



## Seleção de microrganismos para biocontrole de *Aspergillus flavus* *toxigênico*

### Selection of microorganisms for biocontrol of *toxigenic* *Aspergillus flavus*

Matheus Teles da Silva<sup>1</sup>, Elisabete Hiromi Hashimoto<sup>2</sup>

#### RESUMO

*Aspergillus flavus* é um fungo saprófito produtor de aflatoxinas, composto classificado como carcinogênico nível I pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC). Esse fungo é capaz de contaminar plantações de *commodities* como amendoim, afetando a produção e como consequência gerando prejuízos econômicos. Fungos do gênero *Aspergillus spp.* possuem difícil controle e são extremamente adaptáveis, fato que corrobora com a preocupação do presente estudo. Atualmente estuda-se o método de biocontrole que consiste no antagonismo, ou seja, uso de agentes para redução de pragas. Neste trabalho estudamos possíveis antagonistas, realizando isolamentos de microrganismos de 10 amostras de amendoim. Um total de 31 isolados foram testados frente ao *A. flavus* NRRL® 3251, produtor de aflatoxina, em co-cultivo. Após testes e posterior análise de crescimento fúngico, foi possível verificar que 80,65% dos microrganismos apresentaram antagonismo por competição de nutrientes/espaço, em contrapartida, 19,35% dos microrganismos não tiveram qualquer inibição.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aflatoxina; antagonismo; *Aspergillus flavus*; biocontrole

#### ABSTRACT

*Aspergillus flavus* is a saprophytic fungus that produces aflatoxins, a compound classified as a level I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC). This fungus is capable of contaminating commodity crops such as peanuts, affecting production and, as a consequence, generating economic losses. Fungi of the genus *Aspergillus spp.* They are difficult to control and extremely adaptable, a fact that corroborates the concern of the present study. Currently, the biocontrol method is being studied, which consists of antagonism, that is, the use of agents to reduce pests. In this work we studied possible antagonists, performing isolations of microorganisms from 10 peanut samples. A total of 31 isolates were tested against *A. flavus* NRRL® 3251, which produces aflatoxin, in co-culture. After tests and subsequent analysis of fungal growth, it was possible to verify that 80.65% of the microorganisms had antagonism only due to nutrient/space competition, on the other hand, 19.35% of the microorganisms did not have any inhibition.

**KEY-WORDS:** Aflatoxin; antagonism; *Aspergillus flavus*; biocontrol

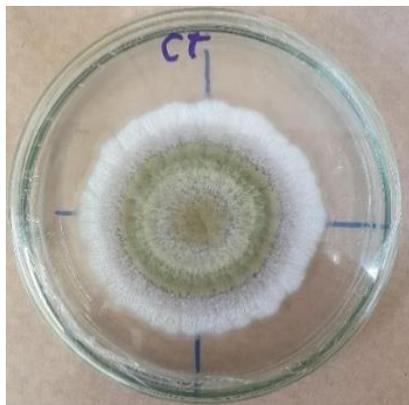
#### INTRODUÇÃO

*Aspergillus flavus* é um fungo filamentoso saprófito, ou seja, obtém seus nutrientes através da matéria orgânica em decomposição, com isso, torna-o um potencial contaminante. Em culturas *in vitro* *A. flavus* apresenta uma coloração amarelo-esverdeada (Figura 1A), de crescimento rápido, 7cm em 7 dias e apresentam conidióforos (estrutura para reprodução assexuada) (Figura 1B) em formato aspergilar. (KLICH, 2007).

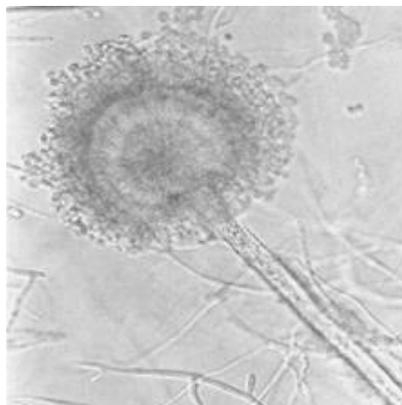
<sup>1</sup> Voluntário PIVIC. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. matheusteles@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2275628950753119.

