

COMUNICAÇÃO

IMPLICAÇÕES DO FUNGO *Aspergillus niger* var. *niger* SOBRE O CRESCIMENTO DE ISOLADOS DE *Aspergillus* DA SEÇÃO *Circumdati* E PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

PATRÍCIA PRADO NASSER¹
SARA MARIA CHALFOUN DE SOUZA²
LUÍS ROBERTO BATISTA³
JULIANE REZENDE MERCER⁴

RESUMO – Buscando esclarecimento a respeito da inibição ou estímulo na produção de ocratoxina A (OTA) e no crescimento dos fungos ocratoxigênicos por fungos que também ocorrem naturalmente associados aos grãos de café, com o presente estudo avaliou-se o efeito inibitório do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181-01 (“*inibidor*”) e seu filtrado, sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdati* e produção de ocratoxina A. O isolado ato-

xigênico do fungo “*inibidor*”, selecionado como possível antagonista para espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* da seção *Circumdati*, apresentou um efeito positivo inibidor sobre os índices de velocidade de crescimento micelial em relação aos demais isolados testados. A ação antagonista do fungo “*inibidor*” associado a grãos de café pode ser um dos fatores responsáveis pelos níveis reduzidos de OTA detectados nas amostras analisadas.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Ocratoxina A, café, *Aspergillus ochraceus*, qualidade.

IMPLICATIONS OF *Aspergillus niger* var. *niger*'s MOLD, FUNGI UPON GROWING *Aspergillus*'s ISOLATE OF SECTION *Circumdati* AND OCHRATOXIN A

ABSTRACT – The present study evaluated the inhibitory effect of the fungus *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T-01 (inhibitor) and its filtrate on the growth of an *Aspergillus* isolate of the section *Circumdati* and ochratoxin A (OTA) production. An atoxigenic isolate of the inhibitor fungus screened as possible antagonist for toxigenic species of the genus

Aspergillus, section *Circumdati*, showed a positive inhibitory effect upon mycelial growth velocity indices comparing with the isolates tested. The antagonistic action of the inhibitor fungus associated with coffee beans may be one of the factors responsible for the reduced levels of OTA detected in the samples analyzed.

INDEX TERMS: Coffee beans, quality, ochratoxin A, *Aspergillus ochraceus*.

O crescimento fúngico em grãos de café raramente ocorre como em cultura pura. Dessa forma, o estudo das interações ecológicas entre fungos colonizadores de um mesmo substrato pode fornecer maior compreensão sobre os microrganismos que controlam a produção de toxina na natureza. De acordo com Northolt et al. (1995), alguns fungos podem inibir o desen-

volvimento de outros fungos. A presença de alguns microrganismos pode restringir o desenvolvimento de outros fungos. Dessa forma, o estudo das interações ecológicas entre espécies colonizadoras com e sem potencial ocratoxigênico assume grande importância para a compreensão dos mecanismos e interações que controlam a produção de ocratoxina A (OTA) em grãos de café.

1. Engenheiro Agrônomo, M.Sc., UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS/UFLA – Caixa Postal 37 – 37200-000 – Lavras, MG.

2. Engenheiro Agrônomo, Dra., Pesquisadora Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Caixa Postal 176, Lavras, MG.

3. Químico, M.Sc., Bolsista CNP&D/Café na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.

4. Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Bolsista CNP&D/Café na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.

Aspergillus niger é uma das poucas espécies de fungos que receberam o status de GRAS (generally regarded as safe) conferido pela Food and Drug Administration (FDA) devido a sua baixa toxicidade, sendo importante mencionar que alguns isolados desse fungo produziram OTA em baixas quantidades (VARGA et al., 1996; ABARCA et al., 1997).

Por outro lado, Varga et al. (2000) apontam que estirpes atoxigênicas têm se mostrado capazes de decompor micotoxinas, tornando-se, assim, promissoras como meio de eliminar essas micotoxinas em substratos, tais como grãos de café e cereais.

Buscando esclarecimento a respeito da inibição ou estímulo na produção de Ocratoxina A (OTA) e no crescimento de fungos ocratoxigênicos com outros fungos que também ocorrem naturalmente em grãos de café, com o presente estudo conduzido *in vitro*, avaliou-se o efeito inibitório de um isolado de *Aspergillus niger* var. *niger*, EcoCentro 1181T01-01 e seu filtrado sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdati*.

Todos os isolados foram obtidos de grãos de cafés beneficiados, sendo depositados na micoteca do EcoCentro da EPAMIG em Lavras - Minas Gerais.

