



TÓPICOS ESPECIAIS EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA

Organizadores

Eskálath Morganna Silva Ferreira
Fabrícia Vieira Silva Bomtempo
Albert Lennon Lima Martins



**EDITORIA
UNITINS**

T674

Tópicos especiais em microbiologia agrícola (livro eletrônico)/ Organizado

por: Eskálath Morgana Silva Ferreira, Fabrícia Vieira Silva Bomtempo, Albert
Lennon Lima Martins. Palmas TO: Unitins, 2023.

89p.; color.

2,87 Mb.

Disponível em: [https://revista.unitins.br/index.php/editoraunitins/issue/
archive](https://revista.unitins.br/index.php/editoraunitins/issue/archive)

ISBN 978-65-86285-71-0

1 Microbiologia. 2 Agricultura. 3 Controle biológico. I. Ferreira, Eskálath
Morgana Silva.

CDD 579

Reitor

Augusto de Rezende Campos

Vice-Reitora

Darlene Teixeira Castro

Pró-Reitora de Graduação

Alessandra Ruita Santos Czapski

Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação

Ana Flávia Gouveia de Faria

Pró-Reitora de Extensão, Cultura e Assuntos Comunitários

Kyldes Batista Vicente

Pró-Reitor de Administração e Finanças

Ricardo de Oliveira Carvalho

Equipe Editorial

Editora Chefe

Liliane Scarpin Storniolo, Unitins, Brasil

Capa, Projeto Gráfico e Diagramação

Leandro Dias de Oliveira, Unitins, Brasil

Apoio Técnico

Andréia Luiza Dias, Unitins, Brasil

Joelma Feitosa Modesto, Unitins, Brasil

Julienne da Silva Silveira, Unitins, Brasil

Leitura de Prova

Mariana da Silva Neta, Unitins, Brasil

Rodrigo Vieira do Nascimento, Unitins, Brasil

Conselho Editorial

Alessandra Ruita Santos Czapski

<http://lattes.cnpq.br/1441323064488073>

Eliene Rodrigues Sousa

<http://lattes.cnpq.br/5857623231904159>

Kyldes Batista Vicente

<http://lattes.cnpq.br/1249709305972671>

Mariany Almeida Montino

<http://lattes.cnpq.br/3117524559575296>

Rodrigo Vieira do Nascimento

<http://lattes.cnpq.br/8227728628110178>

Darlene Teixeira Castro

<http://lattes.cnpq.br/8766578585291045>

Jeferson Moraes da Costa

<http://lattes.cnpq.br/8929854109676237>

Lilian Natália Ferreira de Lima

<http://lattes.cnpq.br/6290282911607995>

Michele Ribeiro Ramos

<http://lattes.cnpq.br/1032124853688980>

Vinícius Pinheiro Marques

<http://lattes.cnpq.br/7300803447800440>

Contato

Editora Unitins

(63) 3218-4911

108 Sul, Alameda 11, Lote 03

CEP.: 77.020-122 - Palmas - Tocantins

Os autores são responsáveis por todo o conteúdo publicado, estando sob a responsabilidade da legislação de Direitos Autorais 9.610/1998 e Código Penal 2.848/1940.

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada desde que citada a fonte.

PREFÁCIO

A Microbiologia Agrícola vem apresentando uma importância cada vez maior, os microrganismos relacionados às culturas são dinâmicos e interferem diretamente na produtividade dos sistemas. Muito destaque vem sendo dado aos organismos microscópicos que vivem em associação com animais e plantas e essa relação pode ser benéfica ou maléfica. Estudos relacionados sobre esse efeito são relevantes e necessários.

Dentre os organismos fitopatogênicos, ou seja, que exercem uma relação de parasitismo com as plantas, os fungos se destacam e constituem como o maior e mais diverso grupo de fitopatógenos. Diferentes espécies de fungos são capazes de causar doença no tecido vegetal, produzir micotoxinas e acarretar grandes prejuízos no setor agrícola. Entre todas as causas que podem ser atribuídas à diminuição da produtividade das culturas, a perda de rendimento, devido às infecções por fitopatógenos, resulta em perdas, direta ou indiretamente, estimadas em 40 milhões a cada ano, o que corresponde a 20-40% das perdas totais no rendimento das culturas. No entanto, a segurança alimentar não implica apenas em utilizar alimentos de qualidade e que não sejam prejudiciais aos consumidores, mas, numa visão mais global e atual, implica também em desenvolver e aplicar ferramentas de produção sustentáveis com baixo impacto ao ambiente.

Dessa forma, a utilização de microrganismos, como os fungos, no controle biológico visa minimizar os impactos causados pelo modelo predominante da agricultura convencional, o qual controla, de forma predominante, os problemas fitossanitários pela aplicação continuada e em larga escala de agrotóxicos. Dentre os problemas inerentes ao uso de agrotóxicos, podemos citar a contaminação de alimentos, solo, água e animais, intoxicação de agricultores, resistência de patógenos a certos princípios ativos dos agrotóxicos, desequilíbrio biológico com alterações da ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica, eliminação de organismos benéficos e redução da biodiversidade.

A introdução de um agente para o controle biológico exige o seu estabelecimento, seguido de interações com o organismo-alvo e outros organismos. Essas interações complexas são fundamentais para o sucesso do controle, devem ser analisadas de modo holístico e consideradas em longo prazo. Sendo assim, as pesquisas que visam ampliar o conhecimento das relações inerentes aos mecanismos de interação entre planta-microrganismos podem auxiliar no desenvolvimento e ampliação do uso de técnicas alternativas que auxiliam no controle biológico. Essas pesquisas podem ser úteis ao combate de doenças causadas por fitopatógenos, no controle de micotoxinas e no aumento da performance dos cultivos.

Além disso, algumas espécies fúngicas, como *trichoderma asperellum*, têm sido utilizadas como fungo promotor de crescimento de plantas, capaz de induzir a tolerância das plantas à estresses bióticos e abióticos. Vários estudos também são conduzidos na investigação do potencial enzimático que os fungos podem apresentar, uma vez que são capazes de degradar a biomassa vegetal, secretando enzimas, como as celulasas que degradam a parede celular e podem ser amplamente utilizadas na indústria.

Diante do exposto, o livro tem como objetivo apresentar alguns resultados sobre os mecanismos das interações planta-microrganismos do solo; a inoculação de *Trichoderma asperellum* na cultura do arroz e milho e as alterações morfofisiológicas causadas; a utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico; tipos de controle alternativos para redução da produção de aflatoxinas; o potencial celulolítico de fungos filamentosos provenientes de ninhos de formigas; e, por fim, a utilização de métodos rápidos de detecção (MINIVIDAS®) para avaliar a eficiência do processo de lavagem e a eliminação da *Salmonella* spp. no pescado.

APRESENTAÇÃO

A obra é resultado do esforço conjunto de docentes, discentes e colaboradores ligados à pesquisa agrícola na região norte do Brasil, mais, especificamente, no estado do Tocantins. Trata-se da compilação de trabalhos de amplo interesse regional e nacional, que têm como intuito contribuir com a ampliação dos horizontes da pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica relacionados à microbiologia agrícola.

O conteúdo científico compreendido situa-se como importante labor, já que se harmoniza muito com o atual cenário local. A região Norte é, atualmente, uma das principais frentes de expansão da agricultura no país, mostrando intensa pressão pela amplificação das atividades agrárias e com projeções de ser, em um futuro bem próximo, o mais expressivo centro de crescimento do agronegócio brasileiro. As práticas agrícolas locais predominantes ainda são de caráter extensivo e de baixa tecnologia, o que justifica esforços científicos realizados em favor do assunto. O apelo mundial, em relação ao objeto de estudo desta obra, não é diferente do regional, já que os olhares do planeta também estão voltados à agricultura, o que reforça a importância da divulgação dos estudos agrupados neste exemplar.

Além de recortes que abordam os desafios e perspectivas locais ligados ao tema, a obra traz entrepostos de interesse global, propondo alternativas de uso do potencial microbiológico e contribuindo com a promoção de uma atmosfera de oportunidades. O livro é dividido em sete capítulos que abordam temas importantes, como: acesso à biodiversidade microbiana de interesse na agricultura; potencial microbiano na promoção do crescimento de culturas, controle biológico e desenvolvimento agrícola sustentável; potencial de produção enzimática, usando microrganismos e biomassa; estudo e controle de toxinas microbiológicas em culturas, produção de probióticos, propriedades funcionais de resíduos vegetais; potencial antimicrobiano de compostos e vários outros subtemas incorporados, que almejam contribuir para a divulgação da científica, propiciam suporte pesquisa, ao ensino e ao desenvolvimento microbiológico agrícola rentável e mais sustentável. Boa leitura!

Os autores

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INOCULAÇÃO DE <i>TRICHODERMA ASPERELLUM</i> (UFT-201) NA CULTURA DO ARROZ (<i>ORYZA SATIVA</i>) E MILHO (<i>ZEAMAYS</i>): ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS.....	07
---	----

CAPÍTULO II

MECANISMOS DAS INTERAÇÕES PLANTA-MICRORGANISMOS DO SOLO E CONTROLE GENÉTICO DO HOSPEDEIRO.....	18
--	----

CAPÍTULO III

FUNGO <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO.....	37
--	----

CAPÍTULO IV

TIPOS DE CONTROLE ALTERNATIVOS PARA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS.....	47
---	----

CAPÍTULO V

A UTILIZAÇÃO DO MINIVIDAS® PARA AVALIAR A EFICIÊNCIA DO PROCESSO DE LAVAGEM EM CILINDRO ROTATÓRIO PARA A ELIMINAÇÃO DE <i>SALMONELLA SPP.</i> EM PESCADO.....	59
---	----

CAPÍTULO VI

ISOLAMENTO DE LEVEDURAS AUTÓCTONES DA REGIÃO AMAZÔNICA PARA APLICAÇÃO COMO PROBIÓTICO - UMA REVISÃO.....	67
--	----

CAPÍTULO VII

POTENCIAL CELULOLÍTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PROVENIENTES DE NINHOS DE FORMIGAS CORTADEIRAS (<i>ACROMYRMEX BALZANI EMERY, 1890</i>).....	74
---	----

INOCULAÇÃO DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* (UFT-201) NA CULTURA DO ARROZ (*ORYZA SATIVA*) E MILHO (*Zea mays*): ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS

Albert Lennon Lima Martins¹

Lisandra Lima Luz²

Evelynne Urzêdo Leão³

Adriano Sérgio Bernardo Queiroz⁴

Lilian Freitas Borges Chagas⁵

Aloísio Freitas Chagas Junior⁶

Introdução

A produção agrícola brasileira é considerada uma das maiores do mundo, devido ao seu tamanho territorial e o seu potencial em produzir grãos. A produção de milho é destinada ao grão, que é utilizado para alimentação humana e animal, e, também, para a produção de silagem, que consiste em um processo fermentativo, utilizado na alimentação animal no período de seca. Dessa forma, a produção de milho deve ser levada em conta o grão e matéria seca, assim, estimulando a geração e adoção de técnicas de produção que a viabilizem (PINTO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2017).

Diante do cenário atual, cujo Brasil tem como sua principal economia a agricultura, procura-se alternativas para aumentar a produção agrícola das principais culturas: soja e milho, além da produção de alimentos saudáveis. O uso de técnicas de produção viáveis, como a produção de inoculantes à base de microrganismos benéficos, que ajudam na promoção de crescimento vegetal, é de grande importância à agricultura, sendo medidas inovadoras para se alcançar uma agricultura sustentável e aumentar a produção agrícola (MACHADO *et al.*, 2012). Recentemente, os profissionais da área e os setores comerciais têm demonstrado grande interesse no desenvolvimento de estratégias ecológicas e econômicas para o manejo de doenças em plantas (PANTH, 2020).

Trichoderma spp. é um dos fungos mais pesquisados no Brasil, pois tem ocorrência natural em praticamente todos os tipos de solos e possui uma versatilidade de ação própria, como parasitismo, antibiose e competição, além da produção de fitômonos, a exemplo do AIA, e sua capacidade de solubilização de fosfatos (OLIVEIRA; CHAGAS, 2012; RIBAS; RECH, 2016), podendo atuar como promotor de crescimento vegetal e indutor de resistência de plantas às doenças. O fungo já vem sendo utilizado em estudos para promoção de crescimento em plantas de soja, feijão caupi, milho e arroz (CHAGAS *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2018).

Os Bioprodutos a base de *Trichoderma* spp. são comercializados em vários países ao redor do mundo (BETTIOL *et al.*, 2012). No Brasil, sua aplicação pelos agricultores ainda é limitada, devido à pouca disponibilidade de

1 Departamento de Agronegócios, Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: albert.ll@unitins.br

2 Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: lisandra.lima.luz@gmail.com

3 Curso de Engenharia Agrônoma, Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: evelynne.ul@unitins.br

4 Departamento de Agronegócios, Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: adrianosbq@gmail.com

5 Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: lillianfbc@mail.uft.edu.br

6 Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: chagasjraf@mail.uft.edu.br

bioformulações devidamente registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), combinada com a falta de identificação de novos isolados com potencial de biocontrole e falta de informação sobre os benefícios do uso desses agentes (MACHADO *et al.*, 2012).

Assim, a prospecção de novos isolados é a etapa primária no processo de desenvolvimento de produtos biológicos e, posteriormente, a formulação de produtos. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inoculação de doses de *Trichoderma asperellum* (UFT-201) na cultura do milho e arroz e determinar as principais alterações sobre a morfofisiologia das culturas.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na estação experimental da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Universitário de Gurupi, localizada na região sul do estado Tocantins (11°43'45" S, 49°04'07" W, 278m de altitude). A classificação climática, segundo Köppen (1948), é do tipo B1wA'a' úmido, com moderada deficiência hídrica, tendo a temperatura média anual de 29,5°C, com precipitação média anual de 1.688 mm, caracterizada por um inverno seco e um verão chuvoso (ALVARES *et al.*, 2013).

O experimento foi conduzido com as culturas do milho e arroz. Os tratamentos consistiram em cinco doses do inoculante (0, 3, 6, 9, 12 g kg⁻¹ de semente), misturados no momento da semeadura. Foram semeadas cinco sementes de milho e 10 de arroz por vaso, onde foi realizado o desbaste aos 15 dias, após a semeadura (DAS), deixando duas plantas de milho e cinco de arroz em cada.

A cepa utilizada foi obtida no acervo da micoteca do Laboratório de Agromicrobiologia Aplicada e Biotecnologia, da Universidade Federal do Tocantins (UFT/PPGPV). O fungo foi repicado em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar – Himedia, Índia), em placas de petri e incubados a temperatura de 25 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias, período determinado para o crescimento das colônias de *Trichoderma asperellum* UFT-201.

O inoculante utilizado foi preparado em fermentação sólida, utilizando arroz como substrato, conforme metodologia descrita por Chagas *et al.* (2017). Sacos de polipropileno, contendo 300g do arroz e 300mL de água destilada, foram autoclavados a 121°C, por 1 hora. Após o resfriamento, o arroz foi inoculado com seis discos de 5 mm de diâmetro de cada isolado, separadamente, contendo micélios e esporos de *Trichoderma* sp. e meio BDA e incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*), com temperatura de 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. A cada dois dias, o substrato contendo arroz foi revolvido, para facilitar a troca gasosa, quebra dos agregados miceliais e aumento da esporulação.

A concentração de *Trichoderma* foi determinada pelo método de diluição em série, por meio da quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), onde foi determinado utilizando-se 1g de arroz, em 10 mL de água esterilizada, seguida de agitação por 1 min no vortex. Em seguida, foram feitas as diluições, utilizando 900ul de solução salina e 100ul da mistura anterior, em seguida, plaqueamento das diluições 10⁴ e 10⁶ em placa de petri contendo meio BDA.

O milho híbrido AG8088PRO2 e o arroz IRGA431 foram cultivados em vasos plásticos, contendo 4 e 10 dm³ de Latossolo Vermelho Amarelo, coletado da camada de 0-20 cm, que apresentava as seguintes características química e textural (TEIXEIRA *et al.*, 2017), conforme tabela, a seguir:

Tabela 1. Análise química e textura do solo utilizado no experimento.

Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB ²	CTC(T) ¹	V ⁴	m ⁵	MO ⁶	pH
		cmol _c dm ⁻³					(%)		CaCl ₂
1,2	0,6	0,0	2,2	1,87	4,07	46	0	1,6	5,6
P	K					Silte	Argila	Areia	
		mg dm ⁻³					g kg ⁻¹		
1,9	29,0					50	475	475	

¹CTC total; ²Soma de bases; ³CTC efetiva; ⁴Saturação por base; ⁵Saturação por alumínio; ⁶Materia orgânica

Fonte: Elaborada pelos autores.

As avaliações agrônômicas e fisiológicas foram realizadas aos 30 e 45 dias, após a semeadura (DAS). Para as características morfológicas, determinou-se a altura das plantas (ALT), com auxílio de régua graduada em centímetro, e foram tomadas medidas do solo ao ápice das folhas. A massa natural da parte aérea e da raiz (MN) foi mensurada em balança antes das folhas perderem turgescência. Foi feito o volume de raiz (VR, mL), com o auxílio de uma proveta.

Em seguida, os componentes morfológicos foram separados: folha, caule e raiz e as amostras foram transferidas para estufa, com circulação forçada a ar à 55°C por 72 horas ou até obterem peso constante. Posteriormente, foram pesadas em balança semi-analítica (0,001g), obtendo: massa seca da raiz (MSR, g), massa seca das folhas (MSF, g) e massa seca do caule (MSC, g). Com somatório de ambas as partes morfológicas, obteve-se a massa seca total (MST, g) das plântulas.

Já para as avaliações fisiológicas, foram quantificados os pigmentos fotossintéticos, por meio de leituras na parte central do limbo foliar, em folhas completamente expandidas, com o auxílio de um clorofilômetro ClorofiLOG® modelo CFL 1030. O equipamento fornece resultados em unidades adimensionais, valores ICF (Índice de Clorofila Falker) da clorofila a (Clo.a), b (Clo.b) e total (Clo.Total) (FALKER, 2008).

As trocas gasosas foram analisadas com equipamento de sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO₂ e vapor d'água por radiação infravermelha (*Infra Red Gas Analyser* – IRGA, modelo LCiSD, da ADC System, UK), no período das 9 às 11 a.m., sempre em dia ensolarado, em folhas totalmente expandidas. Os parâmetros fisiológicos analisados foram: taxa de assimilação CO₂ (A - μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), transpiração (E - mmol H₂O m⁻² s⁻¹), condutância estomática (gs - mol de H₂O m⁻² s⁻¹) e concentração de CO₂ intercelular (Ci - μmol CO₂ mol⁻¹ ar), sob irradiância média de 1100 μmol de fótons m⁻² s⁻¹ e concentração externa de CO₂ de 400 μmol mol⁻¹. Além disso, a eficiência do uso da água (EUA - μmol CO₂ mmol⁻¹ H₂O) foi determinada pela razão A/E, conforme descrito por Zhang *et al.* (2001).

Quatro variáveis dos experimentos (ALT, VR, MSF, MST) foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e os modelos de regressões polinomiais foram ajustados conforme o nível de significância (p ≤ 0,05). Em seguida, todo o conjunto de dados foram submetidos à análise multivariada, utilizando a técnica de componentes principais (Principal Component Analysis - PCA) (HAIR *et al.*, 2009). Os autovetores foram utilizados para avaliar a importância de cada variável e tratamentos nos dois primeiros componentes, bem como para a relação entre as variáveis, sendo que esses valores funcionaram como coeficientes de correlação (GOMES *et al.*, 2004).

Todas as análises e gráficos foram realizados no *software* R, versão 4.0 (TEAM, 2020), utilizando os pacotes

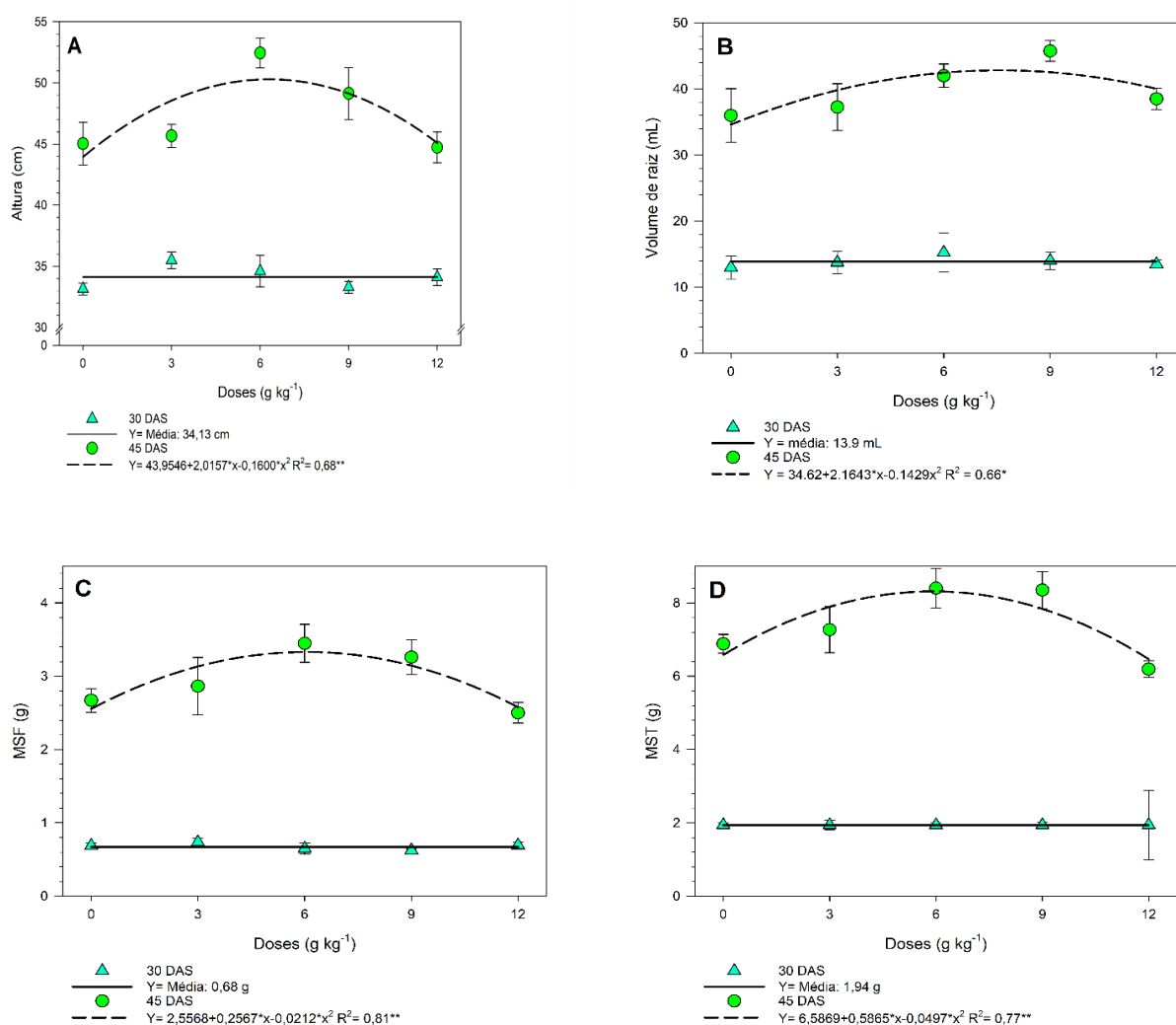
MASS (RIPLEY *et al.*, 2020), *ExpDes.pt* (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2018), *FactoMineR* (HUSSON *et al.*, 2020) e *ggplot2* (WICKHAM *et al.*, 2020).

Resultados e Discussão

A inoculação de *Trichoderma asperellum*, via sementes, influenciou positivamente todos os atributos morfofisiológicos da cultura do milho e arroz apenas aos 45 dias após a semeadura.

Para a cultura do milho, houve interação para altura ($p = 0,01$), cujas doses foram significativas somente aos 45 DAS ($p = 0,0002$), com ajuste quadrático ($R^2 = 0,68$, $p = 0,0001$) e máxima eficiência técnica (MET) em $6,30 \text{ g kg}^{-1}$ de sementes, obtendo $50,30 \text{ cm}$ de altura, o que representa um acréscimo de $11,69\%$, em relação ao controle ($45,04 \text{ cm}$) (conforme Figura 1-A).

Figura 1. Altura (A), volume de raiz (B), massa seca da folha (C) e massa seca total (D) de plantas de milho (*Zea mays*) sob doses de *Trichoderma asperellum* (UFT-201) com 30 e 45 dias após de semeadura.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Para o volume de raiz (VR), a cultura apresentou um crescimento de 192,3%, de 30 DAS (13,9 mL, média geral) para 45 DAS (38 mL no controle) ($p = 0,00001$), ou seja, dobrou o volume de exploração radicular entre as épocas de avaliação (conforme Figura 1-B). A máxima promoção do crescimento do sistema radicular pelo inoculante ocorreu na dose de $7,54 \text{ g kg}^{-1}$ de sementes, com 42,8 mL de VR, 12,7% superior ao controle.

Para a massa seca das folhas (MSF), houve interação ($p = 0,04$) e ajuste quadrático ($R^2 = 0,81$, $p = 0,0004$), significativo somente aos 45 DAS ($p = 0,004$), cuja MET foi a dose de $6,05 \text{ g kg}^{-1}$ e um incremento de 24,75% (3,33g), em relação ao controle, 2,67g (conforme Figura 2-C).

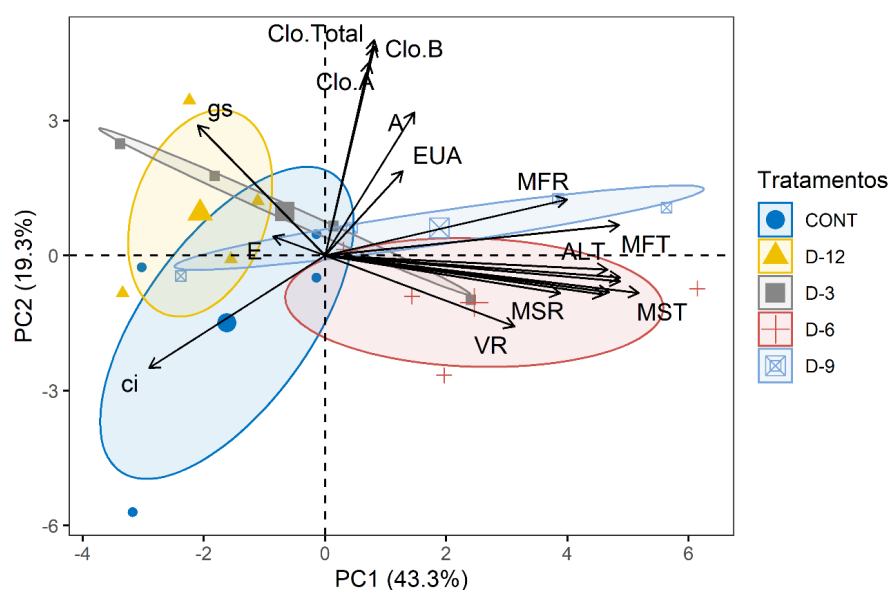
A MST teve interação ($p = 0,01$), também, obteve um ajuste quadrático ($R^2 = 0,77$, $p = 0,00005$), com significância aos 45 DAS ($p = 0,00005$), cuja MET foi $5,9 \text{ g kg}^{-1}$, com 8,32 g (20,78%) comparado ao controle que obteve massa de 6,89 g (Figura 1-D).

Resultados positivos também foram encontrados por Chagas *et al.* (2017), que comprovaram a eficiência do isolado *Trichoderma asperellum* UFT-201, ao incrementar biomassa em gramíneas (arroz e milho) e leguminosas (soja e feijão-caupi). Gonçalves *et al.* (2017), testando doses de inoculante à base de *Trichoderma asperellum* UFT-201, concluíram a eficiência da sua inoculação em aumento da produtividade de soja, por meio do aumento da biomassa da planta.

Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos, como Chagas *et al.* (2019), que testou o isolado de *Trichoderma asperellum* UFT201 em ensaios com soja, cujo houve aumento considerável de biomassa. Esse aumento pode estar relacionado à síntese de Ácido Indol Acético (AIA) e solubilização de fosfatos (CHAGAS *et al.*, 2015; CHAGAS *et al.*, 2017).

Todas as variáveis morfofisiológicas do milho foram avaliadas pelo método multivariado de análise de componentes principais (PCA), com a finalidade de diferenciar os tratamentos com base em todas informações coletadas. Foram utilizados apenas PC1 e PC2 com 62,6% da variação total dos dados, para facilitar a interpretação do gráfico em duas dimensões do efeito de doses de *Trichoderma* na cultura do milho, conforme figura a seguir:

Figura 2. Biplot do primeiro e segundo componentes gerados a partir das variáveis respostas de plantas de milho (*Zea mays*), sob doses de *Trichoderma asperellum* UFT-201, via semente aos 45 dias após a semeadura.



PC1: primeiro componente; PC2: segundo componente; MFR: massa fresca da raiz; MFT: massa fresca total; MSF: massa seca foliar; MFF: massa fresca foliar; ALT: altura; VR: volume de raiz; MFC: massa fresca do caule; MST: massa seca total; MSR: massa seca da raiz; MSC: massa seca do caule; Ci: concentração de carbono interno; E: taxa de transpiração; gs: condutância estomática; A: taxa de assimilação de CO_2 ; EUA: eficiência do uso da água; Clo.Total: clorofila total; Clo.A: clorofila A; Clo.B: clorofila B; CONT: controle; D-3, D-6, D-9, D-12: doses 3, 6, 9 e 12 g kg^{-1} de sementes, respectivamente.

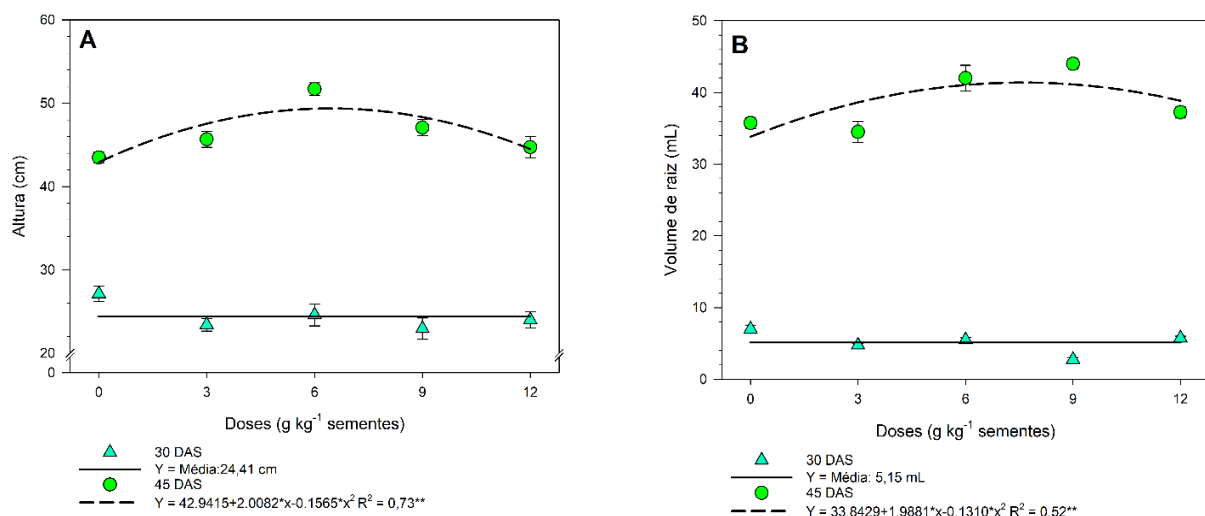
Fonte: Elaborada pelos autores.

