



## AÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS NA CAATINGA NO CONTROLE DE

### *Aspergillus niger*

Micaéla Souza **Diogo**<sup>1</sup>; Abilene Pego **Goulart**<sup>2</sup>; Juliane **Fontana**<sup>3</sup>; Marcia Maria Parma **Leme**<sup>3</sup>;  
Itamar Soares de **Melo**<sup>4</sup>

Nº 20405

**RESUMO** - *Aspergillus niger* é um fungo de grande importância devido a sua patogenicidade, produção de micotoxinas, exploração biotecnológica e por ser um organismo eucarioto. Ele é considerado um patógeno oportunista que se propaga de forma eficaz em diferentes ambientes, causando danos a diversas culturas agrícolas. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de actinobactérias provenientes de solos secos do bioma Caatinga em inibir o crescimento de *A. niger*. O experimento foi realizado na Embrapa Meio Ambiente, em duas etapas. A primeira etapa consistiu no isolamento e purificação de 117 actinobactérias selecionadas de amostras de solo seco e rizosférico do bioma Caatinga. Na segunda etapa foi realizado o teste de inibição do desenvolvimento de *A. niger* por essas actinobactérias. A partir do isolamento e seleção das actinobactérias, foi possível a realização dos testes inibitórios e assim obter o resultado de seis actinobactérias com ação antagonista ao *A. niger*. Tais resultados demonstram a importância do controle biológico para a área agrônoma que contribui para reduzir o uso de pesticidas químicos empregados no manejo integrado de pragas.

**Palavras-chaves:** Aflatoxinas, controle biológico, capacidade inibitória.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, PUC, Campinas-SP; micaeladiogo25@gmail.com

2 Colaborador, Bolsista Embrapa Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, ESAMC, Campinas-SP

3 Colaborador, Analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP

4 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; itamar.melo@embrapa.br



**ABSTRACT:** *Aspergillus niger* is a fungus of great importance due to its pathogenicity, mycotoxin production, biotechnological exploitation and for being a eukaryotic organism. It is considered an opportunistic pathogen that can effectively spread throughout different environments, causing damage to a variety of agricultural crops. Therefore, the objective of this study was to evaluate the capacity of actinobacteria collected from dry soil in the Caatinga biome to inhibit the growth of *A. niger*. The research took place at Embrapa Meio Ambiente, in two stages. The first stage consisted of the isolation and purification of 117 actinobacteria selected from dry and rhizospheric soil from Caatinga. Secondly, the capacity of inhibition of *A. niger* by these actinobacteria was tested. Through the isolation and selection of actinobacteria, it was possible to carry out the tests and thus obtain the result of six actinobacteria with antagonistic action to *A. niger*. Such results demonstrate the importance of biological control for the agronomic field since this can contribute to reduce the use of chemical pesticides applied to integrated pest management.

**Keywords:** Aflatoxin, biological control, inhibition capacity.

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo do gênero *Aspergillus* tem grande impacto tanto a nível econômico quanto social e se encontra distribuído pelo mundo. Sua extrema relevância está relacionada com a patogenicidade, as micotoxinas produzidas, a exploração biotecnológica e por ser um organismo eucarioto (AFONSO, 2015). As micotoxinas são um grupo de metabolitos secundários que são formadas durante o crescimento do fungo filamentosos. Tais compostos podem estar presentes no fungo ou são excretados no meio, ou seja, nos alimentos, levando à sua contaminação. Um exemplo de micotoxinas são as aflatoxinas produzidas pelo gênero *Aspergillus* que causam aberrações cromossômicas, síntese de DNA não programada, troca de cromátides irmãs, quebras no cromossomo e ligações com o DNA de células humanas (ZUCCHI; MELO, 2009). Do ponto de vista agrônomo, tal gênero é caracterizado como patógeno oportunista (SORATO *et al.*, 2016; VARGA *et al.*, 2004). Embora não consideradas uma das principais causas de doenças em plantas, algumas espécies do gênero são responsáveis por vários distúrbios que podem ser de natureza sensorial, nutricional e qualitativa, como: pigmentação, descoloração, podridão, desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis (PERRONE *et al.*, 2007). Dentre essas espécies, se destaca o *A. niger*, fungo de ampla distribuição devido a capacidade de se propagar de forma eficaz em diferentes ambientes, propiciando uma grande versatilidade metabólica e flexibilidade nutricional.



