UDC: 582.28:632.911.2 https://doi.org/10.53040/gppb8.2024.37

ACȚIUNEA ANTIFUNGICĂ A *TRICHODERMEI ATROBRUNNEUM* ASUPRA UNOR FUNGI FITOPATOGENI CULTIVATĂ ÎN PREZENȚA UNOR SUBSTANȚE UTILIZATE ÎN CALITATE DE STIMULATORI ÎN MEDIUL DE CULTIVARE

Țurcan Olga, *https://orcid.org/0000-0002-7103-5986*
Sîrbu Tamara *, *https://orcid.org/0000-0001-7809-9870*
Moldovan Cristina, *https://orcid.org/0000-0003-1634-0344*
Chiselița Oleg, *https://orcid.org/0000-0001-7298-1512*
Chiselița Natalia, *https://orcid.org/0000-0002-6943-8129*
Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, UTM, Chișinău, Republica Moldova
**e-mail:tamara.sirbu@imb.utm.md*

Summary. The action of the cultivation medium and some substances used as stimulators on the productivity of the *T. atrobrunneum CNMN FD 25* strain was studied. The obtained results allow us to summarize that of all the variations of media used for the cultivation of *T. atrobrunneum*, the M(Gl,Z) medium proved to be the most optimal, registering a productivity of 15 g/l. *T. atrobrunneum* cultivated on nutrient medium M (Gl, Z) has a strong antagonistic effect against phytopathogenic fungi: *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Fusarium solani, Fusarium oxysporum*, the diameter of the inhibition zones varied from 20 to 32 mm in relation to strain grown on M (Gl) and M (Z) medium, supplemented with iron compounds and exometabolites of *S. cerevisiae*.

Keywords: fungi, *Trichoderma atrobrunneum*, productivity, antifungal activity, zones of inhibition

Introducere

Fungii alături de bacterii, sunt responsabili pentru descompunerea materiei organice și eliberarea carbonului, oxigenului, azotului și fosforului în sol și atmosferă. Direct sau indirect, fungi sunt benefici pentru om, fiind utilizați în industria alimentară, în producerea medicamentelor, agricultură etc. Sunt bine cunoscute medicamentele minune precum penicilina obținută din *Penicillium notatum* și fucidina (acid fusidic) - din *Fusidium coccineum,* utilizate în tratarea infecțiilor bacteriene.

Fungii sunt o sursă de vitamine, de ex. vitamina A, complexul de vitamine B ce se găsesc în *Saccharomyces cerevisiae* și *Eremothemium ashbyii*. Corpurile de fructificație ale unor ciuperci sunt folosite ca hrană datorită conținutului ridicat de proteine (21-30% din greutatea uscată) și au o cantitate semnificativă de lizină și minerale precum Na, Ca, K și P; vitamine precum B, C, D și K și o cantitate foarte mică de grăsimi, fiind recomandate ca alimente ideale pentru bolnavii de inimă și diabet. Multe ciuperci sunt folosite în producerea de alcool, pâine, brânzeturi, enzime și acizi organici (*Saccharomyces cerevisiae, Penicillium roquiforti și P. camemberti)* [14, 20, 21].

Fungii sunt considerați descompozitori primari de deșeuri organice, celuloză, lignine și alte substanțe organice complexe (*Fusarium, Chaetomium, Chitridium, Penicillium, Aspergillus* etc., pot descompune polimerii structurali precum celuloza, hemiceluloza, lipidele, proteinele, amidonul etc.), astfel contribuind la fertilitatea solului. Mai mulți fungi precum *Rhizoctonia, Tricholoma, Boletus, Phallus, Amanita* etc., sunt asociate cu rădăcinile plantelor superioare formând relația simbiotică-micoriza unde partenerul fungic furnizează apă și minerale și, la rândul lor, preiau substanțe nutritive de la plantă. [2, 4, 13].