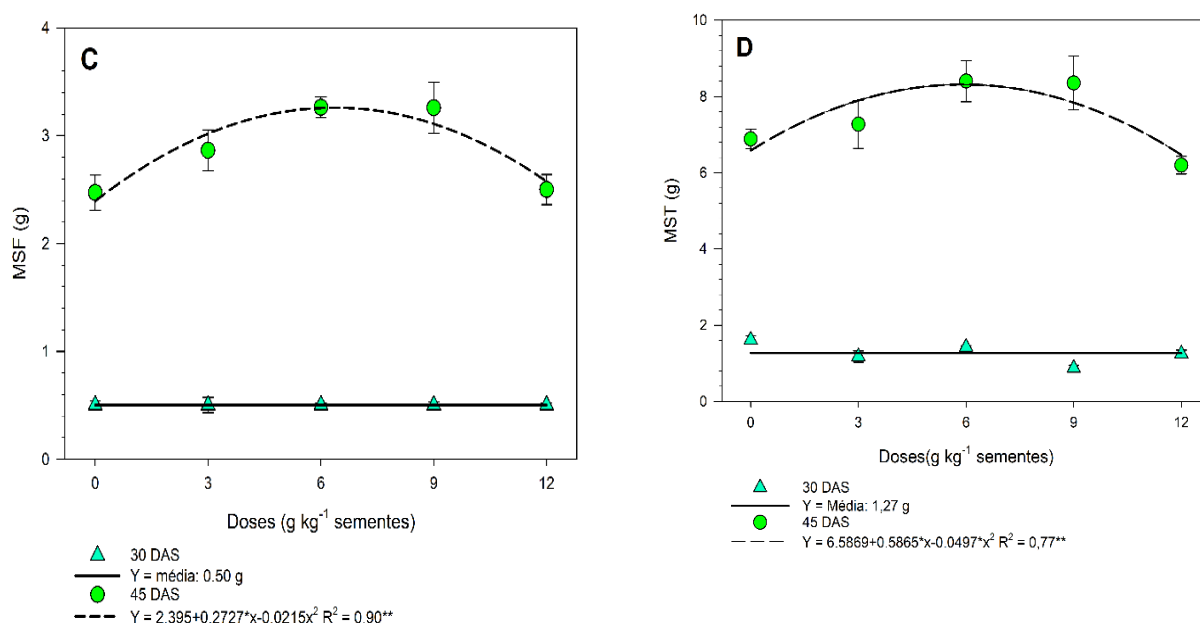
Devido à variabilidade dos dados, não ocorreu discriminação do controle pelas elipses a 95% de confiança, porém D-6 e D-9 apresentaram maior distância euclidiana do controle ($\sim 4,1$), já D-3 e D-12 ($\sim 2,6$) foram agrupadas como semelhantes ao controle. As variáveis mais sensíveis, de forma positiva, foram: A, EUA MFR, MFT e os índices de clorofilas (Clo.A, Clo.B e Clo.Total) e de formas negativa apenas o *Ci*. O controle ficou posicionado inversamente às variáveis mais positivas e correlacionado diretamente com o *Ci*. Esse resultado sugere que as plantas de milho inoculadas apresentaram maior eficiência fotossintética e, por isso, acumularam mais biomassa.

El-Hasan e Buchenauer (2009), utilizando metabólitos secundários de *Trichoderma*, observaram que houve aumento na atividade de peroxidases, polifenol oxidases e β -1,3- glucanase tanto na parte aérea quanto radicular. Esses compostos atuam diretamente na regulação do estresse oxidativo, responsáveis por aumentar a homeostase do metabolismo vegetal, reduzindo os compostos que oxidam e desestruturam as células (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Na cultura do arroz, todas as variáveis apresentadas foram significativas somente aos 45 DAS, conforme figura a seguir. A altura com ajuste quadrático ($R^2 = 0,75$) e MET em $6,4 \text{ g kg}^{-1}$, com um aumento de 11,9% (49,4 cm), em relação ao controle, que obteve apenas 43,5 cm de altura (Figura 3-A).

Figura 3. Altura (A) e Volume de raiz (B), Massa seca das folhas (C) e total (D) de plantas de arroz (*Oryza sativa*) sob doses de *Trichoderma asperellum* UFT-201 via sementes após 30 e 45 dias de semeadura.





Fonte: Elaborada pelos autores.

Para o volume de raiz, houve ajuste quadrático ($R^2 = 0,52$, $p = 0,024$), cuja melhor dose $7,6 \text{ g kg}^{-1}$ incrementou $13,6\%$ ($41,4 \text{ mL}$) em relação ao controle, que teve volume menor de $35,8 \text{ mL}$ (Figura 3-B). Utilizando uma cepa nativa de *Trichoderma* sp. na concentração de $1 \times 10^{-8} \text{ UFC mL}^{-1}$, Vegara *et al.* (2020) observaram incrementos entre 19 e 35% do comprimento e volume das raízes ($1,60 \text{ mL}$ do melhor tratamento contra $0,57 \text{ mL}$ do controle) em mudas de arroz da variedade SLF11. Kurrey *et al.* (2018), utilizando *Trichoderma* com hidrogel, também, observaram resultados positivos na cultura do arroz, mostrando crescimento e desenvolvimento de raízes e produtividade.

A MSF, aos 30 dias, foi de $\sim 0,5 \text{ g}$ (Figura 3-C). Já aos 45 DAS, ocorreu resposta significativa das doses (quadrática, $R^2 = 0,90$, $p = 0,04$), o MET foi de $6,34 \text{ g kg}^{-1}$ de sementes, com aumento de $22,09\%$ em relação ao controle. A MST, com ajuste quadrático ($R^2 = 0,77$), teve melhor resultado: $8,3 \text{ g}$, com MET $5,9 \text{ g kg}^{-1}$ de semente, e um aumento de $17,3\%$ em relação ao controle ($6,9 \text{ g}$) (Figura 3-D).

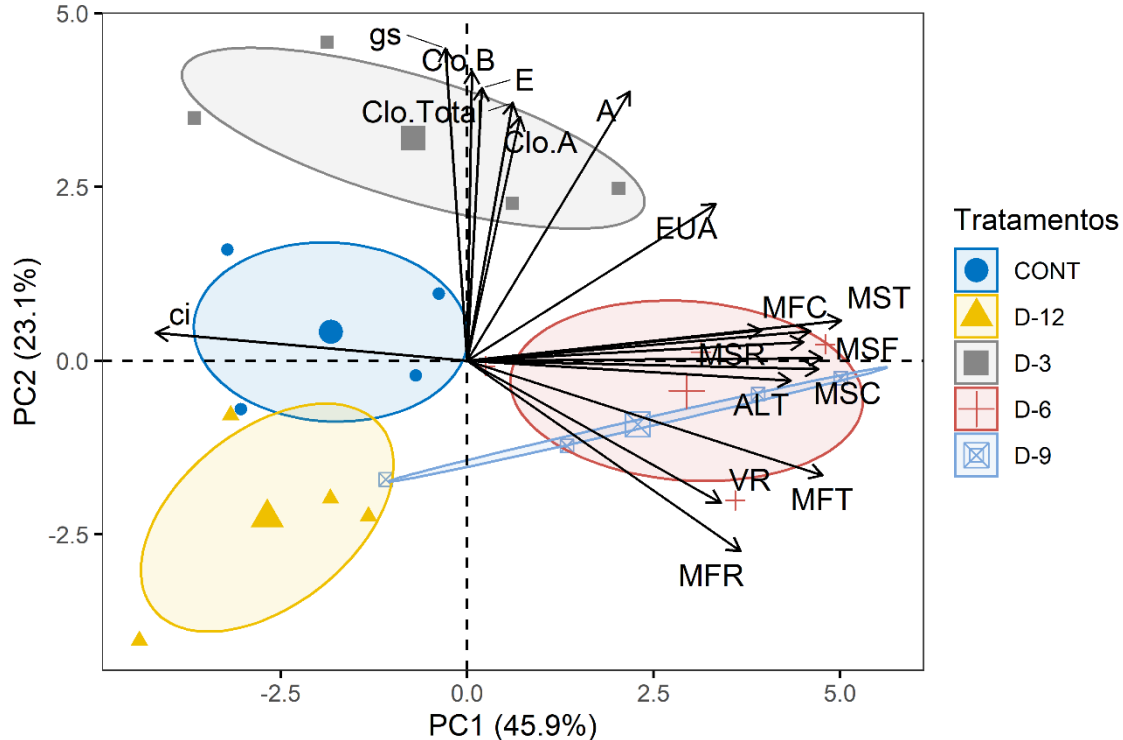
De acordo com Hoyos Carvajal *et al.* (2009), testando cepas de *Trichoderma*, houve a produção de hormônios de crescimento como AIA ou análogos, mecanismo pelo qual há produção de crescimento vegetal. A interação do *Trichoderma* com plantas de arroz ocorre em uma comunicação multicelular da parte aérea com raiz que produz auxinas, metabólitos voláteis e não voláteis, que promove a ramificação radicular da planta (MEYER *et al.*, 2019).

Silva *et al.* (2012) caracterizaram os isolados de *Trichoderma* e concluíram sobre a produção de fosfatase, celulase e AIA em condições de laboratório. Os pesquisadores levaram esses isolados para casa de vegetação e conseguiram um aumento considerável de 61% e 33% em biomassa da parte aérea e da parte radicular, respectivamente, comprovando o potencial do fungo como promotor de crescimento vegetal.

O PC1 e PC2, obtidos pela técnica multivariada, representam 69% da variação dos dados analisados. Conforme as elipses do *Biplot*, apenas D-12 não diferiu do controle, D-6 e D-9 apresentaram maiores distância euclidiana do controle, $\sim 4,8$ e $\sim 4,3$, respectivamente, quando comparados com D-3 ($\sim 3,0$) e D-12 ($\sim 2,8$). As variáveis mais

sensíveis, de forma positiva, foram: A, EUA, E, Clo.A, MFC, MST e MSR. Não houveram variáveis agrupadas como negativas.

Figura 4. Biplot do primeiro e segundo componentes gerados a partir das variáveis respostas de plantas de arroz (*Oryza sativa*) sob doses de *Trichoderma asperellum* UFT-201 via semente aos 45 dias após a semeadura.



PC1: primeiro componente; PC2: segundo componente; MFR: massa fresca da raiz; MFT: massa fresca total; MSF: massa seca foliar; MFF: massa fresca foliar; ALT: altura; VR: volume de raiz; MFC: massa fresca do caule; MST: massa seca total; MSR: massa seca da raiz; MSC: massa seca do caule; Ci: concentração de carbono interno; E: taxa de transpiração; gs: condutância estômática; A: taxa de assimilação de CO₂; EUA: eficiência do uso da água; Clo.Total: clorofila total; Clo.A: clorofila A; Clo.B: clorofila B; CONT: controle; D-3, D-6, D-9, D-12: doses 3, 6, 9 e 12 g kg⁻¹ de sementes, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Na cultura do arroz, D-12 apresentou efeitos negativos quanto aos acúmulos de biomassas e às características fisiológicas da cultura, não diferindo do controle. Esse resultado sugere que as altas doses do inoculante exigem muita energia fotossintética da planta, onde os microrganismos podem tornar-se um forte dreno de carbono nos primeiros estágios de desenvolvimento da cultura.

O aumento do sistema radicular da planta pode estar relacionado ao aumento na translocação de íons, via estimulação da enzima ATPase e da bomba de prótons (MANTELIN; TOURAINE, 2004).

O fungo *Trichoderma* spp. promove modificações nas raízes das plantas, resultando em respostas fisiológicas positivas, que podem estar associadas às mudanças na sinalização das vias dos fitohormônios, por exemplo, o ácido indol-3-acético (AIA), resultando em aumentos da área de superfície, número de raízes e pelos absorventes (RÊGO *et al.*, 2014; MEYER *et al.*, 2019).

Considerações Finais

O fungo *Trichoderma asperellum* UFT-201 inoculado, via semente, aumentou o volume radicular e a biomassa das plantas de milho e arroz na dose de 6 g kg⁻¹ de sementes. O ganho em biomassa das culturas está rela-

cionado às alterações fisiológicas nas culturas promovidas pela inoculação e doses acima de 12 g kg⁻¹ de sementes podem reduzir o desenvolvimento inicial das culturas, principalmente, para arroz.

Referências

- ALVARES, C. A. *et al.* Mapa de classificação climática de Köppen para o Brasil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- CAMPOS, T.; CANÉCHIO FILHO, V. **Principais culturas - II**. 2. ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973.
- CHAGAS, L. F. B. *et al.* Evaluation of the phosphate solubilization potential of *Trichoderma* strains (Trichoplus JCO) and effects on rice biomass. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 15, n. 3, p. 794-804, 2015.
- CHAGAS, L. F. B. *et al.* Phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production by *Trichoderma* strains for biomass increase on basil and mint plants. **Brazilian journal of agriculture-Revista de agricultura**, v. 92, n. 2, p. 176-185, 2017.
- CHAGAS, L. F. B. *et al.* *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Journal of neotropical agriculture**, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2020/2021. Disponível em: <file:///C:/Users/pc/Downloads/GraosZagostoZcompletoZ2020.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- CONTRERAS, C. H. A. *et al.* The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. **Plant and soil**, v. 379, n. 1-2, p. 261-274, 2014.
- DE OLIVEIRA, A. G. *et al.* Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 26, 2012.
- DRUZHININA, I. S. *et al.* Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the myco-parasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. **PLoS genetics**, v. 14, n. 4, p. 2018.
- EL-HASAN, A.; BUCHENAUER, H. Actions of 6-pentyl-alpha-pyrone in controlling seedling blight incited by *Fusarium moniliforme* and inducing defense responses in maize. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 11-12, p. 697-707, 2009.
- FALKER. **Manual do medidor eletrônico de teor de clorofila**. Disponível em: <http://www.falker.com.br/produto-clorofilog-medidor-clorofila.php>. Acesso em: 25 jul. 2020.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **Pacote experimental designs (portuguese)**. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2020.
- GONÇALVES, A. H. *et al.* *Trichoderma asperellum* UFT 201 on biocontrol, growth promotion and soybean productivity at field conditions. **International Journal of Current Research**, v. 9, n. 3, 2017.
- GONÇALVES, A. H. *et al.* *Trichoderma* efficiency in the maintenance and productivity of soybean plants in produ-

- cing savanna regions, Tocantins, Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 1, p. 175–181, 2018.
- HAIR, J. F. J. *et al.* **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto alegre: Bookman, 2009.
- HARMAN, G. E.; *et al.* *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.
- HERMOSA, R. *et al.* The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **International Microbiology**, v.16, n.2, p.69-80, 2013.
- HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa-Soja, 2011.
- HOYOS, C. L.; ORDUZ, S.; BISSET, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropical regions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 615-631, 2009.
- HUSSON, F. *et al.* **Multivariate exploratory data analysis and data mining**. Disponível em: <http://factominer.free.fr>. Acesso em: 05 jun. 2020.
- KUMAR, S. *Trichoderma*: uma arma biológica para o gerenciamento de doenças de plantas e promoção da sustentabilidade. **International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**. 1, 106–121, 2013.
- KURREY, D.; SINGH, R. K.; RAJPUT, R. S. Effect of Hydrogel and *Trichoderma* on root growth and water productivity in rice varieties under Rainfed Conditions **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, p. 210-212, 2018.
- LOPES, R. B. A indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de Microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 15-28, 2009.
- LUCON, C. M. M. **Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp.** São Paulo: Instituto Biológico/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, 2009.
- MACHADO; D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MANTELIN, S.; TOURAINE, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 27-34, 2004.
- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. *Trichoderma*: uso na agricultura. **Embrapa Soja-Livro científico (ALICE)**, 2019.
- MICHEREFF, S. J.; DOMINGOS, E. G. T. A.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. UFRPE, Recife-PE. Imprensa Universitária, p. 388, 2005.
- PACHECO, K. R. *et al.* Efficacy of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. reesei* against *Sclerotium rolfsii*. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, p. 412-421, 2016.
- PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.

- PANTH, M.; HASSLER, S. C.; BAYSAL-GUREL, F. Methods for management of soilborne diseases in crop production. **Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 16, 2020.
- PINTO, A. P. *et al.* Avaliação de doze cultivares de milho (*Zea mays* L.) para silagem. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.4, p.1071- 1078, 2010.
- RAJESH, R. W.; RAHUL, M. S.; AMBALAL, N. S. *Trichoderma*: a significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952– 1965, 2016.
- RÊGO, M. C. F.; *et. al.* Morphoanatomical and Biochemical Changes in the Roots of Rice Plants Induced by Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Journal of Botany**, v.1, n. 4 article, p. 10, 2014.
- RIBAS, P. P. *et al.* Potencial *in vitro* para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n. 2, 2016.
- RIPLEY, B. *et al.* **Support functions and datasets for venables and ripley's MASS**, 2020.
- SILVA, J. C. *et. al.* Rice sheath blight biocontrol and growth promotion by *Trichoderma* isolates from the Amazon. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 55, n. 4, p. 243-250, 2012.
- SILVA, T. I. *et. al.* Ensaio comparativo entre dois cultivares de milho submetidos a diferentes arranjos de plantas. **Revista Acta Iguazu**, v.6, n.1, p.14-22, 2017.
- STORCK, C. R. Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos. 108 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 2004.
- TEAM, R. C. R: **A language and environment for statistical computing**. Disponível em: <http://www.r-project.org>. Acesso em: 2 mai. 2020.
- TEIXEIRA, P. C. *et al.* **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2017.
- TOSELLO, G. A. Milhos especiais e seu valor nutritivo, In: VIEGAS, G. P.; PATERNIANE, E. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p. 375-409, 1987.
- VERGARA, J. A. C. *et al.* Respuestas morfofisiológicas de la raíz del arroz (*Oryza sativa* L.) variedad SFL 11 en fase de semillero a la aplicación de cepa nativa de *Trichoderma* sp. y lixiviados de vermicompost bovino. **La Técnica: Revista de las Agrociencias**. ISSN 2477-8982, n. 23, p. 13-24, 2020.
- VINALE, F. *et al.* A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 3, p. 80-86, 2008.
- WICKHAM, H. *et al.* **Create elegant data visualisations using the grammar of graphics**. Disponível em: <https://cran.rproject.org/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2020.
- ZHANG, S. *et al.* Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO₂ assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday high irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383–388, 2001.

MECANISMOS DAS INTERAÇÕES PLANTA-MICRORGANISMOS DO SOLO E CONTROLE GENÉTICO DO HOSPEDEIRO

Weslany Silva Rocha¹

Albert Lennon Lima Martins²

Evelynne Urzêdo Leão³

Adriano Sérgio Bernardo Queiroz⁴

Ildon Rodrigues do Nascimento⁵

Manoel Mota dos Santos⁶

Introdução

Os microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP) são organismos que colonizam a rizosfera e o rizoplane e melhoram o crescimento das plantas, quando inoculados artificialmente nas sementes ou no solo. Os microrganismos PGP podem promover o crescimento de plantas por estimulação direta, como quelação de ferro, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e produção de fitohormônios ou por estimulação indireta, como supressão de patógenos de plantas e indução de resistência em plantas hospedeiras contra patógenos (HAO *et al.*, 2011; PANHWAR *et al.*, 2012).

O crescimento das plantas pode ser melhorado diretamente pela microbiota, com a produção de compostos metabólicos e com atividade fito-hormonal em concentrações micromolares a nanomolares (JOG *et al.*, 2014), pois as rizobactérias têm a capacidade de solubilizar fosfato e produzir metabolitos diretamente relacionados ao crescimento da planta, como auxinas, giberelinas e citocininas. Além disso, sintetizam antibióticos, sideróforos e ácido hidrodinâmico que reduzem a atividade de patógenos (GRAÇAS *et al.*, 2015).

Muitas espécies de fungos também produzem auxinas, por exemplo, alguns estudos sobre o papel do AIA produzido por fungos em diferentes sistemas de interação fungo-planta abrem a possibilidade de que fungos possam usar AIA e compostos relacionados para interagir com plantas como parte de sua estratégia de colonização, levando à estimulação do crescimento vegetal e modificação da defesa basal da planta (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009; PRUSTY *et al.*, 2004).

Além disso, os microrganismos bioprotetores associados às plantas podem ter a capacidade de minimizar os desafios impostos pelos fitopatógenos. Essa atividade de biocontrole pode se manifestar, como antibiose, competição de nutrientes e espaço, parasitismo, predação, hipovirulência e resistência sistêmica induzida (QIAO *et al.*, 2014), que são mecanismos indiretos de promoção do crescimento das plantas (SOUSA; OLIVARES, 2016).

Os microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP) podem induzir programas de defesa, como resistência sistêmica adquirida e resistência sistêmica induzida, reduzindo as comunidades microbianas fito-

1 Laboratório de Fitoterapia, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: weslany.rocha@mail.uft.edu.br

2 Departamento de Agronegócios, Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: albert.ll@unitins.br

3 Curso de Engenharia Agrônoma, Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: evelynne.ul@unitins.br

4 Departamento de Agronegócios, Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: adrianosbq@gmail.com

5 Curso de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: ildon@mail.uft.edu.br

6 Curso de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: santosmm@mail.uft.edu.br

tóxicas. Eles também podem provocar Tolerância Sistêmica Induzida (TSI) ao estresse abiótico (YANG *et al.*, 2009). Assim, as plantas exibem respostas de defesa durante a infecção por microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP) mas essas são menos agressivas do que as expressas durante interações patogênicas (COMPANT *et al.*, 2005). Embora os mecanismos bioquímicos envolvidos nas respostas dessas plantas não estejam claramente elucidados, o papel fundamental dos fitohormônios, como o Ácido Salicílico (SA), Ácido Jasmônico (JA) e Etileno (ET), têm sido amplamente divulgados na literatura (CONN *et al.*, 2008; SHAH, 2009; YASUDA *et al.*, 2009).

Dessa forma, nessa revisão, serão apresentados os principais mecanismos descritos na literatura científica sobre os diferentes tipos de mecanismos existentes entre as raízes e os microrganismos presentes no solo e, também, a importância do controle genético do hospedeiro (planta) para definir o sucesso e a eficiência dessa interação nesse sistema, em face da limitação destes estudos no Brasil.

Mecanismos existentes entre as raízes e os microrganismos presentes no solo

De acordo com Souza *et al.* (2015), os mecanismos pelos quais as bactérias podem influenciar no crescimento das plantas diferem de espécies e estirpes, pois, tipicamente, não existe um mecanismo único para promover o crescimento das plantas. Os principais mecanismos utilizados microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP) são:

Fixação biológica de nitrogênio

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é o processo responsável pela redução do N_2 à amônia (NH_3) (NEWTON, 2000; FRANCHE *et al.*, 2009) e é realizado em microrganismos diazotróficos, principalmente, bactérias e archaea (DIXON; KAHN, 2004). Os microrganismos diazotróficos realizam a fixação biológica de nitrogênio (BNF) por meio da nitrogenase, uma enzima altamente conservada que compreende duas metaloproteínas: FeMo-proteína e Fe-proteína (DIXON; KAHN, 2004). Embora existam muitas diferenças morfológicas, fisiológicas e genéticas entre os diazotróficos, bem como uma enorme variabilidade de ambientes onde eles podem ser encontrados, todos eles contêm a enzima nitrogenase (BOUCHER *et al.*, 2003; ZEHR *et al.*, 2003).

Os flavonóides variam com a idade da planta e o estado fisiológico, quando exsudados de rizosferas de leguminosas, e induzem a expressão do gene *nodD* em linhagens de rizóbios. O gene *nodD* é um ativador transcricional de genes bacterianos envolvidos na infecção e formação de nódulos durante o estabelecimento de simbioses leguminosa-rizóbia (LONG, 2001).

As bactérias do solo da família *Rhizobiaceae* (rhizobia) estão confinadas aos nódulos radiculares das leguminosas da família *Fabaceae* (WILLEMS, 2006). Dentro desses nódulos, os rizóbios realizam efetivamente a fixação biológica de nitrogênio (FBN), por meio do controle adequado da presença de oxigênio, um inibidor da atividade da nitrogenase (SHRIDHAR, 2012).

Níveis de fitohormônios moduladores

Os hormônios vegetais desempenham papéis fundamentais no crescimento e desenvolvimento das plantas e na resposta das plantas ao meio ambiente (DAVIES, 2004). Ao longo da vida, uma planta é submetida a uma série de tensões não letais, que podem limitar seu crescimento, até que o estresse seja removido ou a planta seja capaz

de ajustar seu metabolismo para superar os efeitos do estresse (GLICK *et al.*, 2007). Quando as plantas encontram condições ambientais limitantes de crescimento, elas tentam ajustar os níveis de seus fitohormônios endógenos, a fim de diminuir os efeitos negativos dos estressores ambientais (SALAMONE *et al.*, 2005). Esta estratégia é, por vezes, bem-sucedida, posto que os microrganismos rizosfera também podem produzir ou modular fitohormônios em condições *in vitro* (SALAMONE *et al.*, 2005), já que muitos microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP) podem alterar os níveis de fitohormônios e, assim, afetar o equilíbrio hormonal da planta e sua resposta ao estresse (GLICK *et al.*, 2007).

Produção de compostos indólicos

Várias espécies bacterianas podem produzir Compostos Indólicos (CIs), como o fitohormônio, auxina, ácido indol-3-acético (AIA), que apresentam grande relevância fisiológica para interações bactéria-planta, variando de patogênese à fitoestimulação. A capacidade de produzir CIs é amplamente distribuída entre as bactérias associadas às plantas (SPAEPEN *et al.*, 2007).

A síntese de CIs em bactérias depende da presença de precursores em exsudatos radiculares. Entre os vários exsudatos, o L-triptofano foi identificado como o principal precursor para a rota da biossíntese de CI em bactérias. A caracterização de compostos intermediários levou à identificação de diferentes vias que utilizam o L-triptofano como principal precursor. As diferentes vias de síntese do AIA em bactérias mostram um alto grau de similaridade com as vias de biossíntese do AIA nas plantas (SPAEPEN *et al.*, 2007). As bactérias benéficas predominantemente sintetizam AIA, por meio da via do ácido indol-3-pirúvico, uma via alternativa dependente do L-triptofano.

O AIA afeta a divisão, extensão e diferenciação celular das plantas; estimula a germinação de sementes e tubérculos; aumenta a taxa de desenvolvimento do xilema e da raiz; controla processos de crescimento vegetativo; inicia formação radicular lateral e adventícia; média respostas à luz, gravidade e fluorescência; e afeta fotossíntese, formação de pigmentos, biossíntese de vários metabólitos e resistência a condições estressantes (SPAEPEN ; VANDERLEYDEN, 2011; TSAVKELOVA *et al.*, 2006). Há mais de 70 anos, diferentes concentrações de AIA afetam a fisiologia das plantas, dramaticamente. As respostas plantas ao AIA variam de um tipo de planta para outra, onde algumas plantas são mais ou menos sensíveis ao AIA do que outras plantas, de acordo com tecido específico envolvido (GLICK, 2012).

O AIA, sintetizado por bactérias, pode estar envolvido em diferentes níveis nas interações planta-bactéria. Em particular, a promoção do crescimento das plantas e a nodulação são afetadas pelo AIA. O AIA bacteriano aumenta a área e o comprimento da superfície da raiz e, assim, proporciona à planta maior acesso aos nutrientes do solo. Além disso, o AIA bacteriano solta as paredes celulares das plantas e, como resultado, facilita uma quantidade crescente de exsudação de raízes, que fornece nutrientes adicionais para suportar o crescimento de bactérias da rizosfera (GLICK, 2012).

Citocininas e giberelinas

Vários estudos demonstraram que muitas bactérias do solo em geral e microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP), em particular, podem produzir citocininas ou giberelinas ou ambas (SALAMONE

et al., 2001). No entanto, uma compreensão detalhada do papel da síntese de hormônios bacterianos e como a produção bacteriana desses hormônios vegetais é regulada não está atualmente disponível (GLICK, 2012).

O etileno

O etileno é um fitohormônio gasoso produzido endogenamente, que atua em baixas concentrações, participando da regulação de todos os processos de crescimento, desenvolvimento e senescência das plantas (SHAHA-ROONA *et al.*, 2006; SALEEM *et al.*, 2007). Além de atuar como regulador de crescimento vegetal, o etileno também foi identificado como um fitohormônio de estresse.

O aumento da quantidade de etileno que é formado em resposta aos vários estresses ambientais pode exacerbar alguns dos sintomas do estresse ou pode levar as respostas que aumentam a sobrevivência das plantas sob essas condições. Esse comportamento, aparentemente, contraditório pode ser explicado por um modelo em que as plantas expostas ao estresse respondem rapidamente, produzindo um pequeno pico de etileno, que inicia uma resposta protetora pela planta, por exemplo, transcrição de genes que codificam proteínas defensivas. Se o estresse persistir ou for intenso, ocorre um segundo pico muito maior de etileno, vários dias depois. Esse segundo pico de etileno induz processos como senescência, clorose e abscisão que podem levar a uma inibição significativa do crescimento e sobrevivência das plantas (GLICK *et al.*, 2007).

Atividade da ACC desaminase

Vários mecanismos foram investigados com o objetivo de reduzir os níveis de etileno nas plantas. Um desses mecanismos envolve a atividade da enzima bacteriana 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase (GLICK, 2005; JALILI *et al.*, 2009; FARAJZADEH *et al.*, 2012). A ACC deaminase regula a produção de etileno vegetal por metabolização de ACC (o precursor imediato da biossíntese de etileno em plantas superiores) em ácido α -cetobutírico e amônia (ARSHAD *et al.*, 2007; SALEEM *et al.*, 2007).

Uma quantidade significativa de ACC da planta pode ser excretada das raízes das plantas e, posteriormente, absorvida pelos microrganismos do solo e hidrolisada pela enzima ACC deaminase, diminuindo a quantidade de ACC no ambiente. Quando associadas às raízes das plantas, as comunidades microbianas do solo com atividade da ACC desaminase podem ter um crescimento melhor do que outros microrganismos livres, pois esses organismos usam o ACC como fonte de nitrogênio. Os microrganismos com expressão baixa de ACC desaminase incluem a maioria, se não todas, espécies de rizóbios (GLICK, 2005).

Em curto prazo, o principal efeito visível da inoculação de sementes ou raízes com bactérias produtoras de ACC desaminase é o aumento do alongamento da raiz da planta. A promoção de crescimento de brotos é geralmente vista em experimentos de longo prazo (CONTESTO *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2012; NAVEED *et al.*, 2008; ONOFRE-LEMUS *et al.*, 2009). Além disso, outros processos, como a nodulação de leguminosas e estabelecimento micorrízico na planta hospedeira, induzem aos aumentos locais no conteúdo de etileno. Como resultado, diminuindo o teor de etileno local nessas plantas, as bactérias produtoras de ACC desaminase podem aumentar a extensão da nodulação rizobiana e da colonização micorrízica em várias leguminosas, como ervilha, alfafa, feijão e grão de bico (MA *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2012) e pepino (GAMALERO *et al.*, 2008), respectivamente.

