

Isolamento de microrganismos para controle de *Fusarium graminearum*

Isolation of microorganisms for *Fusarium graminearum* control.

Amanda Jean Renaud¹, Elisabete Hiromi Hashimoto²

RESUMO

Fusarium graminearum, é um fungo produtor da micotoxina *deoxynivalenol* (DON), o qual é prejudicial à saúde humana e animal. O objetivo do trabalho foi isolar e selecionar microrganismos com atividade para controle de *F. graminearum*. Foram isolados oito microrganismos de sete amostras de cevada. A metodologia envolveu dois principais passos: reativação e isolamento do fungo e o isolamento de microrganismos das amostras de cevada colhidas de diferentes regiões do Brasil e da Argentina. Para reativação foi utilizado caldo BHI estéril, incubado a temperatura ambiente por 7 dias até ficar turvo, indicando o crescimento do fungo e após o crescimento isolar pelo método de estrias por esgotamento em BDA; e para o isolamento dos microrganismos da cevada, a metodologia empregada foi pour plate e estrias por esgotamento utilizando BDA, sendo incubados por 7 dias em estufa à 28°C. A realização dos testes de biocontrole e atividade antagônica foi impossibilitada devido à saída antecipada do projeto por razões pessoais.

PALAVRAS-CHAVE: biocontrole; controle biológico; *deoxynivalenol* (DON); *Fusarium graminearum*; leveduras; micotoxina; segurança alimentar; toxigenicidade.

ABSTRACT

Fusarium graminearum is a fungus that produces the mycotoxin deoxynivalenol (DON), which is harmful to human and animal health. The aim of the study was to isolate and select microorganisms with activity for the control of *F. graminearum*. Eight microorganisms were isolated from seven samples of barley. The methodology involved two main steps: reactivation and isolation of the fungus, and the isolation of microorganisms from barley samples collected from different regions of Brazil and Argentina. For reactivation, sterile BHI broth was used, incubated at room temperature for 7 days until it became cloudy, indicating fungal growth. After growth, isolation was performed using the streaking method on BDA (Bismuth D-Glucose Agar). For the isolation of microorganisms from barley, the methodology employed pour plate and streaking methods using BDA, with incubation for 7 days in an oven at 28°C. The performance of biocontrol and antagonistic activity tests was impossible due to the early termination of the project for personal reasons.

KEYWORDS: Biological control; *deoxynivalenol* (DON); *Fusarium graminearum*; yeasts; mycotoxin; food safety; toxigenicity.

INTRODUÇÃO

A agricultura desempenha um papel fundamental na garantia da segurança alimentar e na sustentação da economia global. No entanto, a produção de culturas agrícolas está constantemente ameaçada por patógenos que causam doenças devastadoras e produzem micotoxinas prejudiciais para a saúde humana e animal. Os fungos do gênero *Fusarium spp* infestam cereais cultivados em todo o mundo, como a cevada e mas a ocorrência de espécies individuais depende das condições climáticas, principalmente da temperatura e da umidade. *Fusarium graminearum* geralmente ocorre em regiões de clima quente, com temperatura média anual acima de 15 °C, mas também é comumente

¹ Voluntária do PIVIC. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: arenaud@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 4258521804552579

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.

encontrada em países de clima temperado nas estações de cultivo caracterizadas por temperaturas mais elevadas e alta umidade. (Mielniczuk, E.; Skwaryło-Bednarz, B., 2020). O Deoxinivalenol (DON) é uma micotoxina, produto do metabolismo secundário de *Fusarium spp*, cuja presença no grão é o resultado do desenvolvimento da doença conhecida como giberela de Fusarium, FHB (*Fusarium Head Blight* ou sarna), que tem aumentado nos últimos anos provocando diversos prejuízos econômicos. O DON no corpo humano e animal pode causar inflamação do epitélio do intestino delgado, o que resulta em diarreia subsequente, vômitos, falta de apetite e perda de peso. Também é possível ocorrer necrose de certos tecidos, como a parede gastrointestinal, medula óssea ou tecido linfóide. Atuando no nível celular, os tricotecenos causam mitose e distúrbios de separação de cromossomos, mas também podem induzir a morte celular programada de células normais. (Mielniczuk, E.; Skwaryło-Bednarz, B., 2020).

Atualmente, uma abordagem promissora para enfrentar essa micotoxina envolve sua desintoxicação por meio de processos biológicos, como o biocontrole utilizando microrganismos antagonistas. Os microrganismos podem converter micotoxinas em produtos não tóxicos ou menos tóxicos (Ji, C.; Ventilador, Y.; Zhao, L., 2016) antes que ocorra sua absorção no trato gastrointestinal.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos presentes na cevada, para posteriormente realizar testes de biocontrole e verificar se há atividade antagonista contra *Fusarium graminearum*.