Trichoderma este unul dintre microorganismele importante din punct de vedere economic, utilizată eficient pe scară largă în agricultură ca agent de control biologic împotriva multor agenți patogeni ai plantelor, cum ar fi viruși, bacterii, ciuperci, nematode și plante parazite superioare. Poate produce diferiți compuși secundari, producând enzime foarte semnificative, cum ar fi chitinaza, proteaze și β-1,3-glucanaza, inducând apărarea plantelor, rezistența sistemică și competiția puternică și activă împotriva multor fitopatogeni. Prin urmare, este important de subliniat capacitatea *Trichodermei* în controlul bolilor plantelor (asupra diferitor agenți patogeni fungici precum *Rhizoctonia solani, Pythium ultimum, Botrytis cinerea* și bacterieni, ca biofertilizant, biopesticid, utilizat în bioremediere) având un rol semnificativ în dezvoltarea agriculturii durabile [1, 2, 7, 11, 16, 17].

Aplicarea *Trichoderma* sp. în sol nu numai că oferă rezistență la diferite boli fungice, dar de asemenea, îmbunătățește calitatea nutrienților și a culturilor [3, 5, 9, 12].

În prezent cercetătorii caută noi soluții și tehnologii inovatoare de bioremediere, iar genul *Trichoderma* în acest sens prezintă o capacitate remarcabilă de a tolera și a acumula diverși contaminanți chimici și metale grele precum Ni, Cd, Zn, Pb, As [6, 8, 10, 18, 19].

Astfel caracteristica sa antagonistă față de microorganismele patogene ale plantelor, utilizarea sa în calitate de bioîngrășământ și stimulator al creșterii plantelor îl fac mai fiabil pentru utilizare în domeniul agriculturii determinând creșterea randamentului atât biologic cât și economic a culturilor prin reducerea utilizării substanțelor chimice nocive astfel, contribuind la dezvoltarea durabilă a sectorului agricol.

Materiale și metode

În calitate de obiect de studiu a servit tulpina *Trichoderma atrobrunneum CNMN FD 25,* depozitată și păstrată în Colecția Națională de Microorgansime Nepatogene, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Universitatea Tehnică a Moldovei. Tulpina este păstrată în tuburi pe medii agarizate, și cultivate pe malț agar de 6ºBlg la 28°C.

Determinarea activității antifungice a micromicetelor din genul *Trichoderma* a fost determinată prin metoda blocurilor de agar [15, 20].

În calitate de culturi de testare au servit fitopatogenii: *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Fusarium solani, Fusarium oxysporum,* care provoacă mari daune și pierderi în sectorul agrar. Toate experimentele au fost efectuate în 3 repetări. S-a efectuat calculul indicilor statistici folosind software-ul MS Excel 2010.

Rezultate și discuții

Ne-am propus să studiem acţiunea mediului nutritiv asupra productivităţii tulpinii *Trichoderma atrobrunneum* CNMN FD 25. Astfel, mediul de cultivare a fost suplimentat cu zaharoză sau glucoză ce a servit drept sursă de carbon și compușii coordinativi: salicilatul de fier (Fe-Sr_2) – și furoatul de fier (Fe_2MnO) THF în concentrații de 1,0; 5,0; 10,0 mg/l precum și soluția de exometaboliți ai tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* în concentrații de 5,0 10, 20 ml/l și soluția de exometaboliți de *S. cerevisiae* cu cobalt (5 mg; 10 mg; 20 mg) - 10 ml fiecare. Tulpina a fost cultivată timp de 6 zile, la o temperatură de 28-30°C, pe un agitator cu 160-180 r/min.

Astfel, în rezultatul cultivării (Fig.1) *T. atrobrunneum* pe medii în care au fost utilizate glucoză (Gl) sau zaharoză (Z) în calitate de sursă de carbon, compuși cu fier și exometaboliți de *S. cerevisiae* a fost stabilit că cel mai bine *T. atrobruneum* a crescut pe mediul M(Gl,Z) (compoziția g/l): glucoză – 20,0; zaharoză - 10; $NaNO_3$ –1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4x7H_2O$ –1,0; $CaCO_3$ – 1,0; apă distilată până la 1 litru) cu o productivitate a biomasei de 15 g/l. La suplimentarea în mediul M (Gl,Z) a furoatului de fier 10 mg/l, productivitatea a crescut nesemnificativ cu 4 % (15,60 g/l). *T. atrobruneum* cultivat pe mediul M și suplimentat cu salicilat de fier (1,0; 5,0; 10,0 mg/l) a obținut o productivitate mai joasă cu 1 - 4,4 % (14,85-14,35), iar suplimentarea în mediul de cultivare a exometaboliților de *S. cerevisiae* a diminuat productivitea *T. atrobrunneum* cu 33-54 % (7-10 g/l).

