

# EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE CO<sub>2</sub> E O<sub>2</sub> NO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Penicillium expansum* (Link.) Thom, IN VITRO

BRACKMANN, Auri; SAQUET, Adriano A.; VEIGA, Vânius V. & BORTOLUZ, Leandro

UFSM/CCR/Deptº de Fitotecnia - Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita - Campus Universitário - CEP 97119-900 - Tel. (055)22111616 - Santa Maria/RS.  
(Recebido para publicação em 16/04/96)

## RESUMO

O experimento foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito das concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> sobre a supressão do crescimento e esporulação de *Penicillium expansum* "in vitro". Os fungos permaneceram em temperatura ambiente média de 20°C e submetidos às seguintes condições de atmosfera controlada (AC): 0%CO<sub>2</sub>/0,2%O<sub>2</sub>, 0%CO<sub>2</sub>/0,7%O<sub>2</sub>, 0%CO<sub>2</sub>/1%O<sub>2</sub>, 0%CO<sub>2</sub>/1,5%O<sub>2</sub>, 0%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 0,2%CO<sub>2</sub>/16%O<sub>2</sub>, 2,5%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 7,5%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 10%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 15%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 20%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>. Após 27 dias da inoculação, foram avaliados o crescimento e esporulação das colônias. Verificou-se que em 0%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub> (ar) o crescimento foi menor, sendo que a redução da concentração de O<sub>2</sub> estimulou o crescimento e, em concentrações abaixo de 0,2%O<sub>2</sub>, foi suprimida a esporulação. Nas condições de AC contendo níveis entre 2,5 e 7,5%CO<sub>2</sub>, *Penicillium expansum* cresceu mais do que em ar. O crescimento não foi suprimido com 20%CO<sub>2</sub> e, a partir de 7,5%CO<sub>2</sub> iniciou a inibição da esporulação do fungo sendo que ainda esporulou com 20%CO<sub>2</sub>. Após a aeração, todos os tratamentos retomaram o crescimento e esporulação normal.

Palavras-chave: *Penicillium expansum*, atmosfera controlada, crescimento, esporulação

## ABSTRACT

EFFECT OF CO<sub>2</sub> AND O<sub>2</sub> CONCENTRATIONS ON THE GROWTH AND SPORULATION SUPPRESSION OF *Penicillium expansum* (Link.) Thom, IN VITRO. The experiment was carried out to evaluate the effect of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations on the growth and sporulation suppression of *Penicillium expansum* "in vitro". The fungus was held at environment temperature (20°C) under CA conditions: 0%CO<sub>2</sub>/0.2%O<sub>2</sub>, 0%CO<sub>2</sub>/0.7%O<sub>2</sub>, 0%CO<sub>2</sub>/1%O<sub>2</sub>, 0%CO<sub>2</sub>/1.5%O<sub>2</sub>, 0%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 0.2%CO<sub>2</sub>/16%O<sub>2</sub>, 2.5%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 7.5%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 10%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, 15%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, and 20%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>. The growth and sporulation were evaluated after 27 days of inoculation. Fungus growth was smaller in 0%CO<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub>, and was stimulated by O<sub>2</sub> reduction, being the sporulation

suppressed with O<sub>2</sub> concentration below 0.2%. The growth was higher in the CA conditions with CO<sub>2</sub> concentrations between 2.5 and 7.5% than in air, and was not suppressed with 20%CO<sub>2</sub>. Inhibition of sporulation started with CO<sub>2</sub> above 7.5% being that sporulation in 20%CO<sub>2</sub> was verified. After aeration, all treatments recovered the normal growth and sporulation.

Key words: *Penicillium expansum*, controlled atmosphere, growth, sporulation

## INTRODUÇÃO

Durante a conservação refrigerada de maçãs, podem ocorrer grandes perdas devido a ocorrência de fungos pois existem espécies que são muito tolerantes a baixas temperaturas e, como no caso do armazenamento em AC, podem suportar altas concentrações de CO<sub>2</sub> e baixas concentrações de O<sub>2</sub>.