Produção de sideróforos

O Ferro (Fe) é um micronutriente essencial para as plantas e os microrganismos, pois está envolvido em vários processos biológicos importantes, como fotossíntese, respiração, biossíntese de clorofila (KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012) e BNF (DIXON; KAHN, 2004).

Apesar de o ferro ser o quarto elemento mais abundante na terra, em solos aeróbicos, o ferro não é prontamente assimilado por bactérias ou plantas, porque o íon férrico ou Fe, que é a forma predominante na natureza, é apenas moderadamente solúvel, de modo que a quantidade de ferro disponível para assimilação por organismos vivos é extremamente baixo (MA, 2005).

Atualmente, existem mais de 500 sideróforos conhecidos; as estruturas químicas de 270 desses compostos foram determinadas (HIDER; KONG, 2010). Em condições aeróbicas, a solubilidade do ferro é baixa, refletindo a predominância de Fe³⁺ tipicamente observado como polímeros de oxihidróxido, limitando assim a oferta de Fe para diferentes formas de vida, particularmente, em solos calcários (ANDREWS *et al.*, 2003; LEMANCEAU *et al.*, 2009).

Os microrganismos desenvolveram estratégias ativas para absorção de Fe. As bactérias podem superar a limitação de Fe nutricional usando agentes quelantes chamados sideróforos. Sideróforos são definidos como moléculas de massa molecular baixa (<1000 Da), com alta especificidade e afinidade para quelação ou ligação de Fe³⁺, seguido pelo transporte e deposição de Fe dentro de células bacterianas (KREWULAK; VOGEL, 2008).

A excreção de sideróforos por bactérias pode estimular o crescimento das plantas, melhorando a nutrição (efeito direto) ou inibindo o estabelecimento de fitopatógenos (efeito indireto), por meio do sequestro de ferro do ambiente (SOUZA *et al.*, 2015).

Solubilização de fosfato

O Fósforo (P) é um nutriente essencial para as plantas, participando como componente estrutural de ácidos nucleicos, fosfolipídios e Trifosfato de Adenosina (ATP), como elemento chave das vias metabólicas e bioquímicas, particularmente, importantes para a fixação biológica de nitrogênio (BNF) e fotossíntese (KHAN *et al.*, 2007).

As plantas absorvem P em duas formas solúveis: a monobásica (H PO₄⁻) e a dibásica (HPO₄²⁻) (RICHARDSON; SIMPSON, 2011). No entanto, uma grande proporção de P está presente em formas insolúveis e, consequentemente, não está disponível para a nutrição das plantas. Baixos níveis de P refletem a alta reatividade do fosfato com outros componentes solúveis (KHAN *et al.*, 2007), como alumínio em solos ácidos (pH <5) e cálcio em solos alcalinos (pH > 7) (MCLAUGHLIN *et al.*, 2011).

Compostos orgânicos (incorporados na biomassa ou matéria orgânica do solo) e compostos inorgânicos, principalmente, na forma de complexos minerais insolúveis são importantes fontes de P disponível no solo (RODRÍGUEZ *et al.*, 2006; RICHARDSON; SIMPSON, 2011). Portanto, a disponibilidade de P depende da solubilidade desse elemento, que poderia ser influenciada pela atividade de raízes de plantas e microrganismos no solo. Bactérias e fungos solubilizadores de fosfato constituem, aproximadamente, 1-50% e 0,1-0,5%, respectivamente, da população total de microrganismos cultiváveis no solo (KHAN *et al.*, 2009).

Normalmente, a solubilização do fósforo inorgânico ocorre como consequência da ação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como o gluconato e ácido cítrico, ambos sintetizados por várias bactérias do solo (RODRÍ-

GUEZ; FRAGA, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Por outro lado, a mineralização do fósforo orgânico ocorre por meio da síntese de uma variedade de diferentes fosfatases, catalisando a hidrólise de ésteres fosfóricos (RODRÍGUEZ; FRAGA, 2009).

As bactérias solubilizadoras de fosfato solubilizam fosfatos do solo inorgânicos, como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , por meio da produção de ácidos orgânicos (os ácidos cítrico, glucônico, láctico, succínico e propiônico), sideróforos e íons hidroxila (CHEN *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2013).

O gênero *Bacillus* spp. se destaca por formar endósporo e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos, possibilitando, dessa forma, a sua longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade nos mecanismos de ação para driblar as defesas dos fitopatógenos (LANNA FILHO *et al.* (2010).

A promoção de crescimento, ocasionada por *B. subtilis*, é consequência do aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo, além dos benefícios indiretos pela supressão deste ambiente contra microrganismos maléficos (MANJULA; PODILE, 2005).

A habilidade das bactérias de controle biológico em promover indiretamente o crescimento das plantas tem sido uma fonte de considerável interesse.

Antibióticos e enzimas líticas

A síntese de uma gama de diferentes antibióticos é a característica de microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP), que é mais associada à habilidade da bactéria para prevenir proliferação de patógenos de plantas (geralmente fungos) (COMPANT *et al.*, 2005; HAAS; KEEL, 2003; MAZURIER *et al.*, 2009).

Algumas bactérias de biocontrole produzem enzimas, incluindo quitinases, celulasas, -1,3 glucanases, proteases e lipases, que podem lisar uma porção das paredes celulares de muitos fungos patógenos. O microrganismo Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP) que sintetiza uma ou mais destas enzimas demonstrou ter atividade de biocontrole contra um gama de fungos patogênicos, incluindo *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* (FRANKOWSKI *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2008).

Espécies do gênero *Trichoderma* vêm sendo utilizadas com sucesso no controle de fitopatógenos, por serem capazes de proteger plantas, por meio de parasitismo, antibiose, competição por nutrientes e substrato e indução de resistência. Além disso, essas espécies colonizam com facilidade o sistema radicular e promovem o crescimento de diversas espécies de plantas (VINALE *et al.*, 2008).

Competição

Embora seja difícil demonstrar, algumas evidências indiretas indicam que a competição entre patógenos e não patógenos (microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP)) podem limitar a incidência e gravidade da doença. Por exemplo, micróbios abundantes e não patogênicos do solo colonizam rapidamente as superfícies das plantas e os nutrientes disponíveis, dificultando o crescimento de patógenos (INNEREBNER *et al.*, 2011).

O efeito *in situ* pela exposição de células vivas de *B. subtilis* pode ocasionar a promoção de crescimento e/ou o biocontrole (HAMMAMI *et al.*, 2009). Este último podendo ser de natureza direta ou indireta. O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos tem o envolvimento dos conhecidos mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobiana, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL *et al.*, 2008). O mecanismo indireto é exercido pelo fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR) (LANNA FILHO *et al.*, 2010).

P. chlamydosporia é também um endófito radicular, pois melhora o crescimento de uma gama de espécies de plantas hospedeiras, enquanto sustenta sua ação de defesa a diferentes patógenos (CIANCIO *et al.*, 2013).

Os efeitos promotores de crescimento relacionados às interações de *Streptomyces*-planta podem ser divididos em biofertilização, bioestimulação e bioproteção (SAHARAN; NEHRA, 2011).

O gênero *Streptomyces* é amplamente reconhecido como capaz de sintetizar vários metabólitos secundários bioativos que atuam controlando o fitopatógeno e conferem uma vantagem a colonização endofítica da rizosfera (GOLINSKA; DAHM, 2013), por exemplo, *quitinase* de *S. violaceusniger* YH27A (GHERBAWY *et al.*, 2012).

Resistência sistêmica induzida

O uso da resistência genética, aliado aos tratamentos biológico e químico, proporcionou incrementos significativos no crescimento da planta (ARAUJO *et al.*, 2012).

Os microrganismos promotores de crescimento vegetal podem desencadear em um fenômeno em plantas conhecidas como Resistência Sistêmica Induzida (RSI), que é, fenotipicamente, semelhante à sistêmica adquirida. A Resistência Sistêmica Induzida (RSI) ocorre quando as plantas ativam seus mecanismos de defesa em resposta à infecção por um agente patogênico (PIETERSE *et al.*, 2009). A ISR positiva diz que as plantas são “preparadas” para que reajam mais rapidamente e fortemente ao ataque de patógenos, induzindo mecanismos de defesa. A ISR não segmenta patógenos específicos. Pelo contrário, pode ser eficaz no controle de doenças causadas por diferentes patógenos. A RSI envolve sinalização de jasmonato e etileno dentro da planta e esses hormônios estimulam as respostas de defesa da planta hospedeira a uma série de patógenos (VERHAGEN *et al.*, 2004). A ISR não requer nenhum acesso direto à interação entre o microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP) indutor de resistência e o patógeno (BAKKER *et al.*, 2007). Além do etileno e do jasmonato, outras moléculas bacterianas, como a cadeia lateral O-antigênica do lipopolissacarídeo de proteína da membrana externa bacteriana, proteínas, poverdina, quitina, β -glucanas, cíclicas surfactantes lipopeptídicos e ácido salicílico têm sido relatados para atuar como sinais para a indução de resistência sistêmica.

Importância do controle genético do hospedeiro (planta) para definir o sucesso e a eficiência dessa interação (especificidade)

As raízes das plantas respondem às condições ambientais, por meio da secreção de uma ampla gama de compostos, de acordo com o estado nutricional e as condições do solo. Essa ação interfere na interação planta-bactéria e é um importante fator que contribui para a eficiência do inoculante (CAI *et al.*, 2012; CARVALHAIS *et al.*, 2013). A exsudação da raiz inclui a secreção de íons, oxigênio e água livres, enzimas, mucilagem e uma

gama diversificada de metabólitos primários e secundários, contendo C (BAIS *et al.*, 2006). As raízes das plantas excretam 10-44% do C fotossinteticamente fixado, que serve como fonte de energia, moléculas sinalizadoras ou antimicrobianos para microrganismos do solo (GUTTMAN *et al.*, 2014). A exsudação radicular varia com a idade da planta e o genótipo e, conseqüentemente, microrganismos específicos respondem e interagem com diferentes plantas hospedeiras (BERGSMA-VLAMI *et al.*, 2005; AIRA *et al.*, 2010; RAMACHANDRAN *et al.*, 2011). Assim, os inoculantes são, geralmente, destinados a uma planta específica, a partir da qual a bactéria foi isolada.

Segundo Doornbos *et al.* (2012), a atividade microbiana no solo rizosférico é marcadamente influenciada por metabólitos, contendo carbono liberado das raízes, por meio do processo de rizodeposição. Esses compostos (secreções iônicas, oxigênio e água livres, enzimas, proteínas, mucilagem, aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e fenólicos) agem como recursos de nutrientes químicos, quimioatractivos, quimiorpulsivos e sinalização de compostos que moldam a estrutura da comunidade microbiana e atividade de diferentes grupos de microrganismos e terem influência significativa nas interações de microrganismos-raiz da planta (BEVER *et al.*, 2012).

Para Ortíz-Castro *et al.* (2009), uma comunicação extensa ocorre entre plantas e microrganismos durante diferentes estágios de desenvolvimento da planta, nos quais as moléculas de sinalização dos dois parceiros desempenham um papel importante. Espécies de fungos e bactérias são capazes de detectar a planta hospedeira e iniciar suas estratégias de colonização na rizosfera, produzindo substâncias reguladoras do crescimento de plantas canônicas, como auxinas ou citocininas. Por outro lado, as plantas são capazes de reconhecer compostos derivados de micróbios e ajustar suas respostas de defesa e crescimento, de acordo com o tipo de microrganismo encontrado. Esse diálogo molecular determinará o resultado final da relação, variando da patogênese à simbiose, geralmente, por meio de processos celulares altamente coordenados.

Os tipos de microrganismos, dentro de uma rizosfera, incluem bactérias, fungos, actinomicetos e algas (ORTÍZ-CASTRO *et al.*, 2009).

A competição microbiana está intimamente associada à eficiência da colonização radicular do microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP), já que a exsudação de diferentes compostos atrai um grande número de diferentes populações microbianas. Essa intensa comunicação molecular em torno das raízes proporciona uma ampla gama de interações micróbio-micróbio, tornando o ambiente altamente competitivo entre as bactérias do solo (SOUZA *et al.*, 2015).

A colonização endofítica, geralmente, representa uma importante vantagem ecológica para o microrganismo, porque o ambiente protegido é menos suscetível ao estresse abiótico (variações de pH, redox, osmótica e hidráulica) comparada com competição microbiana e a rizosfera - sistema de solo. Além disso, o contato íntimo entre células hospedeiras de plantas e células microbianas pode ser mais eficaz para a troca bidirecional de sinais, metabólitos funcionais e fontes nutricionais para o sucesso interação benéfica, que pode promover o crescimento da planta hospedeira (SHIMIZU, 2011; JOHNSTON-MONJE; RAIZADA, 2011).

Os Microrganismos Promotores de Crescimento Vegetal (MPCV) são amplamente reconhecidos como sendo bons colonizadores da rizosfera e sua competência rizosfera pode ser parcialmente explicada por vários aspectos quimiotáticos, tais como, multiplicação de taxa bacteriana, expressão gênica controlada por sensores, aminoácidos, antibióticos e síntese de sideróforos (COMPANT *et al.*, 2010).

Na rizosfera, os actinomicetos têm seu crescimento estimulado por exsudatos (ROVIRA, 1965), os quais têm composições diferentes entre as plantas (GESHEVA, 2002). Portanto, a flora de actinomicetos pode variar com as

diferentes rizosferas.

Um exemplo disso é quando são introduzidas células de estreptomicetos no solo, que respondem aos compostos liberados ativamente atraídos para a rizosfera por quimiotaxia. Nesse ponto, a versátil necessidade nutricional e aumento da taxa populacional combinadas com a produção de compostos bioativos e mecanismos de desintoxicação são determinantes para o sucesso do estabelecimento na rizosfera. As primeiras propriedades desempenham um papel fundamental na superação da concorrência complexa e pode ser, parcialmente, explicado pela capacidade de produzir antibióticos e outros compostos bioativos que conferem vantagem ecológica e permitir que a PGPS colonize nichos (BERG, 2009).

Muitas bactérias regulam diversos processos celulares em conjunto com seu tamanho populacional - um processo comumente chamado de *Quórum Sensing* (QS). A comunicação entre células bacterianas utiliza pequenos sinais difusíveis, que as bactérias produzem e percebem (READING; SPERANDIO, 2006). A bactéria acopla a expressão gênica à densidade populacional, provocando uma resposta apenas quando a sinalização atinge um limiar crítico. A população como um todo é, portanto, capaz de modificar seu comportamento como uma única unidade. Em bactérias Gram-negativas, os sinais de detecção de quórum mais utilizados são *Nacil-L-homoserina lactonas* (AHLs). É agora aparente que as AHLs são usadas para regular diversos comportamentos em rizosfera, habitando bactérias e que as plantas podem produzir seus próprios metabólitos, o que pode interferir na sinalização de quórum.

Os AHLs são compostos de um resíduo de *lactona homoserina*, ligado a uma cadeia do lado acila. A especificidade deriva do comprimento da cadeia acil (4-18 átomos de carbono), substituição na posição C3 e nível de saturação dentro da cadeia acil. Os AHL podem ser classificados como de cadeia longa, média ou curta, dependendo se a sua porção acil consiste em mais de doze, entre oito a doze ou menos de oito átomos de carbono, respectivamente (ZHU *et al.*, 1998; RAFFA *et al.*, 2005). Essas moléculas são livremente difundidas, por meio da membrana bacteriana e distribuídas dentro da rizosfera (ORTÍZ-CASTRO *et al.*, 2008; RAFFA *et al.*, 2005; STEIDLE *et al.*, 2001; SCHUHEGGER *et al.*, 2006; ORTÍZ-CASTRO *et al.*, 2009).

Exemplos de sistemas de genes regulados por AHL são diversos e incluem virulência, bioluminescência, esporulação, enxame, produção de sideróforos, biossíntese de antibióticos e transferência conjugal de plasmídeos. AHLs orquestram processos importantes de muitas bactérias colonizadoras benéficas da rizosfera (PARSEK *et al.*, 1999). Por exemplo: a deleção do gene *pco1*, responsável pela produção dos AHLs 3-oxo-C6-HL e 3-oxo-C8-HL em *Pseudomonas fluorescens* 2P24, causou o mutante defeituoso na formação de biofilme, colonização da rizosfera de trigo e na habilidade de biocontrole contra o *Pseudomonas fluorescens* 2P24, enquanto a complementação de *pco1* restaurou a atividade de biocontrole ao nível do tipo selvagem. Enquanto as bactérias faziam uso de AHLs para sinalização, até recentemente não se sabia se as plantas respondiam funcionalmente a esses mesmos sinais (WEI; ZHANG, 2006).

Mathesius *et al.* (2003) demonstraram que as plantas são capazes de perceber as AHLs e descobriram que, em plantas de *Medicago truncatula* crescendo axenicamente, a aplicação de concentrações nanomolares de dois tipos diferentes de AHL, 3-oxo-C12-HL e 3-oxo-C16: 1-HL causou mudanças significativas no acúmulo de mais de 150 proteínas. Constatou-se que essas proteínas têm funções na defesa de plantas, resposta ao estresse, atividades energéticas e metabólicas, regulação transcricional, processamento de proteínas, atividades do citoesqueleto e respostas hormonais. Esses resultados foram confirmados por análise de expressão de microarray em *Arabidop-*

sis thaliana (MATHESIUS *et al.*, 2003; RAD *et al.*, 2008).

A presença de bactérias produtoras de AHL na rizosfera de tomate induziu respostas de defesa dependentes de ácido salicílico e etileno, que desempenham um papel importante na ativação da resistência sistêmica em plantas e conferiram proteção contra o patógeno fúngico *Alternaria alternata*. Além disso, descobriu-se que as AHLs são absorvidas pelas plantas em um processo que depende do comprimento da cadeia acil (SCHUHEGGER *et al.*, 2006). A aplicação de uma lactose homoserina, um produto de degradação da AHL, por meio de bactérias do solo às raízes do feijoeiro, leva a um aumento na condutância estomática e transpiração na parte aérea (RAD *et al.*, 2008; GOTZ *et al.*, 2007). Isso, por sua vez, é benéfico tanto para a planta quanto para as bactérias, por meio de um aumento na absorção de nutrientes minerais (JOSEPH; PHILLIPS, 2003).

Outro fator importante na comunicação microrganismos-planta são os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs), que são definidos como compostos que têm pressões de vapor altas o suficiente sob condições normais para vaporizar e entrar significativamente na atmosfera. Essa classe de substâncias químicas inclui compostos de baixo peso molecular ($<300 \text{ g mol}^{-1}$), como álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos. Os COVs são eliciadores eficientes para a comunicação, agindo universalmente como atrativos, repelentes ou sinais de alerta em organismos de todos os reinos (VESPERMANN *et al.*, 2007; DUNKEL *et al.*, 2009; ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2009).

Para investigar como os CVOs dos microrganismos promotores de crescimento (PGPRs) desencadeiam a promoção do crescimento em *A. thaliana*, Zhang *et al.* (2007) examinaram os níveis de mRNA de plântulas de *Arabidopsis* expostas a voláteis de *B. subtilis* GB03, utilizando microarrays de oligonucleótidos. Na triagem de mais de 26.000 transcritos codificados por proteínas, um grupo de aproximadamente 600 genes expressos, diferencialmente relacionados às modificações da parede celular, metabolismo primário e secundário, respostas de estresse e homeostase de auxina foram identificados. Esses resultados implicam os COVs como moduladores da homeostase da auxina e da expansão celular e sugerem que os COVs podem afetar diretamente as vias envolvidas na morfogênese das plantas (ZHANG *et al.*, 2007).

O termo “Tolerância Sistêmica Induzida” (TSI) foi proposto para mudanças físicas e químicas, induzidas por microrganismos promotores de crescimento (PGPR) em plantas que resultam em maior tolerância ao estresse abiótico (YANG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2008b). O papel dos COVs emitidos pelo *B. subtilis* GB03, na tolerância sistêmica induzida ao estresse salino (NaCl 100 mM) em *Arabidopsis*, foi avaliado por Zhang *et al.* (2008b). Os autores observaram que os COV, concorrentemente, desregulado *HKT1* (expressão de alta afinidade *K transporter1*) nas raízes, mas regulado positivamente em rebentos, resultam em menor acumulação ao longo da planta (ZHANG *et al.*, 2008b).

Segundo Teixeira (2007), alguns isolados bacterianos avaliados como promotores de crescimento de plantas apresentaram especificidade ao clone de eucalipto empregado, indicando-se, com isto, que os isolados que promovem o crescimento de uma espécie de planta podem ser ineficazes em outras.

Um dos exemplos mais importantes de especificidade é a simbiose leguminosa-rizóbio, que requer comunicação molecular entre os componentes da interação, não só antes, como também, durante a invasão do microsimbionte, sendo que a especificidade do hospedeiro é determinada por vários fatores e a do rizóbio é determinada, principalmente, por sinais moleculares, como os fatores *nod*, os polissacarídeos e as proteínas secretadas (FAUVART; MICHIELS, 2008).

A FBN em leguminosas consiste, essencialmente, de dois processos distintos e complementares: a nodulação (nod) e a fixação do nitrogênio (fix), propriamente dita. A nodulação é um processo complexo, que se inicia logo após a germinação da semente, com a presença do rizóbio no solo ou aderido a semente. Resumidamente, o processo envolve três etapas principais: pré-infecção; infecção e desenvolvimento nodular; e ativação e funcionamento do nódulo. Os eventos que precedem a infecção (pré-infecção) caracterizam-se por uma complexa cadeia de sinais moleculares, desencadeados pela planta hospedeira. Durante a germinação, a planta plântula de feijão promove uma intensa exsudação de compostos fenólicos, caracterizados como flavonas, flavononas, flavonóides e isoflavonóides e xantonas, que atuam na bactéria ativando os genes específicos da nodulação (*genes nod*) presentes no plasmídeo (*pSym*) do rizóbio do feijoeiro (HUNGRIA; PHILLIPS, 1993; CASSINI; FRANCO, 2006).

A partir da ativação, o rizóbio passa a produzir uma série de compostos denominados fatores *nod*, caracterizados como lipo-oligosacarídeos, que interagem com os pelos radiculares das raízes, modificando-lhes a estrutura e a morfologia, induzindo um curvamento e adequando-os para a adesão das células de rizóbios (YUEN *et al.*, 1995).

Após essa adesão inicial, o rizóbio dissolve a fina parede celular do pelo absorvente modificado, conseguindo penetrar até as células corticais e formar uma estrutura especial denominada cordão de infecção. No interior dessa estrutura, multiplicam-se as células do rizóbio. Ao atingir a região cortical, o rizóbio passa para o interior das células corticais, adaptando-se à nova função de fixação do nitrogênio, sendo, nesse estágio, denominado bacteróide. As células corticais da planta hospedeira também respondem a essa infecção, produzindo uma série de proteínas específicas denominadas *nodulinas*. Dentre essas nodulinas, destaca-se a *Leg-hemoglobinas* (Lhb), que, especificamente, confere uma cor avermelhada ao interior dos nódulos radiculares. Após essa série de eventos complexos, a estrutura nodular está apta a funcionar como um verdadeiro órgão de fixação de nitrogênio; no feijão, a fixação já ocorre de 15 a 20 dias, após a emergência das plantas (CASSINI; FRANCO, 2006).

Perret *et al.* (2000) citam que a especificidade representa a habilidade de uma estirpe de rizóbio provocar a nodulação e/ou fixar N_2 , quando associada a cultivares ou espécies do hospedeiro específico, sendo, por isso, uma importante característica a ser considerada em programas de seleção de novas estirpes.

Considera-se que a relação simbiótica é muito específica, devido às bactérias e plantas realizarem uma troca de sinais moleculares que regulam a expressão de genes para a infecção e desenvolvimento dos nódulos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Diante disso, vários trabalhos buscam a maximização da eficiência simbiótica entre plantas e estirpes de *Bradyrhizobium*, visando à obtenção de incrementos na produtividade das culturas (SOUZA *et al.*, 2008).

Referências

- AIRA, M. *et al.* Plant genotype strongly modifies the structure and growth of *maize* rhizosphere microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 2276-2281, 2010.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUINONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 215-237, 2003.
- ARAUJO, F. F.; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. Controle genético, químico e biológico de Meloidoginose na cul-

tura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, p. 220-224, 2012.

ARSHAD, M.; SALEEM, M.; HUSSAIN, S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 356-362, 2007.

BAIS, H. P. *et al.* The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233-266, 2006.

BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C.M. J.; VAN LOON, E. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 97, p. 239-243, 2007.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11-18, 2009.

BERGSMA-VLAMI, M.; PRINS, M. E.; RAAIJMAKERS, J. M. Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, n.1, p. 59-69, 2005.

BEVER, J. D.; PLATT, T. G.; MORTON, E. R. Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, p. 265-83, 2012.

BOUCHER, Y. *et al.* Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 283-328, 2003.

CAI, Z. *et al.* Exudation: An expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. **Plant cell reports**, v. 31, n.3, p. 461-477, 2012.

CARVALHAIS, L. C. *et al.* Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed). **Feijão**. Viçosa: Ed UFV. 2006. p.149-150.

CHEN, Y. P. *et al.* Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilization capabilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, n.1, p. 33-41, 2006.

CIANCIO, A. *et al.* **Transcriptome changes in tomato roots during colonization by the endophytic fungus *Pochonia chlamydosporia***. In: Abstr. 5th Congress, Federation of the European Microbiologists Societies (FEMS), July 21-25, 2013, Leipzig, Germany. 2013.

COMPANT, S.; CLEMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-78, 2010.

COMPANT, S. *et al.* Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

COMPANT, S. *et al.* Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia*

sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1685–1693, 2005.

CONN, V. M.; WALKER, A.R.; FRANCO, C. M. M. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 2, p. 208–18, 2008.

CONTESTO, C. *et al.* Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Science**, v. 175, n. 1-2, p. 178–189, 2008.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* *Trichoderma virens*, a fungus beneficial to plants, increases biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 2009.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!** 3. ed. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, v.3. 750p, 2004.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n.1, p. 227–43, 2012.

DUNKEL, M. *et al.* SuperScent-a database of flavors and scents. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 291-294, 2009.

FARAJZADEH, D. *et al.* Growth promotion characterization of indigenous Azotobacteria isolated from soils in Iran. **Current Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 397-403, 2012.

FAUVART, M.; MICHIELS, J. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. **FEMS Microbiology**, v. 285, n.1. p. 1-9, 2008.

FRANCHE, C.; LINDSTROM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 35–59, 2009.

FRANKOWSKI, J. *et al.* Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. **Archives of Microbiology**, v. 176, n. 6, p. 421–426, 2001.

GAMALERO, E. *et al.* Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, n. 3, p. 459–467, 2008.

GESHEVA, V. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, n.1, p. 85-88, 2002.

GHERBAWY, Y. *et al.* Molecular screening of *Streptomyces* isolates for antifungal activity and family 19 chitinase enzymes. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 459–68, 2012.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology**

Letters, v. 251, n. 1, p. 1–7, 2005.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, **Scientifica**. p.1-15, 2012._

GLICK, B. R. *et al.* Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 329–339, 2007.

GOLINSKA, P.; DAHM, H. Antagonistic properties of *Streptomyces* isolated from forest soils against fungal pathogens of pine seedlings. **Dendrobiology**, v. 69, p. 87-97, 2013.

GÖTZ, C. *et al.* Uptake, degradation and chiral discrimination of N-acyl-D/L-homoserine lactones by barley (*Hordeum vulgare*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 5, p. 1447-1457, 2007.

GUTTMAN, D.; MCHARDY, A. C.; SCHULZE-LEFERT, P. Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n.12, p.797-813, 2014.

GRAÇAS, J. P. *et al.* Microrganismos estimulantes na agricultura. **Série Produtor Rural**, v. 59, 56 p., 2015.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 117–153, 2003.

HAMMAMI, I. *et al.* Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, n.3, p. 253–260, 2009.

HAO, D. *et al.* AC3-33, a novel secretory protein, inhibits Elk1 transcriptional activity via ERK pathway. **Molecular Biology Reports**. v. 38, p. 1375- 1382, 2011.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 5, p. 637–657, 2010.

HUNGRIA, M.; PHILLIPS, D. A. Effects of a seed color mutation on rhizobial nod gene inducing flavonoids and nodulation in common bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n.4, p. 418-422, 1993._

INNEREBNER, G.; KNIEF, C.; VORHOLT, J. A. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3202–3210, 2011.

JALILI, F. *et al.* Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 6, p. 667- 674, 2009.

JOG, R. *et al.* Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. **Microbiology**. v. 160, n. 4, p. 778–788, 2014.

- JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M. N. Plant and endophyte relationships: nutrient management. **Comprehensive Biotechnology**, v. 4, p. 713–727, 2011.
- JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. Metabolites from soil bacteria affect plant water relations. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 189–192, 2003. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/Metabolites-from-soil-bacteria-affect-plant-water-relations.pdf. Acesso em: 06 ago. 2022.
- KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, n.1, p. 29–43, 2007.
- KIM, Y. C. *et al.* An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 4, p. 373–382, 2008.
- KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 131–52, 2012.
- KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, n. 9, p. 1781–804, 2008.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12, 2010. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/233140814.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2022.
- LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.48, n.1, p. 113–121, 2008.
- LEMANCEAU, P. *et al.* Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1, p. 513–535, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 95–112.
- LONG, S. R. Genes and signals in the *Rhizobium* legume symbiosis. **Plant Physiology**, v. 125, n.1, p. 69–72, 2001.
- MA, J. F. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 4, p. 267–281, 2005.
- MA, W.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5891–5897, 2004. _
- MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 21, p. 1057–1062, 2005.
- MATHESIU, U. *et al.* Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. **Procee-**

dings of the National Academy of Sciences EUA. v. 100, n. 3, p. 1444-1449, 2003.

MAZURIER, S. *et al.* Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium wilt*. **ISME Journal**, v. 3, n. 8, p. 977–991, 2009.

MCLAUGHLIN, M. J. *et al.* The chemical nature of P accumulation in agricultural soils—implications for fertiliser management and design: an Australian perspective, **Plant and Soil**, v. 349, n. 1-2, p. 69-87, 2011.

NASCIMENTO, F. X. *et al.* *Mesorhizobium ciceri* LMS-1 expressing an exogenous ACC deaminase increases its nodulation abilities and chickpea plant resistance to soil constraints. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, n.1, p. 15–21, 2012b.

NASCIMENTO, F. *et al.* Enhanced chickpea growth promotion ability of a mesorhizobia expressing an exogenous ACC deaminase gene. **Plant and Soil**, v. 353, n. 1-2, p. 221–230, 2012a.

NAVEED, M. *et al.* Rhizobacteria containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat under fertilized conditions. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 3, p. 1231–1241, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/236179070_Rhizobacteria_containing_ACC-Deaminase_for_improving_growth_and_yield_of_wheat_under_fertilized_conditions/link/00463521f23dc2cc30000000/download. Acesso em: 10 ago. 2021.