Foram utilizados como fungos produtores de OTA: *Aspergillus ochraceus* EcoCentro 1161T01-01 (E1), *Aspergillus elegans* EcoCentro 1141T01-01 (E2), *Aspergillus ostianus* EcoCentro 1091T01-01 (E3), *Aspergillus sclerotiorum* EcoCentro 1131T01-01 (E4) e *Aspergillus sulphureus* EcoCentro 1151T01-02 (E5) vs *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 118101-01 ou "inibidor" (isolado não-produtor de ocratoxina A).

O fungo "inibidor" cresceu em meio YES (Yeast Extractor Sucrose) por 7 dias. Um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro foi colocado em erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de YES líquido. O fungo cresceu por 7 dias sob agitação à temperatura ambiente (25 - 27°C). Após o tempo de incubação, o meio líquido YES foi denominado de YESAN (YES/*Aspergillus niger*).

O meio YESAN foi pré-filtrado em membrana de microfibras de vidro 55 mm de diâmetro em membrana de RC 0,45 µm de diâmetro. Após a filtração, o YESAN foi misturado em YES nas proporções 5%, 10% e 15%, e na proporção de 10% com água, para simular os nutrientes absorvidos em placas de Petri. Para medir o diâmetro das colônias, os fungos foram inoculados em duplicata, em três pontos equidistantes por placas e incubadas a 25°C ± 0,4. Os fungos cresceram em YES+H₂O a 5%, 10% e 15% e em YES+YESAN EcoCentro 1181-01 nas mesmas concentrações.

A avaliação do crescimento das colônias foi feita após 2, 4, 7 e 9 dias, sendo os resultados utilizados para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial dos fungos (IVCM) utilizando-se a fórmula Maquire (1962), adaptada por Oliveira (1991):

$IVCM = \Sigma(D-D_a)/N$, em que: IVCM = Índice de velocidade de crescimento micelial, D = Diâmetro médio atual, D_a = Diâmetro médio anterior e N = Número de dias após a inoculação.

No último dia de avaliação do crescimento das colônias, foi realizado o teste do potencial ocratoxigênico dos fungos pela técnica de Plug Agar. Todos os isolados identificados foram inoculados em meio YES e incubados por 7 dias a 25 ± 1°C. O tempo de incubação para a detecção da produção de micotoxina pela técnica de Plug Agar é de cinco dias à temperatura de 25°C (FILTENBORG e FRISVAD, 1980). Com o auxílio de um instrumento circular, foi feito um corte circular de aproximadamente 50 mm do micélio do fungo com ágar; esse micélio foi colocado sobre uma placa de CCD (Merck - Sílica Gel 60, 20x20) previamente ativada, junto com o micélio dos demais isolados, um ao lado do outro, com 1,5 cm de distância.

Ao lado do último micélio, é feita a aplicação do padrão da micotoxina (ocratoxina A). O micélio é retirado e, após 15 minutos, é feita a eluição em uma cuba de vidro contendo como fase móvel TEF - Tolueno, Acetato de Etila e Ácido fórmico 90% (50:40:10). Esse método conta com o fato de que muitas micotoxinas são extracelulares, difundindo-se no substrato. Após a eluição, as placas são secas em capela pelo fluxo de ar. A confirmação é feita em luz ultravioleta com 366 nm em cromatovisor CAMAG (UV-BETRACHTER). O isolado produtor de ocratoxina apresenta um R_f (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina testada.

A produção de ocratoxina A foi avaliada arbitrariamente utilizando sinais (+) de acordo com a intensidade da fluorescência, e a fluorescência mais intensa recebeu nota (++++). Onde não foi detectada a fluorescência característica de ocratoxina A, a nota dada foi (-).

Na Tabela 1 encontram-se apresentados os resultados referentes aos índices de velocidade de crescimento micelial médios observados para os fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* da seção *Circumdati*, quando em presença de filtrados do fungo antagonista, o inibidor.

Os fungos testados apresentaram índices de velocidade de crescimento micelial semelhantes, ou seja,

na ausência do filtrado do inibidor, esses apresentaram índices de velocidade de crescimento normal para cada espécie.

Pela Tabela 1, observa-se um comportamento diferenciado das distintas espécies estudadas quando submetidas a concentrações variadas do filtrado obtido do isolado do fungo atoxigênico inibidor.

TABELA 1 – Resultados referentes aos índices de velocidade de crescimento micelial médios, observados para os fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* da seção *Circumdati*, quando em presença de filtrados do fungo antagonista, o inibidor.