*Penicillium expansum* (Link.) Thom, é considerado o principal agente causador de podridões durante o armazenamento de maçãs e, se encontra difundido em todas as regiões produtoras de maçã no Brasil (BLEICHER & BERNARDI, 1985), causando perdas de até 30% das frutas armazenadas (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1991).

BROWN (1922) observou que dentro de grandes variações de concentrações de O<sub>2</sub>, existem pequenas variações no crescimento de fungos. Segundo GOLDING (1945), *Penicillium expansum* geralmente não é susceptível a baixas concentrações de O<sub>2</sub> em ausência de CO<sub>2</sub>. Em O<sub>2</sub> abaixo de 0,5%, *Botrytis cinerea* (FOLLSTAD, 1966) não produziu esporos. *Botrytis cinerea* (COUEY & WELLS, 1970) e *Penicillium expansum* (PRATELLA et al., 1989) tiveram crescimento suprimido. SOMMER et al. (1981) verificaram que *Penicillium expansum* cresceu normalmente em 2,5%O<sub>2</sub>, sendo que reduções no crescimento somente ocorreram quando com O<sub>2</sub> abaixo de 2%. KE et al. (1991) verificaram que 0,2% de oxigênio reduziu a incidência de podridões em pêssegos causadas por *Monilinia fructicola*. Os fungos são, em geral, mais sensíveis as altas concentrações de CO<sub>2</sub> do que a baixas concentrações de O<sub>2</sub> (TABAK & COOKE, 1968).

Existem concentrações de CO<sub>2</sub> que inibem, mas existem concentrações que podem estimular o crescimento e esporulação dos fungos, sendo que os níveis deletéreos variam muito com as espécies (TABAK & COOKE, 1968). NEAL & WESTER (1932) verificaram supressão no crescimento de fungos com CO<sub>2</sub> acima de 25% sendo que 100%CO<sub>2</sub> o fungo não cresceu, mas, após o arejamento, o crescimento foi retomado. LITTLEFIELD et al.(1966) observaram que *Penicillium expansum* teve redução do crescimento em 7%CO<sub>2</sub>/2%O<sub>2</sub>, sendo que em 10,5%CO<sub>2</sub>/2%O<sub>2</sub> não houve esporulação e também, retardamento do crescimento. Segundo VRIES-PATERSON et al.(1991), *Monilinia fructicola* foi inibido com 50%CO<sub>2</sub> durante 7 dias a 20 °C.

Tendo em vista que o uso da atmosfera controlada diminui sensivelmente a ocorrência de podridões de *Penicillium expansum* em maçãs armazenadas, desconhece-se a forma de ação dos gases sobre a ocorrência da podridão. O efeito dos gases pode ser direto sobre o desenvolvimento do patógeno e indireto, através do retardamento do amadurecimento dos frutos, que se mantêm mais resistentes a podridões num estágio de maturação menos avançado. Portanto, o objetivo do presente trabalho é de avaliar o efeito das concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> sobre a supressão do crescimento e esporulação de *Penicillium expansum* "in vitro", ou seja, o efeito direto dos gases sobre o fungo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita (NPP) do Departamento de Fitotecnia, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) durante o ano de 1995. Isolados de *Penicillium expansum* foram obtidos a partir de maçãs com sintomas aparentes de mofa azul. A identificação dos isolados foi realizada no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM. O fungo foi cultivado em meio de cultura BDA (ágar dextrose batata) e mantido através de repicagem, foi inoculado em placas de Petri com BDA, que permaneceram por 15 dias em estufa com temperatura de 25 °C para estimular o crescimento das colônias. Das colônias foram retirados discos (3,6mm de diâmetro), contendo somente micélio do fungo, que foram acondicionados no interior de vidros com volume de 100ml, contendo o meio de cultura BDA. Estes vidros foram fechados com papel alumínio perfurados no centro, no início do experimento, para que ocorresse troca de gases. Estas amostras foram acondicionadas em mini-câmaras de AC (vidros com volume de 5 litros), nos quais foram reguladas as concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>.