NEWTON, W. E. Fixação de nitrogênio em perspectiva. In: PEDROSA, F. O., *et al.* editores. **Fixação de Nitrogênio: de Moléculas a Produtividade de Colheita**. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht: 2000. p. 3–8.

ONOFRE-LEMUS, J. *et al.* ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6581–6590, 2009.

ORTÍZ-CASTRO, R. *et al.* The role of microbial signals in plant growth and development. **Plant Signaling e Behavior**. v. 4, n. 8, p. 701–712, 2009.

ORTÍZ-CASTRO, R.; MARTÍNEZ-TRUJILLO, M.; LÓPEZ-BUCIO, J. N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell e Environment**, v. 31, n. 10, p. 1497-1509, 2008.

PANHWAR, Q. A. *et al.* Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, n.11, p. 2711-2719, 2012. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/100662>. Acesso em: 16 ago. 2021.

PARSEK, M. R. *et al.* Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. **Proceedings of the National Academy of Sciences EUA**, v. 96, n. 8, p. 4360-4365, 1999.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1 p. 180-201, 2000.

PIETERSE, C. M. J. *et al.* Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308–316, 2009.

- PRUSTY, R.; GRISAFI, P.; FINK, G. R. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, n. 12, p. 4153-4157, 2004.
- QIAO, J. *et al.* Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 12, 2014.
- RAFFA, R. B. *et al.* Bacterial communication (“quorum sensing”) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 2, p. 417-423, 2005. DOI:
- RAMACHANDRAN, V. K. *et al.* Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. **Genome Biology**, v. 12, p. 106, 2011.
- READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum Sensing: The Many Languages of Bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n.1, p. 1-11, 2006.
- RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 989-996, 2011.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319–339, 1999.
- RODRÍGUEZ, H. *et al.* Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**, v. 287, p. 15–21, 2006.
- RODRÍGUEZ, H. *et al.* Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, 2004.
- ROVIRA, A. D. Interactions between plant roots and soil microorganisms. **Annual Review Microbiology**, v. 19, p. 241-266, 1965.
- SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, p. 1-30, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/284340739_Plant_growth_promoting_rhizobacteria_a_critical_review . Acesso em: 16 ago. 2021.
- SALAMONE, I. E. G.; HYNES, R.K.; NELSON, L. M. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 404–411, 2001.
- SALAMONE, I. E. G.; HYNES, R. K.; NELSON, L. M. Role of Cytokinins in Plant Growth Promotion by Rhizosphere Bacteria. In: Siddiqui, Z.A. (eds) **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. p. 173–195, 2005.
- SALEEM, M. *et al.* Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 635-648, 2007.
- SCHUHEGGER, R. *et al.* Induction of systemic resistance in tomato by rhizosphere bacteria producing N-acyl-L-homoserine lactone. **Plant, Cell e Environment**, v. 29, n. 5, p. 909-918, 2006.

- SCOTT, R. A. *et al.* Long- and short-chain plant-produced bacterial N-acyl-homoserine lactones become components of phyllosphere, rhizosphere, and soil. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 3, p. 227-239, 2006.
- SHAH, J. Plants under attack: systemic signals in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 459–464, 2009.
- SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 155-159, 2006.
- SHARMA, S. B. *et al.* Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springerplus**, v. 2, n. 587, p. 1–14, 2013.
- SHIMIZU, M. Endophytic actinomycetes: biocontrol agents and growth promoters. **Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Responses**. p. 201–220. 2011.
- SHRIDHAR, B. S. R. Nitrogen Fixing Microorganisms. **International Journal of Microbiological Research**, v. 3, n. 1, p. 46-52, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285755879_Review_nitrogen_fixing_microorganisms. Acesso em: 18 jul. 2021).
- SOSA, J. A. DE J.; OLIVARES, F. L. Plant growth promotion by *Streptomyces*: ecophysiology, mechanisms and applications. **Chemical Biological Technologies Agriculture**, v. 3, n. 24, 2016.
- SOUZA, R. A. *et al.* Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 71-82. 2008.
- SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 3, n. 4, 2011.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.
- STEIDLE, A. *et al.* Visualization of cell-to-cell communication mediated by the lactone N-acylhomoserine among the bacteria that colonize the tomato rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5761-5770, 2001.
- TEIXEIRA, D. A. *et al.* Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.1, p.118- 123, 2007.
- TSAVKELOVA, E. A. *et al.* Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117–126, 2006.
- VERHAGEN, B. W. M. *et al.* The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 8, p. 895–908, 2004.

- VESPERMANN, A.; KAI, M.; PIECHULLA, B. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 17, p. 5639-5641, 2007.
- VINALE, F. *et al.* *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n.1, p. 1-10, 2008.
- RAD, U. V. *et al.* Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. **Planta**, v. 229, n. 1, p. 73-85, 2008.
- VURUKONDA, S. S. K. P.; GIOVANARDI, D.; STEFANI, E. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 952, 2018.
- WEI, H.; ZHANG, L. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, n. 2, p. 267- 280, 2006.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v.287, p. 3–14. 2006.
- YANG, J.; KLOPPER, J. W.; RYU, C. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n.1, p. 1–4, 2009.
- YASUDA, M. *et al.* Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 12, p. 2595–9, 2009.
- YUEN, J. P. Y. *et al.* Xanthone induction of Nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **Symbioses**, v. 19, p. 131-40, 1995.
- ZEHR, J. P. *et al.* Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.
- ZHANG, H. *et al.* Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 226, n. 4, p. 839-851, 2007.
- ZHANG, H. *et al.* Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 6, p. 737-744 2008b.
- ZHU, J. *et al.* Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n.20, p. 5398-5405, 1998.

FUNGO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO

Eloane Daize Gomes Dallastra¹

Francisca Maria Pinheiro de Sousa²

Eskálath Morganna Silva Ferreira³

Lina Maria Grajales Aguledo⁴

Juliana Fonseca Moreira da Silva⁵

Introdução

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o Brasil é responsável por 1/5 do consumo mundial de agrotóxicos, o que o torna o maior consumidor de agrotóxicos produzidos no mundo, sendo que este consumo anualmente tem sido superior a 300 mil toneladas. Nos últimos 40 anos, houve um aumento no consumo de até 700% (ANVISA, 2022).

De acordo com Parra *et al.* (2002), atualmente, o controle biológico assume importância cada vez maior em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), principalmente, em um momento que se discute muito a produção integrada rumo a uma agricultura sustentável (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Além disso, é importante como medida de controle para manutenção de pragas abaixo do nível de dano econômico.

As vantagens da utilização de microrganismos entomopatogênicos como agentes de controle biológico para o controle de pragas são a especificidade e a seletividade desses agentes de controle, bem como a facilidade de multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais e a diminuição do impacto ambiental pois proporciona a redução drástica no uso de pesticidas químicos com isto reduz a toxicidade ao homem e outros organismos não alvos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Atualmente, diversos problemas ambientais e de resistência às pragas têm sido relatados associados, principalmente, ao uso excessivo de pesticidas químicos. Essa crescente problemática tem impulsionado o interesse na exploração de fungos para uso no controle de diversas pragas invertebradas e além de doenças de plantas (LEGER, 2020). Desse modo, a utilização e o desenvolvimento de metodologias, como o uso de agentes de controle biológico, têm se potencializado, visando a produção de alimentos com maior segurança, livres de resíduos químicos e que atendam as exigências dos consumidores por alimentos mais saudáveis (SANTOS *et al.*, 2016; MORANDI; BETTIOL, 2009).

Portanto, o aumento da aplicação da técnica de controle biológico tem se intensificado e, dentre os agentes de biocontrole utilizados, os fungos entomopatogênicos são amplamente aplicados em todo o mundo e têm sido objeto de intensa pesquisa por mais de 100 anos. Apesar do uso desses organismos representar apenas 1% do mercado total de produtos para proteção de plantas, nos últimos anos, um número significativo de pesquisas

1 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: eloanedaize@hotmail.com

2 Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: franpinheiros@gmail.com

3 Docente do curso de gestão em Agronegócio, Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: eskalath.ms@unitins.br

4 Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: grajales@uft.edu.br

5 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: julianafmsilva@uft.edu.br

promoveu o aumento da quantidade de produtos disponíveis e ampliou as perspectivas para o mercado. Esses fungos podem infectar artrópodes na natureza e ocorrer em níveis enzoóticos ou epizooticos em suas populações de hospedeiros (MORA *et al.*, 2017).

O primeiro estudo de controle microbiano com um fungo entomopatogênico foi realizado em 1879, por Ilya Metchnikoff, onde foi empregado *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de um curculionídeo, importante praga da beterraba (ALVES, 1998). Hoje, esse microrganismo é, mundialmente, conhecido e utilizado como agente biocontrolador de inúmeras pragas agrícolas (ALVES, 1992; ZAPPELINI, 2009). No Brasil, vem sendo utilizado no controle de insetos, que podem estar presentes em lavouras e pastagens das regiões Norte, Sul (OLIVEIRA *et al.*, 2000), Nordeste (DE FARIA; MAGALHÃES, 2001), Centro-Oeste e no cerrado brasileiro (DE FARIA; MAGALHÃES, 2001).

Assim, o fungo *M. anisopliae* é avaliado como um excelente candidato a implementação em diversos programas de controle biológico, que variam desde o controle de insetos a fitopatógenos de plantas. É o fungo entomopatogênico estudado em termos de dados bioquímicos/moleculares e aplicação à engenharia genética. Possui uma ampla importância de regulação diferencial de seus genes, que codificam enzimas hidrolíticas, proteínas da parede celular, toxinas, proteases, peptídeos antimicrobianos e outras moléculas, o que o torna um bioagente controlador de virulência elevada. Pode ser resistente às altas temperaturas e podem ser ainda facilmente produzidos em condições laboratoriais, o que possibilita sua produção em larga escala (ONOFRE *et al.*, 2002). Entre as principais vantagens da utilização do *Metarhizium anisopliae*, no controle biológico de insetos pragas, está a facilidade de produção das suas unidades infectivas em escala comercial, facilidade de aplicação em condições de campo, o baixo custo decorrido de sua utilização e, principalmente, o reduzido impacto ambiental.

Baseado na ampla gama de aplicações e estudos desenvolvidos por *M. anisopliae*, o presente capítulo visa descrever o seu emprego como agente de controle biológico, além de suas interações com o hospedeiro e principais aplicações.

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

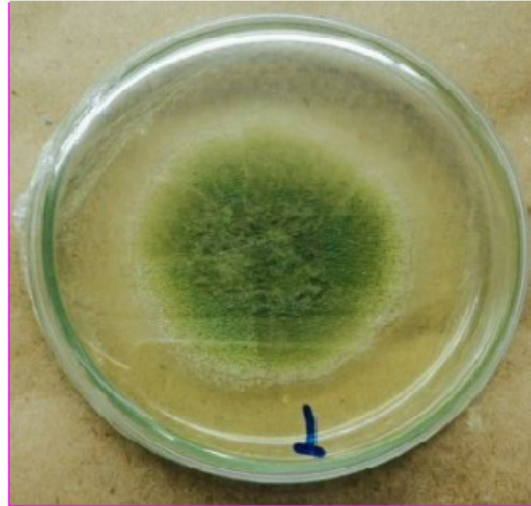
Metarhizium anisopliae é um fungo filamentoso (WANG *et al.*, 2002), descrito como entomopatogênico (ORLANDELLI; PAMPHILE, 2011), ou seja, que ocasiona doenças em insetos, principalmente, espécies de importância agrícola. O primeiro registro do gênero foi descrito a partir de um isolado obtido na Ucrânia, em 1879, por Ilga Metschnikoff, que o isolou de larvas infectadas de besouro *Anisoplia austríaca* e recebeu, inicialmente, a denominação de *Entomophthora anisopliae*. No entanto, em 1883, foi classificado por Sorokin como *Metarhizium anisopliae* (VEGA *et al.*, 2009).

M. anisopliae é um fungo anamorfo da classe Ascomycota, família Clavicipitaceae (ANVISA, 2011). De acordo com Driver *et al.* (2000), o gênero *Metarhizium* apresenta três espécies, divididas em dez variedades: *M. anisopliae*, variedades *anisopliae*, *majus*, *lepidiotum* e *acridum*; *M. flavoviride*, variedades tipo E, *flavoviride*, *minus*, *novazealandicum* e *pemphigum*; e *M. álbum*. E, mais recentemente, foi descrita na China uma nova variedade de *M. anisopliae*, *dcjhyium* (DONG *et al.*, 2009).

A colônia fúngica caracteriza-se por apresentar micélio hialino e septado, conidióforos dos quais surgem conídios uninucleados e cilíndricos, com tamanho entre 3 e 18 µm de comprimento (Figura 1) (SOUZA, 2007; SCHAMNE, 2010; MUNIZ, 2015). Ao infectar o hospedeiro, forma-se uma massa micelial que os recobre com uma

coloração variável, do verde claro a escuro, acinzentados ou esbranquiçados com manchas verdes (ALVES, 1998; GUIMARÃES, 2012), sendo a doença ocasionada ao inseto hospedeiro, conhecida como muscardine verde (ALVES, 1998; SCHAMNE, 2010).

Figura 1. Colônia esporulada de *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura Ágar Batata Dextrose.



Fonte: Elaborado pelos autores.

O *M. anisopliae* é uma espécie de fungo que apresenta uma ampla distribuição na natureza, sendo encontrado desde regiões tropicais às regiões temperadas, podendo ser isolado a partir do solo, da rizosfera de plantas, como saprófitos em cadáveres de artrópodes ou parasitando insetos e carrapatos, ou seja, sendo considerado uma espécie de fungos ubíquos (BISCHOFF *et al.*, 2009). Essa espécie de fungo já foi isolado de uma variedade de ecossistemas e acredita-se que possa infectar cerca de 300 espécies diferentes de insetos (SCHOLTE *et al.*, 2004; SOUZA, 2007; RAMANUJAM *et al.* 2014), possuindo imensa eficácia contra gafanhotos, tripes, moscas brancas e carrapatos.

Por serem encontrados nos mais variados tipos de ambientes na natureza, possui importantes papéis em todos ambientes que são encontrados, como endófitos, promotores de crescimento de plantas e principalmente antagonistas de patógenos de plantas (SARVEN *et al.*, 2020). Assim sendo, é um dos fungos mais estudados e bem descritos a nível de controle biológico (FARIA; WRIGHT, 2007; LEGER *et al.*, 2011; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

***Metarhizium anisopliae* e mecanismo de ação**

O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, assim como suscetibilidade do hospedeiro alvo (ALVES, 1998). Os fungos patogênicos de insetos têm que enfrentar vários desafios, ao infectar o hospedeiro, a fim de produzir novos esporos infecciosos suficientes para manter-se em populações viáveis. Para que uma transmissão seja bem-sucedida, esta requer a liberação de um grande número de esporos pelo fungo, ao qual se inicia o mecanismo de infecção, que envolve a fixação do esporo à cutícula do inseto, seguido da germinação do esporo, penetração da cutícula e disseminação interna no hospedeiro. Os fungos atacam seus hospedeiros de forma percutânea, onde os esporos viáveis são re-

tidos por contato na superfície do tegumento e a fixação se dar devido à hidrofobicidade dos conídios, bem como das superfícies cuticulares (MORA *et al.*, 2017).

A germinação ocorre quando o conídio encontra condições favoráveis, tais como umidade, temperatura, condições nutricionais, requisitos químicos e físicos na cutícula, e produzem estruturas de penetração, como tubos germinativos e apressórios, que se ligam para iniciar a formação do tubo germinativo e, assim, penetrar pelos poros ou as camadas mais externas da epicutícula do inseto. Uma vez que um conídio se fixou na cutícula, um apressório pode se formar no final do tubo germinativo. O apressório é a estrutura de infecção, a partir da qual ocorre a penetração no hospedeiro (MORA *et al.*, 2017).

Ao mesmo tempo, o fungo excreta um grande número de enzimas, incluindo proteases, quitinases, chitobiases, lipases, lipoxigenases e outras enzimas hidrolíticas, degradando a cutícula e fornecendo nutrientes ao fungo (BARRANCO-FLORIDO *et al.*, 2002; MORA *et al.*, 2017).

Durante o processo de infecção, os fungos entomopatogênicos produzem enzimas proteolíticas e toxinas, enquanto os insetos hospedeiros respondem com reações de defesa celular e humoral. Entre as toxinas produzidas por *M. anisopliae*, as destruxinas são as mais estudadas, pelo seu modo de ação, que envolve a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas em células de insetos (MORA *et al.*, 2017). Após uma penetração bem-sucedida, o fungo produz corpos hifais, que proliferam no interior do corpo do inseto (PUCHETA *et al.*, 2006).

Posteriormente, os corpos de hifas invadem a epiderme e a membrana basal, respectivamente, e são distribuídos na hemocele. Assim que ocorre o crescimento das na hemocele do inseto, esse crescimento fúngico passa a induzir os sintomas fisiológicos de anormalidades no inseto, como convulsões, falta de coordenação, alteração do comportamento e paralisia. A morte resulta de uma combinação de efeitos que compreendem o dano físico aos tecidos, toxicidade, desidratação das células, devido à perda de fluido e consumo de nutrientes (BUSTILLO, 200; MORA *et al.*, 2017).

Com o esgotamento dos nutrientes, as hifas emergem na superfície iniciando a formação de esporos. O período de incubação depende do hospedeiro, do estágio hospedeiro, da temperatura e da virulência da cepa do fungo (OUEDRAOGO *et al.*, 2003). Após a morte do hospedeiro, o fungo inicia sua fase reprodutiva, em condições favoráveis de umidade, produzindo conídios na superfície externa do cadáver. Porém, em condições muito secas, o fungo pode persistir no estágio de hifal (KHACHATOURIANS, 1996; OUEDRAOGO *et al.*, 2003).

O mecanismo de infecção de *M. anisopliae* é muito complexo e ainda requer mais estudos. É um mecanismo extremamente especializado e o conhecimento da relação inseto-fungo é essencial, para elucidar seu mecanismo de ação, visto que o grande potencial que esse fungo possui no manejo de pragas na agricultura representa uma alternativa eficiente na substituição de inseticidas químicos.

Controle biológico utilizando *M. anisopliae*

O controle biológico é uma técnica que consiste em utilizar um organismo para controlar a população de outro organismo alvo (ERTHAL JUNIOR, 2011). Os fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* estão sendo cada vez mais utilizados com o objetivo de diminuir as aplicações de pesticidas químicos (POLANCZYK; ALVES, 2006). Possuem vantagens de não representarem riscos mínimos para organismo não alvos, como abelhas, minhocas, que são os principais provedores de serviços ecossistêmicos, e inimigos naturais de artrópodes, como vespas pa-

rasitas e besouros predadores (POTRICH *et al.*, 2009; POLANCZYK *et al.*, 2010; LACEY *et al.*, 2015).

O sistema produtivo agrícola tem buscado cada vez mais conciliar os métodos que conservem os recursos naturais e forneçam produtos de qualidade para o consumo humano, com níveis de resíduos de agrotóxicos e contaminantes, em conformidade com o que estabelece a legislação sanitária (MAPA, 2018). Atualmente, se discute uma produção integrada que visa uma agricultura sustentável e, desta forma, o controle biológico assume importância cada vez maior (LACEY *et al.*, 2001). Pois, em geral, observa-se maior segurança no uso de ferramentas biológicas, apesar dos agrotóxicos ocuparem ainda o lugar principal em relação ao volume total de aplicações (MAZID *et al.*, 2011).

Como mencionado, entre os impactos negativos da aplicação de pesticidas na agricultura está o impacto que as abelhas vêm sofrendo, nesse contexto, muitos estudos da aplicação de agentes de controle biológico vem sendo realizados. Akkoç *et al.* (2019) estudaram a aplicação de fungos entomopatogênicos, a exemplo do *Metarhizium anisopliae*, em abelhas *Apis mellifera* L. e *Bombus terrestris* L., e não observaram nenhum efeito prejudicial dos entomopatógenos, em que o número de abelhas vivas não foi significativamente diferente do grupo de controle. Por outro lado, quando comparado ao uso do inseticida clorpirifos-etil, foi observada a morte de todos os indivíduos de ambas as espécies de abelhas.

Em outros estudos, em que foi avaliada a aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* contra o ácaro *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), presente em colmeias e causador de danos econômicos aos apicultores, foi observada a queda do número de insetos alvo, sem registrar a mortalidade das abelhas presentes (RODRÍGUES *et al.*, 2011). Yuliani (2016) testou *Metarhizium anisopliae* no combate à doença de Tungro, uma doença das plantas de arroz na Indonésia, transmitida por cigarrinhas *Nephotettix virescens*, e observou que *M. Anisopliae* e o extrato da planta *A. paniculata* não afetaram adversamente as pragas de insetos não alvo, como Chironomidae e inimigos naturais de *Nephotettix virescens*.

Os principais projetos de controle de pragas envolvendo *M. anisopliae*, no Brasil, visam a supressão de pragas como a cigarrinha-da-folha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*) (ALVES, 1998; FARIA; MAGALHÃES, 2001), percevejos das pastagens (Deois) (PEREIRA *et al.*, 2008), broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) (OLIVEIRA *et al.*, 2008), gafanhotos (*Rhammatocerus schistocercoides*) (MAGALHÃES *et al.*, 2004), besouro do grão do trigo (*Anisoplia austríaca*) (LEGER, 2004), carrapatos de impacto na pecuária, como *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (BEYS DA SILVA *et al.*, 2010; QUINELATO *et al.*, 2012; ANGELO; BITTENCOURT, 2013).

Os sintomas causados pela patogenia do fungo nos insetos infectados são inquietação, perda da sensibilidade, descoordenação dos movimentos e paralisia, devido aos metabólitos secundários produzidos que afetam os canais de resposta muscular e na estrutura da membrana celular, assim, as toxinas liberadas levam o inseto à morte, período que varia de 5 a 12 dias, dependendo das condições ambientais (temperatura, luz, umidade e radiação ultravioleta), condições nutricionais e suscetibilidade do inseto (ALVES, 1998).

Diversos trabalhos científicos têm demonstrado o uso de *M. anisopliae* para o controle das mais variadas pragas em distintas culturas, como demonstra o trabalho desenvolvido por Peng *et al.* (2020), que investigaram o potencial da cepa fúngica *M. anisopliae* CQMa421 no controle de cigarrinhas do arroz em condições de campo e seus efeitos na microbiota do arroz. Observando que o fungo suprimiu as cigarrinhas do arroz e sua eficiência de controle foi superior a 60% e não diferiu significativamente do tratamento químico. Raoul *et al.* (2019) observaram a interação de *M. Anisopliae*, com a redução da população de *M. sjostedti*, e o rendimento do feijão-caupi

no campo. Os resultados do estudo comprovaram que o fungo pode ser considerado um potencial inseticida no manejo e possuiu uma relação no aumento da produção dos grãos.

Em outro estudo, González *et al.* (2018) avaliaram a virulência de isolados nativos *M. anisopliae* contra adultos de *C. Sordidus*, agente ocasionador da broca da raiz da banana, os experimentos foram conduzidos em condições de laboratório e campo. O isolado testado foi capaz de reduzir as populações de *C. sordidus* em 76,9%, o que confirmou a eficácia do fungo entomopatogênico.

Outro exemplo da aplicação de *M. anisopliae* é contra a formiga cortadeira *Atta cephalotes*, que apresenta alto impacto na agricultura. Arismendy e Peralta (2011) realizaram estudos comparando a ação da aplicação do fungo ao uso de inseticidas químicos. Os resultados mostraram que *M. anisopliae* foi eficaz no controle de colônias de *A. cephalotes* e superior ao produto químico Pirimifos Metil.

Os percevejos *Nezara viridula* (Linnaeus) e o *Dichelops melacanthus* (Dallas) são considerados os principais insetos-pragas na cultura do trigo no Brasil. Groth *et al.* (2017) verificaram a patogenicidade de diferentes isolados de *M. anisopliae* sobre esses insetos praga e observaram que a aplicação do entomopatógeno constitui uma alternativa promissora de controle de adultos de *N. viridula* ou *D. melacanthus* na cultura do trigo.

Em um outro estudo realizado por Batta (2018), foi observado que este fungo causou a morte de adultos de caruncho-do-trigo, *Sitophilus granarius*, um inseto que causa sérios danos aos grãos armazenados, podendo destruir todos os grãos das safras de cereais.

Com o objetivo de obter uma ação mais rápida e a utilização de produtos estáveis, Fernández-Grandon *et al.* (2020) combinaram um inseticida botânico e o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* e avaliaram a eficácia contra o pulgão do feijão, *Aphis fabae*. Os resultados mostraram que a mortalidade dos afídeos foi superior do que quando aplicado os dois produtos em separado ou quando comparado com a não aplicação de nenhum dos tratamentos, indicando o potencial de pesticidas bioracionais que combinam botânicos com fungos entomopatogênicos.

Além dos efeitos significativos sobre diversas pragas, estudos recentes da capacidade antagônica de *Metarhizium* spp. a diversos fitopatógenos vem demonstrando resultados promissores (SIQUEIRA, 2016; SASAN; BIDOCHKA, 2013; KEYSER *et al.*, 2014). Sarven *et al.* (2020), ao utilizar cepas do fungo *M. anisopliae* contra o fitopatógeno *B. cinerea*, principal agente etiológico do mofo cinzento, demonstrou eficácia de controle significativa da doença pós colheita em tomate e os dados obtidos comprovaram uma redução de 78% de *B. cinerea* onde foi utilizado uma concentração tratada de 10% de *M. anisopliae* (SARVEN *et al.*, 2020).

Esses achados sugerem que *M. anisopliae* possui um grande potencial como agente de biocontrole contra o mofo cinzento em tomate, pois esta doença leva a graves perdas financeiras, não só no cultivo do tomate, como também em outras culturas.

Outro estudo do controle biológico de pragas em tomateiro foi o realizado por Erol *et al.* (2020), onde os autores compararam o efeito da aplicação de diversos bioinseticidas comerciais, incluindo o fungo *M. anisopliae*, com o inseticida ingrediente ativo *Spinetoram*, contra o bicho-mineiro do tomate, larvas de *Tuta absoluta* (MEYRICK, 1917) (*Lepidoptera: Gelechiidae*). Neste estudo, entre os bioprodutos testados o fungo *M. anisopliae* foi o que apresentou melhores resultados quanto a taxa de mortalidade do inseto alvo, ficando atrás somente do controle químico.

No setor de hortaliças, foi testado o efeito de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em

Plutella xylostella (L.) (*Lepidoptera*: Plutellidae), uma das principais pragas do repolho, causadora de graves perdas às culturas crucíferas. A aplicação dos isolados, por meio de três métodos de inoculação, suprimiu a população de *P. xylostella* em folhas de repolho, sendo que, dentre os métodos testados, o método de aplicação foliar apresentou a maior mortalidade (BATHINA, 2020). Outro exemplo da aplicação deste fungo é no controle de *Crociodolomia pavonana* Fabricius (*Lepidoptera*: Pyralidae), que é uma importante praga de hortaliças da família Brassicaceae (NURAIDA, 2016).

Lopez *et al.* (2017) avaliou o controle do oídio ocasionado por *Leveillula taurica*, um dos fungos fitopatogênicos mais prevalentes e prejudiciais às plantações de pimenta, e observaram que *M. anisopliae* reduziu a gravidade da doença a um nível semelhante ao de um controle químico e pode ser eficaz no controle. Outro trabalho semelhante é o estudo do efeito da aplicação de metabólitos secundários de quatro fungos entomopatogênicos, incluindo o *M. anisopliae*, contra a doença de pimenta causada por vírus. Os resultados obtidos por Soesanto *et al.* (2020) mostraram que os metabólitos secundários brutos de *M. anisopliae* reduziram o período de incubação e a intensidade da doença viral.

O controle biológico com a aplicação do fungo *M. anisopliae* também vem sendo estudado na área da veterinária. Kasburg *et al.* (2016) avaliaram a ação do fungo *Metarhizium* e outros fungos entomopatogênicos contra o ácaro vermelho de aves domésticas *Dermanyssus gallinae*, importante praga presente em aviários e que causa danos econômicos. Os resultados nesse campo se mostraram promissores, uma vez que o produto químico, geralmente, utilizado não apresenta bons resultados e deixa resíduos nos ovos.

Outro exemplo de estudo nessa área é a aplicação desse fungo no controle de mosquitos vetores de doenças bovinas e equinas, como o vírus da língua azul e da doença equina africana de importância internacional. Os estudos de Ansari (2011) mostraram que, entre os fungos entomopatogênicos testados, a cepa V275 de *Metarhizium anisopliae* foi a mais virulenta, causando uma diminuição significativa na sobrevivência dos insetos. O trabalho realizado por Rodriguez-Vivas *et al.* (2014), avaliou a eficácia de *M. anisopliae* no controle de carrapatos, *Rhipicephalus microplus*, em bovinos infestados naturalmente, e os resultados demonstraram que a eficácia do tratamento pode ser utilizada como alternativa para o controle da infestação natural de *R. microplus* em bovinos.

Na área da saúde, o fungo *M. anisopliae* tem-se mostrado eficiente contra diversos vetores. Paula *et al.* (2011) estudaram a aplicação da combinação desse fungo em conjunto com o inseticida Imidacloprid, contra o vetor da dengue, *Aedes aegypti* (*Diptera*: Culicidae), e observaram a alta taxa de mortalidade após tempos de exposição relativamente curtos. Indriyati *et al.* (2019), também, tiveram resultados positivos ao testar a aplicação de formulações de *M. anisopliae* e azeite de oliva contra *Aedes aegypti*, onde foi observada mortalidade de 100% e a capacidade do fungo em infectar o mosquito em várias fases tanto adultos, ovos e larvas.

A avaliação da aplicação do fungo *M. anisopliae* foi realizada também no combate ao vetor da malária, *Anopheles gambiae*, os resultados obtidos por Mnyone *et al.* (2010) mostraram uma taxa de mortalidade significativa nos mosquitos expostos aos esporos deste entomopatógeno. Resultados promissores foram encontrados também por Willem *et al.* (2011). Relacionado ao controle de outra doença, Ngumbi *et al.* (2011) estudaram a patogenicidade de *M. anisopliae* (Metch) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill para *Phlebotomus duboscqi* adulto, vetor da leishmaniose, e concluíram que a aplicação desses fungos entomopatogênicos pode resultar em mortalidade aguda dos flebotomíneos e redução da transmissão parasitária e, consequentemente, redução do risco de leishmaniose.

Globalmente, *M. anisopliae* tem sido usado como ingrediente ativo no desenvolvimento de micoaseticidas e micoacaricidas, utilizados para combater pragas em diversos países. Um exemplo é BIO 1020, um micoinseticida desenvolvido pela Bayer, Alemanha, que contém *M. anisopliae* como ingrediente ativo para combater pragas da espécie Coleoptera.

Outros exemplos de aplicações do *M. anisopliae* é no controle biológico do gorgulho vermelho da palmeira, que causa prejuízos econômicos em várias espécies de palmeiras (CHEONG; AZMI 2020); dos percevejos de bronze, *T. peregrinus*, um inseto sugador de seiva, que causa grandes perdas em plantações de eucalipto (SOLIMAN *et al.*, 2019); dos ácaros da tamareira que são pragas importantes que infestam severamente os frutos nutritivos e valiosos da tamareira (HUSSIAN; ALJABR, 2020); e contra o besouro *Xylosandrus germanus* uma das pragas mais significativas em pomares de avelã, onde o *M. anisopliae* causou 100% de mortalidade ao final do 8º dia de testes (TUNCER *et al.*, 2019). Outro estudo recente foi o realizado por Kumhar *et al.* (2020), que demonstrou o papel deste fungo no manejo de doenças e pragas de insetos na plantação de chá, onde foi possível observar o controle do ácaro vermelho e cupim nesse tipo de plantação (KUMHAR *et al.*, 2020).

