

Sobre um *Penicillium* vegetando em soluções de sulfato de cobre

JOSE CANUTO MARMO

(Médico e Engenheiro-Agrônomo)

11.a Cad. da E. S. A. "L. Q." — Universidade de S. Paulo

Faz vários anos que vimos observando, com estranheza, vir se desenvolvendo com insistência um cogumelo ou bolor dentro de uma cuba de vidro cheia com uma solução de sulfato de cobre a 5%, do tipo comercial, usada em nosso laboratório para o preparo de plantas, com coloração própria, pelo método de Pollaci-Drumond, para fazer parte do museu de plantas doentes, que pertence às instalações do laboratório da 11.a Cadeira da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo.

Notámos que o miceto se desenvolve a princípio junto à tampa de madeira, que mantemos na cuba para prender os órgãos vegetais em tratamento imersos na solução cúprica, formando sobre a superfície da madeira uma eflorescência branca, cotonosa, relativamente espessa em uma matriz de substância viscosa. Geralmente, o crescimento albino se forma sobre a superfície inferior da madeira em contacto com a solução e não naquela que está exposta ao ar, livre portanto do sulfato de cobre.

Depois de uma ou duas semanas, observamos no seio da massa líquida uns flocos grandes e brancos, constituídos principalmente pelo aparelho vegetativo do fungo, à custa de esporos ou conídias que se formam a princípio sobre a eflorescência da superfície da tampa da cuba.

O desenvolvimento de um fungo em solução concentrada de sulfato cúprico nos surpreendeu, principalmente por sabermos, e ser elementar em fitopatologia, serem muito eficientes e bastante usados os fungicidas cúpricos para combater, profi-licamente, numerosas doenças causadas por fungos, especial-

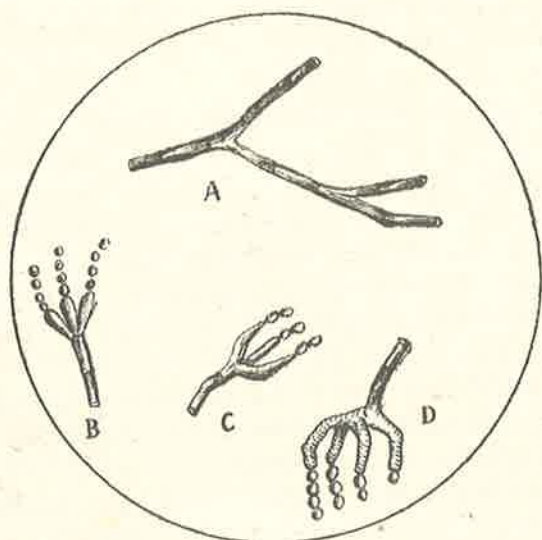
mente os **mildews** (da videira, da batatinha, do tomateiro, etc.). O interesse por tal fato foi se avolumando, em virtude de ser o sulfato cúprico o ingrediente ativo da calda bordalesa (o príncipe dos fungicidas), pois que a cal hidratada tem apenas, como se admite, uma ação neutralizante do poder fitotóxico do sulfato cúprico. Há autores que afirmam que a cal funciona como um corpo inerte, apenas.

Isto tudo nos levou a procedermos a uma série de ensaios para poder sugerir uma explicação ao que se estava passando.

Recolhemos para isso, uma amostra do miceto e vimos ao microscópio tratar-se de um **Penicillium**. Consultando a obra de THOM (1930), **The Penicillia**, vimos à página 558 a citação do **Penicillium cupricum** Trab., como vegetando razoavelmente em soluções fortes de sulfato de cobre. Como o que ali se encontra se aplica bem ao fungo que estava sendo por nós estudado, pensamos ser justamente dessa espécie o bolor por nós ensaiado.

