Inibição de diferentes formas de ocratoxina derivadas de *Aspergillus carbonarius* ao empregar *Bacillus* spp. como estratégia de biocontrole em uvas

Rafaela Diogo Silveira¹, Flávio Fonseca Veras¹, Adriano Brandelli¹, Juliane Elisa Welke¹

Resumo

Espécies de *Bacillus* têm sido utilizadas como estratégia de biocontrole para reduzir o uso de fungicidas sintéticos na viticultura, os quais podem trazer diversas consequências negativas, incluindo o risco ocupacional e geração de resíduos no solo, rios e nas próprias uvas. *Aspergillus carbonarius* é um fungo encontrado em uvas que pode produzir ocratoxina A (OTA), entre outras ocratoxinas (OTs), em uvas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de quatro cepas de *Bacillus* spp. (P1, P7, P11 e P45) em inibir o desenvolvimento de *A. carbonarius* e a síntese de OTs em uvas. A ocorrência de formas de ocratoxina (OT) foi verificada com o uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo (LC-QtoF-MS). As uvas tratadas com a cepa P1 não apresentaram colônias fúngicas (100% de redução), já as cepas P7, P11 e P45 causaram redução fúngica em 95, 95 e 61%, respectivamente. Além da OTA, foram identificadas outras seis formas de OTs nas uvas inoculadas com *A. carbonarius*: OT α , OT β , OT α metil-éster, OT α amida, e N-formil-OT α amida. Dessas, quatro OTs (OT β , OT α metil-éster, OT α amida, N-formil-OT α amida) foram relatadas pela primeira vez em uvas. Todas as cepas de *Bacillus* testadas foram capazes de inibir a síntese de OTA. Nas uvas tratadas com as cepas P1 e P7 nenhuma OT foi encontrada. Já nas uvas tratadas com as cepas P11 e P45, OT α e OT β foram detectadas. Nas uvas tratadas com a cepa P45 também identificamos OT α metil-éster e a N-formil-OT α amida.

Palavras-chave: biofungicida; ocratoxina A; *Bacillus*; uvas; ocratoxinas.

Introdução

Um dos desafios na viticultura é o controle fúngico, pois as condições climáticas das regiões vitivinícolas favorecem a ocorrência desses microrganismos. A ocorrência de *Aspergillus carbonarius* em uvas é menos frequente do que outros fungos do mesmo gênero, entretanto, quase todos os isolados produzem níveis altos de OTA (WELKE, 2019). A exposição a essa micotoxina está relacionada a efeitos genotóxicos, nefrotóxicos, teratogênicos, imunossupressores, entre outros (CIMBALO; FONT; MANYES, 2020). Além disso, a OTA está classificada como possivelmente carcinogênica para humanos (grupo 2B) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993). Além da OTA, outras OTs já foram identificadas em culturas de *A. carbonarius*, como a OT α , OT β , OTC, entre outras (GIL-SERNA; VÁZQUEZ; PATIÑO, 2020; WANG *et al.*, 2016).

O uso de fungicidas sintéticos é uma prática comum para o controle das infecções fúngicas. Entretanto, sua aplicação está associada ao aumento da resistência dos fungos a esses produtos químicos, além de causar danos ao ambiente e à saúde humana (ZHANG, Hongyin *et al.*, 2020). Devido ao impacto negativo causado pelo uso de fungicidas sintéticos, o estudo de métodos alternativos utilizando agentes de biocontrole vem se destacando. Espécies de *Bacillus* têm sido exploradas por possuírem o potencial de inibir o desenvolvimento fúngico e

a biossíntese de micotoxinas (REN *et al.*, 2020). A atividade antifúngica de *Bacillus* spp. pode estar relacionada à capacidade de sintetizar lipopeptídeos, sideróforos, compostos voláteis e enzimas, além de competição por espaço e nutrientes com os patógenos (CALVO *et al.*, 2019; CAULIER *et al.*, 2019).

Em trabalho prévio, dez cepas de *Bacillus* isoladas de ambiente aquático na região Amazônica, Brasil, foram testadas contra fungos toxigênicos em meio de cultura (VERAS *et al.*, 2016). O objetivo deste estudo foi avaliar as quatro cepas mais promissoras selecionadas como agentes de biocontrole para a inibição de *A. carbonarius* e a ocorrência de OTs em uvas.