Considerações finais

A parte básica do controle biológico é controlar quaisquer pragas agrícolas e seus insetos que possam transmitir doenças a partir de uso de inimigos naturais, que vão desde insetos benéficos, predadores, até mesmo, microrganismos, como os fungos que estão entre os agentes de biocontrole mais utilizado no mundo.

Esses fungos entomopatogênicos exercem a função de controle de insetos em ambientes naturais e ecossistemas agrícolas, ocupando um lugar relevante na manutenção do equilíbrio ecológico. Nos últimos anos, o seu uso vem se intensificando, com vantagens em muitas situações, em substituição aos produtos químicos. No atual cenário do agronegócio brasileiro, o crescimento da agricultura orgânica, aliado às exigências de alimentos isentos de agrotóxicos por parte do mercado consumidor, vem propulsionando o avanço e desenvolvimento de estudos e produtos biológicos para controle dessas pragas que deterioram os produtos, tendo como base a substituição de materiais químicos que são prejudiciais à saúde dos consumidores.

Trata-se de um método de controle racional e sadio, que não deixam resíduos nos alimentos e são inofensivos ao meio ambiente e à saúde da população. Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados neste controle biológico via microrganismos. Dentre eles, a espécie *M. anisopliae* possui uma variedade de estudos com os mais diferentes usos e testes, sendo que depende da análise prévia da quantidade a ser aplicada para cada inseto praga, assim como outros fatores, como horário ideal de ser aplicado.

Uma porcentagem alta da produção de *M. anisopliae* têm sido utilizada para o controle de grupos de insetos, como as cigarrinhas da cana-de-açúcar (50%) e as cigarrinhas das-pastagens (30%) e os outros 20% vêm sendo empregados contra gafanhotos, percevejos e outros insetos.

Portanto, as pesquisas envolvendo esses agentes de controle focalizam-se em fatores ambientais e biológicos, que afetam diretamente a interação inseto-hospedeiro e também a persistência e estabilidade dos patógenos, após a introdução no ambiente e sua capacidade de não afetar à planta por ser um produto natural.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. *et al.* Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América latina, p.69-110. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba, Fealq, 2008, p. 414.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. FEALQ: Piracicaba, 1998.
- ALVES, S. B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, 1992.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. **Consulta Pública nº 46**, de 22 de setembro de 2011. Brasília, 2011. Disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em: 10 set. 2022.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. **Consulta Pública nº 46**, de 22 de setembro de 2011. Brasília, 2011. Disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em: 15 set. 2020.
- BUSTILLO, A. Hongos en insectos y posibilidades de uso em el control biológico de plagas en Colombia. In: **Seminário Uso de entomopatógenos en Colombia**. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, 2001.
- DE FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 22, p.18-21, 2001.
- DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v.104, n.2, p.134-150, 2000.
- DONG, C. *et al.* Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *Dcjhium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. **Microbiological Research**, v.164, p.27-35, 2009.
- GUIGÓN LÓPEZ, C. *et al.* (Control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) using *Trichoderma asperellum* and *Metarhizium anisopliae* in different pepper types. **BioControl**. 2018.
- NEGRETE GONZÁLEZ, *et al.* Adequação de *Cordyceps bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle biológico de *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) em uma plantação de banana mexicana orgânica: testes de laboratório e de campo. **J Plant Dis Prot**, v. 125, p. 73–81, 2018.
- ORLANDELLI, R. C. PAMPHILE, A. J. Fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. Sabios: **Revista de Saúde e Biologia**, Maringá, v. 6, n. 2, p. 79-82, 2011.
- SANTOS, P. de S. Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales). 2017, 77 f. **Tese** (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.
- SARVEN, M. S. *et al.* Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium Anisopliae*. **Pathogens**, v. 9, p. 213, 2020.
- LEGER, R. J. S. *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interactions. In: VURRO, M., GRESSEL, J. **Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management**. NATO Se-

curity through Science Series. Springer, Dordrecht, 2007.

MORANDI, A. B. M.; BETTIOL W. In: BETTIOL W.; MORANDI, A. B. M. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, cap. 1, 371 p.

OLIVEIRA, M. A. P. *et al.* Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 220-224, 2008.

OLIVEIRA, L.J. *et al.* **Percevejo castanho da raiz em sistema de produção de soja**. Embrapa Soja. Circular Técnica, 28). Londrina, PR, 2000, 44 p.

VEGA, F. E. *et al.* Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, p. 149 – 159, 2009.

WANG, C.; TYPAS, M. A.; BUTT, T. M. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 213, n. 2, p. 251-255, 2002.

ZAPPELINI, L. O. Seleção de Isolados dos Fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* visando o controle da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). 2009. 67 f. **Dissertação** (Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, São Paulo, 2009.

TIPOS DE CONTROLE ALTERNATIVOS PARA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS

Mirelle Ribeiro Araújo¹

Eskálath Morganna Silva Ferreira²

Michelle Marinho dos Santos Mineli³

Raphael Sanzio Pimenta⁴

Juliana Fonseca Moreira da Silva⁵

Introdução

As micotoxinas são substâncias produzidas por fungos, que são tóxicas para os vertebrados e outros grupos de animais em baixas concentrações. Estas são produzidas por meio do metabolismo secundário de cepas toxigênicas de fungos filamentosos e até o momento não possuem significância bioquímica estabelecida (ZAIN, 2011).

Essas substâncias são encontradas frequentemente, contaminando cereais, amendoim, leite e produtos lácteos, café, vinho, cerveja, sementes de algodão, frutas frescas e secas, legumes, nozes, dentre outros produtos alimentícios (PASCARI *et al.*, 2018).

A contaminação dos produtos ocorre, principalmente, devido às más condições de armazenagem. Segundo Elias (2003), o armazenamento do produto, associado a uma sequência de operações, tais como limpeza, secagem, tratamento fitossanitário, transporte, classificação, tem como intuito preservar as qualidades físicas e químicas desde a colheita, até o abastecimento. Caso não se tenha boas práticas bem estabelecidas, isso facilitará o desenvolvimento de microrganismos nos alimentos, sobretudo, de fungos filamentosos (WIELOGÓRSKA *et al.*, 2016; BENTO *et al.*, 2012).

As micotoxinas possuem baixo peso molecular e são estáveis devido às altas temperaturas e aos baixos valores de pH, o que dificulta sua remoção dos alimentos, mesmo sendo processados. Estes são um grupo estruturalmente diversificado de substâncias e variam de compostos simples a muito complexos. Uma cepa fúngica pode ser capaz de produzir diferentes tipos de micotoxinas e diferentes espécies de fungos podem produzir a mesma substância micotoxigênica (DARWISH *et al.*, 2014).

Diversas micotoxinas já são reconhecidas, tais como (aflatoxinas, fumonisinas, tricoteceno, zearalenona, pitrinina, patulina, ocratoxina A, dentre outras), e representam milhões de dólares anualmente em perdas em todo o mundo.

Devido aos impactos gerados à saúde humana e animal, as micotoxinas ocasionam perdas de vidas humanas, custos veterinários, perda de produção de gado, perda de forragens e alimentos, custos regulatórios e custos de pesquisa focados em diminuir o impacto e a gravidade do problema das micotoxicoses (HUSSEIN; BRASEL,

1 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: mirellera84@gmail.com

2 Docente do Curso de Gestão em Agronegócio, Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: eskalath.ms@unitins.br

3 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (Unitins). E-mail: michelmineli@gmail.com

4 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). Email: biorapha@yahoo.com.br

5 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: julianafmsilva@uft.edu.br

2001).

As micotoxicoses, que são as intoxicações ocasionadas pela ingestão de micotoxinas, podem ser categorizadas como aguda ou crônica. A toxicidade aguda, geralmente, tem um início rápido e uma resposta tóxica óbvia, enquanto a toxicidade crônica é caracterizada pela exposição a baixas doses por um longo período de tempo (ZAIN, 2011; PFLIEGLER *et al.*, 2015).

As micotoxicoses são um problema mundial, devido à sua alta incidência e níveis de ocorrência na alimentação humana e animal. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), cerca de 25% dos alimentos e rações para animais podem estar contaminados com micotoxinas. Dentre estas, as aflatoxinas são um tipo de micotoxinas bastante conhecida, pois são derivadas de algumas estirpes de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, presentes em muitas culturas agrícolas (ALSHANNAQ; YU, 2017).

As aflatoxinas são substâncias muito estáveis, o que lhes confere elevada resistência aos métodos de processamento por aquecimento, sendo assim, também, consideradas como toxina de risco em alimentos processados (MARIN *et al.*, 2013). Portanto, devem ser rigorosamente monitoradas tanto em produtos de origem animal, quanto naqueles de origem vegetal (AMELIN *et al.*, 2013), sobretudo, a detecção da aflatoxina B1 que ocorre com maior frequência e são consideradas de alta toxicidade (GUPTA *et al.*, 2017).

Desse modo, o presente capítulo visa descrever a utilização de alternativas para controlar as micotoxinas em grãos e visa descrever a importância desses processos, devido ao elevado potencial carcinogênico das micotoxinas em humanos e animais.

Aflotoxinoses

As Aflatoxicoses são doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas, que são metabólitos secundários tóxicos, produzidos, naturalmente, por várias espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e, em particular, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (AMAIKE; KELLER, 2011; UDOMKUN *et al.*, 2017).

As substâncias produzidas por esses fungos podem ser classificadas em duas classes de estrutura química distintas, os difurocumarociclopentenona (AFB1 e AFB2) e os difurocumarolactona (AFG1 e AFG2). Os termos usados para classificação “B” e o “G” utilizados na identificação dos grupos (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) referem-se às cores azul e verde, produzidas pelas aflatoxinas sob luz UV, enquanto os números “1” e “2” indicam compostos maiores e menores, respectivamente (AMAIKE; KELLER, 2011).

O primeiro grupo das AFBs, normalmente, são produzidas por *A. parasiticus* e a aflatoxina B1 é considerada a de maior preocupação para os órgãos de controle em saúde. A aflatoxina B1 é reconhecida como cancerígeno para humanos (IARC, 2012), sendo sua toxicidade gerada a partir da indução de carcinoma hepatocelular, um câncer que possui uma alta taxa de mortalidade. Essa substância também é reconhecida como: teratogênica, genotóxica e citotóxica para muitos tipos de células (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

A doença aguda pode causar morte, seu quadro se inicia após 6 horas da ingestão da micotoxina e seus sintomas incluem apatia, presença de sangue nas fezes, tremores musculares, hipertermia (até 41°C) e a doença crônica desencadeia alterações patológicas mais prolongadas, como o câncer e imunossupressão. Muitas vezes, a aflatoxicose aguda se manifesta como hepatite aguda, pois o principal órgão afetado pela aflatoxina B1 é o fígado (MURRAY *et al.*, 2006).

Tipos de controle alternativo na produção de aflatoxinas

Contribuição biológica

Tradicionalmente, o controle de micotoxinas pode ser realizado durante as fases de pré e pós-colheita e dentre as estratégias que podem ser utilizadas para prevenção do desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos, dentre as diferentes estratégias estabelecidas pode se citar: uso de cultivares resistentes de plantas; cuidados na colheita, transporte e armazenagem; proteção contra insetos e controle ambiental, especialmente, controle da temperatura, atmosfera e umidade. Outros tipos de controle também são utilizados, como o uso de substâncias químicas e o uso de controle biológico (PRADO *et al.*, 2011).

O controle biológico de fungos aflatoxigênicos é uma estratégia muito promissora e já demonstra alto potencial no controle da produção de aflatoxinas em alimentos (DARWISH *et al.*, 2014; PIMENTA *et al.*, 2008), que consiste na redução de uma população-alvo (patógenos, parasitas, competidores, vetores, etc.) por outra população ou comunidade. Muitas pesquisas demonstraram que alguns microrganismos, como fungos e leveduras, podem controlar o crescimento e a produção de aflatoxinas em *Aspergillus* sp. (PERSONS *et al.*, 2013; PRADO *et al.*, 2011; PATIL *et al.*, 2014; BHATNAGAR-MATHUR *et al.*, 2015).

Normalmente, o controle biológico de fungos aflatoxigênicos foi realizado com a aplicação de cepas não toxigênicas de *A. flavus* e/ou *A. parasiticus* no campo em pré-colheita ou utilização de leveduras e bactérias na pós-colheita e durante armazenamento (BHATNAGAR-MATHUR *et al.*, 2015; PIMENTA *et al.*, 2010).

No entanto, esta estratégia possui algumas limitações, devido às possibilidades de uma instabilidade genética, cujo fungo pode se tornar aflatoxigênico, onde ocorre a conversão da linhagem não aflatoxigênica para aflatoxigênica e devido ao fato da cepa antagonista ainda ser um forte patógeno que pode reduzir o valor das sementes por colonização e produção de lesões nos substratos (OLARTE *et al.*, 2010).

Muitas espécies de bactérias e fungos, como *Flavobacterium aurantiacum*, *Corynebacterium rubrum*, *Candida lipolitica*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Armillariella tabescens*, *Nurospora* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., dentre outras demonstraram degradar enzimaticamente as micotoxinas (BATA; LASZTITY, 1999; CIEGLER *et al.*, 1966). No entanto, permanece a questão da toxicidade de produtos de degradação enzimática e efeitos indesejados de fermentação com microrganismos não nativos na qualidade do alimento.

Uso de microrganismos probióticos

O termo probiótico é derivado do grego, que significa “para a vida”. A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) afirmaram que há evidência científica adequada com o objetivo de indicar que há potencial para alimentos probióticos, a fim de fornecer benefícios para a saúde e que as cepas específicas são seguras para uso humano (FDA, 2001; REID, 2003).

Certas cepas de Bifidobactérias, bactérias produtoras de ácido láctico e Propionibactéria, têm estruturas de parede celular que podem ligar as micotoxinas (YOON; BAECK, 1999) e limitam sua biodisponibilidade no corpo. As cepas bacterianas, como *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*, foram encontradas e podem ser altamente eficaz contra OTA e patulina, respectivamente (FUCHS *et al.*, 2008).

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas utilizando as bactérias ácido-láticas (BAL), que são caracterizadas como

produtoras de ácido láctico, gram-positivas, não esporogênicas e negativas para catalase e oxidase (ONILUDE *et al.*, 2005). O uso dessas bactérias, como agente antibacteriano e antifúngico, também, é avaliado para substituir métodos físicos e químicos, que alteram a qualidade e características de alimentos, sendo eficazes no controle de toxinas (GOURAMA; BULLERMAN, 1995; MAGNUSSON *et al.*, 2003).

A ação de BAL pode minimizar riscos de diversos tipos de contaminantes, e tem sido uma das formas de controle de aflatoxinas por métodos biológicos mais utilizados, como confirmam os estudos desenvolvidos por diversos autores, que comprovam que o recurso a estas cepas probióticas removem e/ou inativam as formas de aflatoxinas (M1 e B1) impedindo a sua adsorção pelas células intestinais do consumidor (FUCHS *et al.*, 2008; FAZELI *et al.*, 2009; BOVO *et al.*, 2010; DALIÉ *et al.*, 2010; GRANATO *et al.* 2010; EL-KHOURY *et al.*, 2011; GERBALDO *et al.* 2012; SERRANO-NINO *et al.*, 2013; ANNUZIATA; VECCHIO, 2013).

Leveduras para o controle de Aflatoxinas

Tradicionalmente, o controle biológico pós-colheita faz uso de leveduras, que são os organismos mais utilizados, devido possuírem várias características intrínsecas, capacidade de rápida colonização e sobrevivência em superfície vegetal por um longo período de tempo e, em diferentes condições ambientais, raramente, produz substâncias químicas antagonistas e são menos afetadas por pesticidas, isso as tornam um bom candidato para o desenvolvimento de protocolos de controle biológico (DROBY *et al.*, 2009; PIMENTA *et al.*, 2009).

O controle de micotoxinas, utilizando microrganismos, é uma das estratégias bem conhecidas para o manejo de micotoxinas em alimentos e rações. Entre os diferentes potenciais microrganismos descontaminantes, os *Saccharomyces cerevisiae* e *S. boulardii* são espécies interessantes, devido à sua utilização anterior em rações e produtos alimentícios (SILVA *et al.*, 2015; SHETTY; JESPERSEN, 2006).

As espécies de leveduras podem ser definidas como generalistas ou especialistas, dependendo de sua ocupação de habitat e perfis fisiológicos. Levedura generalista tem a capacidade de utilizar os diversos compostos de carbono e podem sobreviver e crescer em diferentes ambientes. As leveduras especializadas têm um perfil fisiológico simples e obtêm energia apenas a partir de poucos compostos de carbono e essa limitação restringe sua amplitude de habitat, contudo, permite um crescimento mais rápido (MORAIS *et al.*, 1995; ABRANCHES *et al.*, 2000; ROSA; PÉTER, 2006).

Muitas espécies de leveduras, como *Aureobasidium pullulans*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces spp.*, *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomycopsis spp.*, *Saccharomyces cerevisiae* e *S. boulardii*, foram testadas quanto à capacidade de suprimir o crescimento micológico e limitar a produção de micotoxinas em alimentos, como uvas, grãos de café, cereais, amendoim e laticínios (PERSONS *et al.*, 2013).

Persons *et al.* (2013) observaram que *A. flavus* e *A. parasiticus* foram inibidos por *S. cerevisiae* em diferentes temperaturas, mas como a concentração de levedura diminuiu, os efeitos inibitórios foram diminuídos. Das seis concentrações de levedura testadas em três regimes de temperatura, a *S. cerevisiae* foi mais efetiva na inibição do crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* nas menores diluições e na menor temperatura.

Prado *et al.* (2011) relacionaram as capacidades de *S. cerevisiae* para reduzir a concentração de aflatoxinas em grãos de amendoim. Os autores observaram que a inibição das aflatoxinas foi resultado de um mecanismo do tipo *quorum sensins*, uma vez que a concentração de células fúngicas (levedura mais fungos filamentosos) in-

fluenciou a produção de aflatoxina no substrato. Muitos autores afirmam que um mecanismo que pode explicar a redução da aflatoxina pelo agente de biocontrole (levedura antagonista) é a ligação entre a toxina / parede celular.

No entanto, as metodologias para avaliar a concentração de aflatoxinas nos experimentos utilizam diferentes substâncias e processos para extrair as aflatoxinas dos substratos, inclusive da parede celular da levedura. No entanto, o mecanismo exato pelo qual a levedura limita a produção de aflatoxinas por *Aspergillus* ainda é pouco conhecido.

Outros métodos de controle de micotoxinas

Diversas abordagens foram desenvolvidas para a descontaminação de micotoxinas em alimentos. Embora muitas abordagens estejam disponíveis para a descontaminação, a maioria delas não está amplamente disponível, devido ao alto custo ou às dificuldades práticas envolvidas no processo de desintoxicação (ALIABADI *et al.*, 2013; SHETTY *et al.*, 2006).

Grandes esforços têm sido feitos para descontaminar alimentos pelo uso de adsorventes físicos e químicos, porém o sucesso obtido até agora é limitado (PATIL *et al.*, 2014; SHETTY; JESPERSEN, 2006).

O processo de descontaminação deve: 1) inativar, destruir ou remover a micotoxina; (2) não resultar na deposição de substâncias, metabólitos ou subprodutos tóxicos nos alimentos ou rações; (3) reter valor nutricional e capacidade de alimentação do produto ou mercadoria; (4) não resultar em alterações significativas das propriedades tecnológicas do produto; (5) destruir esporos de fungos. Além desses critérios, os processos devem estar prontamente disponíveis, ser facilmente utilizados e baratos. As estratégias envolvem métodos, principalmente, na fase pós-colheita e são utilizados métodos físicos, químicos e biológicos para inativar, destruir ou remover as micotoxinas (GALVANO *et al.*, 2001; PATIL *et al.*, 2014).

Métodos Físicos

Separação mecânica: os níveis de toxinas diminuem, à medida que o produto é limpo e fisicamente separado dos grãos contaminados, a separação é feita da forma eletrônica ou manualmente.

Processamento de alimentos: a maioria das micotoxinas é estável à temperatura ambiente. O processamento de alimento é importante para diminuir a concentração inicial de micotoxinas. Alguns exemplos de processamento: moagem úmida, maltagem na fabricação de cerveja, cozimento e secagem na produção de óleo são métodos para reduzir as micotoxinas. Estudos afirmam que a autoclavagem a 132°C por 5 horas reduz a concentração de ocratoxina em 85% (MADSEN *et al.*, 1983).

Separação de densidade: a segregação de grãos contaminados e sementes oleaginosas envolve a classificação e delineamento de grãos bons versus contaminados por flutuação. Esse método pode diminuir notavelmente várias concentrações de micotoxinas em grãos contaminados.

Etapa de lavagem: consiste na utilização de água para a remoção das camadas externas do pericarpo dos grãos antes do processamento de cereais, resultando em uma queda de 50% na concentração de ocratoxina.

Irradiação: a irradiação gama ou eletrônica é altamente eficaz para destruir os esporos dos fungos. Os raios fluorescentes ou ultravioletas (UV) decompõem as aflatoxinas e ocratoxinas. A aplicação de luz UV, por 20 minu-

tos, a 25° C, na presença de peróxido (0,05%), diminuiu a concentração de aflatoxina M1 no leite contaminado. A exposição simples de grãos contaminados à luz solar (UV) reduz substancialmente os níveis de micotoxinas (PATIL *et al.*, 2014).

Carvão ativado: Geralmente, a absorção das propriedades do Carvão Ativado é estritamente dependente dos materiais de origem e dos parâmetros físicos, como área de superfície. *In vitro*, tem alta capacidade de ligação com várias micotoxinas e a propriedade de adsorção já foi relatada como eficaz contra a aflatoxina B1 e ocratoxina em até 95% e 91%, respectivamente, durante estudos *in vitro* realizados por Galvano *et al.* (2001).

Métodos Químicos

Agentes antifúngicos: agentes antimicóticos, como ácido sórbico e sorbato; ácido propiónico e propionato, ácido benzóico, benzoatos e parabenos; e o ácido acético e seus derivados são os produtos químicos que impedem o crescimento de fungos e interferem na produção de micotoxinas. 1% de ácido propiônico inibe a produção micotoxigênica de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *P. viridicatum* e de micotoxinas em milho armazenado (VANDEGRAFT *et al.*, 1975). Na silagem, a incorporação de 0,2% de sorbato de potássio, 0,7% de metil parabeno e 0,2% de propionato de sódio inibiu completamente o crescimento de fungos (TONG; DRAUGHON, 1985). A fosfina foi eficaz na inibição do crescimento de fungos e produção de toxinas. O sorbato de potássio foi muito eficaz e inibiu completamente a produção de aflatoxina e ocratoxina nos níveis 0,1 a 0,2% e 0,10 a 0,15%, respectivamente. Ervas e especiarias, como cravo, óleo de canela, mostarda, pimenta da Jamaica, alho e orégano, mostraram ter fortes propriedades antimicóticas (BULLERMAN *et al.*, 1977). Baixa concentração de oxigênio (<1%) e/ou concentrações aumentadas de outros gases (por exemplo, 90% CO₂) diminuem o crescimento de fungos e a formação de micotoxinas.

Ozonização: Ozônio (O₃) gás, um poderoso oxidante é um químico não persistente, o que significa que se decompõe muito rápido. Dentro de 20 minutos, metade do ozônio é decomposto em oxigênio (em meio ambiente aquoso). Vários estudos indicam que o ozônio degrada aflatoxinas em milho e farelo de algodão e também degrada as micotoxinas desoxinivalenol e a moniliformina (PATIL *et al.*, 2014).

Hidróxido de sódio: o aquecimento de grãos a temperatura de 105°C, na presença de 0,5% de hidróxido de sódio tem ocasionado a desintoxicação de micotoxinas no alimento (PATIL *et al.*, 2014).

Degradação estrutural: numerosos produtos químicos, incluindo ácidos, bases, aldeídos, bissulfitos, oxidantes agentes e vários gases, foram testados para sua capacidade de degradar ou desintoxicar AFB1 e outras micotoxinas. Embora a maioria deles possa destruir as micotoxinas. Não devem ser utilizados devido à geração de produtos tóxicos e à alteração de qualidade do produto (PATIL *et al.*, 2014).

Colestiramina: estudos indicaram que colestiramina (CHA), uma resina de permuta iônica, com forte afinidade pelos sais biliares, foi encontrado contra a nefrotoxicidade induzida por OTA em ratos. CHA adicionado à dieta (5%) reduziu a concentração de OTA no plasma (até 50%) e aumentou a eliminação por meio das fezes, diminuindo a quantidade excretada na bile e na urina (KERKADI *et al.*, 1998). Isso foi encontrado para ser um adsorvente eficaz de OTA no trato gastrointestinal de ruminantes (MADYASTHA *et al.*, 1992).

Silicato de Aluminossilicato de Sódio Hidratado (HSCAS): a superfície molecular do HSCAS fica saturada com água e atrai a estrutura polar de várias micotoxinas (SANTIN *et al.*, 2002; GIRISH; DEVEGOWDA, 2006). Em

frangos jovens de corte, HSCAS (0,5%) foi eficaz em reduzir a toxicidade da aflatoxina (HARVEY *et al.*, 1993; ABO-NORAG *et al.*, 1995), bem como toxicidade combinada com OTA (HUFF *et al.*, 1974).

Polivinilpolipirrolidona: Polivinilpolipirrolidona, uma resina sintética, a 0,4g / kg pode se ligar a 50g / kg de AFB1 na alimentação. A melhora parcial foi relatada contra a AFB1, quando administrada com bentonita em frangos de corte (KECECI *et al.*, 1998).

Aspartame: Aspartame (*L-aspartil-L-fenilalanina* éster metílico), um análogo estrutural da OTA e fenilalanina, foi demonstrado que tem efeito contra a citotoxicidade induzida pela OTA em animais (CREPPY *et al.*, 1998). O aspartame impede efeitos citotóxicos da OTA, incluindo a inibição da síntese protéica, peroxidação lipídica e vazamento de certas enzimas, como a lactato desidrogenase, gama glutamil transferase e fosfatase alcalina (BAUDRIMONT *et al.*, 1997).

Proteínas brutas: elevando os níveis de proteína da dieta de 14-18% a 22-26% contra os efeitos da OTA (GIBSON *et al.*, 1989). Os frangos de corte alimentados com dieta contendo 5 ppm de aflatoxina, aumentando a proteína de 20 a 30%, aliviaram o crescimento e efeitos depressivos da aflatoxina (SMITH *et al.*, 1971). Algumas proteínas protegem contra os efeitos negativos da OTA (BAILEY *et al.*, 1989), presumivelmente, devido ao aumento da concentração de fenilalanina na dieta de frangos. O aumento da proteína bruta da dieta ajuda a aliviar, mas não elimina os efeitos adversos da ocratoxina A. No entanto, aumentar os níveis de proteína é uma abordagem de alto custo para o controle de micotoxinas.

Lipídios dietéticos: Inclusão de óleo de algodão a 2, 6 ou de 16% em dietas semi-purificadas, contendo 10 ppm aflatoxina, não somente melhorou o peso corporal dos frangos, mas também, a mortalidade que foi significativamente reduzida (SMITH *et al.*, 1971). Lanza *et al.* (1981) avaliaram o efeito de uma variedade de lipídeos (azeite, óleo de coco, óleo de cártamo e gordura animal) nas concentrações de 2 e 16% em dietas, contendo 10 ppm de aflatoxina e observaram uma redução da mortalidade e, em alguns casos, uma melhora nos pesos corporais dos frangos.

Os lipídios, em partes, exercem seus efeitos, interferindo com a absorção da aflatoxina. A suplementação com azeite e óleo de cártamo (fontes de ácidos graxos insaturados), também, melhorou o peso, que sugere que dietas contendo os maiores níveis de ácido linoléico melhoraram a conversão alimentar e menor mortalidade em frangos alimentados com dietas com aflatoxina (LANZA *et al.*, 1981).

Substâncias antioxidantes: os antioxidantes possuem propriedades protetoras, devido à sua capacidade de agir como ânion superóxido catalizadores, protegendo, assim, as membranas celulares ao dano induzido por micotoxinas (PATIL *et al.*, 2014).

Ácido Ascórbico (Vitamina C): tem sido usado para reagir diretamente com superóxido, hidroxila oxigênio radical e singlet, além de dirigir supressão do radical livre reativo. A adição de vitamina C à dieta contendo OTA, pode, parcialmente, proteger contra o efeito tóxico (HAAZELE *et al.*, 1993).

Compostos fenólicos: os antioxidantes fenólicos, ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatecuico, 4-ácido hidroxibenzóico, catequina, ácido cafeico e ácido clorogênico foram eficazes contra o crescimento fúngico de *Aspergillus* sp. produtores de ocratoxina (PALUMBO *et al.*, 2007). Além disso, vários compostos antioxidantes foram capazes de inibir a biossíntese de aflatoxina (REVERBERI *et al.*, 2006).

Vitamina A: a vitamina A possui propriedades antioxidantes contra os danos induzidos por micotoxinas. Carotenóides, principalmente, carotenos e xantofilas presentes em cenouras, óleo de palma e milho, possuem propriedades antioxidante, antimutagênicas e anticarcinogênicas e reduzem a toxicidade da OTA (HAAZELE *et al.*,

1993).

Considerações finais

Quando ocorre a contaminação por fungos, o controle, geralmente, é feito com a aplicação de fungicidas, como os *propiconazole-Notox S/A*, *Abacus-Basf*, *cyproconazole-Syngenta*, *tebuconazol- Agralliance* e *Amistar-Syngenta*, dentre outros, no entanto, as abordagens químicas são consideradas as mais eficazes ao controle dos fungos produtores de micotoxinas.

O controle das micotoxinas, na agricultura, é de extrema importância para a saúde pública, pois se deve estar sempre atento aos seus perigos e as formas de manejo, além de buscar novas alternativas de controle, como: controles químicos, físicos e biológicos. Todavia, esses esforços contínuos são impedidos por limitações nestas áreas, como a escassez de financiamento de pesquisa e tecnologia em muitos institutos e universidades que poderiam facilitar esse controle em vários países.

