



## Microrganismos sobreviventes em coproduto de pinhão manso e atividade antagonista sobre *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea*

Ludmilla Louise Cerqueira Maia Prates, Ronize Viviane Jorge Faria, Cleonice Alves, Sergio Avelino Mota Nobre

### Introdução

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é considerado uma opção agrícola para regiões áridas e secas por ser uma espécie nativa, exigente em insolação e com forte resistência à seca. Atualmente essa espécie está sendo bastante explorada comercialmente no Brasil, por ser uma planta oleaginosa viável para a obtenção do biodiesel, por produzir, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare, levando de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que pode se estender por 40 anos [1]. As sementes de pinhão manso sofrem o mesmo tratamento industrial que as bagas de mamona, isto é, cozimento prévio e esmagamento subsequente em prensas para extração do óleo. A torta, resíduo resultante da extração do óleo, possui elevados teores de nutrientes tornando possível a sua utilização na forma de fertilizante orgânico, além de ter uma composição adequada para o crescimento microbiano e quando desintoxicada pode ser empregada na alimentação animal [2]. Muitos agentes procarióticos são capazes de exercer antagonismo diretamente contra alguns patógenos de plantas, inibindo a germinação de seus esporos ou conídios. Dentre os diversos mecanismos de controle biológico, antagonismo direto é um dos mais valorizados [3], o que geralmente, pode acontecer graças à produção de substâncias que inibem, de alguma forma, a germinação de unidades propagativas de patógenos fúngicos. Dentre essas substâncias antimicrobianas inibidoras da germinação de esporos estão a herbicolinas A, B, O e I e as pantocinas excretadas por *Pantoea agglomerans* [4] além de inúmeras outras moléculas produzidas por isolamentos de *Pseudomonas* sp. [5]. Espécies de *Trichoderma* são amplamente utilizados na agricultura e na indústria como biopesticidas e fontes de enzimas, respectivamente. Estes fungos se reproduzem assexuadamente por produção de conídios e clamidósporos e em habitats selvagens por ascósporos. São relatados como micoparasitas eficientes e produtores prolíficos de metabólitos secundários, alguns dos quais têm importância clínica [9]. O fungo *Clonostachys rosea* é um eficiente antagonista de fitopatógenos em várias hospedeiras [10].

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antagonista, de microrganismos sobreviventes à esterilização da torta de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), sobre isolados de *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea*.

### Material e Métodos

Foram utilizadas seis culturas microbianas, sendo cinco bactérias (B01, B02, B03, B04 e B05, todas pertencentes ao gênero *Bacillus* sp.) e dois fungos (F1 e F2, ambos do gênero *Penicillium* sp.), isoladas a partir da torta de pinhão manso autoclavada a 121°C por 30 minutos. Como microrganismos desafiados foram utilizados três isolados fúngicos, sendo *Trichoderma viride* (T39), *T. harzianum* (T40) e *Clonostachys rosea* (Cr52). A metodologia utilizada foi a de crescimento pareado para expressão de antibiose. As bactérias e os fungos foram identificados com auxílio de métodos morfológicos (coloração de gram para bactérias e morfologia de conidióforos para os fungos). Com o intuito de compreender a resistência à temperatura expressa pelas bactérias isoladas, procedeu-se um teste de termoresistência e formação de endósporos. Para tal, culturas de 24 horas feitas em tubo de ensaio contendo caldo TSB, foram mantidas por 20 minutos, em aparelho Banho Maria, a 80°C. Em seguida uma alíquota de 100 µL foi retirada, estriada em placa de Petri com meio TSA e incubada a 37°C por 24h. O ensaio de antagonismo foi desenvolvido em placas de Petri contendo meio BDA (Ágar batata dextrose). O micélio fúngico foi retirado de culturas com idade de 7-10 dias, utilizando-se um furador circular (Cobre - Ø = 0,5 cm) nas bordas da colônia. As bactérias foram inoculadas por estriamento único, com auxílio da alça de platina calibrada (10 µL). Os microrganismos foram dispostos em posição pareada com distância proximal de 20 mm. Os tratamentos foram aplicados em duplicata e as placas incubadas a 27°C. Foram avaliados 21 contrastes entre antagonistas e agentes de colonização (desafiados). O crescimento foi acompanhado por cinco dias e medições das distâncias foram feitas diariamente, com o auxílio de um paquímetro digital. Os resultados foram expressos através da média e desvio padrão das medidas finais da interação.