<sup>2</sup> Docente no Departamento Acadêmico de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. elisabete@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2913931020821513.

Figura 1 – Estruturas macro e microscópicas.



1A - Cultura de *A. flavus* em placa de petri  
Fonte: Autoria própria (2022)



1B - Imagem microscópica do conidióforo.  
Fonte: KLINCH (2007)

Além do ônus econômico, *A. flavus* possui a capacidade de produzir aflatoxina, um metabólito secundário que apresenta classificação de toxicidade nível 1 pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Esse composto é um dos contaminantes mais tóxicos em alimentos e rações (SAVIC, 2020). No Brasil, o limite máximo tolerado de aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) para amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim é de 20µg/kg (BRASIL, 2011). O resíduo dessas toxinas em alimentos vegetal ou animal pode ser passado através da cadeia alimentar, o que afeta a saúde humana induzindo câncer, deformidade, toxicidade renal, hepática, genética e supressão, entre outros efeitos adversos (KOLOSOVA & STROKA, 2011).

Atualmente existem métodos físico-químicos para a descontaminação de aflatoxinas. No entanto, esses não apresentam a eficácia desejada em função da perda de nutrientes ou ainda a dificuldade na remoção dos subprodutos tóxicos (REN, 2020). Desta forma o presente trabalho teve como objetivo o estudo do biocontrole de *A. flavus* produtor de aflatoxina por meio da prospecção de microrganismos antagonistas.

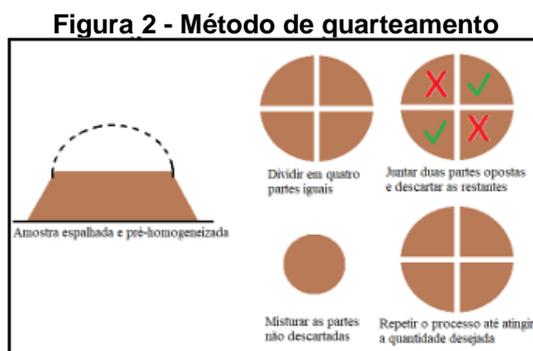
## MATERIAIS E MÉTODOS

### AMOSTRAS

Para o isolamento de possíveis antagonistas foram utilizadas 10 amostras de amendoim, fornecidas pela Cooperativa Casul®. Cada uma das amostras era composta por aproximadamente 1 kg, colhidas em diferentes localidades do interior do Estado de São Paulo – Brasil, no período de janeiro e abril 2022.

## ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Para o isolamento de microrganismos, foi realizado o quarteamento (Figura 2) resultando em 150 g de amostra de amendoim com casca, separando os grãos das cascas e posterior trituração de forma asséptica.



Fonte: Rezende (2018)

Após trituradas, as amostras foram adicionadas à 250 mL de solução de peptona bacteriológica estéril 0,1% (v/v), e executada a diluição seriada até a concentração  $10^{-6}$  esporos/mL. Um volume de 1mL de cada diluição foi inoculado *Pour Plate* em placas de Petri acrescido ágar batata dextrose (BDA, 39g/L) a 40 °C. Após 3-4 dias, foram selecionadas colônias que se assemelhavam leveduras. Depois de selecionadas, as colônias foram isoladas por estria por esgotamento em meio BDA.

## CEPA DE REFERÊNCIA

*A. flavus* NRRL® 3251 foi utilizada como cepa de referência reativado em caldo Brain Heart Infusion (BHI, 37g/L), incubados a 28 °C, por 7 dias. Em seguida a cepa padrão foi isolada por estria por esgotamento em placas contendo ágar BDA.

A fim de confirmar a produção de aflatoxina, NRRL 3251 foi inoculada em ágar-coco (LIN et al. 1976). Posteriormente foi realizada extração e análise em câmara escura com exposição a luz de ondas longas (365nm – UV, ACCINELLI et al., 2018).

## EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA AFLATOXINA

A produção de aflatoxina pela cepa NRRL 3251 foi avaliada em ágar coco e caldo YES (Yeast Extract Sucrose), incubados a 28°C por 30 dias e posteriormente realizado extração da aflatoxina. Para essa extração utilizamos a metodologia descrita por Ono et al. (2007. Apud SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). A extração foi realizada em solução de metanol, cloreto de potássio 4% (KCl) e sulfato de amônio 30% ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) seguida de clarificação com terra diatomácea. Em funil de separação a extração foi finalizada com clorofórmio, o extrato clorofórmico foi seco à 50 °C em banho-maria. E a toxina armazenada em freezer.

## EXPERIMENTO TESTE

Os testes foram realizados *in vitro* através do método de co-cultura, no qual foram adicionados o *A. flavus* e os possíveis antagonistas na mesma placa de Petri. Para esta etapa, os esporos de *A. flavus* previamente inoculados em BDA, foram suspensos em solução Tween 80, 0,1% (v/v) seguida de diluição até  $10^6$  esporos/mL, determinada por contagem em câmara de Neubauer e microscópio óptico (EL-SHANSOURY, 2022). Uma alíquota de 25  $\mu$ L de *A. flavus* foi inoculado no centro da placa através de micropipeta, representando uma microgota. O inóculo dos possíveis microrganismos antagonistas foi realizado em quatro pontos equidistantes do centro da placa. Sendo inoculados uma alçada de cada microrganismo teste, previamente cultivado em BDA por 3 dias à 28 °C. As placas testes foram incubadas a 28 °C. No 7<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia foram analisadas o crescimento e aspectos das colônias quanto a inibição do crescimento de *A. flavus*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 31 microrganismos para realização do teste de biocontrole de *A. flavus*. Durante o período de análise foi possível verificar que dentre os 31 microrganismos, 6 não apresentaram qualquer potencial inibitório frente a *A. flavus*. Por outro lado, 25 isolados apresentaram inibição por competição de nutrientes e/ou espaço.

Figura 3 – Tipos de inibição



3A - Competição por espaço



3B - Competição por espaço



3C - Competição por nutrientes

Fonte: Autoria própria (2023)

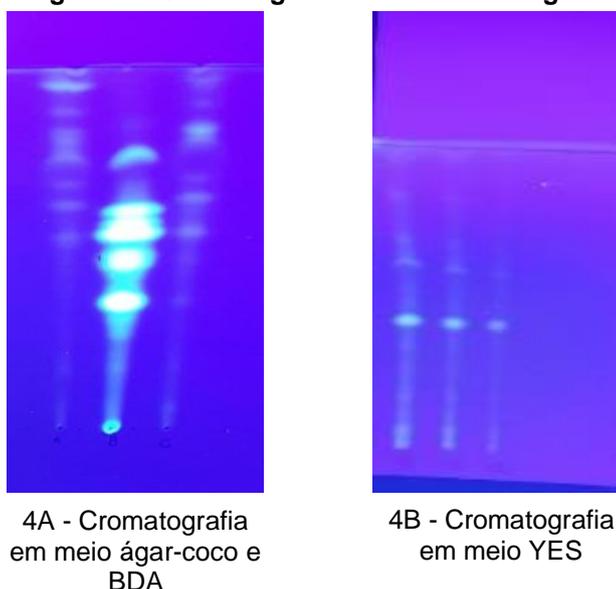
É possível afirmar, pelo crescimento fúngico que houve apenas competição por espaço, Figura 3A e 3B, ou ainda, competição por nutriente, Figura 3C. Estes tipos de competição consistem na disputa por algum nutriente que ambos os microrganismos usem para seu metabolismo (LANNA FILHO, 2010) ou ainda ao rápido crescimento em relação ao fungo.