Ficámos sabendo também, pela literatura consultada, que Trabut em 1895 relatou uma espécie de cogumelo, **Penicillium cupricum** com esporos vermelhos, como crescendo em soluções fortes de sulfato de cobre; que De Seynes em 1895 afirmou que a espécie de Trabut era **Penicillium glaucum** e não como ele relatara; que Gueguen em 1898 trabalhando com a espécie **P. glaucum** observou em soluções de 1:200 as reações relatadas por Trabut, pelo que decidia que não era justificada a separação sugerida; que Hattori, trabalhando no Japão, reportou que uma solução contendo sulfato de cobre a 0,008% age como um estímulo para o **Penicillium**; que Biourge em 1923 relatou uma linhagem de **Penicillium cupricum** que tolerava CuSO_4 a 10% e que resistia ao contacto, por um ano dos cristais de CuSO_4 com 5 moléculas de água e que muitos **Cytomyces** são muito tolerantes ao cobre; que De Seynes e Gueguen mostraram que a cor e as estruturas reportadas por Trabut eram meramente a resposta de uma espécie verde ao sulfato de cobre.

De posse desses dados da literatura ao nosso alcance, pedimos ao cont. Jorge Lordello, auxilliar do nosso laboratório, fizesse com material colhido na cuba de sulfato em que o bolor estava esporulando, uma cultura pura, em gelose-batata-



Penicillium eupricum Trab.
 A-Hifa septada e ramificada
 B-C-D Conidióforos e conídias

glicose, o que foi feito usando placas de Petri para realizar a diluição em série e tubos de cultura, com o meio cultural inclinado, para as repicagens.

Por essas culturas observámos a princípio o desenvolvimento do aparelho vegetativo que é branco quando visto em massa e incolor ao microscópio; observámos também o aparecimento dos conidióforos que são incolores e ramificados à semelhança de um pincel ou dedos de u'a mão e que nas últimas ramificações mostram os esporos assexuados ou conídias que são unicelulares, arredondados, catenulados, coloridos em verde-oliváceo e em grande número.

Obtida e estudada a cultura pura, providenciámos o preparo de vários tubos de cultura contendo uns solução a 1% preparada com água de torneira e sulfato de cobre comercial e outros sulfato de cobre "pro analysi" em água destilada. Outros

tubos ainda foram preparados contendo um leite de cal com água destilada e cal virgem "pro analysi" a 5%. Todo esse material foi esterilizado em autoclave a 1 atm., durante 15 minutos.

Em vários tubos contendo sulfato de cobre, dos acima relatados, fizemos repicagens com material colhido em cultura pura sobre agar-batata-glicose. Depois de uma ou duas semanas observávamos, como esperávamos, o desenvolvimento da amostra que, repicada em condições asséticas, com um diâmetro de cerca de 2 mm. com auxílio de agulha de platina estirada, mostrava-se com cerca de 1 cm. no maior diâmetro.

Este material levado para o microscópio, entre lâmina e lamínula, mostrou-se constituído exclusivamente de micélio formado por hifas muito delicadas, regularmente septadas, hialinas e ramificadas; os conidióforos e conídias não apareceram em qualquer um dos tubos, embora confeccionados com pequenas diferenças. Como em alguns tubos havia apenas água e sulfato de cobre quimicamente puros, supomos que os esporos não puderam se formar devido à falta de elementos necessários ao metabolismo do fungo. Esses esporos entretanto se formam abundantemente quando a água e o sulfato de cobre não são puros, como acontece com o bolor encontrado na cuba, em que a tampa da mesma é de madeira e os órgãos vegetais em tratamento deixam resquícios de matéria orgânica que poderá ser aproveitada pelo fungo.

As culturas obtidas em meio estéril e com substâncias puras, foram conservadas em laboratório cerca de quatro semanas, exibindo um desenvolvimento muito lento. Depois disso, colocávamos nas mesmas o leite de cal, preparado como acima referimos. Com surpresa nossa, notávamos a paralização total do crescimento do **Penicillium** e sua morte, dentro de pouco tempo. A desintegração do fungo foi comprovada fazendo-se repicagens para tubos de cultura estéreis, contendo agar-batata-glicose e por exames ao microscópio. A vitalidade das amostras que estavam na solução de sulfato de cobre, em tubos com meio estéril foi também comprovada fazendo-se repicagens para outros tubos de cultura contendo o meio **standard** para

fungos. Nestes últimos tubos, observámos o crescimento vigoroso do bolor, que depois esporulou abundantemente, como esperávamos.

