



Isolamento de microrganismos para biocontrole de *Fusarium graminearum*

Isolation of microorganisms for biocontrol Fusarium graminearum

Arthur Baldomero Taques¹, Elisabete Hiromi Hasjimoto¹

RESUMO

A cevada é um grão muito utilizado seja para alimentação humana ou animal. O grão de cevada é susceptível à contaminação fúngica, podendo levar a perdas econômicas e riscos à saúde. Estes fungos podem produzir micotoxinas, dentre elas o desoxinivalenol (DON), produzidas pelo fungo *Fusarium graminearum*. Os efeitos tóxicos desta micotoxina são problema gastrointestinais e ação teratogênica. A região Sul do Brasil decorrente ao seu clima subtropical favorece o crescimento do fungo, assim havendo necessidade da utilização de agrotóxicos em excesso para tentar contê-lo. O objetivo deste trabalho é realizar o isolamento dos microrganismos encontrados na cevada afim de avaliar o seu potencial uso para o biocontrole. As amostras de cevada deste estudo foram da cidade de Guarapuava-Paraná, totalizando 5 amostras distintas onde realizou-se o isolamento em meios sólidos de batata dextrose, extrato de levedura, extrato de malte, nutriente e sabouraud, assim obtendo cerca de 50 microrganismos isolados, sendo necessário dar continuidade para sua identificação molecular e sua análise para verificar a presença de DON.

Palavras-chave: desoxinivalenol, micotoxinas, cevada, *Fusarium graminearum*

ABSTRACT

Barley is a grain widely used either for human or animal food. Barley grain is susceptible to fungal contamination, which can lead to reduced loss and health risks. These fungi can produce mycotoxins, including deoxynivalenol (DON), produced by the fungus *Fusarium graminearum*. The toxic effects of this mycotoxin are gastrointestinal problems and teratogenic action. The southern region of Brazil, due to its subtropical climate, favors the growth of the fungus, thus making it necessary to use pesticides in excess to try to contain it. The objective of this work is to carry out the isolation of microorganisms found in barley in order to evaluate its potential use for biocontrol. The barley abbreviations in this study were from the city of Guarapuava-Paraná, totaling 5 different ones, where dextrose potato, yeast extract, malt extract, nutrient and sabouraud were isolated in solid media, thus obtaining about 50 microorganisms. , being necessary to continue its molecular identification and its analysis to verify the presence of DON.

Keywords: deoxynivalenol, mycotoxins, barley, *Fusarium graminearum*



1 INTRODUÇÃO

Fusarium graminearum é um fungo recorrente em países com clima tropical e subtropical, que atinge principalmente cereais como cevada, trigo e milho. Quando infectado, seus grãos podem adquirir toxicidade decorrente a presença de micotoxinas, dentre elas está o desoxinivalenol (DON) (BANDO et al, 2007; FREIRE et al, 2007).

O DON é uma toxina da classe dos tricotecenos produzida principalmente por *Fusarium graminearum*, são comumente encontradas em cereais de grãos pequenos, ocorre em condições de excesso de chuva em conjunto com temperaturas moderadas. A sua exposição, acarreta diversos riscos aos humanos e animais, causando problemas com inibição da síntese proteica e efeitos agudos gastrintestinais (PESTKA e SMOLINSKI, 2005; PESTKA, 2010).

Com a alta crescente na produção de cevada na região sul, segundo a Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento (SEAB) Do Rio Grande do Sul (2021), em 2021 já houve um aumento na produção de 30% comparado ao ano anterior, partindo de cerca de 272 mil toneladas para atuais 354,6 mil toneladas, ainda ressalta que a estimativa prevista no próximo ano, que a produção na região irá corresponder a 15% de toda produção nacional de malte.

Com o aumento da produção e disponibilidade de grãos, faz se necessário um rigoroso controle devido aos riscos de contaminação por micotoxinas. Segundo Carneiro (2015) a utilização de agroquímicos, como fungicidas, pesticidas e defensivos agrícolas, podem causar diversas doenças como: arritmias cardíacas, lesões renais, câncer, alergias respiratórias dentre outras. A autora ainda reforça a utilização de ações biotecnológicas para enfrentar o problema, como os biopesticidas a base de microrganismos, os transgênicos e a utilização do controle biológico.

Então como poderíamos isolar os microrganismos encontrados na cevada?

Esse trabalho tem como objetivo isolar os microrganismos a partir de amostras de cevada, para em seguida avaliar o seu potencial uso para o biocontrole de *F. graminearum*.