Productivitatea *T. atrobrunneum* cultivată pe mediul M (Gl) a constituit 10,7 g/l cu 28,7% mai puțin față de cea cultivată pe mediul M (Gl,Z), iar suplimentarea cu exometaboliți de *S. cerevisiae* nu a stimulat, dar din contra a inhibat cu 4 - 72 % formarea biomasei. Se poate de menționat că *T. atrobrunneum* cultivat pe mediul M (Gl) și suplimentată cu 1 ml exometaboliți de *S. cerevisiae* (5 mg Co) a înregistrat o productivitate de 11,6 g/l, mai mult decît în cazul cultivării pe mediul M (Gl) cu 8,41 %.

O productivitatea foarte joasă (1,5 g/l) *T. atrobrunneum* a înregistrat-o în cazul cultivării pe mediul M (Z), ceea ce ne vorbește despre rolul important al glucozei ca sursă de carbon în procesele biosintetice.

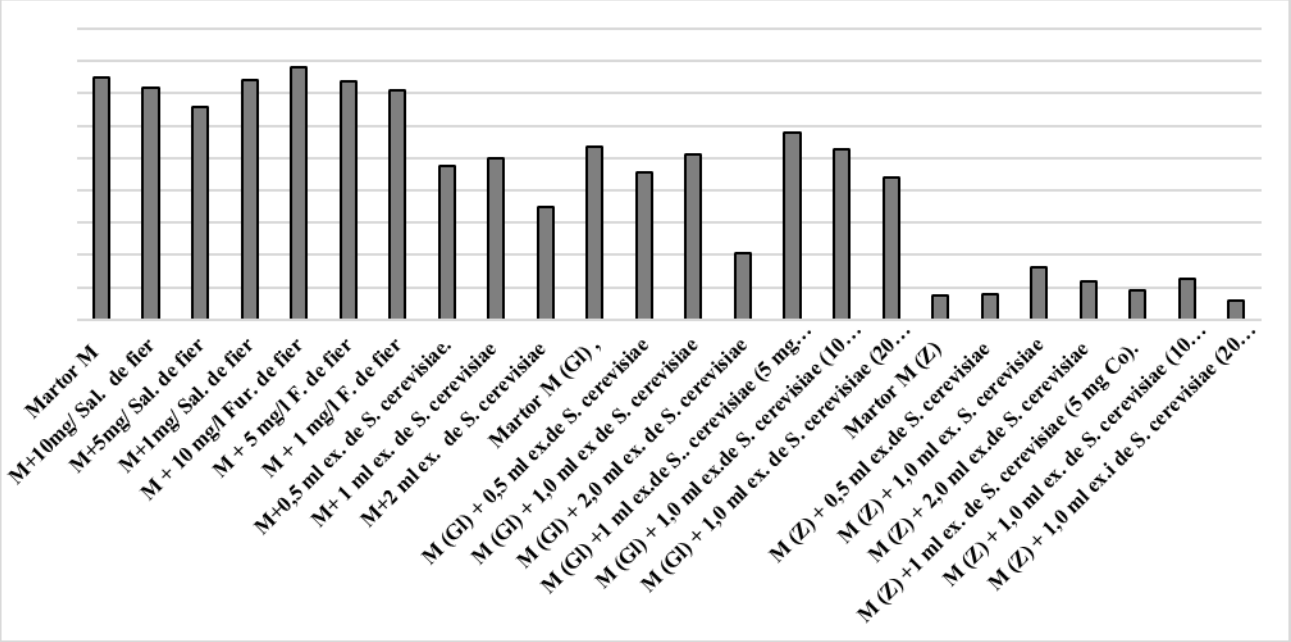


Figura 1. Productivitatea tulpinii *Trichoderma atrobruneum CNMN FD 25* la cultivarea în prezența unor substanțe în calitate de stimulatori

Un alt obiectiv al cercetării a fost studierea activității antifungice a tulpinii *Trichoderma. atrobrunneum* CNMN FD 25 cultivată pe mediile nutritive și suplimentate cu compușii de fier și exometaboliți ai tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* .

