



Teste de antagonismo para controle de *Aspergillus ochraceus* ocratoxigênico

Selection of antagonistic microorganisms to control ochratoxin A-producing *Aspergillus ochraceus*

Nicolas de Aguiar Justus¹, Elisabete Hiromi Hashimoto²

RESUMO

Aspergillus ochraceus, fungo filamentosos, destaca-se pela produção da micotoxina ocratoxina A (OTA). Essa contamina grãos e cereais desde o cultivo até o processamento e armazenamento, se tornando um risco à saúde para o consumidor final devido a seu potencial nefrotóxico, cancerígeno, teratogênico e imunotóxico, principalmente. O trabalho teve como objetivo realizar testes com microrganismos isolados do milho e leveduras de diferentes fontes para avaliar o potencial para o controle biológico. Além disso, foi avaliado a produção de Ocratoxina A por *A. ochraceus* em meio BDA, ágar coco e ágar Czapeck. Para avaliar a atividade antifúngica de microrganismos, os microrganismos testes foram reativados. Os experimentos de antagonismo em cultura líquida e com microgotas revelaram limitações, o primeiro pois houve dificuldade na observação clara das hifas e conídios e o segundo devido à presença indesejada de leveduras. Desta forma, embora os testes de antagonismo tenham apresentado dificuldades, a detecção de OTA foi bem-sucedida.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico; Micotoxinas; Ocratoxina A.

ABSTRACT

Aspergillus ochraceus, a filamentous fungus, stands out for producing the mycotoxin ochratoxin A (OTA). This contamination of grains and cereals from cultivation to processing and storage, poses a risk to the health of the final consumer due to its nephrotoxic, carcinogenic, teratogenic and immunotoxic potential, mainly. The aim of this research was to carry out tests with microorganisms isolated from corn and yeast from different sources to evaluate the potential for biological control. Furthermore, the production of Ochratoxin A by *A. ochraceus* was evaluated on PDA medium, coconut agar and Czapeck agar. To evaluate the antifungal activity of microorganisms, trial microorganisms were reactivated. The antagonism experiments in liquid culture and with microdrops revealed limitations, the first because there was difficulty in clearly observing the hyphae and conidia and the second due to the unwanted presence of yeast. Thus, although the antagonism tests presented difficulties, the detection of OTA was successful.

KEYWORDS: Biological control; Mycotoxins; Ochratoxin A.

INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse no emprego do controle biológico, com uso de microrganismos benéficos, para controlar os patógenos vegetais, como fungos (HAGGAG, 2007 e OZTEKIN, 2023). O interesse é devido a grande quantidade de perda pós-colheita relacionada a presença de fungos produtores de micotoxinas. Ocratoxina A (OTA), produzida por *Penicillium* e *Aspergillus* spp. apresenta efeitos principalmente nefrotóxicos, mas também cancerígenos, teratogênicos e imunotóxicos (ALSALABI, 2023).

Neste sentido, o uso de leveduras para esse controle vem da capacidade dessas serem mais eficazes no controle de contaminações pós-colheita, por serem mais

¹ Bolsista do PIBIC. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: nicolasjustus@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6634069089203644..

² Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: elisabete@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2913931020821513.



resistentes a fatores de estresse, por crescerem em substratos simples e por não produzirem metabólitos secundários tóxicos (UL HASSAN, 2023 e OZTEKIN, 2023). A busca por antagonistas do *A. ochraceus* é importante para inibir o crescimento e reduzir a produção de OTA (ARFAOUI et al., 2019). Em trabalho prévio, realizados em nosso grupo de pesquisa, o controle desse fungo por microrganismos isolados do milho apresentou microrganismos capazes de inibir o crescimento de *A. ochraceus* por produção de substância (JUSTUS; HASHIMOTO, 2022). O antagonismo pode se manifestar por competição por nutrientes e ou produção de substância. No segundo caso, a caracterização da substância antagônica é importante para avaliar sua aplicabilidade.