2 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DA PESQUISA

A pesquisa foi realizar na Universidade Tecnológica Federal do Paraná do campus de Ponta Grossa. Para as análises foram selecionadas duas amostras de cevada coletadas em 2020 e 2021 da Cooperativa Agrária Agroindustrial da cidade de Guarapuava PR. A amostra foi submetida ao processo de quarteamento até sua redução de 25g, este processo foi realizado 5 vezes, uma para cada meio selecionado.

As amostras selecionadas foram trituradas e submetidas a diluição seriadas a partir de 225 mL de peptona a 0,1%, até diluição 10^{-6} , com transferência de 2 mL sequenciais em tubos contendo 18 mL de peptona 0,1%, prosseguindo para inoculação em triplicada, inoculando uma alíquota de 1 mL nos meios de cultura ágar batata dextrose, ágar nutriente, ágar extrato de levedura, ágar extrato de malte e ágar Sabouraud, utilizado da técnica “pour plate” para cada placa. Em seguida todas as placas foram incubadas por 7 dias a 25 °C.

Após o este período foi realizada uma análise das colônias de microrganismos; para isolamento de microrganismos com características macroscópicas diferentes. Para o isolamento, cada colônia foi submetida novamente em repique nos seus respectivos meios, com fim de purificar, utilizando método de estriamento por esgotamento e incubando por 7 dias a 25°C.



3 RESULTADOS

Os microrganismos isolados foram codificados de 01 a 50. Para o resultado observamos a relação de placas que obtiveram em cada meio sobre suas respectivas diluições, sendo de 10^{-1} a 10^{-6} disposto na tabela 1 e em seguida os microrganismos selecionados: 12 no meio de extrato de leveduras e 6 em batata dextrose e suas respectivas características na tabela 2. Os 32 microrganismos que foram isolados não foram discriminados na tabela 2, não demonstraram boas características e necessitam mais estudos.

As amostras em meio extrato de levedura, apresentaram colônias com cores amarelas, alaranjadas e brancas, com aspectos leitoso, lisa e bem carradas; as amostras em batata dextrose demonstraram em condições de concentrações mais baixas, fungos filamentosos, rugosos, de aspectos opacos com coloração verde e muitos esporos; em extrato de levedura e sabouraud obtivemos diversas colônias em todas as diluições, onde os aspectos visuais eram muitos parecidas quando comparados aos meios de batata dextrose e extrato de levedura.

Assim foi preferível utilizar as condições em meios com a menor concentração, onde colônias mais isoladas seriam a melhor escolha para purificação. Não ocorreu crescimento em ágar nutriente em nenhum grau de diluição.

Tabela 1 – Colônias de microrganismos de amostras de cevada isoladas em diferentes meios de cultura

Diluições	Meio de cultura				
	Extrato de levedura	Batata dextrose	Extrato de malte	Sabouraud	Ágar nutriente
10^{-1}	3	3	3	3	0
10^{-2}	3	3	3	3	0
10^{-3}	3	3	1	1	0
10^{-4}	3	2	1	1	0
10^{-5}	3	2	0	2	0
10^{-6}	3	1	0	0	0

Fonte: Autoria própria (2021).

Tabela 2 – Amostras que obtiveram crescimento:

Código	Meio de cultura	Código	Característica da colônia
01.	Batata dextrose 10^{-5}	MG09	Colônias brancas, rugosas com aspectos opacos
02.	Batata dextrose 10^{-5}	MG10	Colônias brancas, rugosas com aspectos opacos
03.	Batata dextrose 10^{-5}	MG11	Colônias brancas, rugosas com aspectos opacos
04.	Batata dextrose 10^{-6}	MG12	Colônias brancas, leitosas tons brancos
05.	Batata dextrose 10^{-6}	MG13	Colônias brancas, leitosas tons brancos e amareladas
06.	Batata dextrose 10^{-6}	MG14	Colônias brancas, leitosas tons brancos e bordas amareladas