Material e Métodos

Uvas (*Vitis vinífera*) cultivar Chardonnay, colhidas em 2019 na cidade de Canela, Rio Grande do Sul, Brasil, foram usadas. As uvas foram submetidas à desinfecção com hipoclorito de sódio 1%.

A. carbonarius (ITAL293) foi cultivado em meio ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a 25°C. As cepas de *Bacillus* utilizadas neste estudo (P1, P7, P11 e P45) foram isoladas de ambiente aquático da região Amazônica, e previamente descritas como as mais promissoras contra fungos toxigênicos em testes *in vitro* (VERAS *et al.*, 2016). As cepas de *Bacillus* foram cultivadas em caldo *Brain-Heart infusion* (BHI) à 37°C.

¹Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43212, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. e-mail: rafaela_dsilveira@hotmail.com

O efeito das cepas de *Bacillus* (P1, P7, P11 e P45) sobre o crescimento de *A. carbonarius* em uvas foi avaliado através da imersão das bagas na suspensão de células de *Bacillus* 10⁹ UFC mL⁻¹, e posteriormente na suspensão de esporos de *A. carbonarius* 10³ esporos mL⁻¹. As uvas foram incubadas por 7 dias a 30°C. O efeito inibitório das cepas de *Bacillus* foi avaliado pela contagem de colônias de fungos e por inspeção visual de acordo com JIANG *et al.*, (2014).

As OTs foram extraídas das uvas com acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (v/v) e analisadas com o uso da LC-QTOF-MS em coluna C₁₈, fase móvel composta por água MilliQ:ácido acético:acetato de amônia e acetonitrila:ácido acético:acetato de amônia com fluxo de 0,4 mL min⁻¹. Os compostos foram identificados através do tempo de retenção, massa protonada, padrão de fragmentação, e ordem de eluição na coluna C₁₈ em comparação com os dados da literatura (BITTNER *et al.*, 2015; GONZÁLEZ-ARIAS *et al.*, 2017; ZHANG, Jian *et al.*, 2016).

As análises estatísticas foram realizadas no software XLSTAT2017 (Addinsoft, New York, USA).

Resultados e Discussão

A contagem de colônias fúngicas verificada nas bagas de uvas inoculadas com as cepas de *Bacillus* e a porcentagem de bagas de uvas que não apresentaram desenvolvimento fúngico após o uso dos agentes de biocontrole está apresentada na Figura 1. Todas as cepas bacterianas causaram redução significativa (p <0,05, de acordo com o teste t de Student) na contagem de colônias fúngicas quando comparadas às uvas do grupo controle. As cepas P1, P7 e P11 foram as mais eficientes. As bagas tratadas com a cepa P1 não apresentaram colônias de fungos (100% de redução), enquanto as cepas P7 e P11 causaram uma redução de cerca de 95% na contagem de fungos. A menor porcentagem de redução nas contagens de colônias de fungos foi encontrada para a cepa P45 (61%).

A espessura e a dureza da casca da uva são fatores-chave na colonização de *A. carbonarius*. Cultivares com menor espessura de casca e dureza, como as uvas Chardonnay em estudo, são mais suscetíveis à colonização por fungos do que outras cultivares. Portanto, controlar o crescimento de *A. carbonarius* torna-se mais desafiador em cultivares com essas características de casca (VERAS *et al.*, 2020).

A Tabela 1 mostra o tempo de retenção, massa monoisotópica e relação massa-carga (m/z) de íons precursores das OTs detectadas usando LC-QToFMS. Foram encontradas seis formas de OT nas uvas inoculadas com *A. carbonarius*, incluindo OTα, OTβ, OTα metil-éster, OTα amida, N- formil- OTα amida e OTA. A presença de OTβ, OTα metil-éster, OTα amida e N-formil-OTα amida não foi relatada anteriormente em uvas.