Fungos	Tratamentos		Médias
		Concentração (%)	
E1		5 YESAN	0,538 c ¹
		10 YESAN	0,445 b
		15 YESAN	0,544 c
		10 H ₂ O	0,555 c
E2		5 YESAN	0,544 c
		10 YESAN	0,495 c
		15 YESAN	0,460 b
		10 H ₂ O	0,518 c
E3		5 YESAN	0,605 c
		10 YESAN	0,390 a
		15 YESAN	0,345 a
		10 H ₂ O	0,538 c
E4		5 YESAN	0,454 b
		10 YESAN	0,490 c
		15 YESAN	0,538 c
		10 H ₂ O	0,569 c
E5		5 YESAN	0,470 b
		10 YESAN	0,504 c
		15 YESAN	0,480 b
		10 H ₂ O	0,508 c
Inibidor		5 YESAN	0,430 b
		10 YESAN	0,405 a
		15 YESAN	0,445 b
		10 H ₂ O	0,518 c

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade. Dados são médias de três repetições.

Não se observou, portanto, exceto para o fungo *Aspergillus ostianus*, uma relação direta entre redução dos índices de velocidade de crescimento micelial e concentrações dos filtrados do fungo inibidor. A inconsistência dos dados obtidos para os demais isolados testados, significa que o efeito inibidor do fungo *Aspergillus niger var. niger*, observado em ensaios visando ao levantamento da microbiota associada aos frutos e grãos de café, envolve outros mecanismos, os quais necessitariam ser investigados.

Na Tabela 2 encontram-se apresentados os resultados da produção de OTA por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* da seção *Circumdati* em presença de diferentes concentrações do filtrado do fungo antagonista *Aspergillus niger* Ecocentro 1181-T 01. Por meio dos resultados apresentados, observa-se que, de uma maneira geral, todos os fungos demonstraram uma redução na produção de OTA devido à presença do filtrado do fungo inibidor.

Nota-se ainda uma diferença quanto ao potencial toxigênico entre espécies estudadas, com um potencial mais elevado de *Aspergillus elegans*, conforme demonstrado no tratamento com 10% de água, o que não impediu que o filtrado do fungo antagonista, nas três concentrações testadas, reduzisse a produção da micotoxina. A possibilidade de ocorrência de um fenômeno de detoxificação de micotoxinas por meio da ação de microrganismos foi relatada por outros autores, como Varga et al. (2000) e Lee e Magan (2000).

Não se observou uma relação entre inibição do crescimento micelial e produção de toxinas, inferindo-se que a presença do fungo causou uma ação diferenciada sobre os dois fenômenos, não confirmando afirmativas anteriores de que existe uma tendência de ocorrência de inibição simultânea de crescimento micelial e de produção de micotoxinas (LEE e MAGAN, 2000).

O isolado atoxigênico do fungo inibidor, selecionado como possível antagonista para espécies toxigênicas de fungos do gênero *Aspergillus*, seção *Circumdati*, apresentou um efeito positivo inibidor sobre os índices de velocidade de crescimento micelial em relação aos isolados testados.

A ação antagonista do filtrado do fungo inibidor associado a grãos de café pode ser um dos fatores responsáveis pelos níveis reduzidos de OTA detectados em amostras de café analisadas (NASSER, 2000).

TABELA 2 – Resultados da produção de OTA por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* da seção *Circumdati* em presença de diferentes concentrações do filtrado do fungo antagonista, o inibidor.

Fungos	Tratamentos	
	Concentração (%)	Produção de OTA
E1	5 YESAN	+ ¹
	10 YESAN	+
	15 YESAN	-
	10 H ₂ O	++
E2	5 YESAN	+++
	10 YESAN	+++
	15 YESAN	+++
	10 H ₂ O	++++
E3	5 YESAN	+
	10 YESAN	+
	15 YESAN	+
	10 H ₂ O	++
E4	5 YESAN	-
	10 YESAN	+
	15 YESAN	+
	10 H ₂ O	++
E5	5 YESAN	+
	10 YESAN	+
	15 YESAN	+
	10 H ₂ O	+

¹(-) fluorescência não detectada e (+++++) fluorescência mais intensa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F. J. New ochratoxigenic species in the

genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 2, p. 580-1582, Feb. 1997.

FIELTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening: method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, p. 128-130, 1980.

LEE, H. B.; MAGAN, N. Impact of environmental and interspecific interaction between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 11-16, 2000.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

NASSER, P. P. **Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A**. 2000. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

NORTHOLT, M. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. **Introduction to foodborne fungi**. 4. ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelculture, 1995. 243 p.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tratamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

VARGA, J.; KEVEL, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62. n. 12, p. 4461-4464, Dec. 1996.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, p. 1-7, 2000.