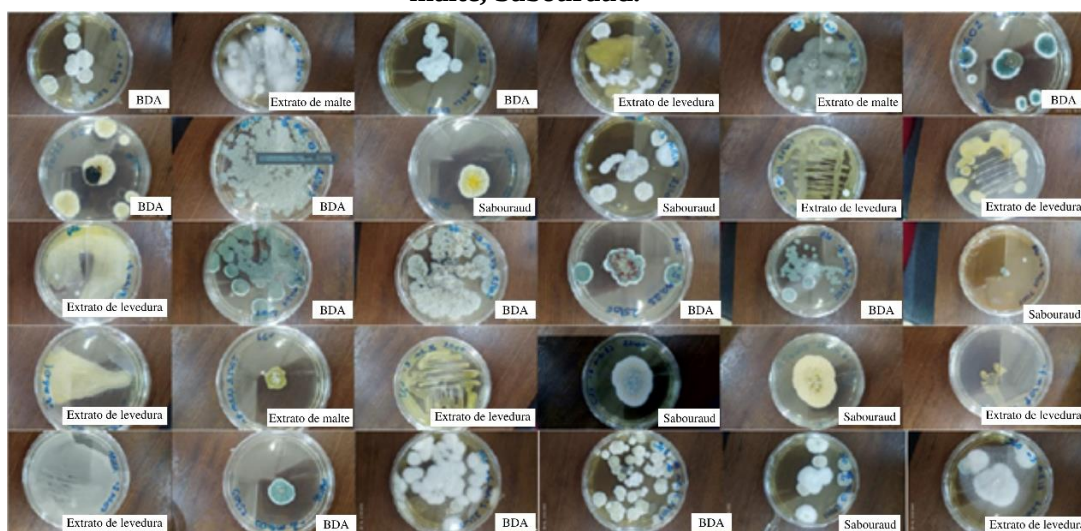


07.	Extrato de levedura 10^{-3}	MG21	Colônias uniformes redondas amareladas
08.	Extrato de levedura 10^{-3}	MG22	Colônias leitosas pequenas de aspecto alaranjado
09.	Extrato de levedura 10^{-3}	MG23	Colônias leitosas amareladas
10.	Extrato de levedura 10^{-4}	MG24	Colônias brancas leitosas e colônias amarelas leitosas
11.	Extrato de levedura 10^{-4}	MG25	Colônia amarelada leitosa
12.	Extrato de levedura 10^{-4}	MG26	Colônia branca opaca por toda extremidade da placa
13.	Extrato de levedura 10^{-5}	MG27	Pequenas colônias avermelhadas leitosas
14.	Extrato de levedura 10^{-5}	MG28	Colônia alaranjada brilhosa
15.	Extrato de levedura 10^{-5}	MG29	Colônia alaranjada brilhosa
16.	Extrato de levedura 10^{-6}	MG30	Colônia branca opaca, com ranhuras na sua superfície
17.	Extrato de levedura 10^{-6}	MG31	Colônia branca opaca, com ranhuras na sua superfície
18.	Extrato de levedura 10^{-6}	MG32	Colônia branca com bordas amareladas e leitoso

Fonte: Autoria própria (2021).

A figura 1 apresenta os diferentes microrganismos isolados nos meios de cultura, com as diferentes diluições.

Figura 1 – Microrganismos isolados em meio de extrato de levedura e batata dextrose, extrato de malte, Sabouraud.



Fonte: Autoria própria (2021).



Logo, como obtemos maior número de crescimento referente nos meios de extrato de levedura e batata dextrose, foi selecionada algumas colônias específicas na tentativa de realizar o isolamento, assim obtivemos algumas colônias purificas, foram selecionadas as colônias presente nas diluições 10^{-5} e 10^{-6} .

Assim para realizar a purificação foi inoculado as colônias escolhidas nos seus meios de origem e gerando assim 18 microrganismos novos como dispostos na Figura 2:

Figura 2 – Microrganismos isolados a partir da diluição 10^{-5} e 10^{-6} em meio batata dextrose e extrato de levedura



Fonte: Autoria própria (2021).

Os próximos passos a serem realizados é a identificação dos microrganismos obtidos através das diluições, pois verificou-se que ao se desenvolverem junto com o fungo, pode haver algum potencial inibitório. Além de verificar a existência e a presença de DON e o seu grau de toxicidade nos grãos de cevada.

4 CONCLUSÃO

A partir das amostras de cevada, obtivemos 50 diferentes microrganismos e posteriormente selecionado 18 para dar continuidade na pesquisa, sendo assim o próximo procedimento é realizar o experimento para presença do DON. A continuidade dessa pesquisa se dará com testes de antagonismos dos isolados frente a *Fusarium graminearum*, que devido a pandemia de SARS COV-2 não foi possível realizar no período vigente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a UTFPR pela infraestrutura e apoio.



REFERÊNCIAS

- BANDO, Érika; GONÇALES, Leandro Nishikawa; TAMURA, Nathalie Kira; JUNIOR, Miguel Machinski. **Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas**. Revista Brasileira de Patologia Médica, v.43, n. 3, p. 175-180, jun. 2007.
- CARNEIRO, Fernando Ferreira. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Organização de Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campos Búrigo. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.
- FREIRE, Francisco das Chagas Oliveira; VIEIRA, Icaro Gusmão Pinto; GUEDES, Maria Isabel Florindo; MENDES, Francisca Noélia Pereira. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza. Documentos 110, 1.ed. 2007.
- PESTKA, J. J.; SMOLINSKI, A. T. **Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans**. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, v. 8, n. 1, p. 39–69, 14 2005.
- PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. Archives of Toxicology, v. 84, n. 9, p. 663–679, 2010.