Alguns dos tubos contendo cultura pura do *Penicillium* ensalado, em agar-batata-glicose, foram tratados com uma solução de sulfato de cobre em água, tudo esterilizado, mostrando um crescimento exuberante do fungo, muito maior daquele de que provinha, o que vem verificar o acerto da asserção de Hattori que considera o CuSO_4 em determinada concentração como substância estimulante ao crescimento do fungo em questão. Aliás, o mercúrio, que faz parte do mesmo grupo químico do cobre, como metal pesado que é, também age como estimulante para os vegetais. É sabido que as plantas que se originam de sementes tratadas com fim profilático, com alguns dos seus sais orgânicos, como os encontrados no *uspulum* e outros preparados do comércio, desenvolvem-se mais rapidamente do que as plantas não tratadas.

Das amostras que se desenvolviam em agar-batata-glicose, fizemos repicagens para os tubos com leite de cal. Notámos, com surpresa, que o *Penicillium cupricum* se desenvolve também nesse meio. Dêstes últimos tubos fizemos repicagens para outros com agar-batata-glicose, onde se desenvolveram normalmente. Disto se conclui que a cal, sozinha, não mata o bolor.

Em alguns tubos de cultura com meio de batatinha em que o *Penicillium* se desenvolvia, colocámos em condições assépticas, leite de cal a 5%, esterilizado; observámos depois de alguns dias que o fungo se desenvolvia normalmente.

Por fim, outros tubos com culturas puras, também em agar-batata-glicose, receberam a mistura bordalesa recém-preparada a partir de soluções estéreis. Esta paralizou o crescimento do fungo, tendo mesmo destruído sua vitalidade, o que verificámos por meio de repicagens para tubos contendo batata-agar-glicose, meio cultural usado para os micetos em geral. Notámos também que a calda bordalesa fez com que o fundo da cultura dos tubos se mostrasse com coloração vermelha ou levemente parda, o que vinha justificar a afirmação de Trabut que supôs que os esporos ou conídias do *Penicillium cupricum* fôsem de coloração vermelha. A nosso ver, é o cobre libertado

pelo precipitado de grãos muito finos que se forma pela mistura de CuSO_4 e Ca(OH)_2 , que vai impregnar as estruturas vegetativas e reprodutivas do *Penicillium* e dar origem, assim, ao aparecimento de tal coloração. Dêsses últimos tubos, tratados com calda bordalesa, recém-preparada, levámos amostras, em replicagens, para tubos com meio estéril de batatinha, que não se desenvolveram, como esperávamos.

Uma das finalidades do presente trabalho era verificar se o *Penicillium cupricum*, que se desenvolve relativamente bem, principalmente em seu estadio vegetativo em soluções de sulfato de cobre, podia vegetar também em calda bordalesa, constituindo assim uma exceção em todo o campo da patologia vegetal.

Para nosso gáudio, vimos que tal não se dá. Embora o bolor em questão vegete razoavelmente em solução aquosa de sulfato cúprico, preparada com substâncias quimicamente puras e vegete e esporule em soluções preparadas com água de torneira e sulfato de cobre comercial, com resquícios de matéria orgânica, e embora cresça também em leite de cal, quimicamente puro, verificámos que êle não pode vegetar, nem esporular, em calda bordalesa.

Êste fato pode ser explicado apenas pela forma em que se encontra o cobre em uma e outra mistura. Na primeira êle se encontra fora de dúvida, em estado iônico (Cu^+); pelos ensaios que fizemos o *Penicillium* pode vegetar em tal caso. Na última mistura, calda bordalesa, não é bem conhecido o estado em que o cobre se encontra; estaria na forma de hidróxido, de complexo coloidal, de sal básico ou na de óxido. O cobre em um dêsses estados inibe o crescimento do *Penicillium*, chegando mesmo a matá-lo, conforme observámos pelos nossos ensaios.