Os tratamentos foram formados pela combinação de concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> na atmosfera das mini-câmaras. Cada tratamento teve três repetições, sendo a unidade experimental composta por um vidro de 100ml. Os tratamentos podem ser vistos na Tabela 1.

A temperatura média ambiente em que os fungos permaneceram foi de 20 °C. As concentrações de oxigênio pré-estabelecidos foram obtidos pela eliminação do O<sub>2</sub> com injeção de nitrogênio nas mini-câmaras, pelo princípio da diluição do O<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> foi mantido nos níveis ideais pela injeção de CO<sub>2</sub> puro nas mini-câmaras. Nos tratamentos com 0%CO<sub>2</sub> utilizou-se cal no ambiente para absorver o CO<sub>2</sub> produzido pela respiração dos fungos. Para eliminar o CO<sub>2</sub> produzido e o O<sub>2</sub> consumido pela respiração dos fungos foram realizadas diariamente correções das concentrações para manter os níveis ideais. Para a análise das concentrações dos gases foram utilizados analisadores eletrônicos de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, marca Agri-Datalog.

As avaliações foram realizadas 27dias após a inoculação, quando o diâmetro da colônia de um dos tratamentos atingiu o diâmetro máximo, tomando todo o fundo do vidro com BDA. Estas avaliações constaram das medidas do diâmetro das colônias e da área com esporulação dos fungos. O diâmetro das colônias foi medido com paquímetro, tomando-se duas medidas perpendiculares por colônia, calculando-se um valor médio. O percentual de área da colônia esporulada foi estimado a partir da observação visual com uma lupa, verificando-se a presença ou não de esporos do fungo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Relacionando o crescimento e esporulação do fungo (Tabela 1) com as concentrações de O<sub>2</sub>, verificou-se, que as colônias que permaneceram em ar, apresentaram menor crescimento e, a medida em que a concentração do oxigênio foi abaixada, estimulou o crescimento do fungo, sendo suprimido somente abaixo de 0,2% de oxigênio. Em 0,2%O<sub>2</sub> o fungo produziu apenas micélio branco, sendo verificado pequena capacidade de esporular. Após o arejamento dos vidros, o fungo cresceu e esporulou de forma normal. Não foi encontrado nenhum efeito do baixo O<sub>2</sub> sobre *Penicillium*, porém, resultados semelhantes foram obtidos por FOLLSTAD (1966) com *Botrytis cinerea*, quando teve a esporulação suprimida somente com O<sub>2</sub> abaixo de 0,5% e KE et al.(1991) verificaram redução do crescimento de *Monilinia fructicola* em pêssegos com 0,2%O<sub>2</sub>. Algumas espécies não são completamente inibidas mesmo em concentrações de 0,2%O<sub>2</sub> (GEDDES et al.,1955; PETERSON et al.,1956). Por outro lado, THACKER & GOOD (1952), verificaram que baixas concentrações de O<sub>2</sub> foram estimulantes para o crescimento do fungo.

O comportamento de *Penicillium expansum* mediante a elevação dos níveis de CO<sub>2</sub> foi surpreendente, pois observou-se a capacidade deste fungo crescer e esporular em concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> (Tabela 1). *Penicillium* apresentou crescimento expressivo quando utilizadas atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub> entre 2,5 e 20%. O alto CO<sub>2</sub>, no entanto, inibiu parcialmente a esporulação do fungo, principalmente na concentração de 20%, quando os esporos apresentavam-se esbranquiçados. O crescimento da colônia iniciou a ser suprimido a partir de 7,5% de CO<sub>2</sub> sendo que uma redução mais severa ocorreu somente com 20%CO<sub>2</sub>. Quando reestabelecida a atmosfera normal e retirado o CO<sub>2</sub>, as colônias retomaram o crescimento e esporulação. SKOVHOLT (1933) verificou retardamento do crescimento do fungo com 17%CO<sub>2</sub> sendo o crescimento paralisado com 50%CO<sub>2</sub>. PETERSON et al.(1956) verificaram redução do crescimento com CO<sub>2</sub> acima de 18,5% em ar. Segundo LITTLEFIELD et al. (1966), *Penicillium expansum* não esporula com 10,5%CO<sub>2</sub> combinado com 2%O<sub>2</sub>. Mais recentemente, BORTOLUZ et al. (1994) verificaram supressão do crescimento de *Penicillium expansum* utilizando CO<sub>2</sub> acima de 8% combinado com 1,5%O<sub>2</sub>.