O crescimento dos fungos não se vincula, de maneira automática, à produção de micotoxinas. Dentro de uma mesma espécie fúngica, o potencial micotoxigênico varia consideravelmente conforme a cepa. A formação de micotoxinas está sujeita à influência da composição físico-química da matriz onde os fungos se desenvolvem e de fatores ambientais (DRUSCH, 2003). No caso da OTA, sua biossíntese ocorre sob condições específicas disponibilidade de nutrientes, atividade de água e a temperatura do ambiente de cultivo. É importante ressaltar que a atividade de água ideal para a produção de OTA por essa espécie fúngica varia na faixa de 0,98 a 0,99, enquanto a faixa de temperatura adequada abrange de 4 a 31°C (IAMANAKA, 2003 e PRADO, 2000).

Neste estudo, o objetivo principal foi estabelecer um protocolo para avaliar a atividade antagonista por produção de substância para controle de *A. ochraceus* e da produção de OTA.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa A152 de *A. ochraceus*, foi reativada em caldo BHI (Infusão Cérebro Coração) seguida de diluições seriadas até 10^{-9} afim de eliminar interferente, haja visto que o inóculo estava há muito tempo sem repique e poderia estar contaminado. Uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada em placas de Petri contendo Batata Dextrose Ágar (BDA) (39 g/L), incubada a 25 °C por 7 dias.

REATIVAÇÃO DE ANTAGONISTAS

Cepas de microrganismos previamente isolados de amostras de milho (JUSTUS; HASHIMOTO 2022) foram reativadas em placas de Petri com BDA e incubados por 48 horas, enquanto os 10 isolados, previamente obtidos por Coelho (2007) de diferentes fontes do ecossistema e reservados no laboratório, foram reativados em caldo Infusão Cérebro Coração de Boi (BHI 37g/L) a 28 °C por 48 horas.

TESTES DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para padronizar a concentração de esporos de *A. ochraceus* em 10^5 esporos/mL, os esporos fúngicos foram adicionados em uma solução de Tween 0,01%. A contagem dos esporos foi realizada utilizando um microscópio óptico e câmara de Neubauer.



TESTE COM MICROGOTAS

Para este experimento, adaptou-se a metodologia de Coelho (2007). A concentração de esporos de *A. ochraceus* foi padronizada em 10^5 esporos/mL. Os isolados foram reativados em meio YM (Yeast Medium). Para os testes de antagonismo, os isolados foram inoculados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo YM. Alíquotas de 100 μ L das células suspensas com concentração de $3,0 \times 10^6$ células (determinada por escala McFarland) foram transferidas para 5 Erlenmeyers diferentes, cada um contendo 25 mL de caldo YM. Os frascos foram incubados a 25 °C em condições estáticas. Em intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, coletou-se 2 mL da suspensão, que foram inseridos em microtubos estéreis. Esses foram centrifugados 3.000 rpm, 8.000 rpm e 13.000 rpm por 10 min e, em seguida, foram filtrados em membranas Millipore de 0,20 μ m. Posteriormente, preparou-se 5 tubos contendo 1 mL de meio YM estéril cada, em seguida foram adicionados 1 mL de 10^5 esporos/mL de *A. ochraceus*. Uma alíquota de 1 mL do filtrado foi radionada ao tubo (120 x 13 mm) contendo 10^5 esporos/mL de *A. ochraceus*. Um controle foi preparado, substituindo o filtrado por 1 mL de água destilada estéril. Os tubos foram incubados a 25 °C por 12 horas. Realizou-se análise microscópica para determinar a porcentagem de germinação dos conídios e o tamanho das hifas, avaliando o crescimento fúngico.

PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

Para confirmar a produção de ocratoxina A (OTA), *Aspergillus ochraceus* cepa A152 foi inoculada em placas de Petri com Ágar Coco (CA) (KUNTAWEE, 2015) e incubada à 28 °C por 5 dias. Essas placas foram analisadas em uma câmara escura usando uma lâmpada UV de 365 nm para detectar a fluorescência de OTA. OTA foi extraída de placas de ágar coco (não submetida à luz UV) com crescimento de *A. ochraceus* A152 conforme a metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989), seguido por cromatografia em camada delgada o extrato clorofórmico foi aplicada em uma placa cromatográfica de sílica-gel 60 (MACHEREY-NAGEL). A cromatografia foi realizada até que a fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20) percorresse 10 cm na placa. A detecção foi conduzida em uma câmara escura sob luz UV de 365 nm, comparada com uma placa cromatográfica contendo o padrão de OTA de uma análise prévia.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em trabalho prévio 3 isolados de milho demonstraram potencial antagonista ao *A. ochraceus* em meio sólido (JUSTUS; HASHIMOTO, 2022). De forma para caracterizar a substância antagônica e avaliar sua aplicabilidade neste trabalho foram realizados testes em meio líquido.

No teste de antagonismo, houve dificuldades na observação clara das hifas e conídios de *A. ochraceus* o que prejudicou a interpretação dos resultados e a análise dos efeitos específicos do *A. ochraceus*. Esse teste possibilitaria uma análise estatística baseada no quanto houve de inibição do fungo medindo suas hifas e conídios e transformando esses em Unidades de Inibição (Chen, 1999). Portanto, recomenda-se a revisão da metodologia ou a exploração de abordagens alternativas para avaliar o antagonismo contra *A. ochraceus* em cultura líquida.

Os resultados obtidos para esse teste não foram conclusivos devido ao crescimento simultâneo do isolado juntamente com o fungo (Figura 1). Essa interferência prejudicou a análise dos resultados e dificultou a interpretação dos efeitos específicos sobre o *A. ochraceus*. A presença indesejada do isolado pode ter ocorrido devido à falta de eliminação adequada durante a centrifugação. Portanto, são necessários ajustes e refinamentos no protocolo experimental, como modificações nas concentrações, condições de incubação ou a implementação de medidas para controlar o crescimento da levedura, a fim de obter resultados mais conclusivos e confiáveis para avaliar o efeito do fungo *A. ochraceus*.

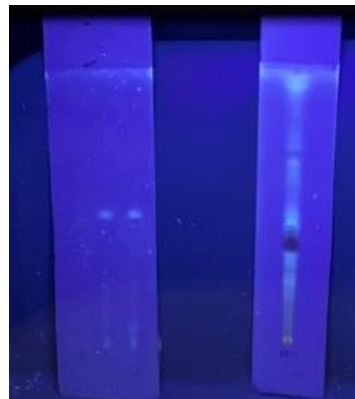
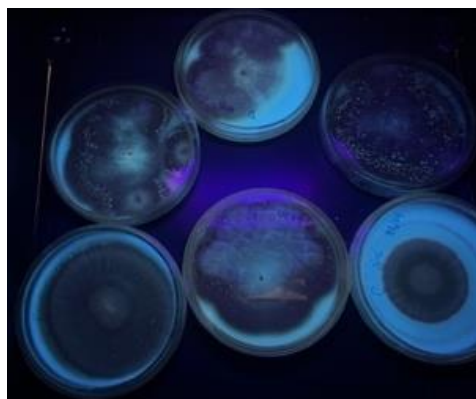
Figura 1 – Teste com microgotas para levedura M para centrifugação de 13.000 rpm



Fonte: autoria própria, 2023.

A presença de OTA foi identificada com emissão de fluorescência nas placas com ágar coco e nos spots fluorescentes de coloração azul esverdeada característica (Figura 2), que é típica da OTA quando exposta à luz UV 365 nm (HEENAN, 1998 e KUNTAWEE, 1995). No entanto, é relevante ressaltar que essa técnica fornece apenas informações qualitativas, indicando se a OTA está presente ou ausente na amostra analisada.

Figura 2 – Teste de detecção de OTA produzido pelo *A. ochraceus* em Ágar coco e cromatografia em camada delgada



Fonte: autoria própria, 2023.