# FÓRUM FEPEG

ENSINO • PESQUISA  
EXTENSÃO • GESTÃO

## UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas e culturais • Debates • Minicursos e Palestras



24 a 27  
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

## Resultados

Seis dos 21 contrastes propostos expressaram antibiose, tanto por parte do desafiado quanto por parte do microrganismo sobrevivente na torta de pinhão manso. *Trichoderma harzianum* (T40) apresentou antibiose contras os *Bacillus* 4 e 5, sendo incapaz de inibir ou ser inibido pelos *Bacillus* 1,2 e 3, o mesmo ocorrendo com os dois isolados de *Penicillium* utilizados (F1 e F2). Fenômeno idêntico, contudo de proporções mais acentuadas foi observado entre o isolado de *T. viride* (T39) e os *Bacillus* 4 e 5 (Tabela 1, Figura 1). O isolado de *Clonostachys rosea* (Cr 52) também induziu resposta de antibiose quando desafiado pelos *Bacillus* 4 e 5, não sendo observada com os demais microrganismos desafiadores (Tabela 1, Figura 1).

## Discussão

A presença de bactérias esporogênicas na torta de pinhão manso, mesmo após a extração física do óleo e autoclavagem a 121°C é um fenômeno esperado e justificado pela referida resistência destas estruturas a condições ambientais adversas [6]. Provavelmente estes microrganismos encontravam-se como endofíticos nas sementes de *Jatropha curcas*. Processos fermentativos a serem desenvolvidos com o coproduto do esmagamento de sementes de pinhão manso provavelmente sofrerá influência de microrganismos residuais, resistentes aos processos de extração física do óleo, bem como da esterilização por autoclavagem, caso seja implementado. Esta afirmativa decorre da constância de resposta antagonica aos três microrganismos desafiados, imposta pelos *Bacillus* 4 e 5. A capacidade de síntese de antibióticos, como metabólitos secundários por procariotos, inibindo o crescimento e, ou, a multiplicação de outros microrganismos é bastante referida na literatura científica [6]. Entre essas substâncias citam-se as voláteis como alcoóis, aldeídos, cetonas e sulfetos [7] e amônia [8]. Desta forma em uma situação de desafio no sítio biológico do coproduto, em um processo fermentativo, certamente não haveria necessidade de contato para inibição do crescimento do agente fermentador (desafiado) mesmo em condições favoráveis aos mesmos.

## Conclusão

Os microrganismos, residentes e resistentes ao aquecimento acima de 120°C, presentes na torta de pinhão manso são potenciais inibidores do crescimento de fungos fermentadores ou detoxicadores deste coproduto em processo fermentativo.