Diversos métodos para o controle fúngico vêm sendo testados com o intuito de encontrar algum produto natural que seja capaz de proporcionar à planta resistência ao ataque de fungos fitopatogênicos (SORATO *et al.*, 2016). Dentre os métodos empregados, o controle biológico por microrganismos capazes de controlar patógenos de planta é um dos mais frequentes. Tal alternativa tem demonstrado eficiência no manejo de diversas doenças, colaborando para a redução dos danos que afetam os processos vitais do vegetal e indiretamente auxiliam no crescimento do hospedeiro. Contribuindo, também, para reduzir o uso de pesticidas químicos empregados no manejo integrado de pragas, favorecendo a melhoria da qualidade dos produtos agrícolas, redução da poluição ambiental, preservação dos recursos naturais e, portanto, para a sustentabilidade dos agroecossistemas.

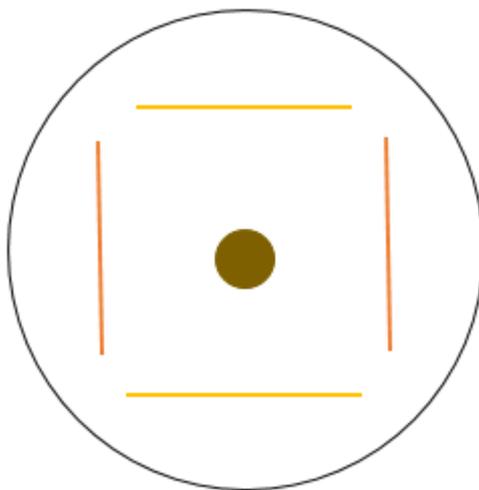
Um potencial agente de controle biológico de fitopatógenos são as actinobactérias. Ao se associarem à planta hospedeira, produzem antibióticos, sideróforos e enzimas com ação antimicrobiana. Ademais, favorecem o crescimento da planta por meio da produção de fitormônios e em vista disso são conhecidas como PGPR (rizobactérias promotoras de crescimento de plantas). O método de controle de fungos fitopatogênicos por actinobactérias ocorre por meio de diversos mecanismos, tais como hiperparasitismo, antibiose, enzimas degradantes da parede celular e indução à resistência (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2005; MIYAUCHI, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi selecionar actinobactérias isoladas de amostras de solo seco e rizosférico de plantas do bioma Caatinga com capacidade de inibição ao desenvolvimento fúngico de *A. niger*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento e seleção das actinobactérias foram utilizados 10 g de solo seco e rizosférico do bioma Caatinga, homogeneizados em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85 %). Em seguida, foi feita uma diluição de 1:100 e duas diluições sucessivas. Após as diluições, foram retiradas alíquotas de 100µL da porção suspensa de solo e estas foram cultivadas nos meios GY (extrato de levedura 10 g, dextrose 10 g, ágar 16 g/L de água destilada) e NYDA (dextrose 10 g, extrato de carne 3 g, peptona 5 g, extrato de levedura 5 g, fosfato de potássio monobásico 0,3 g, fosfato de potássio dibásico 1,2 g, ágar 16 g/L de água destilada). Após o crescimento em placa, foram selecionadas as colônias com características morfológicas de actinobactéria, que posteriormente foram transferidas para uma nova placa contendo um dos meios de cultura para purificação. O isolado de *Aspergillus niger* utilizado nos testes de inibição está depositado na

Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA), localizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental na Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna/SP.

O teste de inibição foi realizado em placas de Petri de 150x15mm, contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), no qual foram, previamente, crescidas duas actinobactérias, com características morfológicas diferentes, coletadas da superfície das placas purificadas e depositadas nas extremidades da placa. No centro da mesma placa foi depositado um disco, de 8 mm, com estruturas propagativas do fungo *A. niger* com o auxílio de uma alça esterilizada (Figura 1). Para o tratamento controle, um disco de 8 mm, contendo estruturas propagativas do fungo foi depositado ao centro da placa de Petri, sem a presença de actinobactéria. Cada teste foi realizado em triplicata e para obtenção destes dados, foi realizado a medição do raio da placa (100%), determinando a placa em 4 quadrantes. Em seguida, foi medido até que ponto do quadrante houve contaminação pelo *A. niger*. E por fim, foi realizada uma estimativa de porcentagem contaminada de acordo com o parâmetro do raio total (100%), resultando em diferentes valores de porcentagem relacionados a diferentes graus de contaminação.