În calitate de culturi de testare au servit fungii patogeni: *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Fusarium solani, Fusarium oxysporum* care provoacă boli și daune mari în sectorul agrar.

În rezultatul testării s-a observat (Fig. 2) un efect antagonist pronunțat al *T. atrobrunneum* cultivată pe **mediul M** (compoziția g/l): glucoză – 20,0; zaharoză - 10; $NaNO_3$ –1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4x7H_2O$ –1,0; $CaCO_3$ – 1,0; apă distilată până la 1 litru) în care diametrul zonelor de inhibiție a variat de la 20 până la 32 mm față de toți fungi patogeni luați în testare .

Se poate de menționat că *T. atrobrunneum* cultivată pe mediul nutritiv M și suplimentat cu 1 mg/l și respectiv 5 mg/l de salicilat de fier a inhibat creșterea fitopatogenilor *Alternaria alternata* și *Botrytis cinerea* (diametrul zonelor de inhibiție 20-30mm).

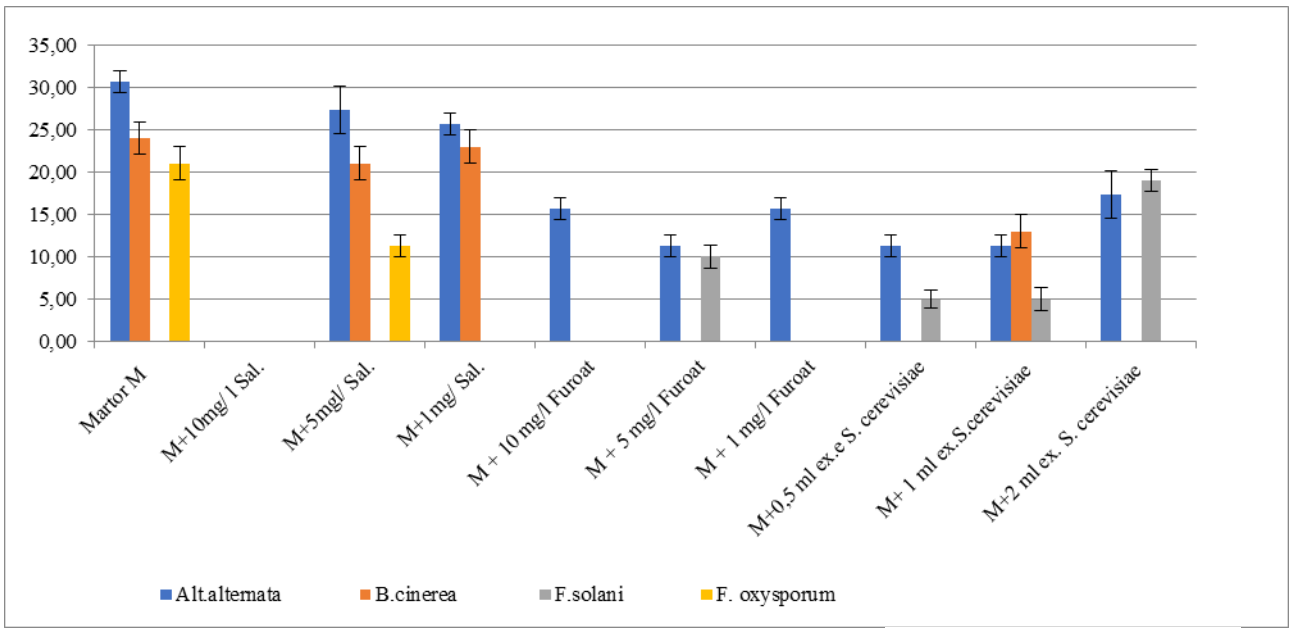


Figura 2 Activitatea antifungică a *Trichoderma atrobruneum CNMN FD 25* cultivată pe mediul M (Gl, Z) și suplimentat cu soluții de exometaboliți de *S.cerevisiae* și compuși ai fierului

