre o crescimento micelial (cm) de *Pisolithus tinctorius* em meio de MMN (Ensaio 3).

Fonte de matéria orgânica	Concentração (ppm) do extrato de matéria orgânica no meio ¹				Médias
	1	10	100	1.000	
Testemunha (MMN)	7,0 abc				
Lodo de esgoto	A 7,3 abc xy A	A 6,9 abcd xy A	A 7,2 abc xy A	A 7,2 abc x A	7,2 A
Esterco de curral	A 7,3 abc xy A	A 7,2 abc x A	A 6,5 bcd yz A	A 7,1 abc x A	7,3 A
Torta de filtro	A 6,7 abcd Y A	B 7,4 ab x B	B 7,4 ab x B	A 7,3 abc x A	7,2 A
Acículas de <i>Pinus</i>	A 7,7 a x	B 6,3 cd Y	B 5,9 d z	A 7,2 abc x	6,8 B
Médias	7,3 X	7,0 XY	6,8 Y	7,2 X	

¹ Médias seguidas de mesma letra, médias de concentrações dentro de fontes com letras iguais sobre as mesmas e médias de fontes dentro de concentrações com letras iguais sob as mesmas não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Para análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$ e os valores foram obtidos da média de cinco repetições.

TABELA 5. Efeito de fontes e concentrações de extrato (v/v) de matéria orgânica sobre o crescimento micelial (cm) de *Thelephora terrestris* em meio de MMN (Ensaio 4).

Fonte de matéria orgânica	Concentração (%) do extrato de matéria orgânica no meio ¹				Médias
	5	10	15	20	
Testemunha (MMN)	3,4 a				
Lodo de esgoto	A 2,4 ab x A	B 1,5 cdef xy A	BC 1,1 ef y A	C 1,0 f y A	1,5 B
Esterco de curral	A 2,2 bc x A	A 2,0 bcd x A	A 1,8 bcd x A	A 1,8 bcd x A	2,0 A
Torta de filtro	A 1,6 cdef Y A	B 1,7 bcde xy A	BC 1,5 cdef xy A	C 1,4 def xy A	1,6 B
Acículas de <i>Pinus</i>	A 1,4 def Y	B 1,4 def Y	BC 1,4 def xy	C 1,4 def xy	1,4 B
Médias	1,9 X	1,7 XY	1,5 YZ	1,4 Z	

¹ Médias seguidas de mesma letra, médias de concentrações dentro de fontes com letras iguais sobre as mesmas e médias de fontes dentro de concentrações com letras iguais sob as mesmas não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$ e os valores foram obtidos da média de quatro repetições.

TABELA 6. Efeito de fontes e concentrações de extrato (v/v) de matéria orgânica sobre o crescimento micelial (cm) de *Thelephora terrestris* em meio de MMN (Ensaio 5).

Fonte de matéria orgânica	Concentração (%) do extrato de matéria orgânica no meio ¹				Médias
	1	2	3	4	
Testemunha (MMN)	3,4 a				
Lodo de esgoto	A 2,9 ab x	A 2,9 ab x	A 2,7 abcd x	B 2,1 bcd xy	2,7 A
Esterco de curral	AB 2,8 abc x	A 3,0 ab x	B 2,6 abcd x	C 2,4 abcd x	2,7 A
Torta de filtro	A 2,8 abc x	A 2,4 abcd x	A 3,0 ab x	A 2,6 abcd x	2,7 A
Acículas de <i>Pinus</i>	A 1,7 d Y	A 1,8 cd Y	A 1,7 d Y	A 1,7 d Y	1,7 B
Médias	2,6 X	2,5 X	2,5 X	2,2 Y	

¹ Médias seguidas de mesma letra, médias de concentrações dentro de fontes com letras iguais sobre as mesmas e médias de fontes dentro de concentrações com letras iguais sob as mesmas não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$ e os valores foram obtidos da média de quatro repetições.

TABELA 7. Efeito de fontes e concentrações de extrato (v/v) de matéria orgânica sobre o crescimento micelial (cm) de *Thelephora terrestris* em meio de MMN (Ensaio 6).