Esta explicação está baseada apenas no modo de agir da calda bordalesa, atuando como protectante ou fungicida. Admite-se que ela forma uma fina película ou *film* sobre os órgãos das plantas tratadas, película esta que atua como uma barreira ativa e não apenas fisicamente. Ela elimina pequenas porções de cobre, em determinado estado químico, que vão destruir as hifas de infecção dos esporos ao germinar.

rem sobre a água que se condensa sobre a parte aérea da planta-hospedeira, protegendo-a desse modo, contra os fitopatógenos.

Em todo o decorrer do nosso estudo, considerámos quase só a ação do sulfato de cobre, porque na calda ou mistura bordalesa, éle é ingrediente ativo, conforme se admite, dando-se à cal apenas um valor de neutralizante da fitotoxicidade que o sulfato de cobre possui em alto grau. Esta propriedade do sulfato cúprico pode ser demonstrada experimentalmente. Para isso, aplicámos com aparelho de aspersão ou de pulverização uma solução de sulfato cúprico sobre o aparelho vegetativo de ervilhas (*Pisum*), por exemplo. Depois de poucos dias observámos sobre as fôlhas principalmente, grande número de lesões de queimaduras ou de escaldadura, que fizeram com que a planta viesse a perecer completamente crestada. A mesma cousa não acontecerá se a solução de sulfato de cobre for misturada com leite de cal até à sua neutralização, preparado por hidratação de cal virgem. A ação fitotóxica do cobre, desaparecerá desse modo, não queimando a planta-hospedeira.

Por meio desses ensaios de laboratório, pudemos chegar às seguintes conclusões :

1a.) Há fungos, como o *Penicillium cupricum* Trab., que podem vegetar em soluções aquosas de sulfato de cobre.

2.a) *Penicillium* esporulará se houver sulfato de cobre, água e pequena porção de matéria orgânica (madeira).

3a.) O *Penicillium* pode vegetar também em leite de cal, preparado a 5% com substâncias puras.

4a.) O *Penicillium* obtido em cultura pura em batata-agar-glicose continua a viver bem se acrescentarmos aos tubos de cultura, soluções de sulfato de cobre ou leite de cal.

5.a) A calda bordalesa, que é feita como é sabido, à base de sulfato de cobre, inibe o crescimento dos fungos em geral, mesmo o do *Penicillium cupricum* que pode viver no sulfato de cobre e no leite de cal, separadamente.

6.a) O sulfato de cobre, à semelhança dos sais orgânicos de mercúrio para as plantas superiores, estimula o crescimento do *Penicillium cupricum*.

7a.) A preservação de madeira, contra apodrecimento, por

meio do CuSO_4 não deve ser aconselhada, pois que há fungos, como o *Penicillium cupricum* que podem se desenvolver nessa substância.

8a.) O tratamento dos troncos das arvores por meio de cal hidratada não deve ser aconselhado, pois que há fungos, como o *Penicillium cupricum*, que se desenvolvem nessa substância.

LITERATURA CITADA

- 1 — BIOUSGE, PH. — Les moisissures du groupe *Penicillium* Link. Etude monographique. 1923.
- 2 — DE SEYNES, J. — Resultats de la culture du *Penicillium cupricum* Trab. Bull. de la Soc. Botanique de France XLII (Paris) : 451-455; 482-485. 1895.
- 3 — GUEGUEN, F. Recherches sur les organismes myceliens des solutions pharmaceutiques. Etudes biologiques sur la *Penicillium glaucum*. Bul.Soc. Mycol. France 14 : 201-255. 1898.
- 4 — HATTORI, H. — Studien über die einwirkung des kupfersulfats auf einige Pflazen. Abd. a.d. Jour. of Coll. of Sci. Imperial Univ. Tokyo. XV : 371-394. 1901.
- 5 — HORSFALL, J. G. — Fungicides and their Action. Mass., U.S.A. 1945.
- 6 — MASON, A. F. Spraying, Dusting and Fumigatting of Plants. New York. 1929.
- 7 — Thom, Ch. — The Penicillia. Baltimore. 1930.
- 8 — Trabut, L. — Sur um *Penicillium* vegetant dans des Solutions concentrées de sulfat de cuivre. Bul. Soc. Bot. France 42 : 451-455. 1895.