O efeito das diferentes cepas de *Bacillus* sobre a ocorrência de OTs está disposto na Figura 2. As OTs foram quantificadas como equivalente à OTA usando uma curva analítica (y = 317673x - 6255,1) com linearidade adequada (coeficiente de determinação, R² de 0,9998), limite de detecção (LOD; 0,01 µg kg⁻¹) e o limite de quantificação (LOQ; 0,05 µg kg⁻¹) mostram que o método é suficientemente sensível para quantificar OTs em uvas, uma vez que esses valores são, respectivamente, 200 e 40 vezes inferiores ao limite máximo permitido para OTA em produtos de uva (2 µg kg⁻¹) pela Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION (EFSA), 2006) e agência Brasileira (ANVISA, 2011). GALLO *et al.*, (2012) relataram o OTα como produto da hidrólise da OTA por *A. carbonarius*, o que foi sugerido como estratégia de autoproteção. Esta hipótese também poderia ser investigada em relação ao metabolismo de *A. carbonarius* na presença de *Bacillus* spp. A inibição da síntese de OTA também foi verificada quando *Bacillus vallismortis* EBHVSH28 e *B. amyloliquefaciens* EBHVSH29 foram usados como estratégia de biocontrole para uvas. Outras ocratoxinas não foram avaliadas (EL-SHANSHOURY *et al.*, 2018).

Figura 1: Porcentagem de bagas de uvas que não apresentaram desenvolvimento fúngico após o uso dos agentes de biocontrole (A) e contagem de colônias fúngicas verificadas nas bagas de uvas inoculadas com as cepas de *Bacillus* (B). O asterisco indica uma diferença significativa entre as uvas tratadas com *Bacillus* e as uvas controle (p <0,05, de acordo com o teste t de Student).

Tabela 1: OTs identificadas nas uvas inoculadas com *A. carbonarius* (10³ esporos mL⁻¹)

Micotoxina	OTα	OTβ	OTα metil- éster	OTα amida	N-Formil- OTα amida	OTA
Variáveis analíticas						
TR (min) ^a	1,0	1,1	1,2	1,4	1,5	2,5
Massa monoisotópica	256,0139	222,0528	270,0295	255,0298	283,0247	403,0823
m/z íon precursor e modo	294,9776 [M+K] ⁺	245,0426 [M+Na] ⁺	253,0268 [M+H-H2O] ⁺	273,0642 [M+NH4] ⁺	284,0326 [M+H] ⁺	404,0901 [M+H] ⁺

^a Tempo de retenção em minutos.

Todas as cepas de *Bacillus* foram capazes de inibir a síntese de OTA, a forma mais tóxica de OT. As uvas tratadas com *Bacillus* sp. P1 não apresentaram crescimento fúngico, e consequentemente, nenhuma OT foi encontrada quando esta cepa foi usada nas uvas. *Bacillus* sp. P7 também foi capaz de inibir todas as OTs que foram identificadas nas uvas do grupo controle.

Nas uvas tratadas com *Bacillus* sp. P11, OT α e OT β foram detectadas. Níveis semelhantes dessas OTs foram encontrados nas uvas tratadas com a cepa P45, além das outras formas de OTs como OT α metil-éster e a N-formil-OT α amida. Os níveis encontrados nas uvas tratadas com essas cepas (P11 e P45) foram cerca de 97% mais baixos do que aqueles encontrados nas uvas controle.

Referências

ANVISA. RDC No 7, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. 2011.

BITTNER, Andrea; CRAMER, Benedikt; HARRER, Henning; HUMPF, Hans Ulrich. Structure elucidation and in vitro cytotoxicity of ochratoxin α amide, a new degradation product of ochratoxin A. *Mycotoxin Research*, v. 31, n. 2, p. 83–90, 2015.

CALVO, H.; MENDIARA, I.; ARIAS, E.; BLANCO, D.; VENTURINI, M. E. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food Microbiology*, v. 82, n. January, p. 62–69, 2019.

CAULIER, Simon; NANNAN, Catherine; GILLIS, Annika; LICCIARDI, Florent; BRAGARD, Claude; MAHILLON, Jacques. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. FEB, p. 1–19, 2019.

CIMBALO, A; FONT, G; MANYES, L. Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 137, p. 111–161, 2020.

EL-SHANSHOURY, Abd El-Raheem R; EL-HALMOUCH, Yasser H; MOHAMED, Samia F; FAREED, Mervat F. Potential of Grape Epiphytic Antagonists to Biocontrol *Aspergillus* Transmission and Accumulation of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Post Harvest Taify Table Grape. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, v. 9, n. 10, p. 1–10, 2018.