**Figura 1:** Modelo do desenho experimental utilizado no teste de inibição. Traço cor amarelo (actinobactéria 1); traço cor laranja (actinobactéria 2); disco (*Aspergillus niger*).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mediante o procedimento realizado, foram isoladas do solo seco e rizosférico 117 actinobactérias. Do total de actinobactérias selecionadas, 51 permaneceram viáveis, as quais, foram utilizadas na realização do teste de inibição do desenvolvimento fúngico do *A. niger* e posteriormente preservadas em glicerol 20%. A partir dos testes *in vitro*, foi possível a observação



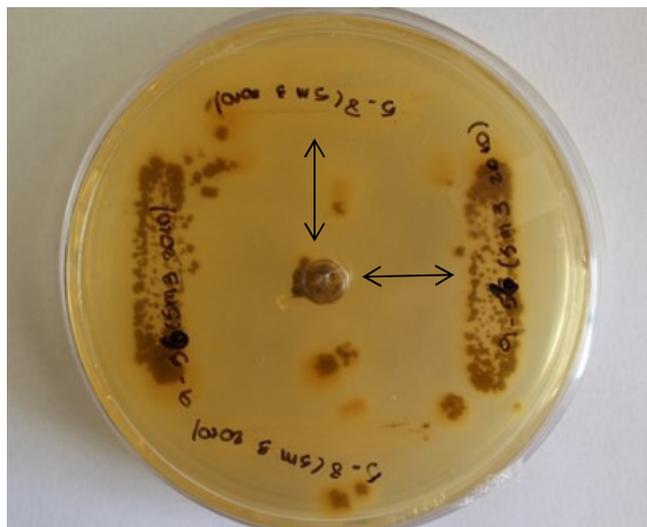
da inibição total ou parcial do crescimento fúngico de *Aspergillus niger* pela ação antagônica (Figura. 2, 3, 4, 5, e 6). Os dados referentes a capacidade inibitória dos seis isolados de actinobactérias ao crescimento micelial do patógeno foram compilados em uma tabela (Tabela 1).

Com a execução do presente trabalho, foi possível observar nos controles dos testes de inibição a capacidade do fungo *A. niger* de se propagar de forma eficaz na placa de petri em pouco tempo (Figura 7).

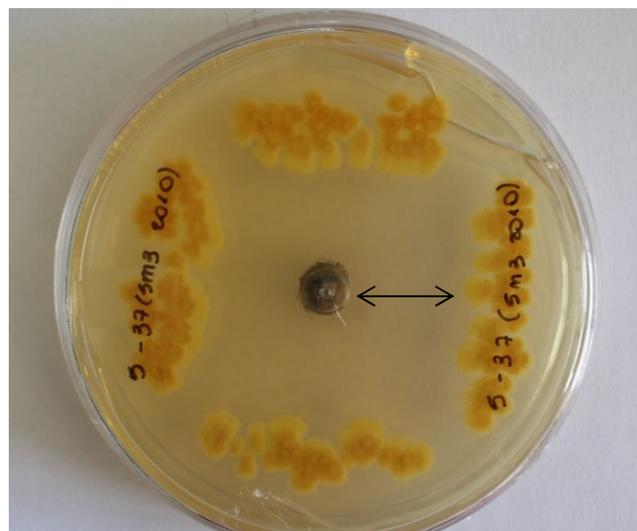
Com base na busca bibliográfica realizada durante o trabalho, observou-se que o controle de *A. niger* é de grande importância para diminuição da produção de micotoxinas, como a aflotoxina, durante a produção e colheita de grãos, como o amendoim. Algumas linhagens de actinobactéria têm sido descritas como protetoras contra doenças de plantas, atuando principalmente no controle direto de fitopatógenos, fonte de compostos ativos e promotor de crescimento vegetal (DOUMBOU; SALOVE; BEAULIEU, 2001; ABDALLAH *et al.*, 2013), evitando a prevalência de distúrbios e doenças causados por fungos e podendo ser uma diferente alternativa ao uso de pesticidas. O biocontrole de importantes patógenos fúngicos do arroz por *Streptomyces corchorusii* promoveu o aumento do crescimento e de produção de grãos de arroz em condições de vaso (TAMREIHAO *et al.*, 2016). Outro importante trabalho foi o biocontrole efetivo de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucaria angustifolia* (MIYAUCHI, 2012).