În cazul suplimentării în mediul de cultivare a furoatului de fier în concentrații de 1 și 5 mg/l s-a observat o activitate antifungică slabă față de fitopatogenii luați în testare sau chiar deloc. O activitate mai vădită s-a obervat față de *Alternaria alternata*, diametrul zonelor de inhibiție de 15-17 mm. De asemenea suplimentarea mediului de cultivare a *T. atrobrunneum* CNMN FD 25 cu exometaboliți de *S. cerevisiae* nu a prezentat rezultate semnificative asupra acțiunii antifungice, diametrul zonelor de inhibiție nu au depășit valorile de 15-20 mm, față de *Alternaria alternata și Botrytis cinerea,* iar dezvoltarea și creșterea fungilor patogeni *Fusarium solani* și *Fusarium oxysporum* nu a fost inhibată.

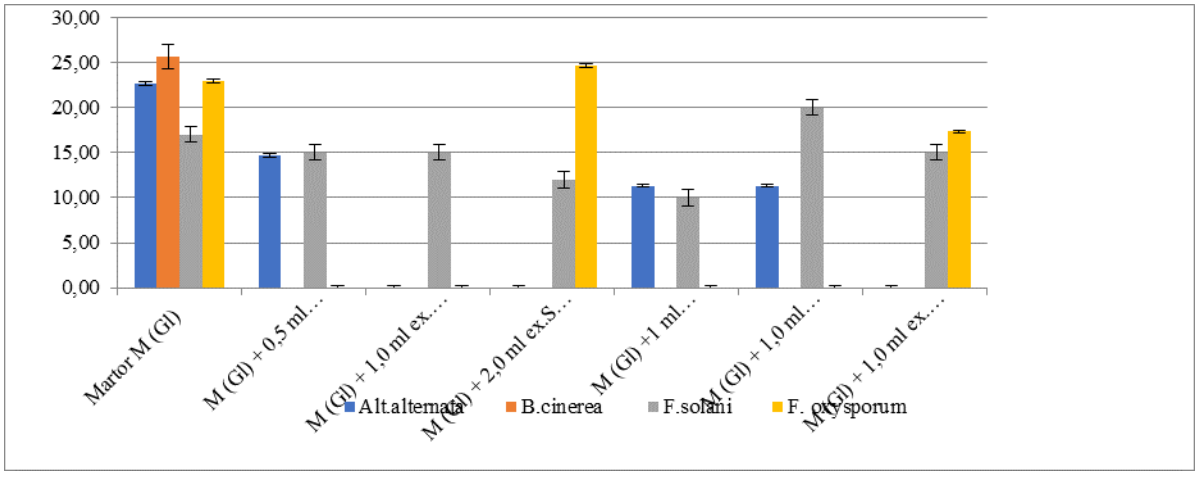


Figura 3 Activitatea antifungică a *Trichoderma atrobruneum CNMN FD 25* cultivată pe mediul M (Gl,) și suplimentat cu soluții de exometaboliți de *S.cerevisiae*

La cultivarea pe mediul M (Gl) cu următoarea compoziție (g/l): glucoză – 30,0; $NaNO_3$ – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4x7H_2O$ – 1,0; $CaCO_3$ – 2,0; apă distilată până la 1 litru, a *Trichodermei atrobruneum CNMN FD 25* (Fig. 3) s-a dovedit a avea o activitate antifungică vădită, diametru zonelor de inhibiție variind de la 17 - 27 mm asupra culturilor de fitopatogeni luate în testare, în

timp ce tulpina crescută pe mediul M (Gl) suplimentată cu soluție de exametaboliți de *S. cerevisiae* în diferite variante a prezentat valori mai diminuate față de martor sau nu au inhibat deloc creșterea și dezvoltarea fitopatogenilor (*B.cinerea* și *F. oxysporum*).