Os resultados destacam uma necessidade de refinamentos na metodologia para os testes utilizando meio líquido e microgota, afim de tornar possível análises estatísticas e numéricas da inibição do fungo como realizado por Coelho (2007) e Virgili (2012). Além disso, a detecção de OTA é importante, apesar da análise ser qualitativa, principalmente para avaliação da eficácia de práticas de controle, quando em pesquisa científica. Esses achados fornecem uma base sólida para futuras pesquisas e podem ter implicações significativas na segurança alimentar e na qualidade dos produtos agrícolas.

CONCLUSÃO

Embora os experimentos de antagonismo em cultura líquida e com microgotas tenham apresentado resultados inconclusivos e dificuldades na obtenção de dados confiáveis para avaliar o efeito na inibição de *A. ochraceus*, os testes para avaliar a produção de ocratoxina pelo fungo foram bem-sucedidos e recomendados devido à sua facilidade de execução, baixo custo e possibilidade de replicação. As limitações observadas enfatizam a necessidade de refinamentos nos protocolos experimentais e a exploração de abordagens alternativas para investigar o antagonismo contra *A. ochraceus* em cultura líquida.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, a qual agradecemos pela bolsa de iniciação científica concedida.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse

REFERÊNCIAS

ALSALABI, Fatma Ali et al. Molecular identification and biocontrol of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in animal feed marketed in the state of Qatar. *Heliyon*, v. 9, n. 1, 2023.

ARFAOUI, Mayssa et al. Isolation, identification and in vitro characterization of grapevine rhizobacteria to control ochratoxigenic *Aspergillus* spp. On grapes. **Biological control**, v. 129, p. 201-211, 2019.

CHEN, Lin et al. The secondary metabolites and biosynthetic diversity from *Aspergillus ochraceus*. *Frontiers in Chemistry*, v. 10, p. 938626, 2022.

CHEN, Z.; BROWN, R. L.; LAX, A. R.; CLEVELAND, T. E. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n. 3, p. 1320-1324, 1999

COELHO, Alexandre Rodrigo et al. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation in vitro. *Brazilian archives of Biology and Technology*, v. 50, p. 725-733, 2007.



DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *Journal of food protection*, v. 66, n. 8, p. 1514-1527, 2003.

HAGGAG, Wafaa Mohamed et al. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, v. 1, n. 1, p. 7-12, 2007.

HEENAN, C. N.; SHAW, K. J.; PITT, J. I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. 1998.

IAMANAKA, Beatriz Thie; OLIVEIRA, Idjane Santana; TANIWAKI, Marta Hiromi. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, v. 7, p. 138-161, 2010

JUSTUS, Nicolas de Aguiar; HASHIMOTO, Elisabete Hiromi. Biocontrole do *Aspergillus ochraceus* Toxigênico. *Anais do XII Seminário de Extensão e Inovação & XXVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR*. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/seisicite2022/548902-BIOCONTROLE-DO-ASPERGILLUS-OCHRACEUS-TOXIGENICO>. Acesso em: 22/09/2023

KUNTAWEE, Sumanee et al. Isolation and identification of *Aspergillus* species producing Ochratoxin a in Arabica coffee beans. *J. Agric. Technol*, v. 11, p. 1235-1242, 2015.

OZTEKIN, Sebahat et al. Recent Insights into the Use of Antagonistic Yeasts for Sustainable Biomanagement of Postharvest Pathogenic and Mycotoxigenic Fungi in Fruits with Their Prevention Strategies against Mycotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023.

PRADO, Guilherme et al. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. *Food Science and Technology*, v. 20, p. 192-196, 2000.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUES-AMAYA, D. Survey of aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone and Sterigmatocystin in Some Brazilian Foods by using multi-toxin Thin-Layer Chromatographic method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International.*, v.72, n.1, p.22-26, 1989.

UL HASSAN, Zahoor et al. Microbial volatilome in food safety. Current status and perspectives in the biocontrol of mycotoxigenic fungi and their metabolites. *Biocontrol Science and Technology*, v. 33, n. 6, p. 499-538, 2023.

VIRGILI, Roberta et al. Biocontrol of *Penicillium nordicum* growth and ochratoxin A production by native yeasts of dry cured ham. *Toxins*, v. 4, n. 2, p. 68-82, 2012