## Referências

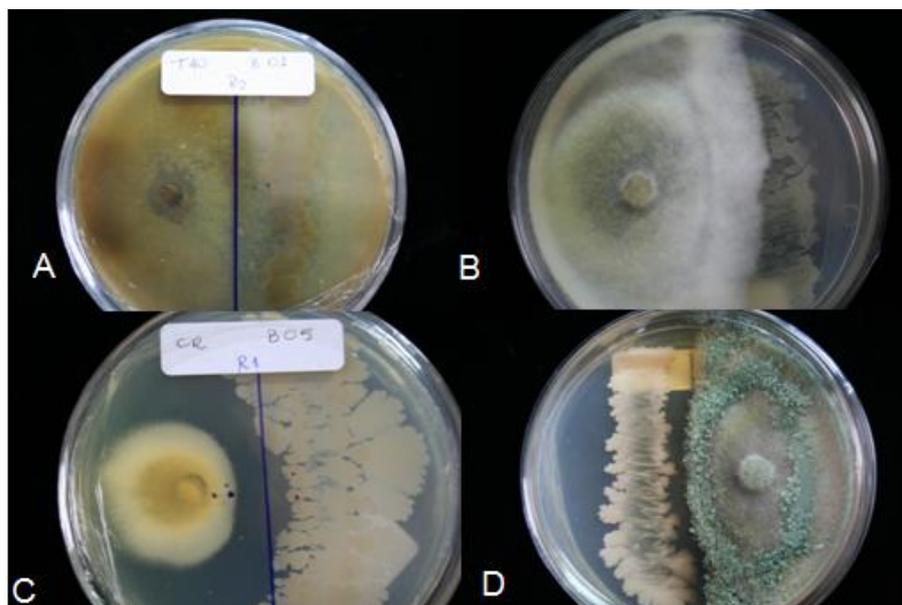
- [1] ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A.P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido Nordestino. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosa*, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.
- [2] GOMES, F. H. T. Composição químico-bromatológica e degradação In Situ de nutrientes de co-produtos da mamona e do pinhão manso da cadeia produtiva do biodiesel. 2007. 49f. Trabalho de Graduação (Graduação em Agronomia)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.
- [3] DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen selfdefense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review Phytopathology*, v. 41, p. 501-538, 2003.
- [4] FRAVEL, D. R. Role in antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, v. 26, p. 75-91. 1988.
- [5] GUESTSKY, R.; ELAD, Y.; SHTIENBERG, D.; DINNOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each whit several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*, v.92, n.9, p. 976-985, 2002.
- [6] MADIGAN, M. M.; MARTINKO, J.; PARKER, J.E. *Brock Biology of Microorganisms*. New York: Prentice Hall. 2003. 1.104 p.
- [7] STOCKWELL, V. O.; JOHNSON, K. B.; SUGAR, D.; LOPER, J. E. Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology*, v. 92, n. 11, p. 1202-1209, 2002.
- [8] WRIGHT, S. A. I.; ZUMOFF, C. H.; SCHNEIDER, L.; BEER, S. V. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 284-292, 2001.
- [9] MUKHERJEE, P. K., et al. *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annual Review of Phytopathology*, v.51, n.1, p. 105-129, 2013.
- [10] NOBRE, S. A. M., et al. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, v.34, n.2, p. 132-143, 2005.

## Anexos

**Tabela 1-** Matriz de interação entre microrganismos esporogênicos, isolados da torta de pinhão manso em desafio a fungos fermentadores expressa em distância (mm) entre colônias. Os dados estão expressos em média aritmética e desvio padrão.

<b>Microrganismo isolado da Torta</b>	<b>Microrganismos desafiados</b>		
	<i>T. viride</i> (T39)	<i>T. harzianum</i> (T40)	<i>Clonostachys rosea</i> (Cr 52)
<b>B01</b>	0,0	0,0	0,0
<b>B02</b>	0,0	0,0	0,0
<b>B03</b>	0,0	0,0	0,0
<b>B04</b>	3,4 ± 0,8	4,4 ± 0,5	10,1 ± 0,8
<b>B05</b>	4,9 ± 0,5	3,3 ± 0,7	8,8 ± 1,1
<b>F1</b>	0,0	0,0	0,0
<b>F2</b>	0,0	0,0	0,0

**Figura 1 –** Imagem do teste de antagonismo dos isolados T40 x B01 e CR 52 x B05



**A e B** - Placa com os isolados T40 x B01- sem inibição;  
**C** - Placa com isolados CR 52 x B05- com inibição;  
**D** - Placa com isolados T40 x B05- com inibição;