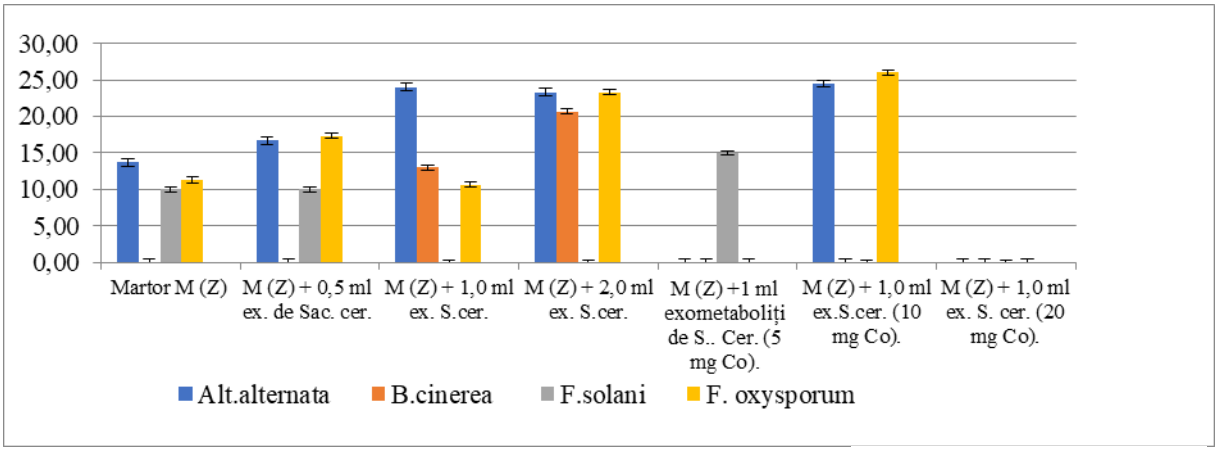


Figura 4. Activitatea antifungică a *Trichoderma atrobruneum CNMN FD 25* cultivată pe mediul M (Z)și suplimentat cu soluții de exometaboliți de *S. cerevisiae*

A fost testată și activitatea antifungică a *Trichoderma atrobrunneum* cultivată pe mediul **M (Z)** care conține zaharoză în calitate de sursă de carbon cu următoarea compoziție (g/l): zaharoză – 30,0; $NaNO_3$ –1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4x7H_2O$ – 1,0; $CaCO_3$ – 2,0; apă distilată până la 1 L, și suplimentat de asemenea cu soluție de exometaboliți de *S. cerevisiae*. Datele prezentate în Fig. 4 ne arată prezența activității antifungice semnificative, mai ales în cazul suplimentării în mediul M (Z) a 1,0 ml de exometaboliți de *S. cerevisiae*, unde dimaterul zonelor de inhibiție a fost de 25 mm față de *Alternaria alternata* și 15 mm față de *B.cinerea,* demonstrînd efectul anatagonist asupra fitopatogenilor luați în studiu de către exometaboliții elaborați de *T.atrobrunneum* în asociere cu exometaboliți de *S. cerevisiae.* De asemenea în cazul suplimentării în mediul M (Z) a 2,0 ml de exometaboliți de *S. cerevisiae* au fost înregistrate zone de inhibiție a creșterii fitopatogenilor de 20-25 mm față de *Alternaria alternata, Botrytis cinerea și Fusarium oxysporum.* Este important să subliniem că, suplimentarea în mediul **M (Z)** de cultivare a *T. atrobrunneum* a 1,0 ml de exometaboliți de *S. cerevisiae* ce conține 10 mg de cobalt a prezentat un efect antagonist puternic asupra fitopatogenilor*: Alternaria alternata (ø* zonei de inhibiție – 24 - 25 mm*), Fusarium oxysporum (ø* zonei de inhibiție – 25 - 28 mm*)* etc.

Concluzii

Rezultatele obţinute permit a rezuma că din toate variațiile de medii utilizate pentru cultivarea *Trichoderma atrobrunneum*, mediul M(Gl,Z) s-a dovedit a fi cel mai optim, înregistrîndu-se o productivitate de 15 g/l. *Trichoderma atrobrunneum* cultivată pe mediul nutritiv M (Gl, Z) posedă un efect antagonist puternic față fungii fitopatogeni: *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Fusarium solani, Fusarium oxysporum*, diametrul zonelor de inhibiție a variat de la 20 până la 32 mm în raport cu tulpina cultivată pe mediul M (Gl) și M (Z), suplimentat cu compușii fierului și exometaboliți ai *Saccharomyces cerevisiae.*

Notă. Lucrarea a fost realizată în baza proiectului: 020101 InBioS - Soluții biotehnologice inovative pentru agricultură, medicină și protecția mediului. Nu există niciun conflict de interese real sau potențial în legătură cu acest articol.