Fonte de matéria orgânica	Concentração (ppm) do extrato de matéria orgânica no meio ¹				Médias
	1	10	100	1.000	
Testemunha (MMN)	2,3 abcd				
Lodo de esgoto	A 2,6 abcd x	AB 2,4 abcd y	B 1,8 cd y	B 1,7 d y	2,1 B
Esterco de curral	A 2,1 bcd x	A 1,8 cd y	A 1,8 cd y	A 1,8 cd xy	1,9 B
Torta de filtro	B 2,0 cd x	A 3,2 a x	A 2,8 abc x	AB 2,7 abcd x	2,7 A
Acículas de <i>Pinus</i>	A 2,6 abcd x	A 2,4 abcd y	A 3,0 ab x	A 2,5 abcd x	2,6 A
Médias	2,3 X	2,5 X	2,4 X	2,2 X	

¹ Médias seguidas de mesma letra, médias de concentrações dentro de fontes com letras iguais sobre as mesmas e médias de fontes dentro de concentrações com letras iguais sob as mesmas não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$ e os valores foram obtidos da média de quatro repetições.

A torta de filtro e o esterco de curral não inibiram o crescimento micelial de *P. tinctorius*, possivelmente por seus extratos, nas concentrações estudadas, não possuem compostos inibidores ao desenvolvimento do fungo em quantidades inibitórias. Contudo, esses extratos não apresentaram estímulo no crescimento micelial do fungo. Já para *T. terrestris* esses extratos em concentrações superiores a 4% inibiram o seu crescimento, demonstrando o efeito variável das fontes orgânicas em dependência dos microorganismos envolvidos.

A inibição no crescimento micelial de *P. tinctorius* e *T. terrestris* pelos extratos de matéria orgânica testados pode, ainda, ser resultante da presença de compostos orgânicos, tais como ácidos fúlvicos, húmicos e outros (Tan & Nopamornbodi 1979). Estudo mais detalhado da composição dos extratos testados e do efeito dos componentes sobre os fungos ectomicorrízicos torna-se, pois, necessário. O pH também pode ter influência marcante nos resultados, como demonstraram Tan & Nopamornbodi (1979). No presente estudo, o pH foi apenas corrigido antes da autoclavagem e não houve acompanhamento do que ocorreu no transcorrer do crescimento do fungo.

REFERÊNCIAS

- BETTIOL, W. Influência de algumas fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorrizas em mudas de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari pelos fungos *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch e *Thelephora terrestris* Ehr. ex Fr. Piracicaba, ESALQ/USP, 1984. 79p. Tese Mestrado.
- BURGES, A. & LATTER, P. Decomposition of humic and acid by fungi. *Nature*, London, 186:404-5, 1960.
- CHEN, C.C. & BUIJTENEN, J.P. van. Chemogenetic study of phenolic compounds extracted from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) needles. *Silvae Genet.*, 29:205-8, 1980.
- HENDERSON, M. The influence of trace elements on the metabolism of aromatic compounds by soil fungi. *J. Gen. Microbiol.*, 23:307-13, 1960.
- KENDRICK, W.B. Soil fungi of a copper swamp. *Can. J. Microbiol.*, 8:639-47, 1962.
- MCLOUGHLIN, A.J. & KUSTER, E. The effect of humic substances on the respiration and growth of microorganisms. *Plant Soil*, 37:17-25, 1972.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonist of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and bacteria. *Phytopathology*, 59: 153-63, 1969.
- MATHUR, S.P. & PAUL, E.A. A microbiological approach to the problem of soil humic acid structure. *Nature*, London, 212:646-7, 1966.
- NEELAKANTAN, S.; MISHIRA, M.M.; TEWARI, H.K. & UYAS, S.R. Characterization and microbial utilization of humic acid in Hissar soil. *Agrochimica*, 14:341-4, 1970.
- TAN, K.H. & NOPAMORNBODI, V. Fulvic acid and the growth ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*. *Soil Biol. Biochem.*, 11:651-3, 1979.