Referências

- ABO-NORAG, M.; EDRINGTON, T. S.; KUBENA, L. F.; Harvey RB and Phillips TD. Influence of a hydrated sodium calcium aluminosilicate and virginiamycin on aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, 74: 626-632. 1995.
- ABRANCHES, J. *et al.* The yeast community and mycocin producers of guava fruit in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycologia**, V. 92: p. 16-22. 2000.
- ALIABADI, M. A. *et al.* Biological Control of Aflatoxins. **European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 2, p. 162-166. 2013.
- AMELIN, V. G.; KARASEVA, N. M.; TRETYAKOV, A. V. Simultaneous Determination of Trichothecene Micotoxins, Ochratoxin A, and Zearalenone in Grain and Products of Its Processing, Feed Premixes, and Meat by Gas Chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**. Vol. 68, Nº. 1, pp. 61–67. 2013.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, p. 348-355, 2013.
- ALSHANNAQ, A; YU, J. H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int J Environ Res Public Health*, V. 14, n. 6, p. 632., 2017.
- BAILEY, C. A. *et al.* Ochratoxin A and dietary protein. 2. Effects on hematology and various clinical chemistry measurements. **Poultry Science**, p. 1664- 1671. 1989.
- BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by micro-organisms. **Trends Food Sci. Technol.** p. 223-228. 1999.
- BAUDRIMONT, L.; BETBEDER, A. M.; CREPPY, E. E. Reduction of the OTA induced toxicity in vero cells by aspartame. **Archives of Toxicology**, p. 290-299. 1997.
- BENTO, L. F. *et al.* Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, p. 44-

49. 2012.

BHATNAGAR-MATHUR, P. *et al.* Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops, **Plant Science**, Vol. 234, P. 119-132, 2015.

BOVO, F. *et al.* Eficiência de Bactérias Ácido-Láticas para Descontaminação de Aflatoxina M1 em Solução Tampão Fosfato, **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, [S. l.], V. 13, n. 3, p. 151-156, 2011.

BULLERMAN, L. B.; LIEU, F.Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, p. 1107-1108. 1977.

CIEGLER, A. *et al.* Microbial detoxification of Aflatoxin. Appl. **Microbiol.** p. 934 -939. 1966.

CREPPY, E.E. *et al.* Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxin A in mice. **Toxicology Letters**, p. 77-80. 1980.

DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M.; FORGET, F.R. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: review. **Food Control**, V. 21, p. 2-8, 2010.

DARWISH, M.; ABDULRAHIM, H.; MOHIELDEEN, Y. Desalination and Water Treatment. **Qatar and GCC water security**. Vol. 55. 2014.

DROBY, S. *et al.* Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm. **Postharvest Biology and Technology**. 2009.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A.; YAGHI, J. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. **Food Control**, [S.l.], V. 22, n. 10, p. 1695-1699, 2011.

ELIAS, M. C. **Armazenamento e conservação de grãos**. Pelotas: **Editora e Grafica Universitaria da UFPel**, 2003. Apostila. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA2bQAG/armazenamento-conservacao-graos>. Acesso em: 05 jul. 2019.

FAZELI, M. R. *et al.* Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**. V. 72, n. 1, p. 189-92, 2009.

FDA. FOOD Safety and inspection service. **Federal Register**. Rules and Regulations. Vol. 64, n. 246. 2001.

FUCHS, S. *et al.* Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1398-1407. 2008.

GALVANO, F. *et al.* Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in diary products marketed in Italy: Second year of observation. **Food additives and contaminants**. 2001.

GERBALDO, G. *et al.* Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. **FEMS Microbiology Letters**, n. 332, p. 27-33, 2013.

GIBSON, R. M. *et al.* Ochratoxin A and dietary protein. 1. Effects on body weight, feed conversion, relative organ weight and mortality in three week old broilers. **Poultry Science**, p. 1658-1663, 1989.

GIRISH, C. K.; DEVEGOWDA, G. Efficacy of glucomannan-containing yeast product (Mycosorb®) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, p. 877-883, 2006.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, [S. l.], V. 58, n. 11, p. 1249–1256, 1995.

GRANATO, D. *et al.* Probiotic dairy products as functional foods. **Food Science and Food Safety**, V. 9, p. 455–470, 2010.

GUPTA, J. K. S. A.; HOFMEYER, G.; VOGEL, J. P. Position in the second stage of labour for women without epidural anaesthesia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 2017.

HAAZELE, F. M. *et al.* Beneficial effects of dietary ascorbic acid supplement on hens subjected to ochratoxin A toxicosis under normal and ambient temperatures. **Canadian Journal of Animal Science**, p. 149-157. 1993.

HARVEY, R. B. *et al.* Efficacy of zeolitic ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler chickens. **Avian Diseases**, p. 6773. 1993.

HUFF, W. E. *et al.* Ochratoxicosis in the broiler chicken. **Poultry Science**, p. 1585-1591, 1974.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. **Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals**. *Toxicology*, p. 101-134, 2001.

KECECI, T. *et al.* Effects of polyvinylpyrrolidone, synthetic zeolite and Bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. **British Poultry Science**, p. 452-458, 1998.

KERKADI, A. *et al.* Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, p. 231-250, 1998.

LANZA, G. M.; WASHBURN, K. W.; WYATT, R. D. The effect of linoleic acid on broiler response to graded levels of aflatoxin. **Archiv für Geflügelkunde**, p. 206-211, 1981.

MADSEN, A.; HALD, B.; MORTENSEN, H. P. Feeding experiment with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs-3. Detoxification by ammonia heating +NaOH or autoclaving. **Acta Agriculturae Scandinavica**, p. 171-175, 1983.

MADYASTHA, M. S.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. Effect of dietary cholestyramine in the elimination of ochratoxin A in rats. **Food Additives and Contaminants**, p. 709-714, 1992.

MAGNUSSON, J.; SCHNURER, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 1-5, 2001.

MARIN, S.; RAMOS, A. J. G.; CANO-SANCHO, V. S. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food Technology Agrotecnio Center**, University of Lleida, Rovira Roure, Spain. p. 218–237, 2013.

- MORAIS, P. B. *et al.* Yeast succession in the amazon fruit *Parahancornia amapa* as a resource partitioning among *Drosophila* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4251-4257, 1995.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. Microbiologia Médica, **Elsevier**. p. 187-315, 2006.
- OLARTE, R.A. *et al.* Effect of sexual recombination on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. **Molecular Ecology**, p. 1453-1476, 2012.
- OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo. Vol. 31, Nº4, p. 417-424, Aug. 1997.
- ONILUDE, A. A. *et al.* Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. Microbial Physiology and Biotechnology Research, Department of Botany and Microbiology, University of Ibadan, Ibadan, NIGERIA. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 4 (12), p. 1404-1408, 2005.
- PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L.; MAHONEY, N. E. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. **Mycopathologia**. p. 241-248. 2007.
- PASCARI, X. *et al.* Micotoxinas e cerveja. Impacto do processo de produção de cerveja na contaminação por micotoxinas. Uma revisão. **Food Research International**, p. 121-129, 2018.
- PATIL, R.D; RINKU, S.; RAJESH, K. A. Mycotoxicosis and its control in poultry: A review. **Journal of Poultry Science and Technology**. Vol 2, p. 01-10, 2014.
- PERSONS, K.; RAINES, J.M.; RODRIGUEZ, J.M. Antagonistic effects of *Saccharomyces cerevisiae* on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* at varying temperatures, **Mycology: An International Journal on Fungal Biology**. p. 38-43, 2013.
- PFLIEGLER, W. P.; PUSZTAHELYI T.; PÓCSI, I. Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. **J Basic Microbiol**. 2015.
- PIMENTA, R.S. *et al.* Utilization of Yeasts in Biological Control Programs. In: Satyanarayana T., Kunze G. (eds) Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. **Springer**, Dordrecht, 2009.
- PIMENTA, R. S. *et al.* Integrated control of *Penicillium digitatum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis crataegensis* and sodium bicarbonate on oranges. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010.
- PIMENTA, R.S. *et al.* Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2008.
- PRADO G. *et al.* Reduction of aflatoxin B1 in stored peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Food Prot.** p. 1003–1006. 2011.
- REID, L.M. *et al.* CO441 Corn inbred line. **Canadian Journal of Plant Science**. p. 79-80. 2003.
- REVERBERI, M. *et al.* Oxidant/antioxidant balance in *Aspergillus parasiticus* affects aflatoxin biosynthesis. **Mycotoxin Research**, p. 39-47. 2006.

ROSA, C. A; PÉTER, G. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. **Springer Berlin**, 2006.

SANTIN, E. *et al.* The effects of ochratoxin/aluminosilicate interaction on the tissues and humoral response of broilers. **Avian Pathology**, p. 73, 2002.

SERRANO-NINO, J.C. *et al.* Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. **Food Control**, N.31, p. 202-207, 2013.

SHETTY, P.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science Technology**, p. 48-55. 2006.

SILVA, F.C. *et al.* Taxonomia Polifásica para Identificação de *Aspergillus* seção *Flavus*: Uma Revisão. **Revista IFES Ciência**, V.1, N. 1, p. 18-40, 2015.

SMITH, J.W.; HILL, C. H.; HAMILTON, P. B. The effect of dietary modifications on aflatoxicosis in the broiler chicken. **Poultry Science**, p. 768-774. 1971.

TONG, C. H.; DRAUGHON, F.A. Inhibition by antimicrobial food additives of ochratoxin A production by *Aspergillus sulphureus* and *Penicillium viridicatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1407-1411, 1985.

VANDEGRAFT, E. E.; HESSELTINE, C.W.; SHOTWELL, O.C. Grain preservatives: effect on aflatoxin and ochratoxin production. **Cereal Chemistry**, p. 79-84, 1975.

WIELOGÓRSKA, E.; MACDONALD, S.; ELLIOTT, C. T. A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. **World Mycotoxin Journal** 9. p. 419-433. 2016.

YOON, Y.; BAECK, Y.J. Aflatoxin binding and antimutagenic activities of *Bifidobacterium bifidum* HY strains and their genotypes. **Korean Journal of Dairy Science**. p. 291-298. (1999).

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. Medical Laboratory Sciences Dept., College of Applied Medical Sciences, Al-Kharj University, Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**. Volume 15, Issue 2. p. 129-144. April 2011.

A UTILIZAÇÃO DO MINIVIDAS® PARA AVALIAR A EFICIÊNCIA DO PROCESSO DE LAVAGEM EM CILINDRO ROTATÓRIO PARA A ELIMINAÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. EM PESCADO

Catharina do Couto Caetano Costa¹

Cecília Marques Tenório Pereira²

Patrícia Costa Mochiaro Soares Chicrala³

Viviane Rodrigues Verdolin dos Santos⁴

Roseane Veras⁵

Juliana Fonseca Moreira da Silva⁶

Raphael Sanzio Pimenta⁷

Introdução

As demandas de mercado dos peixes têm sofrido mudanças importantes nos últimos anos, principalmente, pelo discurso fortemente embasado no paradigma epidemiológico, associando ao consumo alimentar de peixes a inúmeros benefícios à saúde (OLIVEIRA, 2013).

O pescado é um alimento que se destaca nutricionalmente, devido à sua qualidade e quantidade de proteínas, à presença de vitaminas e minerais e, sobretudo, por ser uma fonte de ácidos graxos essenciais ômega-3 eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA) (FONSECA *et al.*, 2017).

Entre os patógenos mais relacionados às infecções alimentares no mundo e que são reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos mais relevantes por seu papel na saúde pública está incluso o gênero *Salmonella* (WHO, 2021). A sorotipagem da *Salmonella* spp. é muito importante à saúde pública, à segurança alimentar, assim como ao comércio nacional e internacional de alimentos, especialmente, os que são de origem animal (LIMA *et al.*, 2016).

O sistema VIDAS® (Biomérieux), utilizado para a detecção de *Salmonella* spp., é um imunoanalisador automático de múltiplos parâmetros, sendo capaz de processar até 60 análises/hora, e utiliza o método ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) e ELFA (*Enzyme-Linked Fluorescent Assay*) (GAVA, 2012).

As indústrias de processamento de pescado necessitam dar uma atenção especial em toda linha de produção, pois a qualidade final do produto depende de um processamento, armazenamento, conservação e transporte adequado, visto que os produtos de má qualidade podem tornar-se um risco em potencial para os consumidores. Ainda há poucos estudos disponíveis sobre a presença de *Salmonella* em peixes no Brasil, consequentemente, é necessário realizar pesquisas que incluam não apenas a verificação da presença de bactérias no produto final, mas também, a verificação de toda a cadeia de produção envolvida.

1 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). Email: catharina.costa@hotmail.com

2 Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). Email: tenorioctn@gmail.com

3 Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Pesca e Aquicultura (EMBRAPA). Email: patricia.mochiaro@embrapa.br

4 Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Pesca e Aquicultura (EMBRAPA). E-mail: viviane.santos@embrapa.br

5 Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Pesca e Aquicultura (EMBRAPA). E-mail: roseane.veras05@gmail.com

6 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: julianafmsilva@mail.uft.edu.br

7 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: biorapha@yahoo.com.br

Aquicultura no Brasil e produção de Tambaqui

No ano de 2020, a produção aquícola nacional atingiu a quantia de 551,9 mil toneladas e o seu valor bruto foi de R\$5,9 bilhões. A segunda espécie de peixe mais produzida nacionalmente foi o Tambaqui (18,2% da produção), sendo responsável por R\$ 565 mil na produção (CNA, 2021).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie de peixe nativo mais produzida no Brasil. Sua rusticidade favorece a criação em sistemas diversificados, como o semi-intensivos, que abrange as barragens, viveiros e tanques, quanto em sistemas intensivos, que englobam os viveiros, e tanques com aeração mecânica, tanques-rede (CORRÊA; SOUZA; JUNIOR, 2018).

No ano de 2019, o tambaqui foi responsável por cerca de 19% da produção da piscicultura nacional, atingindo o valor de 101,9 mil toneladas, validando como a espécie nativa de maior importância para a aquicultura (IBGE, 2020).

Segurança Alimentar

Os perigos à saúde decorrentes do consumo de alimentos contaminados podem ser de origem biológica, física e química. Os de origem biológica envolvem a presença de microrganismos. Entretanto, a presença de substâncias tóxicas pode acarretar riscos de origem química à saúde humana. As bactérias compõem um dos grupos que mais são encontrados dentre os de origem química. Ao causarem deterioração, elas modificam as propriedades sensoriais dos alimentos, provocando doenças, sendo uma das mais comuns a *Salmonella typhi* (MARINS *et al.*, 2014).

Considerando que a principal via de transmissão de *Salmonella* spp. está na cadeia alimentar, sua presença em animais, criados com objetivo comercial, o torna como o mais incidente e relevante agente etiológico de enteroinfecções. Alimentos de origem animal ocupam o principal na epidemiologia das *Salmonellas* entéricas, sendo uma fonte de infecção, porém de difícil controle (BRASIL, 2011).

Alguns processos de conservação, como a salmoura ($\geq 9,0\%$) e a defumação, possuem efeito limitado na sobrevivência das *Salmonellas*, podendo resistir por vários meses na salmoura, com cerca de 20% de sal, e em produtos com altos teores de proteína e/ou de gordura. Como exemplo, temos a carne seca defumada e o pescado, onde ambos possuem a capacidade de se manterem vivos por várias semanas e até mesmo, por meses (BRASIL, 2011).

MINIVIDAS®

As metodologias tradicionais para detecção de *Salmonella* spp requer em um tempo mínimo de quatro dias para a obtenção dos resultados, porém as indústrias de alimentos necessitam de resultados em menor tempo, para reduzirem a estocagem de produtos e custos associados, assim, métodos rápidos para detecção são utilizados com frequência por causa do seu benefício de detecção rápida e eficiente, como é o caso da utilização do ensaio imunoenzimático – ELISA ELFA (ANDRADE *et al.*, 2010; BIOMERIEUX, 2020).

O VIDAS® *Salmonella* (SLM) é um teste qualitativo automatizado para utilização em aparelhos da família VIDAS® para a detecção de *Salmonella* em amostras de produtos alimentares e ambientais, utilizando a técnica

ELFA. A detecção de Salmonella, utilizando protocolos morosos, pode demorar até cinco dias, a confirmar que uma amostra é negativa.¹ Os Imunoensaios Enzimáticos (EIA), baseados em técnicas de rastreio, podem contribuir para acelerar e simplificar a detecção (BIOMERIEUX, 2020).

Material e Métodos

Obtenção dos espécimes

Exemplares de tambaqui foram doados pela Embrapa Pesca e Aquicultura, após a finalização de experimentos realizados na instituição de pesquisa. As cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 foram adquiridas da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA), da Universidade Federal do Tocantins (UFT). O experimento foi realizado no laboratório de processamento de pescado da Embrapa Pesca e Aquicultura e no LMGA da UFT.

Preparação do inóculo

As células liofilizadas foram hidratadas em tubo, contendo caldo de infusão de cérebro coração (BHI), incubadas a 37°C/24 horas. Na sequência, foram inoculadas em placas, contendo meio de cultivo BHI e mantidas a 37°C/24 horas. Após a incubação, as colônias provenientes da placa de BHI foram transferidas com o auxílio de uma alça microbiológica estéril descartável para uma solução salina estéril a 0,9%, formando uma suspensão celular que foi mensurada em espectrofotômetro DR 5000 HACH até atingir a Densidade Óptica de 0,150, em comprimento de onda = 600 nanômetros (GASPAR, 2019). A cultura de *Salmonella* foi preparada no dia da utilização.

Tipos de tratamentos

Conforme mostra a Tabela a seguir, 16 tratamentos foram realizados, consistindo na combinação de 4 concentrações de cloro (0, 2, 5 e 10 ppm), com 4 tempos de lavagem (20, 40, 60 e 120 segundos).

Tabela 1. Tratamentos realizados no tambaqui, com a quantidade de cloro e tempo utilizado em cada tratamento.

Tratamentos	Cloro (ppm)	Tempo de lavagem (s)
T1	0	20
T2	0	40
T3	0	60
T4	0	120
T5	2	20
T6	2	40
T7	2	60
T8	2	120
T9	5	20

T10	5	40
T11	5	60
T12	5	120
T13	10	20
T14	10	40
T15	10	60
T16	10	120

Fonte: Elaborada pelos autores.

Preparação da solução de água clorada

Para o preparo da água clorada, foi utilizada uma solução de hipoclorito de sódio com teor de cloro ativo mínimo 10% p/p de cloro. No preparo da água de lavagem no tanque de 500L, após 30 minutos da adição do cloro, foi feita a medição no espectrofotômetro, utilizando o kit de cloro da HACH (cloro livre reagente DPD PP 25 mL), para confirmar se os valores das concentrações em cada tanque estava conforme o esperado (2ppm, 5ppm e 10ppm).

Inoculação dos peixes

Para a contaminação experimental, os peixes foram aspergidos com o auxílio de um borrifador, contendo a solução com a cultura de *S. typhimurium*. O borrifador foi previamente higienizado com álcool a 70% e, em seguida, lavado com solução salina estéril. Dentro da câmara de fluxo laminar, na Embrapa Pesca e Aquicultura, foram aplicadas três borrifadas (± 1 mL/borrifada) de cada lado do peixe. Repetiu-se esse processo quatro vezes, para cada tratamento diferente.

Lavagem no cilindro e processamento da amostra após a lavagem no cilindro

Após a contaminação, os peixes foram inseridos no cilindro de lavagem para dar início ao processo de lavagem e, com o auxílio de um cronômetro, os peixes foram sendo retirados do cilindro giratório, conforme cada tempo estipulado e colocado em um saco estéril. Após a lavagem dos cinco peixes, foram levados para a câmara de fluxo laminar para a coleta da amostra na superfície da pele do pescado, utilizando-se um Swab estéril e um molde de 10 cm² (5cm x 2cm) para cada peixe. As amostras coletadas com Swab, foram obtidas individualmente de forma padronizada, pressionando-o contra a pele do peixe, sempre da esquerda para direita, em movimento giratório contínuo (SILVA *et al.*, 2021) por três vezes, em toda a área demarcada pelo molde, posicionado na base do opérculo sobre a linha lateral do peixe. Em seguida, o Swab foi transferido para um tubo cônico, devidamente identificado para cada amostra contendo 10 mL de água peptonada tamponada (BPW). Esse processo foi feito separadamente para cada tratamento e da menor para a maior concentração de cloro, para evitar contaminações.

Análise MINIVIDAS®

Após a lavagem, os tubos contendo BPW com Swab foram incubados em estufas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 16/22 horas. Após esse período, foi inoculado 0,1mL da amostra em 10 mL de caldo suplementado SX2 (Caldo *Salmonella* Xpress) proveniente do kit MINIVIDAS® e incubados em estufa à $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 22/26 horas, após a incubação transferiu-se 0,5 mL do caldo SX2 para o poço de amostra da barrete e aquecida por 15 ± 1 minutos. Retirou-se a barrete e deixou-se esfriar por 10 minutos, conforme o protocolo Easy Salmonella validado segundo AOAC RI (N° 020901) e AOAC Official Method Of Analysis (N° 2011.03).

Depois dos barretes terem sido esfriados, foram colocados no equipamento MINIVIDAS® (Figura 1) e foram analisados automaticamente pelo sistema informático do mesmo.

Figura 1. Analisador MINIVIDAS®..



- 1 — Indicador luminoso de funcionamento
- 2 — Bloco de cones SPR
- 3 — Secção de barretes
- 4 — Suporte de preparação de barretes
- 5 — Teclado e ecrã
- 6 — Impressora térmica
- 7 — Leitor de códigos de barras externo

Fonte: Manual do utilizador (2019).

O equipamento efetuou duas medições de fluorescência na cuvete de leitura da barrete de reagente para cada amostra testada. A primeira leitura correspondeu ao branco da cuvete, antes de o substrato entrar em contacto com o cone (SPR). A segunda leitura foi efetuada após incubação do substrato com a enzima que pode estar ligada ao interior do cone (SPR).

O cálculo do RFV (Relative Fluorescence Value) foi o resultado da diferença das duas medidas. Este cálculo apareceu na folha de resultados.

O RFV obtido para cada amostra é interpretado pelo aparelho, conforme mostra a equação a seguir:

$$\text{Valor de teste (VT)} = \frac{\text{RFV da amostra}}{\text{RFV do calibrador}};$$

Um resultado com um valor de teste inferior ao valor limiar indica uma amostra que não contém antígenos de *Salmonella* ou que contém uma concentração de antígenos *Salmonella* inferior ao limite de detecção. Um resultado com um valor do teste superior ou igual ao valor limiar indica uma amostra contaminada com *Salmonella* (Tabela 2).

Tabela 2. Limiar e interpretar os resultados.

Valor de teste	Interpretação
< 0,23	Negativo
≥ 0,23	Positivo

Fonte: Documento técnico do produto (2020).

Resultados

Na Tabela, a seguir, estão listados os resultados das análises geradas pelo sistema automatizado do equipamento MINIVIDAS®.

Como pode se observar na tabela, os tratamentos com 0 ppm de cloro (T1 – T4) e 5 ppm (T5 – T9) não foram eficazes para a eliminação da *Salmonella*. Isso já era esperado para o tratamento sem cloro (0 ppm), já que apenas a lavagem com água não é eficaz para a eliminação da *Salmonella*. Já nos tratamentos com 2 ppm de cloro, nas lavagens com o tempo 40 e 120 segundos (T6 e T8, respectivamente), houve eliminação de *Salmonella*, porém, na lavagem com 60 segundos, a 2 ppm (T7), ainda, se detectou presença de *Salmonella*. Esse fato pode ser em decorrência do manejo incorreto durante o tratamento.

Tabela 3. Resultados das análises dos tratamentos gerados pelo equipamento MINIVIDAS®.

Tratamentos	VT	Resultado
T1	2,76	Positivo
T2	3,48	Positivo
T3	2,94	Positivo
T4	0,57	Positivo
T5	3,14	Positivo
T6	0,00	Negativo
T7	3,56	Positivo
T8	0,00	Negativo
T9	4,26	Positivo
T10	1,40	Positivo
T11	3,97	Positivo
T12	2,22	Positivo
T13	4,63	Positivo
T14	3,56	Positivo
T15	3,32	Positivo
T16	0,01	Negativo

Fonte: Elaborada pelos autores.

No tratamento com 10 ppm, apenas o tempo de 120 segundos (T16) de lavagem foi eficaz para eliminar a *Salmonella*, os demais tratamentos apresentaram detecção de *Salmonella*.

Observou-se que o tratamento com 2 ppm foi eficaz, porém o de 5 ppm não eliminou a *Salmonella* em nenhum dos tempos de lavagem, esse fato pode ser em decorrência de diversos fatores, como: contaminação cruzada durante a lavagem, manejo incorreto, carga bacteriana elevada entre os tratamentos durante a inoculação no pescado.

Considerações Finais

As tecnologias que proporcionam uma análise de precisão e eficiência são cada vez mais necessárias para evitar surtos de infecção, pois comprometem a saúde pública. Os métodos tradicionais de ensaio de análises microbiológicas ainda são muito utilizados, devido sua eficiência, porém os resultados são gerados em um período longo. Apesar disso, técnicas de análises microbiológicas de teste rápido, como o MINIVIDAS®, estão sendo usadas com mais frequência nas indústrias de alimentos, já que os resultados são gerados por um período curto de tempo.

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que somente a lavagem com água potável não elimina a *Salmonella* dos pescados, sendo assim, é necessário a adição de hipoclorito na água da lavagem.

Referências

ANDRADE, R. B. *et al.* **Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares:** *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. Arquivo do Instituto Biológico. v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.

BIOMERIEUX. **Documentação técnica do produto.** 2020. Disponível em: <https://biomerieuxdirect.com/industry/Immunoassay/Immunoassay-Automated/VIDS-system/ID-Industry/Industry-Reagents/VIDAS%26reg-SALMONELLA-%28SLM%29-/p/30702>. Acesso em: 6 set. 2022.

BIOMERIEUX. **Manual do Utilizador.** 2019. Disponível em: <https://5.imimg.com/data5/RW/LW/MQ/SELLER-4682066/biomeriux-minividas-blue-immunossay-analyzer.pdf>. Acesso em: 6 set. 2022.

BRASIL. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, p. 60, 2011.

CNA, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **Comunicado Técnico**, Pesquisa Pecuária Municipal 2020. Brasília, edição 30/2021, outubro, 2021.

CORRÊA, R. O.; SOUSA, A. R. B.; JUNIOR, H. M. **Criação de tambaquis.** Brasília, DF. Embrapa, Ed. PDF (20 p.), 2018.

FONSECA, S. G. *et al.* O consumo de peixe anchoita na alimentação escolar: aceitabilidade e adesão. **Ciência e Saúde**, v. 10, n. 4, p. 245-250, 2017.

GAVA, F. Análise comparativa entre elisa utilizando bacteriófago recombinante e outros métodos diagnósticos para detecção de *Salmonella* spp. em produtos de origem animal. Santa Catarina: Universidade do Estado de Santa

Catarina, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal 2019**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020.

LIMA, A. L. *et al.* Sorovares e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em *Salmonella* spp. isoladas de produtos de origem suína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, V. 68, n. 1, p. 39–47, fev. 2016.

MARINS, B. R.; TANCREDI, R. C. P.; GEMAL, A. L. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária**: reflexões e práticas. Rio de Janeiro: EPSJV. p. 288, 2014.

OLIVEIRA, J. M. de O. **O peixe e a saúde: das recomendações para o consumo às possibilidades ambientais de atendê-lo**. Segurança alimentar e nutricional, Campinas, v. 20(supl), p. 141-146, 2015.

WHO. **Estimating the burden of foodborne diseases**: A practical handbook for countries. [s.l.: s.n.]

ISOLAMENTO DE LEVEDURAS AUTÓCTONES DA REGIÃO AMAZÔNICA PARA APLICAÇÃO COMO PROBIÓTICO - UMA REVISÃO

Thaís Costa Santos¹

João Guilherme da Silva Araújo²

Artur Gabina Baltazar Vieira³

Eskálath Morganna Silva Ferreira⁴

Juliana Fonseca Moreira da Silva⁵

Introdução

Os Probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas e regularmente, podem resultar em benefícios à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2002; CONTRERAS-RODRIGUEZ *et al.*, 2020). Dentre os microrganismos comumente utilizados como probióticos, destacam-se as bactérias do gênero *Lactobacillus sp.* e *Bifidobacterium sp.* Porém, leveduras, principalmente, as do gênero *Saccharomyces*, têm se destacado nos últimos anos na aplicação, como probióticos. Atualmente, somente a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* está disponível (TERHAAG *et al.*, 2020).

No entanto, com o avanço das pesquisas que objetivam encontrar microrganismos que desempenham efeitos benéficos para saúde dos hospedeiros, leveduras do gênero não *Saccharomyces* têm apresentado destaque, mostrando-se promissoras na aplicação como probióticos. Por exemplo, as do gênero *Meyerozyma caribbica* (MENDONÇA, 2020; AMORIM *et al.*, 2018).

Tais leveduras podem ser isoladas de diversas fontes, como algas, briófitas, solo e frutos (COUTINHO *et al.*, 2021). Os frutos da região amazônica possuem alto potencial biotecnológico, sendo explorados em diversos processos. Por exemplo, na produção de enzimas microbianas, elaboração de alimentos funcionais, isolamento de microrganismos e entre outras aplicações potenciais, devido a sua composição nutricional (CARVALHO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2016; ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Dentre os frutos da região amazônica, destacam-se três: o tucumã, bacupari e pupunha. Esses frutos, de forma geral, apresentam potencial medicinal, nutricional e são ricos em fibras, lipídios e carotenóides (CARVALHO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2016).

A obtenção de microrganismos provenientes de frutos amazônicos tem sido instigada em diversos trabalhos, devido à crescente demanda da população por alimentos que ofereçam mais que a função de nutrir, e, consequentemente, a demanda da indústria alimentícia por novos produtos que atendam às exigências dos consumidores (CARVALHO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2016; ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo realizar uma revisão de literatura qualitativa sobre o isolamento de leveduras probióticas autóctones da região amazônica e suas características.

1 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: taicostass441@gmail.com

2 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: silvaguilhermearaujo@gmail.com

3 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: arturgabina@gmail.com

4 Docente do Curso de Gestão em Agronegócio, Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: eskalath.ms@unitins.br

5 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: julianafmsilva@uft.edu.br

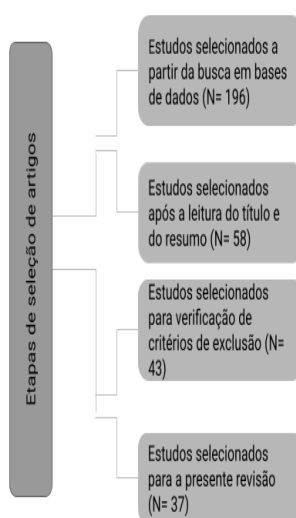
Metodologia

Esta revisão foi realizada por meio de um estudo descritivo, realizado a partir do levantamento bibliográfico exploratório de publicações científicas, incluindo artigos de pesquisa e de revisão e livros, adotando-se um intervalo de publicação de 13 anos (2009 a 2022).

Para a realização da busca bibliográfica, foram utilizados os seguintes bancos de dados: Periódicos CAPES, *Web of Science*, Elsevier, PubMed e Scielo, utilizando os seguintes termos descritores: “leveduras probióticas” OR “leveduras isoladas de frutos”, “leveduras isoladas de diferentes habitats AND “*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*”. A busca foi realizada nos idiomas inglês e português.

Para a seleção dos artigos utilizados nesta revisão, foram aplicados os critérios de seleção: artigos científicos que abordassem frutos como potencial fonte de isolamento de leveduras, uso como probiótico e/ou aplicação biotecnológica. Foram encontrados um total de 196 artigos em todas as bases de dados pesquisadas, destes apenas 43 estavam alinhados aos critérios de inclusão utilizados, os demais trabalhos encontrados foram excluídos, por não atenderem o intervalo de publicação e/ou serem duplicatas, restando ao final 37 estudos, como pode ser observado na figura, a seguir, representada por um fluxograma das etapas de seleção dos artigos.