Referințe bibliografice

1. Brunner K., Zeilinger S., Ciliento R. et al. Improvement of the Fungal Biocontrol Agent. 2005; 71(7): 3959-3965.

2. Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Kubicek C.P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular. In: *Mycoscience.* Volume 47, Issue 2, April 2006, pp. 55-64 https://doi.org/10.1007/S10267-006-0279-7
3. Fiorentino N., Ventorino V., Woo S.L. et al. *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. In: *Front Plant Sci*. 2018; 9:1-15.
4. Haque M.M., Haque M.A., Ilias G., Molla A.H. *Trichoderma*-Enriched Biofertilizer: A Prospective Substitute of Inorganic Fertilizer for Mustard (*Brassica campestris*) Production. In: *Agric.* 1970; 8(2):66-73.
5. Harman G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp*. In*: Phytopathology*. 2006; 96(2):190-194.
6. Hasan S. Bioremediation: A review. 2016; 3(9):776-779.
7. Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. Plantbeneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. In: *Microbiology*. 2012; 158(1):17-25.
8. Kamal R.K. *Trichoderma*: a most common biofertilizer with multiple roles in agriculture. In: *Biomed J Sci Tech Res*. 2018; 4(5):4136-4137.
9. Khan M.Y., Haque M.M., Molla A.H., Rahman M.M., Alam M.Z. Antioxidant compounds and minerals in tomatoes by Trichoderma-enriched biofertilizer and their relationship with the soil environments. In: *J Integr Agric*. 2017; 16(3): 691-703.
10. López Errasquín E., Vázquez C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma* atroviride isolated from sludge. In*: Chemosphere*. 2003; 50(1):137-143.
11. Mahato S., Bhuju S., Shrestha J. Effect of *Trichoderma viride* as biofertilizer on growth and yield of wheat. Malaysian J Sustain Agric. 2018; 2(2):1-5.
12. Molla A.H., Manjurul Haque M., Amdadul Haque M., Ilias GNM. *Trichoderma*-enriched biofertilizer enhances production and nutritional quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and minimizes NPK fertilizer use. Agric Res. 2012; 1(3):265-272.
13. Muthuraman Yuvaraj, Murugaragavan Ramasamy. Role of fungi in agriculture. In: *Biostimulants in Plant Science* 2020. DOI: 10.5772/intechopen.89718.
14. Ratnam J. , Sye J. Comparative study on production of penicillin by Penicillium notatum and *Penicillium chrysogenum* & its antimicrobial property. In: *International Journal of Biotech Trends and Technology (IJBTT)*, Volume 4 Issue 3, 2014, 2249-0183.
15. Rizk, M., Abdel-Rahman, T., Metwally, H. Screening of antagonistic activity in different *Streptomyces* species against some pathogenic microorganisms. In: *J Biological Sciences*, 2007, 7(8): 1418-1423.
16. Samia Ageeb Akladious. Application of *Trichoderma harziunum* T22 as a biofertilizer supporting maize growth. In: *African J Biotechnol*. 2012; 11(35): 8672-8683.
17. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L. et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. In: *Soil Biol Biochem*. 2008; 40(1):1-10.
18. Yao X, Guo H, Zhang K, Zhao M, Ruan J, Chen J. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. In: *Front Microbiol*. 2023 May 3;14:1160551. doi: 10.3389/fmicb.2023.1160551.
19. Tripathi P., Singh P.C., Mishra A. et al. *Trichoderma*: A potential bioremediator for environmental cleanup. In: *Clean Technol Environ Policy*. 2013; 15(4):541-550.
20. Егоров Н.С., 2004. Основы учения об антибиотиках. Изд-во Московского университета, изд-во «Наука», Москва. С. 526.
21. Садовая Т.Н. Исследование микроструктуры сыров с голубой плесенью. Техника и технология пищевых производств. 2010. № 4, с. 45-50.