Vários trabalhos têm demonstrado que algumas espécies de fungos são capazes de crescer mais quando em atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub> (BROWN, 1922; STOVER & FREIBERG, 1958; BULIT & LOUVET, 1960; BRIGATI et al., 1989), inclusive em certos casos crescendo o dobro em 10%CO<sub>2</sub> em relação a ar (THACKER & GOOD, 1952). BARINOVA (1954) verificou que o CO<sub>2</sub> em níveis não muito elevado pode estimular a respiração celular dos fungos.

Existem hipóteses de que alguns fungos seriam capazes de utilizar o CO<sub>2</sub> atmosférico como fonte de carbono para seu crescimento (KRAUSE, 1930; STOVER & FREIBERG, 1958). Baseado nos resultados do presente experimento fica evidente que o armazenamento de maçãs em AC com 1 a 4%CO<sub>2</sub> e 1,5%O<sub>2</sub>, a inibição de podridões é devido ao efeito do CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> sobre o retardamento do processo de amadurecimento, que torna os frutos mais sensíveis ao ataque de patógenos. Ficou evidente que, condições de AC com baixo O<sub>2</sub> (< 1,5%) e alto CO<sub>2</sub> (> 2,5%) estimulam a frutificação de *Penicillium expansum*, podendo por isso, acarretar mais disseminação do fungo em câmaras frigoríficas.

TABELA 1 - Efeito das concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> sobre o crescimento e esporulação de *Penicillium expansum* "in vitro".

Tratamentos	%CO <sub>2</sub> /%O <sub>2</sub>	Diâmetro colônia(mm)	% da colônia
1	0/0,2	22,8 b *	10 a
2	0/0,7	33,2 a	90 d
3	0/1	32,5 a	95 d e
4	0/1,5	31,3 a	100 e
5	0/16	30,3 a	100 e
6	0,2/21	24,6 b	100 e
7	2,5/21	31,6 a	100 e
8	5/21	33,7 a	95 d e
9	7,5/21	33,3 a	90 d
10	10/21	32,5 a	70 c
11	15/21	32,1 a	30 b
12	20/21	24,6 b	5 a

\* Tratamentos com médias não seguidas pelas mesmas letras, diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan, 5%.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste experimento, é possível concluir que:

a) Na ausência de CO<sub>2</sub>, concentrações de até 0,2%O<sub>2</sub> não suprime o crescimento e esporulação de *Penicillium expansum*.

b) Com O<sub>2</sub> entre 0,7 e 16% e CO<sub>2</sub> entre 2,5 e 15%, *Penicillium expansum* cresce mais do que em ar.