Embora a inoculação do possível antagonista tenha sido por uma alçada sem padronização do número de células, considera-se que foi inoculado uma grande concentração de células e ainda assim não apresentaram inibição. No entanto, uma padronização de contagem de células, pode ter influenciado o crescimento microbiano, baseando-se pelos resultados de Bueno et al. (2006), no qual foi utilizado uma concentração de 100:1 bactérias:fungo. Outro ponto a ser pensado é a fonte dos possíveis

antagonistas, visto que no trabalho também descrito por Bueno et al. (2006), foram isolados microrganismos de fezes humanas e iogurte que apresentaram inibições contra o *A. flavus*.

Em relação a produção de toxina, foi confirmado a produção de aflatoxinas em cromatografia em camada delgada. A cepa NRRL 3251 é reconhecidamente toxigênica, no entanto devido ao longo tempo de armazenamento sob refrigeração foi necessário a confirmação da produção, por possíveis perdas na expressão. Com a análise foi possível afirmar que houve maior produção quando o microrganismo foi inoculado no meio ágar-coco.

Figura 4 – Cromatografia em camada delgada



Fonte: Autoria própria (2023)

Verifica-se (Figura 4) que em diferentes meios de cultura houve quantidades diferentes de produção da toxina. Na cromatografia da toxina extraída do ágar-coco (linha ao centro, Figura 4A) é visivelmente maior a quantidade de fluorescência o que indica maior quantidade de toxina (Lin et al. 1976). Em contrapartida, na cromatografia da toxina extraída do meio BDA (linha a direita e esquerda, Figura 4A) ou do caldo YES (Figura 4B), há pouca fluorescência, indicando menor quantidade de toxina.

## CONCLUSÃO

Do total de 33 microrganismos testados nenhum inibiu o crescimento de *A. flavus* através de metabólitos intra e/ou extracelulares, e sim por competição de espaço e nutrientes. Assim, sugere-se, que sejam isolados microrganismos de diversas fontes para tentativa de controlar o crescimento do *Aspergillus flavus*. A produção e aflatoxina foi confirmada, sendo um resultado importante para as próximas etapas, pois o biocontrole pode ser testado além da inibição do crescimento do fungo, através da inibição da produção e ou biodegradação da toxina.

## Agradecimentos



Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e à Cooperativa Casul pelas amostras concedidas.

### Conflito de interesses

Não há conflito de interesse.

### REFERÊNCIAS

ACCINELLI, C. et al. Controle biológico da produção de aflatoxina em milho utilizando *A. flavus* não aflatoxigênico administrado como revestimento de sementes à base de bioplástico. **Proteção de Cultivos**, v. 107, pág. 87-92, 2018.

BRASIL. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, 2011.

BUENO, DJ. et al. *Lactobacillus casei* CRL 431 e *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1224 como controles biológicos para cepas de *Aspergillus flavus*. **Revista de proteção alimentar**, v. 69, n. 10, pág. 2544-2548, 2006.

EL-SHANSHOURY, ABD EL-RAHEEM R. ET AL. Biocontrol of *A. flavus* and Producing Aflatoxin B1 by *Streptomyces exfoliatus*. **Egyptian Journal of Botany**, v. 62, n. 2, p. 457-473, 2022.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular plant pathology**, v. 8, n. 6, p. 713-722, 2007.

LANNA FILHO, Roberto; FERRO, Henrique Monteiro; PINHO, RSC de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LIN, MT; DIANESE, JC. Meio ágar-coco para detecção rápida da produção de aflatoxina por *Aspergillus spp.* **Fitopatologia**, v. 66, n. 12, pág. 1466-1469, 1976.

REN, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; MAO, J.; LI, P. Controle de fungos aflatoxigênicos por microrganismos antagonistas: Comportamentos inibitórios, compostos bioativos, mecanismos relacionados e fatores de influência. **Toxinas**, v. 12, n. 1, pág. 24, 2020

REZENDE, V.M.M. SANTANA, C.G. Composição gravimétrica dos resíduos de construção civil da cidade de São Luís – MA. **Revista do Centro de Estudos de Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, 2018.

SAVIĆ, Z. et al. Controle biológico da aflatoxina no milho cultivado na Sérvia. **Toxinas**, v. 12, n. 3, pág. 162, 2020.