Figura 1. Fluxograma das etapas de seleção de artigos.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Isolamento de leveduras

De forma geral, leveduras possuem ubiquidade (MOZZACHIODI *et al.*, 2022), haja visto isso, podem ser isoladas de diversos ambientes, por exemplo, no solo, flores, folhas, algas, leite e derivados, grãos, frutos e entre outros (ABID *et al.*, 2022; LAZO- VELEZ *et al.*, 2018). São considerados microrganismos fáceis de isolar a partir de

seus ecossistemas naturais (PIETROWSKI, 2011). O isolamento é realizado a partir de técnicas de microbiologia e biologia molecular, por exemplo, em meios sintéticos (líquidos ou sólidos) (WILSON *et al.*, 2016). Segundo Crous *et al.* (2009), o isolamento consiste basicamente em suspender uma amostra do substrato que se deseja utilizar, em água estéril e estriar ou realizar o plaqueamento, seja pelo método de semeadura em superfície ou por profundidade no meio de cultura escolhido (CROUS *et al.*, 2009).

Alguns princípios devem ser levados em consideração durante a etapa de isolamento e, consequentemente, de seleção destes microrganismos. A exemplo, é importante utilizar meios de culturas acidificados ou com a adição de um antibacteriano para evitar o crescimento de bactérias; observar a pureza dos isolados; definir quais propriedades são de interesse, como resistência a ambientes ácidos, temperatura ou pH ácido, por exemplo (PIETROWSKI, 2011). Para definir quais propriedades desejadas, é interessante ter um objetivo de aplicação claro.

As leveduras desempenham um papel importante para biotecnologia, sendo utilizadas em diversas aplicações, por exemplo, na produção de enzimas, elaboração de alimentos fermentados (cerveja, vinho e pão) e como probióticos (SILVA *et al.*, 2020). Nesse contexto, a busca por leveduras selvagens se faz necessário, uma vez que podem contribuir para melhorar esses produtos biotecnológicos obtidos (SILVA *et al.*, 2022).

Estudos disponíveis na literatura mostram que o isolamento de leveduras a partir de frutos mostra-se vantajoso, uma vez que os frutos, devido a sua composição nutricional, disponibilizam condições favoráveis para seu crescimento (SOUSA *et al.*, 2021; CORRÊA, 2019). Segundo Chang *et al.* (2018), os frutos autóctones da região da Amazônia apresentam ativos que podem ser benéficos para a saúde humana. Santos *et al.* (2018) relatam que esses frutos têm atraído interesse de diversos segmentos industriais, devido ao seu potencial nutricional e funcional. Menezes *et al.* (2018) isolaram e caracterizadas 31 linhagens de leveduras provenientes de frutos amazônicos e avaliaram suas capacidades biotecnológicas, porém, não foram realizados testes para avaliação do potencial probiótico (MENEZES *et al.*, 2018).

Tucumã

O tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), também conhecido como tucumã-da-Amazônia e/ou tucumã-do-Pará, é uma palmeira nativa da região amazônica (KIELING *et al.*, 2019). Seus frutos apresentam formato irregular, possuem cerca de 4 a 5 cm de comprimento e 3,5 a 4,5 cm de diâmetro (MARTINS, 2022). Segundo Craveiro *et al.* (2014), o epicarpo e mesocarpo alteram-se de amarelo à laranja escura e vermelha. São ricos em vitamina A, fibras, lipídios e β -caroteno (SINGH, 2015; SILVA, 2016), mostrando-se promissores no isolamento de microrganismos.

Bacupari

O bacupari (*Garcinia gardneriana*) é fruto do bacuparizeiro, pertencente à família da *Clusiaceae*. Os seus frutos são bagas de coloração alaranjada a esverdeada, medindo de 3 a 4 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, apresentam frutos saborosos e bem apreciados na região amazônica, sendo comumente consumidos *in natura* (PINTO, 2013).

Pupunha

Os frutos da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), planta que pertence à família das Arecáceas, nativa da América Central e Amazônia (BRANDÃO *et al.*, 2020), são comumente cultivados na região Norte do Brasil e possuem duas variedades: *chichagui* ou pupunha brava, com frutos pequenos, e a *gasipaes* (ou pupunha domestica-da), que apresenta frutos maiores (CARVALHO *et al.*, 2013).

Os frutos possuem características morfológicas, de forma simplista, quando maduro apresenta epicarpo fibroso, a cor pode ser desde avermelhada, amarelada ou, até mesmo, alaranjada, o mesocarpo que apresenta características amiláceo a oleoso e seu endocarpo envolvido por uma amêndoa fibrosa e oleosa (CARVALHO *et al.*, 2013).

Leveduras como probióticos

Dentre os microrganismos considerados potencialmente probióticos, atribuídos à melhora da saúde do hospedeiro, destacam-se as leveduras, principalmente, as do gênero *Saccharomyces* sp. (TERHAAG *et al.*, 2020). A *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* é a única levedura probiótica disponível comercialmente para aplicação em alimentos e/ou na aplicação da indústria farmacêutica (BALIZA *et al.*, 2018). McFarland (2017), em seu estudo, mostrou que, em um período de 39 anos, foram realizados cerca de 90 ensaios controlados com esta levedura dos quais abrangeram 15 tipos diferentes de doenças, apontando eficácia no tratamento de diarreia aguda pediátrica e na prevenção de diarreia associada a antibióticos. Além disso, sua aplicação como probiótico é realizada desde a década de 50, sendo comercializada na forma liofilizada, auxiliando na prevenção e tratamento de diarreia em crianças e adultos (YI *et al.*, 2016).

No decorrer dos últimos anos, graças aos avanços das pesquisas sobre aplicação de leveduras em produtos probióticos, as leveduras não-*Saccharomyces* têm mostrado alto potencial na aplicação em diversos produtos (CASSANEGO, 2015). Visto que podem reduzir a presença de micotoxinas no intestino e/ou em alimentos, são capazes de produzir vitaminas e, normalmente, são resistentes aos antibióticos, fazendo-se necessário a manutenção da microbiota intestinal em períodos de tratamento (ARÉVALO-VILLENA, *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2022).

Na tabela, a seguir, estão destacadas as principais espécies de leveduras não-*Saccharomyces* com potencial probiótico já estudadas.

Tabela 1. Principais leveduras não-*Saccharomyces* potencialmente probióticas isoladas de diferentes substratos.

Nome da espécie	Fonte de isolamento	Referência
<i>Candida vini</i>	Vinícola	Fernandez-Pacheco <i>et al.</i> (2021)
<i>Meyerozyma caribbica</i> 9 C e 9 D	Polpa de abacaxi fermentada espontaneamente	Amorim <i>et al.</i> (2018)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Kefir	Merchán <i>et al.</i> (2020)

<i>Lachancea thermotolerans</i>	Vinícola	Fernandez-Pacheco <i>et al.</i> (2021)
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Destilaria	Fernandez-Pacheco <i>et al.</i> (2021)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Vinícola	Fernandez-Pacheco <i>et al.</i> (2021)
<i>Pichia membranifaciens</i>	Vinícola	Fernandez-Pacheco <i>et al.</i> (2021)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 32	Flores e/ou frutos endêmicos	Fernandez-Pacheco <i>et al.</i> (2021)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Intestino e comida de peixe	Chang <i>et al.</i> (2016)

Fonte: Santos *et al.* (2022).

Uma das características que faz com que haja um avanço nos estudos utilizando leveduras como probióticos é que tais microrganismos são naturalmente resistentes aos antibióticos, visto que o mecanismo de ação dos antibióticos tem como objetivo principal aderir a células procariotas, afetando mais especificamente as células de bactérias (NOGUEIRA *et al.*, 2016) e essa é uma característica considerada importante, pois a grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes. Assim, os efeitos desses microrganismos devem ser basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano (SHRUTHI *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2022).

Considerações Finais

A obtenção de leveduras, a partir do seu isolamento em frutos, mostra-se vantajoso, além de ampliar as fontes de isolamento de microrganismos ocorre também a valorização desses frutos. O estudo sobre leveduras probióticas é interessante, uma vez que o mercado de probióticos está crescendo e, conseqüentemente, a demanda aumentará, fazendo com que a indústria invista em pesquisas para otimizar o processo de obtenção de produtos com potencial probiótico.

Referências

- ABID, R. *et al.* Probiotic Yeast *Saccharomyces*: Back to Nature to Improve Human Health. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 444, 2022.
- ALBUQUERQUE, A. P.; *et al.* Utilização de polpa de frutas em pó carregadoras de probióticos como alimento funcional: aspectos gerais e perspectivas. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, V. 24, e2019310, 2021.
- AMORIM, C. J.; PICCOLI, H. R.; DUARTE, F. W. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. **Food Research International**, V. 107, p. 518–527, 2018.

ARÉVALO-VILLENA, M. *et al.* Probiotic Capability in Yeasts: Set-up of a Screening Method. **Food Science e Technology**, V. 89, p. 657-65, 2018.

CARVALHO, V. A. *et al.* Características físicas e químicas de frutos de pupunheira no estado do Pará. **Revista Brasileira Frutic.**, V. 35, n. 3, p. 763-768, 2013.

CASSANEGO, B. D. *et al.* Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. **Ciência e Natura**, V. 37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 175– 186, 2015.

COSTA, B. E. T.; SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; FRANÇA, L. F. Comparative study on the quality of oil extracted from two tucumã varieties using supercritical carbon dioxide. **Food Science and Technology**. V. 36, n. 2, p. 322-328, 2016.

CONTRERAS-RODRIGUEZ, O.; MATA, F.; VERDEJO-ROMÁN, J.; RAMÍREZ-BERNABÉ, R.; MORENO, D.; VILAR-LOPEZ, R.; SORIANO-MAS, C.; VERDEJO-GARCÍA, A Neural-based valuation of functional foods among lean and obese individuals. **Nutrition Research**, V. 78, p. 27-35, 2020.

CORRÊA, P. I. Avaliação de Leveduras no Controle Pós-colheita de *Aspergillus* sp. em grãos de café. **Tese de doutorado**. Curitiba/PR. Universidade Federal do Paraná, 2019.

COUTINHO, O. P. A. J. *et al.* In Vitro and In Vivo Evaluation of the Probiotic Potential of Antarctic Yeasts. **Probiotics Antimicrob Proteins**, V. 13, n. 5, p. 1338-1354, 2021.

CROUS, P. W. *et al.* **Fungal Biodiversity**. Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009.

BRANDÃO, P. C.; OLIVEIRA, P. S. M.; JUNIOR, O. M. C. M. Caracterização e avaliação morfológica de frutos em genótipos de pupunheira para mesa. **Research, Society and Development**. V. 10, n. 6, 2021.

FAO; WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report; FAO: Rome, Italy; WHO: Geneva, Switzerland, 2002.

FERNÁNDEZ-PACHECO, P. P. C.; PÉREZ, B. A.; ARÉVALO-VILLENA, M. Potential Probiotic Strains of *Saccharomyces* and Non- *Saccharomyces* : Functional and Biotechnological Characteristics. **Journal of Fungi** (Basel) 7.3 (2021): 177.

MOZZACHIODI, S. *et al.* Yeasts from temperate forests. **Yeast (Chichester, England)**, V. 39, p. 4-24, 2022.

MCFARLAND, V. L. Chapter common organisms and probiotics: *Saccharomyces boulardii*. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. **Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis**, p. 145-164, 2017.

MENDONÇA, A. Emprego de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* no processo de elaboração de cervejas com potencial probiótico. **Monografia**. Bento Gonçalves/RS. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, 2021.

PINTO, P. M. Pós-colheita de abiu, bacupari e camu-camu nativos da Região Amazônica, cultivados no Estado de

São Paulo. 2013. **Tese (Doutorado em Ciências)** - Programa de Pós-graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2013.

SANTOS, C. T. *et al.* Avaliação do Potencial Probiótico de Leveduras do Gênero *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. **Revista Mérida, Probióticos - Viabilidade e Saúde**, ISBN, 978-65-84548-09-1, 2022.

SILVA, V. K. Potencial de Aplicação de Leveduras Selvagens em Processos de Panificação. **Monografia** (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Campus Universitário de Palmas, Universidade Federal do Tocantins. Palmas, Tocantins, 2020.

SILVA, J. A. C.; MALTA, J. N. D. A importância dos fungos na biotecnologia. **Revista de ciências biológicas e da saúde**, V. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.

SOUSA, M. N. *et al.* Aspectos morfológicos de leveduras isoladas de frutas e flores. **Brazilian Journal of Development**, V. 7, n. 4, p. 40309 – 4031, 2021.

SHRUTHI, B. *et al.* Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. **Biotechnology Reports**, V. 34, e00716, 2022.

PIETROWSKI, M. A. G. Isolamento, Seleção, Identificação e Aplicação de Leveduras Não-convencionais com Potencial para a Produção de Aromas e Fermentado de Maçã. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2011.

TERHAAG, M. M.; BERTUSSO, R. F.; PRUDÊNCIO, H. S. Desenvolvimento de Bebidas Probióticas não Lácteas Adicionadas de *Saccharomyces boulardii*: situação Atual e Perspectivas. **Research, Society and Development**, V. 9, n. 12, 2020.

POTENCIAL CELULOLÍTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PROVENIENTES DE NINHOS DE FORMIGAS CORTADEIRAS (*Acromyrmex balzani* Emery, 1890)

Fabírcia Vieira Silva Bomtempo¹

Raphael Sanzio Pimenta²

Patrícia Martins Guarda³

Solange Cristina Carreiro⁴

Sandra Faria Pereira⁵

Emerson Adriano Guarda⁶

Introdução

A produção biotecnológica enzimática é uma área em destaque atualmente, há uma crescente expansão na produtividade e utilização de enzimas, o que tem sido capaz de viabilizar diversos processos tecnológicos, por meio da diminuição de custos (RIGON *et al.*, 2009), por exemplo, o aproveitamento de biomassa lignocelulósica, para geração de uma gama de produtos com alto valor agregado: álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e uma série de outros compostos químicos de interesse comercial (SILVA, 2012).

A biomassa lignocelulósica é o composto orgânico mais abundante da biosfera e sua produção é oriunda de atividades como: agricultura, florestas, frutas, vegetais etc. (ZUBIOLLO *et al.*, 2021). Constituinte de toda matéria orgânica vegetal, essa biomassa é abundante, de alta disponibilidade, fácil estocagem, baixo custo, distribuição geográfica homogênea e encontrada em uma vasta variedade de fontes (DHYANI; BHASKAR, 2019; RAUD *et al.*, 2019). É uma complexa e resistente rede, composta principalmente por celulose (30% a 50%), hemicelulose (15% a 35%) e lignina (10% a 30%), em que a concentração de cada um desses elementos varia muito de acordo com o tipo de matéria-prima, idade e estágio vegetativo da planta (LIU *et al.*, 2021).

Dos derivados do material lignocelulósico, destaca-se a celulose, que é o principal constituinte da parede celular dos vegetais. Ela é altamente cristalina e compacta, devido às ligações β -1,4 e tal conformação estrutural, assim como sua estreita associação à lignina, hemicelulose, amido, proteínas e minerais, a tornam altamente resistente à hidrólise e ao ataque biológico (ANDRADE *et al.*, 2019). Assim, o processo de hidrólise para obtenção e aproveitamento de açúcares fermentescíveis torna-se difícil e oneroso, já que as enzimas utilizadas para quebra da celulose, as celulasas, ainda são de alto custo (BOMTEMPO *et al.*, 2017).

As Celulasas são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas, na indústria têxtil, elas atuam degradando as fibras da superfície do tecido, tornando-os mais lisos, macios e com melhor caimento. Elas, também, são utilizadas para remoção parcial do corante índigo, usado no acabamento de jeans (LOPES, 2011). Na indústria de

1 Universidade Estadual do Tocantins (Unitins). E-mail: fabriciavs@gmail.com

2 Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: pimentars@uft.edu.br

3 Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: patriciaguarda@uft.edu.br

4 Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: solange@mail.uft.edu.br

5 Escola Municipal Olímpio Sampaio. E-mail: sandrafariapnn@hotmail.com

6 Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: emersonprof@uft.edu.br

bebidas, essas enzimas são empregadas na produção de sucos de frutas e nos processos de vinificação. Também são importantes para indústrias de nutrição animal, aumentando a digestibilidade das rações produzidas, na fabricação de detergentes e nas indústrias de papel (CASTRO; PEREIRA JR *et al.*, 2010). O interesse pelas enzimas celulósicas também tem aumentado muito, devido ao seu potencial de utilização no processo de produção de etanol lignocelulósico (BOMTEMPO *et al.*, 2017).

Estima-se que o uso de biomassa lignocelulósica para produzir etanol pode aumentar significativamente a produção de álcool por hectare, contribuindo para diversificação do panorama energético mundial e garantindo atendimento à demanda energética futura e desenvolvimento ambientalmente coerente (SDSN, 2019; WEC, 2020). A diversificação da matriz energética é de suma importância, já que o contínuo e acelerado crescimento mundial exige demandas energéticas cada vez maiores e traz preocupações, como: o abastecimento futuro, renovação da matriz e diminuição da dependência de combustíveis fósseis, recurso limitado, responsável pela liberação de gases poluentes apontados como impulsionadores de mudanças climáticas (MURDOCK *et al.*, 2020; FRIEDLINGSTEIN *et al.*, 2020).

Alguns microrganismos conseguem degradar paredes celulares vegetais, utilizando enzimas hidrolíticas e oxidativas produzidas naturalmente por eles. Desse modo, investigações quanto à habilidade de cepas de diferentes microrganismos hidrolisarem celulose e hemicelulose têm sido constantemente realizadas (LIU *et al.*, 2021).

A espécie de formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* vive em simbiose com o fungo filamentoso *Leucoagaricus gongylophorus* e coleta material lignocelulósico oriundo exclusivamente de certas gramíneas para servir de substrato para o desenvolvimento desse fungo dentro da colônia (jardim). Essas formigas cultivam o fungo simbiote, fazem podas, limpam o jardim e levam o substrato rejeitado para um local de descarte localizado na parte de fora do ninho (lixo). A estreita relação do fungo simbiote e dos possíveis fungos contaminantes das regiões de jardim e de lixo, com o material lignocelulósico oriundo das gramíneas coletadas, indica uma possibilidade de que esses fungos possuam capacidade de degradar polímeros, celulose, hemicelulose e lignina, existentes no substrato sobre o qual crescem (ABRIL; BUCHER, 2004).

Acreditando no potencial biotecnológico dos fungos filamentosos e nos indícios de alta atividade enzimática em ninhos de formigas cortadeiras, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biocatalítico de fungos filamentosos, isolados de ninhos de *Acromyrmex balzani*, buscando linhagens com potencial para utilização no processo de produção de etanol lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Escavações dos ninhos

A área escolhida para as escavações dos ninhos foi a área experimental da Universidade Federal do Tocantins, Câmpus de Palmas - TO.

Foi coletado material da câmara de cultivo do fungo simbiote (jardim) e da região de descarte de substrato rejeitado (lixo), localizado na parte externa do ninho, próximo ao montante de terra formado pelas formigas. Essas coletas foram feitas em 5 ninhos. Os ninhos foram escavados pela abertura de uma vala de 1-2 m de profundidade, dependendo da profundidade prevista de jardins, próximo ao montante de terra na área da colônia, onde a ati-

vidade de escavação da maioria das formigas estava concentrada. Iniciada a escavação, o trabalho continuou em direção ao local dos jardins até uma câmara de fungo ser exposta. Essa escavação lateral garantiu que os jardins fossem acessados com mínima contaminação. Jardins adultos e material do lixo foram coletados assepticamente e armazenadas em recipientes esterilizados para transporte até o laboratório.

Isolamento

Foram preparadas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} em YMB (extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5% e glicose 1,0%), com amostras retiradas dos jardins de fungos e do material de descarte (lixo), as quais, após agitação (10s a 2800 RPM), foram semeadas em meios seletivos, como: YMA (extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1,0% e ágar 2,0%); e MYP ágar (extrato de malte 0,7%, extrato de levedura 0,05%, soytone 0,25% e ágar 1,5%) suplementados com cloranfenicol (0,1%). As placas inoculadas foram incubadas à 20°C por 5 dias. Após incubação, cada morfotipo diferente de fungo filamentoso foi repicado e purificado em Agar Batata Dextrose (BDA). As colônias puras foram cortadas em discos e armazenadas em glicerol a 30% a uma temperatura de -80°C.

Caracterização dos isolados

Todos os isolados de fungos filamentosos foram agrupados em morfoespécies, de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso), aspecto da borda e produção de pigmentos.

Atividade celulolítica em meio sólido

Os espécimes guardados foram reativados em tubos contendo meio BDA inclinado a 25°C por sete dias. Para verificação da capacidade produtiva de carboximetilcelulase (CMCase), os isolados foram inoculados em placa de Petri, contendo meio seletivo composto de carboximetilcelulose (CMC), 10 g/L; extrato de levedura, 0,6 g/L; KH_2PO_4 , 7,0 g/L; K_2HPO_4 , 2,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 g/L; agar, 15,0 g/L, esterilizado a uma temperatura de 121 °C por 15 minutos.

As placas inoculadas foram mantidas a 25°C por 96 horas e, então, coradas com 10 ml de solução de vermelho Congo (1,4 g/L) em tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 8,0 por 30 minutos. Em seguida, o corante foi descartado e a placa recoberta por uma solução de NaCl 0,5M por mais 30 minutos e lavada novamente com NaCl 0,5 M. As cepas de fungos filamentosos produtores de (CMCase) foram selecionadas por meio de observação de halo descolorido em torno da colônia testada (STAMFORD *et al.*, 1998). Os diâmetros dos halos formados foram mensurados utilizando-se paquímetro digital na região de crescimento da colônia e do halo formado. A atividade enzimática foi determinada, segundo Hankin e Agnostakis (1975), por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressa como Índice Enzimático de Atividade (IEA).

Produção de celulase por Fermentação Submersa em meio CMC

Os fungos que apresentaram Índice de Atividade Enzimática (IEA) maior que cinco (5) foram testados para produção enzimática em meio líquido, com exceção dos fungos JN3 119 e JN1 07, que perderam a viabilidade e não puderam ser revitalizados. Os selecionados foram repicados em placas de Petri, contendo BDA e incubados a 25°C por 7 dias.

Dos fungos que esporularam, foi obtida uma suspensão de esporos por meio da adição de 10 mL de água destilada, resultando em uma concentração (esporos/mL) de 1×10^6 , para as linhagens não produtoras de esporos foram cortados discos de aproximadamente 6 mm de diâmetro. As suspensões e discos foram inoculados em meio autoclavado a 121 °C, por 15 min, para produção de celulases, contendo: CMC 10 g/L; extrato de levedura 0,6 g/L; e solução de sais, segundo Mandels e Weber (1969). O ensaio foi conduzido por 14 dias (336 h), a 35°C e agitação constante de 150 rpm. Foram coletadas alíquotas após sete dias de incubação e ao final do ensaio. A fase líquida foi separada por meio de filtração, obtendo-se o extrato enzimático bruto, mantido à temperatura de -20 ° até posterior verificação da atividade enzimática.

Produção de celulase por Fermentação Submersa em bagaço de cana

A partir dos resultados da análise estatística, as três melhores cepas, quanto à atividade de celulases totais em meio CMC, foram testadas para produção enzimática em meio utilizando bagaço de cana como fonte de carbono. Os fungos selecionados foram repicados em placas de Petri contendo BDA e incubados a 25°C por 7 dias. Dos fungos que esporulam, foi obtida uma suspensão de esporos em uma concentração (esporos/mL) de 1×10^6 e, para as linhagens não produtoras de esporos, foram cortados discos de 6 mm. Os discos e as suspensões foram inoculados em meio autoclavado a 121 °C, por 15 min, contendo a mesma composição do meio descrito anteriormente, porém com bagaço de cana 10 g/L como fonte única de carbono (MANDELS; WEBER 1969).

Foram utilizados três tipos de bagaço de cana: bagaço sem tratamento químico (ST); tratado com hidróxido de sódio a 4% (BH); e tratado com hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico e vapor (BHAV). Primeiramente, 100 g do bagaço de cana, lavado e moído, foram tratadas com 2000 mL da solução de hidróxido de sódio a 4% em autoclave a 121 °C, por 30 minutos. Em seguida, o bagaço foi recuperado por filtração e dividido em duas partes, uma delas foi lavada com água corrente até a neutralidade e seca a 65 °C até massa constante, esse processo originou o bagaço tratado com hidróxido de sódio a 4% (BH).

A outra parte do bagaço obtido, sem passar por lavagens, foi levada a um pH de 2,0 utilizando ácido fosfórico (p.a) por 30 min e, logo, neutralizada com hidróxido de sódio. O material recuperado por filtração foi, então, seco em estufa a 65 °C até massa constante, depois acrescido do mesmo volume de água destilada. Bagaço e água foram autoclavados a 121 °C por 30 min, a suspensão foi filtrada e o material sólido desidratado a 65 °C até massa constante. Esse processo deu origem ao bagaço tratado com hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico e vapor (BHAV).

O bagaço sem tratamento (ST) foi somente moído, lavado e seco a 65 °C até massa constante (MENEZES *et al.* 1991). Os ensaios para produção enzimática foram mantidos por 12 dias (288 h), sob temperatura de 35°C e agitação constante de 150 rpm. Foram coletadas alíquotas após 4, 8 e 12 dias de incubação. A fase líquida foi separada por meio de filtração, obtendo-se o extrato enzimático bruto, mantido à temperatura de -20 °C até posterior verificação da atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação da atividade de enzimas celulolíticas

Para todas as atividades enzimáticas, celulase total (FPAse), endoglucanase (CMCase) e avicelase, conduziram-se controles da reação colorimétrica para descontar as contribuições do extrato enzimático (branco da enzima) e do substrato (branco da reação), separadamente, nos valores de absorbância obtidos. Os valores das absorbâncias (a 540nm) foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose, mediante curva padrão previamente estabelecida (GHOSE, 1987). Para conversão dos valores de quantidade equivalente de glicose em valores de atividade enzimática, considerou-se que 1 Unidade Internacional (IU) equivale a 1 μmol de glicose liberada por minuto.

Determinação da atividade de FPAase

Para esta análise, foi utilizado procedimento recomendado por Ghose (1987), em que se utiliza como substrato papel de filtro cortado em tiras de 1x6 cm (correspondendo à aproximadamente 50 mg). Aos tubos com capacidade de 25 mL, foram adicionados, além do papel filtro, 1 mL de tampão citrato 0,05M (pH=4,8) e 0,5mL do extrato enzimático. A reação enzimática foi mantida por 30 minutos em banho térmico a 50°C, o processo foi interrompido pela imersão dos tubos em banho de gelo. Ao meio reacional, foram adicionados 2 mL de Ácido Dinitrosalicílico (DNS) e a mistura fervida por 5 minutos. Foram acrescentados 10 mL de água destilada e as absorbâncias avaliadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro a 540nm (MILLER, 1959).

Determinação da atividade de CMCase

Em tubos com capacidade de 25 mL, foram incubados 0,5 mL de uma solução de CMC a 2% em tampão citrato com 0,5 mL do extrato enzimático. Após a reação enzimática de hidrólise (a 50°C por 30 minutos), o processo foi interrompido em banho de gelo (GHOSE 1987). Ao tubo, foram acrescentados 2 mL de DNS e a mistura foi fervida por 5 minutos e, em seguida, foram acrescentados ao tubo mais 10 mL de água destilada. As absorbâncias foram avaliadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro a 540nm (MILLER, 1959).

Determinação da atividade de Avicelase

Foram adicionados, em tubos de 25 mL, 1mL do extrato enzimático bruto mais 1 mL da solução de 1% de Celulose Microcristalina (Avicel) em tampão citrato 0,05M, pH 4,8. A mistura ficou incubada a 50°C, por 30 minutos. O processo foi interrompido em banho de gelo. Ao tubo, foram acrescentados 2 mL de DNS e a mistura foi fervida por 5 minutos, após fervura foram somados ao tubo mais 10 mL de água destilada. As absorbâncias foram avaliadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro a 540nm (MILLER, 1959).

Análise estatística dos dados

O experimento de verificação da atividade celulolítica em meio sólido foi conduzido seguindo um Delineamento Inteiramente Casualizado em triplicata. O experimento de fermentação submersa, utilizando carboximetil-

celulose (CMC) como fonte única de carbono, foi conduzido seguindo um Delineamento em Parcelas Subdivididas. O experimento de Fermentação submersa, utilizando bagaço de cana como fonte única de carbono, foi conduzido seguindo um Delineamento em Parcelas Subsubdivididas. Os dados obtidos foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de significância com utilização do sistema aplicativo ASSISTAT - Assistência Estatística (SCOTT; KNOTT, 1974).

Resultados e Discussão

Avaliação do potencial celulolítico em meio sólido

Das regiões de jardim e lixo dos cinco ninhos coletados, foram isoladas 179 cepas. Esses foram analisados quanto à atividade de carboximetilcelulase e 141 apresentaram halo descolorido em torno da colônia, devido à ausência de carboximetilcelulose original. Foi considerado positivo cerca de 80% do total analisado, sendo que os valores de IEA médios variaram entre 1.026 e 15.92, com média de 2.367. A análise estatística das médias de IEA dos fungos pelo teste de *Scott-Knott* indicou diferença significativa das médias ao nível de 5% de significância.

Das 141 cepas com atividade celulolítica, as de maior IEA foram: cepa JN2-29, com IEA médio de 15.92; cepa LN4-25 com IEA médio de 11.69; e a cepa JN3-119, com IEA médio de 10.341. A tabela, a seguir, mostra os isolados que apresentaram índice de atividade enzimática (IEA) superior a 2,0 e os respectivos locais de origem.

Tabela 1. Valores médios de IEA para os fungos isolados de jardins e lixo.