METODOLOGIA

REATIVAÇÃO E ISOLAMENTO DO FUNGO

Cultivos de *Fusarium graminearum* mantidas em tubos com ágar Batata dextrose (BDA) e óleo mineral para conservação do microrganismo, foram reativadas em caldo BHI (37 g/L) estéril e incubado por 7 dias em temperatura ambiente. Após a turvação do caldo, foi possível replicá-lo para placas contendo BDA (39 g/L) *pour plate* e incubado por 7 dias em temperatura ambiente. Colônias de fungos que cresceram foram transferidos para outra placa contendo BDA estéreis e, pelo método de estrias por esgotamento.

E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DA CEVADA

Um total de 7 amostras de cevada colhidas de regiões do Brasil e da Argentina foram utilizadas para o isolamento dos microrganismos.

Para isolamento de microrganismos de amostras, foi feita homogeneização e quarteamento de cada amostra de cevada. Deste, uma porção de 25g da cevada foram trituradas em um liquidificador industrial de forma asséptica. A amostra foi colocada em um Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada estéril a 0,1%. Então uma diluição seriada das amostras foi realizada em tubos de ensaio contendo água peptonada até a diluição 10^{-6} . Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi inoculada em placas de Petri estéreis pelo método *pour plate*, em BDA e incubado por 7-10 dias até o crescimento dos microrganismos.

O método de estrias por esgotamento foi usado para isolar cada microrganismo, as colônias com características de levedura foram em placas de Petri e tubos estéreis

contendo BDA mantidas em temperatura ambiente até obter crescimento e refrigerada após a codificação.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram selecionados 8 microrganismos das 7 amostras de cevada e isolados; selecionados pela sua aparência remeter a de leveduras. Também foi observado um possível crescimento de *F. graminearum*.

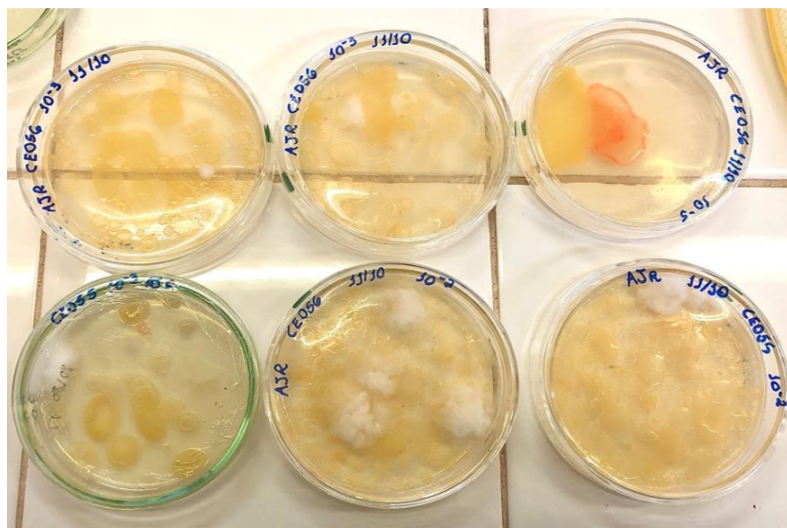
Tabela 1 - Origem das amostras de cevada

AMOSTRA	ORIGEM	CÓDIGO LOTE
CE01	Brasil	CE-001232/21
CE012	Brasil	CE-001230/21
CE04	Argentina	CE-004507/21
CE045	Argentina	CE-004508/21
CE05	Argentina	CE-005502/21
CE055	Argentina	CE-005503/21
CE056	Argentina	CE-005601/21

Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

A tabela acima mostra a origem de cada amostra de cevada, lote e seu devido código.

Imagem 1 - Placas selecionadas para isolamento.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Quanto às morfologias dos microrganismos, cresceram como leveduras de colorações: laranja, creme, amarelada, branca, nude, marronzinha e rosa.

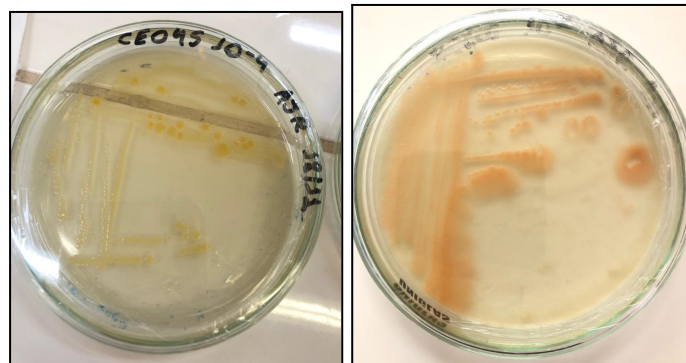
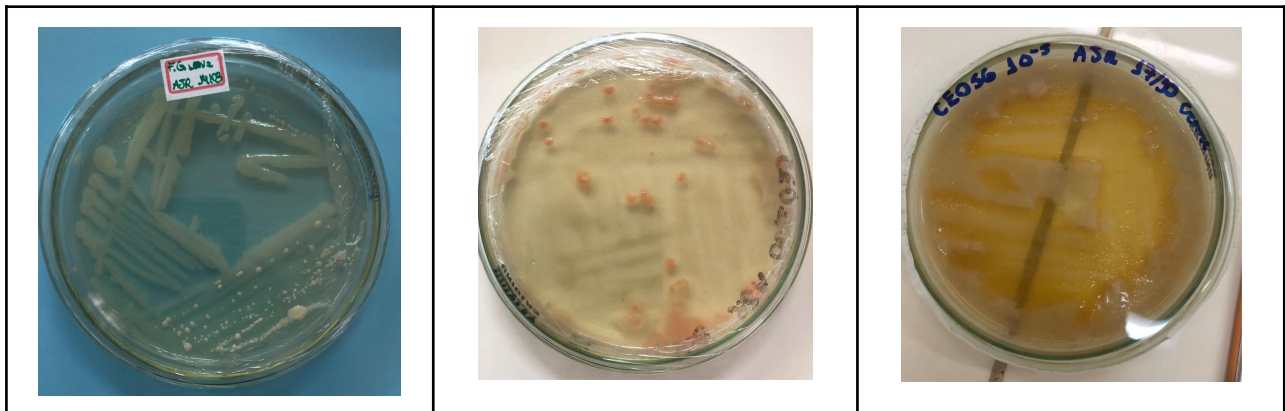
Imagem 2 - Placa com possível *F.graminearum*