c) A inibição do crescimento do fungo em ar, inicia com CO<sub>2</sub> acima de 20%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARINOVA, S.A. Effects of carbon dioxide on respiration in molds. *Mikrobiologiya*, v.23, p.521-526, 1954.
- BLEICHER, J., BERNARDI, J. Doenças da maçã e seu controle na pós-colheita. EMPASC, 1985, Boletim Técnico n.28.
- BORTOLUZ, L., BREDEMEIR, F.D., MAZARO, S.M., BRACKMANN, A. Efeito do CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> na supressão do crescimento de *Penicillium expansum* (Link ex Fr). In: I JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA EXTENSÃO E ENSINO. Anais..., Santa Maria. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p.309, 1994.
- BRIGATI, S., PRATELLA, G.C., BASSI, R. CA and low oxygen storage of kiwifruit: effects on ripening and diseases. In: PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE. Washington, v.2, p.41-48, 1989.
- BROWN, W. On the growth and germination of fungi at various temperatures and in various concentrations of oxygen and carbon dioxide. *Ann. Bot.*, London, v.36, p.257-283, 1922.
- BULIT, J., LOUVET, J. A technique for the study of the action of carbon dioxide on fungi parasitizing underground plant organs. *Ann. Inst. Pasteur*, v.98, p.557-561, 1960.
- COUEY, H.M., WELLS, J.M. Low-oxygen or high-carbon dioxide atmospheres to control postharvest decay of strawberries. *Phytopathology*, v.60, p.47-49, 1970.
- FOLLSTAD, M.N. Mycelial growth rate and sporulation of *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* e *Rhipopus stolonifer* in low-oxygen atmospheres. *Phytopathology*, v.56, n.9, p.1098-1099, 1966.
- GEDDES, W.F., CUENDET, L.S., CHRISTENSEN, C.M. Recent investigations on grain storage. 3rd Int. Bread. Congr., Hamburg, p.136-139, 1955.
- GOLDING, N.S. The gas requirements of molds. IV. A preliminary interpretation of the growth rates of four common mold cultures on the basis of absorbed gases. *J. Dairy Sci.*, v.28, p.737-750, 1945.
- KE, D.Y., RODRIGUEZ-SINOBAS, L., KADER, A.A. Physiological responses and quality attributes of peaches kept in low oxygen atmospheres. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.47, n.3-4, p.295-303, 1991.
- KRAUSE, A.W. Untersuchungen über der Einfluss der Ernährung, Belichtung und Temperatur auf die Perithezienproduktion einiger Hypocreaceen. Beitrag zur Kulturmethodik einiger Parasitärer und saprophytischer Pilze. *Zeitschr. Parasitenk.*, v.2, p.419-476, 1930.
- LITTLEFIELD, N.A., WANKIER, B.A., SALUNKHE, D.K., MCGILL, J.N. Fungistatic effects of controlled atmospheres. *Appl. Microbiol.*, v.14, n.4, p.579-581, 1966.
- NEAL, D.C., WESTER, R.E. Effects of anaerobic conditions on the growth of cotton rot fungus *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathology*, v.22, p.917-920, 1932.
- PETERSON, A., SCHLEGEL, V., HUMMEL, B., CUENDET, L.S., GEDDES, W.F., CHRISTENSEN, C.M. Grain-storage studies. XXII. Influence of oxygen and carbon dioxide concentrations on mold growth and grain deterioration. *Cereal Chem.*, v.33, p.53-66, 1956.
- PRATELLA, G.C., FOLCHI, A., BRIGATI, S. Low oxygen atmosphere and CA storage effects on senescence and diseases of two apple varieties grown in Italy. In: PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL CONTROLLED ATMOSPHERE RESEARCH CONFERENCE. Washington, v.1, p.204-214, 1989.
- SKOVHOLT, O. The influence of humidity and carbon dioxide upon the development of molds in bread. *Cereal Chem.*, v.101, p.446-451, 1933.
- SOMMER, N.F., FORTLAGE, R.J., BUCHANAN, J.R., KADER, A.A. Effect of oxygen on carbon monoxide suppression of postharvest pathogens of fruits. *Plant Disease*, v.65, n.4, p.347-349, 1981.
- STOVER, R.H., FREIBERG, S.R. Effect of carbon dioxide on multiplication of *Fusarium* in soil. *Nature*, v.181, p.788-789, 1958.
- TABAK, H.H., COOKE, W.M.B. The effects of gaseous environments on the growth and metabolism of fungi. *Botanik Review*, v.34, p.126-252, 1968.
- THACKER, D.C., GOOD, H.M. The composition of air in trunks of sugar maple in relation to decay. *Can. J. Bot.*, v.30, p.475-485, 1952.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Desinfecção da água e das câmaras frigoríficas para diminuição do inóculo de *Penicillium expansum*. *Bol. Téc.* n.21, EMBRAPA, Pelotas, 1991, 16p.
- VRIES-PATERSON, R.M.de, JONES, A.L., CAMERON, A.C. Fungistatic effects of carbon dioxide in a package environment on the decay of Michigan sweet cherries by *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, v.75, n.9, p.943-949, 1991.