Cepa	Origem	IEA*	Cepa	Origem	IEA*
JN1-29	Jardim Ninho 2	15,92 a	JN1-06	Jardim Ninho 1	3.1673 f
LN4-25	Lixo Ninho 4	11.691 b	JN4-72	Lixo Ninho 4	3.0616 f
JN3-119	Jardim Ninho 3	10.341 c	JN2-89	Jardim Ninho 2	3.0520 f
JN1-07	Jardim Ninho 1	9.5406 c	JN1-27	Jardim Ninho 1	3.0043 f
JN1-17	Jardim Ninho 1	8.6356 d	JN2-50	Jardim Ninho 2	2.9463 f
JN1-19	Jardim Ninho 1	7.3243 d	JN1-01	Jardim Ninho 1	2.9357 f
LN4-15	Lixo Ninho 4	6.5743 e	JN2-87	Jardim Ninho 2	2.7373 g
JN2-65	Jardim Ninho 2	6.4916 e	JN2-145	Jardim Ninho 2	2.6887 g
JN1-28	Jardim Ninho 1	6.2153 e	JN2-62	Jardim Ninho 2	2.6697 g
JN2-84	Jardim Ninho 2	5.7400 e	LN4-21	Lixo Ninho 4	2.6560 g
LN4-75	Lixo Ninho 4	5.6703 e	JN2-103	Jardim Ninho 2	2.6333 g
LN4-71	Lixo Ninho 4	5.4866 e	JN2-57	Jardim Ninho 2	2.6083 g
JN2-45	Jardim Ninho 2	4.1680 f	JN2-140	Jardim Ninho 2	2.5833 g
LN5-172	Lixo Ninho 5	3.8826 f	LN4-54	Lixo Ninho 4	2.4153 g
JN2-60	Jardim Ninho 2	3.8000 f	LN5-169	Lixo Ninho 5	2.4103 g
LN4-12	Lixo Ninho 4	3.7040 f	JN2-107	Jardim Ninho 2	2.3777 g

JN2-95	Jardim Ninho 2	3.6520 f	LN4-53	Lixo Ninho 4	2.2997 g
JN1-18	Jardim Ninho 1	3.5643 f	JN4-123	Jardim Ninho 4	2.2790 g
LN4-39	Lixo Ninho 4	3.5220 f	LN5-139	Lixo Ninho 5	2.2147 g
JN3-37	Jardim Ninho 3	3.3730 f	JN4-22	Jardim Ninho 4	2.2090 g
JN1-08	Jardim Ninho 1	3.3293 f	JN2-111	Jardim Ninho 2	2.1807 g
JN1-31	Jardim Ninho 1	3.2743 f	JN2-88	Jardim Ninho 2	2.1523 g
LN4-76	Lixo Ninho 4	3.2690 f	JN2-105	Jardim Ninho 2	2.0717 g
JN2-83	Jardim Ninho 2	3.2416 f	JN2-97	Jardim Ninho 2	2.0523 g
JN2-93	Jardim Ninho 2	3.2220 f	LN5-148	Lixo Ninho 5	2.0186 g

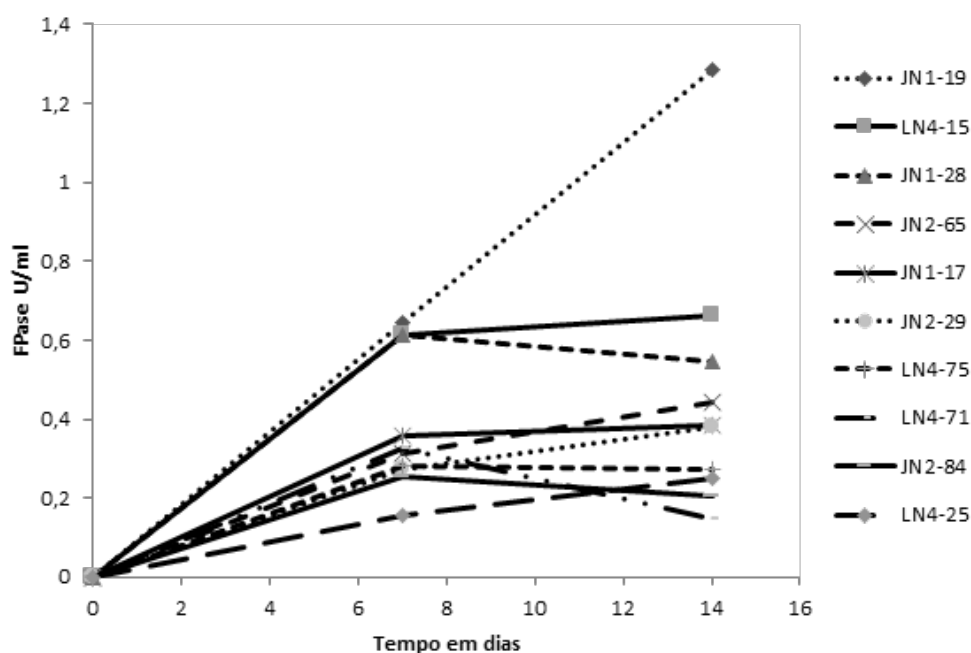
IEA* Índice Enzimático de Atividade - corresponde à média de três repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, ao nível de 5 % de significância pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Produção de celulase por Fermentação Submersa em meio CMC

A análise dos fungos que apresentaram IEA maior que 5, exceto as cepas JN-119 e JN1-07, que não foram testadas devido à perda de viabilidade, demonstraram que todas as cepas testadas apresentaram atividade significativa de celulase total (FPase). Três delas se destacaram, JN1-19, LN4-15 e JN1-28 (Figura 1), sendo que a linhagem JN1-19 mostrou-se bem superior a todas outras, com atividade de FPase de 0.64 U/ml com 7 dias de incubação e 1.3 U/ml com 14 dias de incubação.

Figura 1. Atividade de Papel filtro (FPase) em meio CMC.



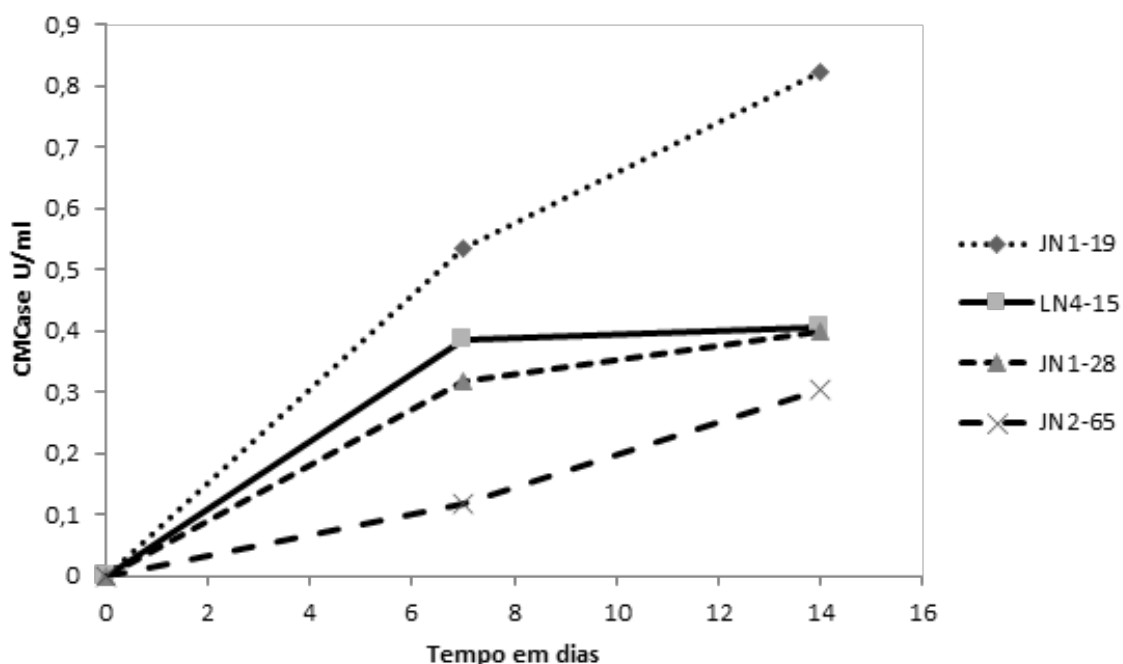
Fonte: Elaborada pelos autores.

Houve interação significativa entre a produção enzimática dos fungos testados e os tempos analisados. Para os fungos JN2-29, LN4-25, JN1-19, LN4-15, JN2-65, o tempo de 14 dias foi significativamente melhor e para os fungos JN1-28, JN2-84 e LN4-71 o tempo de 7 dias foi mais eficiente que o de 14 dias e os fungos JN1-17 e LN4-75 não apresentaram diferença significativa de produção enzimática entre os dois tempos analisados.

Das 10 cepas testadas, quatro delas apresentaram atividade de Carboximetilcelulase (CMCase), que foram JN1-19, LN4-15, JN1-28, JN2-65. A atividade de CMCase da cepa JN1-19 foi superior às outras testadas com 0.53 U/ml-1 com 7 dias de incubação e 0.82 U/ml-1 com 14 dias de incubação (Figura 2).

Também, houve diferença entre os tempos analisados. Por meio da análise estatística, pôde-se observar que a atividade enzimática aumentou significativamente com 14 dias.

Figura 2. Atividade de (CMCase) em meio CMC.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Atividade enzimática por Fermentação Submersa em meio com bagaço de cana

No experimento, utilizando bagaço de cana como fonte única de carbono, o melhor resultado foi obtido com o fungo LN4-15, com bagaço BHAV, com 8 dias de incubação, apresentando atividade FPase de 0,99 U/m e 0,5 U/ml de atividade de CMCase (Figura 3).

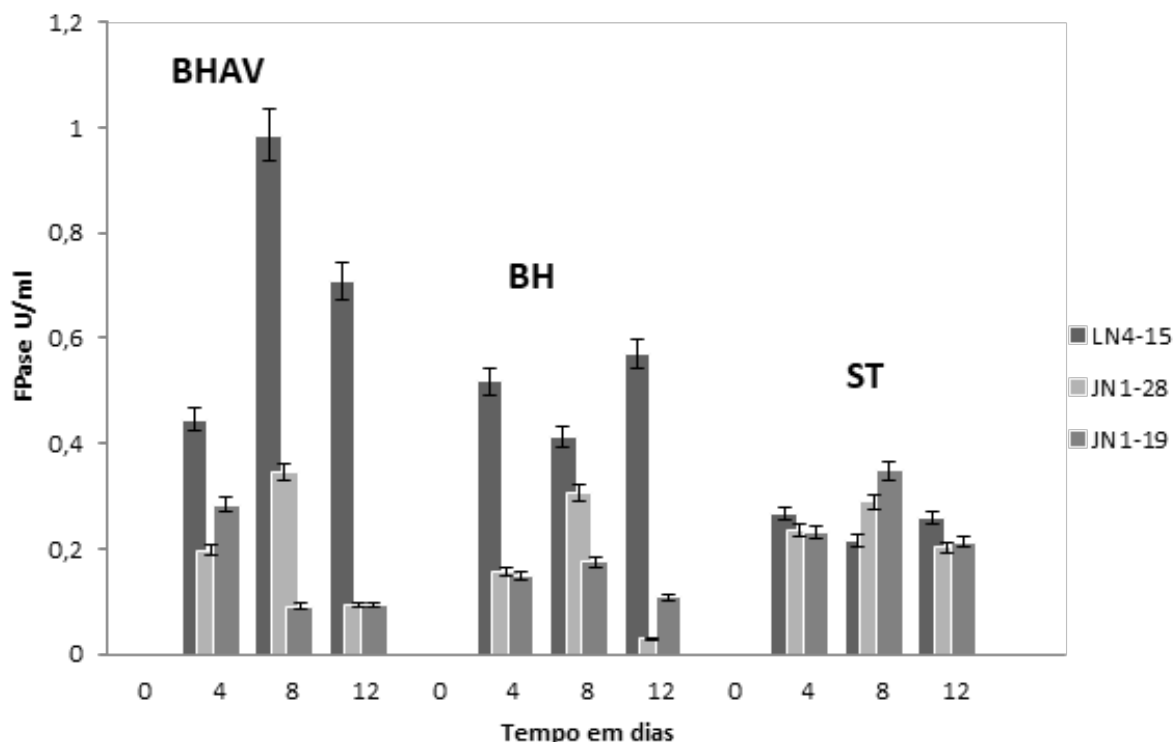
Quanto à atividade de FPases, todas as cepas testadas apresentaram atividade enzimática significativa, sendo a linhagem LN4-15 a que apresentou os melhores índices e foi estatisticamente superior as outras analisadas (Figura 3), com atividade enzimática variando entre 0,44 – 0,99 U/ml.

Quanto aos tempos fixados, segundo a análise estatística, pode-se observar que o melhor tempo de incubação foi o de 8 dias seguido do tempo 4 dias e com resultados menos expressivos, o tempo de cultivo de 12 dias. Para o fungo LN4-15, o tempo não influenciou significativamente na atividade enzimática; para o JN1-19, os

períodos de 4 e 8 dias foram melhores que o de 12 dias; já para cepa JN1-28, melhores resultados foram obtidos com 8 dias de cultivo, seguido do tempo de 4 dias.

Para todos os fungos analisados, pôde-se observar que foram obtidos melhores resultados nos menores períodos de incubação, que foram 4 e 8 dias.

Figura 3. Atividade de celulase total (FPase) em meio com bagaço de cana. (BHAV) bagaço tratado com hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico e vapor; (BH) bagaço tratado com hidróxido de sódio a 4%; (ST) bagaço sem tratamento.



Fonte: elaborada pelos autores.

A eficiência dos tratamentos do bagaço foi avaliada de acordo com o potencial enzimático de cada fungo sobre o substrato, pode-se notar que o tratamento ideal variou de fungo para fungo. Para a cepa LN4-15, o tratamento com hidróxido de sódio, ácido e vapor (BHAV) mostrou-se mais eficiente; já a cepa JN1-19 apresentou melhores resultados, quando cultivada em bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento (ST); e para o fungo JN1-28 não houve diferença significativa entre os três tratamentos testados.

Para a produção de CMCases, somente as cepas LN4-15 e JN1-19 apresentaram atividade enzimática significativa, sendo que LN4-15 mostrou-se bem superior a JN1-19 (Figura 4).

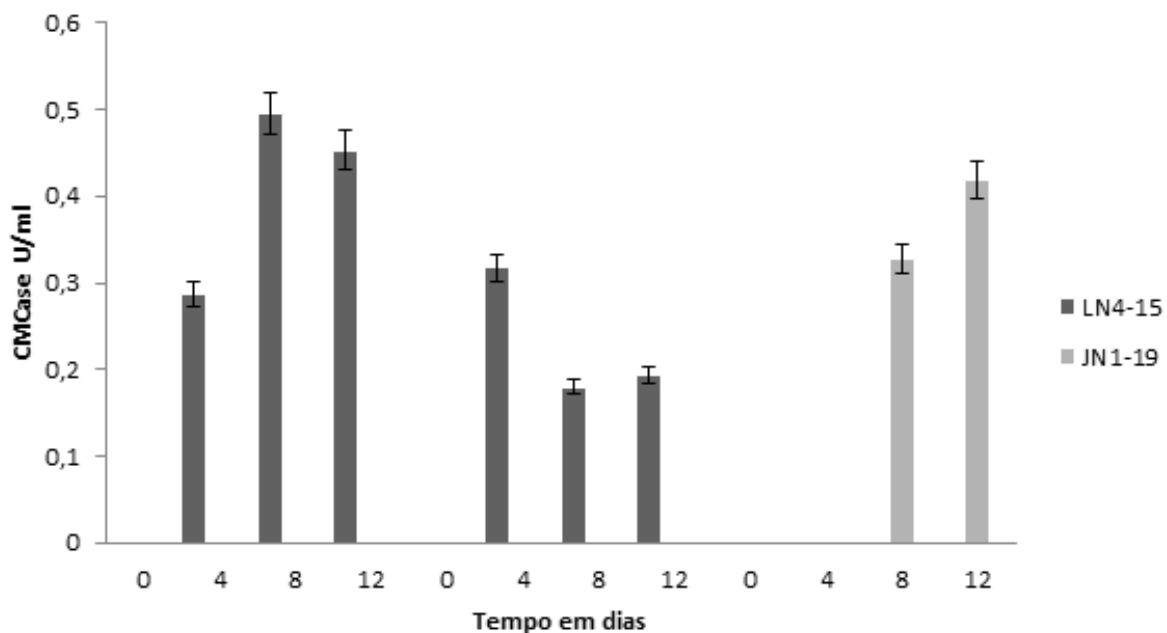
No ensaio com bagaço de cana, quanto à produção de CMCases, o melhor resultado obtido foi por meio da fermentação utilizando o fungo LN4-15 com bagaço tratado com hidróxido de sódio, ácido e vapor (BHAV), com 8 dias de incubação, com atividade enzimática entre 0,4 – 0,63 U/ml (Figura 4).

Quanto aos tempos fixados, segundo a análise estatística, pode-se observar que os melhores tempos de incubação foram 8 e 12 dias e com 4 dias os resultados foram menos expressivos. Para o fungo LN4-15, o tempo não influenciou significativamente na atividade enzimática; já para a cepa JN1-19 os períodos de 8 e 12 dias foram

melhores.

A eficiência dos tratamentos do bagaço foi avaliada de acordo com o potencial enzimático de cada fungo sobre determinado substrato, pode-se notar que o tratamento ideal variou de fungo para fungo. Para a cepa LN4-15, o tratamento BHAV mostrou-se mais eficiente; já a cepa JN1-19 apresentou melhores resultados quando cultivada em bagaço ST.

Figura 4. Atividade de cboximetilcelulases (CMCases) por fermentação submersa em meio com bagaço de cana. (BHAV) bagaço tratado com hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico e vapor; (BH) bagaço tratado com hidróxido de sódio a 4%; (ST) bagaço sem tratamento.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Quanto à atividade de avicelase, nenhuma das cepas apresentou resultados positivos.

Comparando-se os resultados do presente trabalho com os obtidos por fungos provenientes de outros substratos, como: ar, solo, plantas e ambientes poluídos, pôde-se observar que a quantidade de fungos celulolíticos em ninhos de *Acromyrmex balzani* foi mais elevada que em outros substratos de estudo.

Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) analisaram, quanto ao índice enzimático, 80 linhagens de fungos filamentosos isolados de solo, utilizando meio sintético com carboximetilcelulose por quatro dias a 28 °C e mostraram que 36 destes isolados apresentaram halo indicador de atividade enzimática ou 45% dos fungos isolados.

Jahangeer *et al.* (2005), estudando a microbiota fúngica nativa de solo, ar e plantas, isolaram 115 linhagens fúngicas e testaram quanto à produção de celulasas, obtendo 78 isolados (67,83%) de produtores de celulasas. Stamford *et al.* (1998), estudando a microbiota endofítica e epifítica de tubérculos de *Pachyrhizus erosus* L. Urban, isolaram 68 cepas, entre fungos e bactérias e as analisaram quanto ao potencial para produção de celulasas e nenhum dos isolados apresentou halo indicativo de atividade celulolítica. Subash *et al.* (2005) isolaram 28 cepas de fungos filamentosos, oriundos de ambientes poluídos com óleo e 78.5 % destes fungos apresentaram potencial celulolítico.

Tal destaque dos isolados de formigueiros pode ser explicado devido à alta atividade celulolítica em ninhos de formigas. Segundo De Fine *et al.* (2010), o perfil enzimático nos jardins de *Attine* superiores e jardins de cortadeiras é particularmente adequado para digerir materiais vegetais frescos e para acessar os nutrientes de células vivas. Apesar da produção enzimática não ser necessariamente proporcional à biomassa microbiana, acredita-se que a maior parte da atividade enzimática medida na área dos jardins de fungos decorre do fungo cultivado, que é conhecido por produzir muitas enzimas que degradam material vegetal e que compreende a maior biomassa microbiana em um jardim (ABRIL e BUCHER, 2004).

Martin *et al.* (1975) afirmam que as enzimas contidas no fluido fecal de *Atta colombica*, que degradam os polímeros de plantas, tais como pectinases, amilases e xilanases, provavelmente, são de origem fúngica e que as formigas atuam no transporte dessas enzimas, ingerem-nas e as defecam sobre folhas recentemente cortadas, estimulando assim o crescimento do fungo. Esse processo inicia a degradação do material vegetal.

O alto percentual de fungos filamentosos capazes de degradar celulose pode estar relacionado também à questão do substrato presente no microambiente do isolamento. Em ninhos e lixos de formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*), o substrato é composto exclusivamente por material vegetal. Segundo Pimenta *et al.* (2007), os Attini utilizam folhas frescas, brotações e flores como substrato para o cultivo de fungos com os quais vivem em associação para obter parte do alimento que necessitam.

O maior IEA encontrado no presente estudo, produzido pela cepa JN2-29 (IEA = 15.92), supera os resultados de Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), que relataram maior índice enzimático de 5.0 em fungos oriundos do solo e Herculano *et al.* (2011), analisando fungos oriundos de resíduos de mamona, encontraram 6,0 como máximo de atividade celulolítica.

Nos resultados, foram apresentados os microrganismos que obtiveram IEA maior que 2 (Tabela 1), isso porque entende-se que cepas que apresentam IEA maior ou igual a 2 têm real habilidade em degradar determinado substrato. De acordo com Lealem e Gashe (1994), um valor do índice de atividade enzimática maior ou igual a 2 mostra real habilidade do microrganismo em degradar amido em meio sólido.

Analisando os resultados apresentados na tabela 1, é possível observar que dentre os 50 fungos com índice enzimático maior que dois, 72% foram isolados de jardim e somente 28% de lixo, o que indica melhor desempenho dos fungos de jardim e um potencial acentuado desses para produção de enzimas. Tal efeito pode estar relacionado à diferença de matéria orgânica vegetal presente em lixos e jardins e também outros fatores, como temperatura, umidade etc. Enquanto o lixo, encontra-se fora do formigueiro e é composto de material de descarte; o jardim é constantemente mantido pelas formigas com material orgânico fresco e condições favoráveis para o fungo simbiote e, conseqüentemente, melhores condições para os fungos associados.

Todas as cepas testadas para produção enzimática por Fermentação Submersa em meio CMC apresentaram atividade significativa de celulase total (FPase). No entanto, a linhagem JN1-19 mostrou-se bem superior a todas as outras testadas, apresentando até 1,3 U/ml de atividade de celulase total com 14 dias de incubação e 0.83 U/ml de atividade de CMCase. Resultado que supera o encontrado por Picart *et al.* (2007), que, ao trabalharem com duas amostras de *Penicillium sp.*, utilizando meio suplementado com carboximetilcelulose, encontraram atividades de CMCase de 0,11-0,13 U/ml.

Foi possível verificar que o tempo foi um fator importante na produção enzimática, de acordo com a análise estatística, somente os fungos JN1-17 e LN4-75 não apresentaram diferença significativa de produção enzimática

entre os dois tempos analisados. Sales *et al.* (2010), analisando as variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*, também, destacaram o tempo como fator importante na produção enzimática.

Foi possível observar que os fungos com maior potencial para produção de celulase total foram também destaques na produção de CMCase.

No experimento utilizando meio suplementado com bagaço de cana, foi obtida atividade de celulase total (FPase) de 0,99 U/ml, valor superior aos encontrados em muitos trabalhos consultados. Menezes e Hennies (1994), utilizando também bagaço de cana e fermentação submersa com 7 dias de incubação, encontraram 0,2 U/ml de celulase total usando *Aspergillus niger*. Menezes *et al.* (1991), usando como fonte de carbono para cultivo de *Aspergillus niger*, bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de sódio 4% e fermentação submersa, encontraram, aproximadamente, 0,25 U/ml de celulase total.

Aguiar e Menezes (2000) avaliando a produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger*, também, utilizando tratamento alcalino e bagaço de cana, encontraram maior atividade FPase de aproximadamente 0,26 U/mL.

Latif *et al.* (1997), cultivando *Aspergillus fumigatus* sobre resíduos de grama, encontraram atividade de celulase total de 0,4 U/ml. Khan *et al.* (2007), cultivando *Trichoderma* sp em palha de arroz por 8 dias de cultivo, encontraram atividade celulolítica total de 0,10 U/ml no extrato enzimático. Sales *et al.* (2010), avaliando as variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*, encontraram atividade máxima de celulase total de 0,45 U/ml.

O melhor resultado obtido para produção de CMCase foi também por meio da fermentação utilizando o fungo LN4-15, com bagaço tratado com hidróxido de sódio, ácido e vapor (BHAV), após 8 dias de incubação. Nessas condições, foi encontrada 0,5 U/ml de atividade de CMCase. Resultado inferior ao encontrado por Khan *et al.* (2007), que cultivando *Trichoderma spp* em palha de arroz, por 8 dias de incubação, obtiveram atividade de endoglucanase ou CMCase de 0,7 U/ml de extrato enzimático. No entanto, o valor máximo de atividade encontrado no presente trabalho, foi maior que o divulgado por Aguiar e Menezes (2000), que avaliando a produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger*, também utilizando tratamento alcalino e bagaço de cana, obtiveram maior atividade CMCase de aproximadamente 0,27 U/mL.

No geral, o bagaço tratado mostrou-se mais eficiente na indução da produção enzimática que o bagaço sem tratamento. O que ratifica o afirmado por Menezes e Hennies (1991) e Aguiar e Menezes (2000) em que o bagaço de cana tratado com soluções alcalinas é mais eficiente na síntese das diferentes frações enzimáticas do que o bagaço sem tratamento.

No entanto, o fungo JN1-19 apresentou atividade de CMCase somente em bagaço não tratado, enquanto as outras cepas não foram capazes de produzir enzimas utilizando tal bagaço como substrato. Menezes *et al.* (1976) sugeriram que as linhagens que se sobressaem em bagaço, sem qualquer tratamento, produzem a fração exoglucanase, uma vez que o bagaço é uma celulose *in natura* e, portanto, exige ação da fração pré-hidrolítica da exoglucanase antes de ser hidrolisado pelas outras frações endoglucanase e β glicosidase.

Sales *et al.* (2010), analisando as variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*, verificaram a influência da variação de pH inicial, tempo de cultivo, concentração do substrato, agitação, concentração do inóculo, temperatura, tipo de bagaço de cana-de-açúcar e espécie de *Aspergillus* e encontraram uma variação na atividade de endoglucanase de 0,04 a 0,60 U/mL. Isso confirma que a otimização das

condições de cultivo de cada microrganismo pode aumentar significativamente a produção enzimática dos fungos avaliados no presente trabalho.

Nesse contexto, pode-se pensar na realização de novos testes com esses microrganismos, oriundos de formigueiros, em outras condições de cultivo, para potencializar a produção de enzimas celulolíticas, uma vez que vários fatores podem influenciar na atividade enzimática dos microrganismos (SANOMIYA; NAHAS, 2003; MACCHERONI-JUNIOR *et al.*, 2004).

Considerações Finais

Os fungos filamentosos provenientes de ninhos de formigas cortadeiras, da espécie *Acromyrmex balzani*, apresentam enorme potencial na produção de enzimas celulolíticas e que estudos mais detalhados poderão possibilitar o aproveitamento desse potencial na indústria bioenergética. Os resultados também permitiram concluir que o bagaço de cana-de-açúcar foi eficiente na indução da produção enzimática, com valores de atividades maiores que muitos trabalhos descritos na literatura utilizando o mesmo ou outros substratos lignocelulósicos.

Referências

- ABRIL, A. B; BUCHER, E. H. Nutritional sources of the fungus cultured by leaf-cutting ants. **Appl Soil Ecol.**, V. 26 p. 243–247, 2004.
- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger* iz9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B. CEPPA**, V. 18 p. 57-70, 2000.
- ANDRADE, T. C. C. *et al.* Hidrólise Enzimática de celulose para obtenção de glicose utilizando líquido iônico como meio solvente. **Rev. Virtual Quim.**, V. 11, n. 1, p. 310-325, 2019.
- BOMTEMPO, F. V. S. *et al.* Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, V. 7, p. 26-44, 2017.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, V. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- DHYANI, V.; BHASKAR, T. Pyrolysis of biomass. In: PANDEY, Ashok *et al.* (Eds.). **Biomass, Biofuels, Biochemicals, Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels** (2nd edition). Academic Press, New Delhi, 2019, p. 217-244.
- DE FINE, L. H. H. *et al.* Evolutionary transitions in enzyme activity of ant fungus gardens. **Evolution**, v. 64, p. 2055-2069, 2010.
- FRIEDLINGSTEIN, P. *et al.* Global carbon budget 2020. **Earth System Science Data**, V. 12, n. 4, p. 3269-3340, 2020.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chem**, V. 59, p. 257-268. 1987.
- HERCULANO, P. N. *et al.* Isolation of Cellulolytic Fungi from Waste of Castor (*Ricinus communis* L.). **Curr Microbiol**,

v. 62, p. 1416-1422, 2011.

JAHANGEER, S. *et al.* Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. **Pakistan Journal of Botany**, V. 37, p. 739 -748, 2005.

KHAN, M. H. *et al.* Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. **Journal of Environmental Science and Health**, V. 42, p. 381-386, 2007.

LATIF, F.; RAJOKA, M. I.; MALIK, K. A. Production of cellulases by thermophilic fungi grown on *Leptochloa* straw. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, V. 11, p. 343-348, 1997.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, V. 77, p. 348-352, 1994.

LIU, L. *et al.* Diversity of cellulolytic microorganisms and microbial cellulases. **International Biodeterioration e Biodegradation**, V. 163, p. 105277, 2021.

LOPES, C.S. D. Análise ambiental da fase de acabamento do jeans. **Interfacehs Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, V. 6, n. 3, p. 87-102, 2011.

MACCHERONI-JUNIOR, W.; ARAÚJO, W. L., AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, V. 61, p. 298-302, 2004.

MARTIN, M. M. *et al.* Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. **Journal of Insect Physiology**, V. 21, p. 1887-1892, 1975.

MENEZES, T. J. B.; HENNIES, P. T. Sistema celulolítico de *Aspergillus niger* em substrato sólido de bagaço de cana-de-açúcar tratado. **Coletânea do ITAL**, V. 24, p. 75-89, 1994.

MENEZES, T. J. B; MAKINO, Y; GRILLO, R. L. M. Produção de celulase: efeitos do tratamento do bagaço de cana-de-açúcar na produção de celulase. **Coletânea do ITAL**, V. 21, p. 29-44, 1991.

MENEZES, T. J. B; DE LAMO, P. R.; ARAKAKI, T. Produção do complexo celulolítico C1, Cx por microrganismos. **Coletânea do ITAL**, V. 7, p. 91-96, 1976.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, V. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MURDOCK, H. E. *et al.* **Renewables 2020**: Global status report, 2020. Disponível em: https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:52059346. Acesso em: 04 abr. 2022.

PICART, P; DIAZ, P; PASTOR, F. I. J. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. **Letters in Applied Microbiology**, V. 45, p. 108–113, 2007.

PIMENTA, L. B. *et al.* Dinâmica de forrageamento e caracterização de colônias de *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente de cerrado goiano. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, V. 9, p. 1-12, 2007.

RAUD, M. *et al.* Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, V. 111, p. 44-56, 2019.

RIGON, Z. K., *et al.* Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, V. 10, n. 14, p. 123–137, 2009.

RUEGGER, J. S. M.; TAUKE-TORNISIELO, M. S. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil Bot**, V. 27, p. 205-211, 2004.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, V. 30, p. 507-512, 1974.

SALES, M. R. *et al.* Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesq. Agropec. Bras**, V. 45, p. 1290-1296, 2010.

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, V. 33, n. 5, p. 835–842, 2003.

SILVA, F. V. Panorama e Perspectivas do Etanol Lignocelulósico. **Revista Liberato (Novo Hamburgo)**, V. 13, p. 43-58, 2012.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, V. 18, p. 382-385, 1998.

SUBASH, C. B. G; PERIASAMY, A.; AZARIAH, H. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, V. 46, p. 119–126, 2005.

ZUBIOLO, C. *et al.* Caracterização de resíduos lignocelulósicos e avaliação de seus produtos de pirólise. In: OLIVEIRA, R. J; MOREIRA, R. C. (org.). **Recursos naturais: energia de biomassa florestal**. Editora Científica digital. 2021, p. 22 - 34.

WEC - World Energy Council. **World Energy Trilemma Index**, 2020. Disponível em: <https://www.worldenergy.org/publications/entry/world-energy-trilemma-index-2020> . Acesso em: 08 fev. 2022.