EUROPEAN COMMISSION (EFSA). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union*, 2006.

GALLO, Antonia; BRUNO, Kenneth S.; SOLFRIZZO, Michele; PERRONE, Giancarlo; MULÉ, Giuseppina; VISCONTI, Angelo; BAKER, Scott E. New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 23, p. 8208–8218, 2012.

GIL-SERNA, Jéssica; VÁZQUEZ, Covadonga; PATIÑO, Belén. Genetic regulation of aflatoxin, ochratoxin A, trichothecene, and fumonisin biosynthesis: A review. *International Microbiology*, v. 23, n. 1, p. 89–96, 2020.

GONZÁLEZ-ARIAS, Cyndia A.; MARÍN, Sonia; ROJAS-GARCÍA, Aurora E.; SANCHIS, Vicente; RAMOS, Antonio J. UPLC-MS/MS analysis of ochratoxin A metabolites produced by Caco-2 and HepG2 cells in a co-culture system. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 333–340, 2017.

Conclusões

As cepas de *Bacillus* P1, P7, P11 e P45 mostraram potencial para serem utilizadas como agentes de controle biológico para prevenir ou reduzir o crescimento de *A. carbonarius* e a ocorrência de OTs em uvas. A síntese da OTA, a forma mais tóxica da OT, foi inibida pelas quatro cepas de *Bacillus* em estudo. A cepa P1 revelou ser o agente de biocontrole mais promissor, apresentando 100% de inibição fúngica. Seis formas de OT foram identificadas por LC-QToF-MS nas uvas inoculadas com *A. carbonarius*: OT α , OT β , OT α metil-éster, OT α amida, e N-formil-OT α amida. O potencial promissor das cepas de em inibir o desenvolvimento de *A. carbonarius* e síntese de OTs em uvas abre perspectivas para novas opções de biofungicidas para a agricultura.

IARC. International Agency of Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1993. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc>.

JIANG, Chunmei; SHI, Junling; LIU, Yanlin; ZHU, Chengyong. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control*, v. 35, n. 1, p. 41–48, 2014. DOI 10.1016/j.foodcont.2013.06.054.

REN, Xianfeng; ZHANG, Qi; ZHANG, Wen; MAO, Jin; LI, Peiwu. Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors. *Toxins*, v. 12, n. 1, p. 1–22, 2020.

VERAS, Flávio Fonseca; CORREA, Ana Paula Folmer; WELKE, Juliane Elisa; BRANDELLI, Adriano. Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. *International Journal of Food Microbiology*, v. 238, p. 23–32, 2016.

VERAS, Flávio Fonseca; DACHERY, Bruna; MANFROI, Vitor; WELKE, Juliane Elisa. Colonization of *Aspergillus carbonarius* and accumulation of ochratoxin Aa in *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, and hybrid grapes – research on the most promising alternatives for organic viticulture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 101, n. 6, p. 2414–2421, 2020.

WANG, Yan; WANG, Liuqing; LIU, Fei; WANG, Qi; SELVARAJ, Jonathan Nimal; XING, Fuguo; ZHAO, Yueju; LIU, Yang. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins*, v. 8, n. 3, p. 1–15, 2016.

WELKE, Juliane Elisa. Fungal and mycotoxin problems in grape juice and wine industries. *Current Opinion in Food Science*, v. 29, p. 7–13, 2019. DOI 10.1016/j.cofs.2019.06.009.

ZHANG, Hongyin; GODANA, Esa Abiso; SUI, Yuan; YANG, Qiya; ZHANG, Xiaoyun; ZHAO, Lina. Biological control as an alternative to synthetic fungicides for the management of grey and blue mould diseases of table grapes: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 450–462, 2020.

ZHANG, Jian; ZHU, Liuyang; CHEN, Haoyu; LI, Min; ZHU, Xiaojuan; GAO, Qiang; WANG, Depei; ZHANG, Ying. A Polyketide Synthase Encoded by the Gene An15g07920 Is Involved in the Biosynthesis of Ochratoxin A in *Aspergillus niger*. [S. l.: s. n.], 2016. v. 64.