**Tabela 1:** Capacidade inibitória (%) das actinobactérias no controle de *Aspergillus niger*.

<b>Código das actinobactérias</b>	<b>Capacidade inibitória</b>
5-8	100%
9-56	100%
5-37	100%
1-4	25%
4-5	30%
2-15	40%



**Figura 2:** Inibição total (seta) de *A. niger* por actinobactéria 5-8 e 9-56.



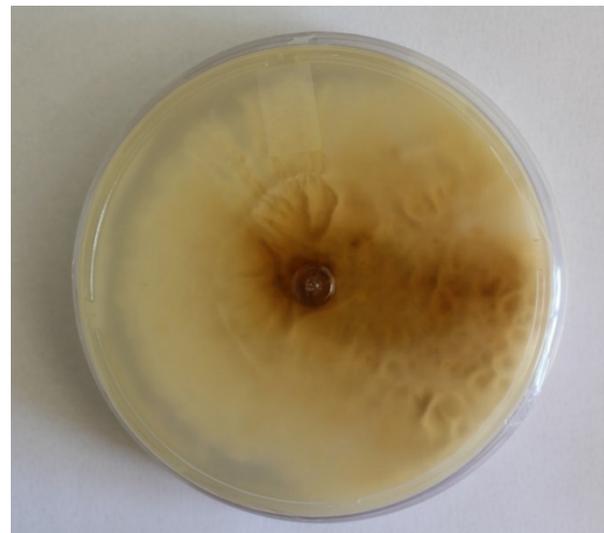
**Figura 3:** Inibição total (seta) de *A. niger* por actinobactéria 5-37.



**Figura 4:** Inibição parcial (seta) de *A. niger* por actinobactéria 1-4.



**Figura 5:** Inibição parcial (seta) de *A. niger* por actinobactéria 2-15.





**Figura 7.** Crescimento de *A. niger* no tratamento controle.

#### 4 CONCLUSÃO

No presente estudo verificou-se que seis isolados de actinobactérias, providas de solo seco e rizosférico com baixa umidade, mostraram-se eficientes na inibição do crescimento micelial de *Aspergillus niger*.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida, ao orientador Itamar Soares de Melo pela oportunidade de realizar a iniciação científica e a Embrapa Meio Ambiente por ceder espaço no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) para a realização do experimento.

#### 6 REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M.E. *et al.* Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases. **Archives of Phytopathology and Plant Protection, Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.46, n. 15, p. 1797-1808, 2013.

AFONSO, S. de O. M. ***Aspergillus niger: sua utilização na indústria farmacêutica***. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10400.26/10960>>. Acesso em: 20 maio 2020.

DOUMBOU, C. L.; SALOVE, M. K. H.; BEAULIEU, C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection**, v. 28, p. 1-7, 2001.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1505–1520, 2005.

MIYAUCHI, M. Y. H. **Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucaria angustifolia***. 2012. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-23032012-104848/en.php>>. Acesso em: 18 maio 2020.

OLIVEIRA, A. P. G. *et al.* Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, v. 10, n. 18, p. 3938-3952, jul. 2014. Disponível em: <<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/MULTIDISCIPLINAR/importancia.pdf>>. Acesso em: 26 maio 2020.

PERRONE, G. *et al.* Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies In Mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.



SORATO, A. M. C. *et al.* Controle Alternativo de *Aspergillus niger* em sementes de zarcillito com licor pirolenhoso de Timburi in vitro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 11, p. 2, 2016.

VARGA, J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology** 110, 627-640, 2004.

TAMREIHAO, K. *et al.*; Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. **Microbiological Research**, v. 192. p. 260-270. Nov. 2016.

ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. de. Controle biológico de fungos aflatoxigênicos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 69-84.