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

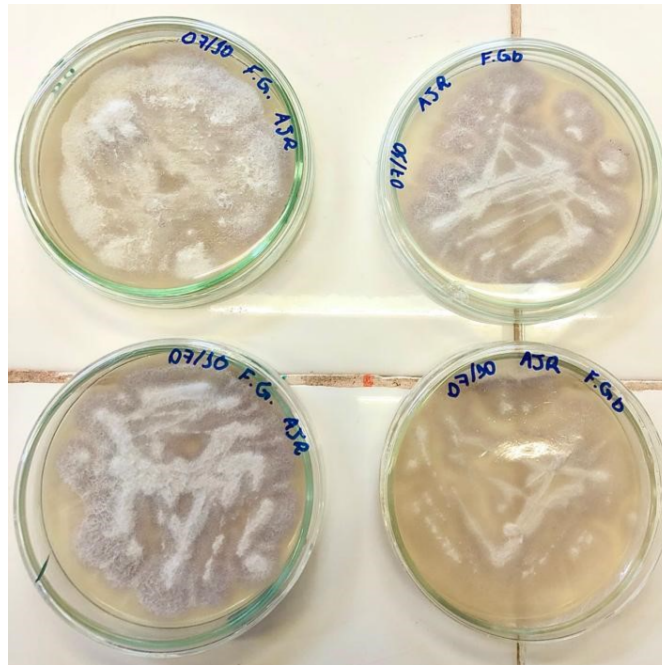
Em uma das amostras de cevada da Argentina foi observado o possível crescimento de *F.graminearum*.

Imagem 3 - Placas com microrganismos isolados.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Imagem 5 - Cepas reativadas de *F. graminearum*



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Esses resultados proporcionam uma base sólida para futuros testes de toxigenicidade e biocontrole contra *Fusarium graminearum* utilizando esses microrganismos isolados. A literatura sugere que microrganismos de fermentação podem ser eficazes na inibição da micotoxina e controle do crescimento micelial do fungo, mas os microrganismos contaminados ainda requerem esforços adicionais de isolamento.

A proposta de testes de atividade antagônica não foi realizada devido a saída antecipada do projeto de pesquisa por motivos pessoais.

CONCLUSÃO

Este estudo representa um passo importante na compreensão e mitigação dos riscos associados a micotoxinas em culturas agrícolas, contribuindo para a segurança alimentar e a saúde pública. Embora represente um passo preliminar na busca por medidas eficazes de biocontrole contra *F. graminearum*, a proposta de realizar testes de atividade antagônica não foi realizada, devido a saída antecipada do projeto de pesquisa por motivos pessoais que impactaram minha capacidade de dedicar o tempo e a atenção necessários ao projeto. Ressalta-se a importância de futuras pesquisas nessa área, onde devem explorar o potencial dos microrganismos isolados em aplicações de biocontrole, oferecendo esperança para práticas agrícolas aprimoradas e redução dos riscos à saúde associados à contaminação por *F. graminearum*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Ponta Grossa.

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: **EMBRAPA-CNPDA**, 1991. Organizado por Wagner Bettiol. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/10080>

Ji, C.; Ventilador, Y.; Zhao, L. Revisão sobre degradação biológica de micotoxinas. *Anima Nutr.* **2016**, 2, 127–133.

MIELNICZUK, E.; SKWARYŁO-BEDNARZ, B. Fusarium Head Blight, micotoxinas e estratégias para sua redução. *Agronomy* **2020**, 10, 509. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy10040509>

TADEI, Nicole S. et al. Fusarium mycotoxins in beer production: characteristics, toxicity, incidence, legislation and control strategies. *Scientia Agropecuaria*, Trujillo, v. 11, n. 2, p.247-256, abr. 2020. Disponível em: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172020000200247&lng=es&nrm=iso

YIZHI YAO, MIAO LONG, The biological detoxification of deoxynivalenol: A review, **Food and Chemical Toxicology**, Volume 145, 2020