

Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*

Evaluation of potential antagonistism in yeasts, seeking biocontrol of spoilage by *Penicillium expansum*

Alexandre Rodrigo Coelho^{1*}; Gisele Maria de Andrade Nóbrega²; Fernando Carlos Pagnocca³; Fernando Leite Hoffmann⁴; Ken-ichi Harada⁵; Elisa Yoko Hirooka⁶

Resumo

As perdas consideráveis no armazenamento de maçãs decorrem principalmente de desordens microbiológicas, causadas por *Penicillium expansum*, que além de colonizar o fruto e causar dano à polpa, produz a patulina, micotoxina teratogênica e cancerígena. Entre as alternativas ao tradicional tratamento químico de doenças pós-colheita de frutos, enfoca-se o biocontrole por leveduras antagonistas, com ênfase em linhagens *killer*, em função da baixa possibilidade de resíduos tóxicos e com ampla inocuidade demonstrada nos processos fermentativos. O objetivo deste trabalho foi analisar o potencial antagônico de leveduras no controle de *P. expansum*, mediante antifungigrama em meio sólido e líquido. Do total de 44 leveduras isoladas (16 de frutas, 10 de silagem de milho e 18 de formigueiro de laboratório), 20 apresentaram antagonismo perante esporos de *P. expansum* em ágar Meio Para Levedura, sendo *Debaryomyces hansenii* C1 responsável por maior atividade associada à competição por nutrientes (zona de inibição de 31 mm) e *D. hansenii* C7 por antibiose/hiperparasitismo (15 mm). Entretanto, o ensaio realizado com o sobrenadante de cultivo reduziu o número de cepas ativas em cinco, sendo *Pichia ohmeri* 158 e *Candida guilliermondii* P3 as de maior atividade antagônica. No antifungigrama em meio líquido (caldo MPL) o sobrenadante do cultivo de *C. guilliermondii* (25°C/72 horas) inibiu 58,15% da germinação dos esporos de *P. expansum* e *P. ohmeri* (25°C/48 horas) inibiu o desenvolvimento de hifas em 66,17%. A atividade do meio extracelular baseado em antibiose sugeriu mecanismo associado ao caráter *killer*, uma vez que ambas as leveduras foram positivas perante as linhagens padrão *S. cerevisiae* NCYC 1006 e *P. kluyveri* CAY-15. A diferença entre os sobrenadantes obtidos do cultivo destas leveduras isoladamente e em interação com o fungo teste, visando estímulo adicional na produção de substância antifúngica, não foi significativa ($P > 0,05$). De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a aplicação de leveduras antagonistas constitui ferramenta promissora no controle biológico de *P. expansum* em pós-colheita de maçã.

Palavras-chave: *Penicillium expansum*, leveduras antagonistas, biocontrole

Abstract

Considerable losses during apple fruit storage occur due to microbiological diseases, mainly caused by *Penicillium expansum*, which in addition to fruit pulp deterioration produces patulin, a mycotoxin with carcinogenic and teratogenic activity. Biological control of post-harvest disease by antagonist yeasts

¹ Prof. Dr. Curso de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Francisco Beltrão, PR. E-mail: arcoelho@utfpr.edu.br

² Prof^a Dr^a do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, UEL. E-mail: giselenobrega@uel.br

³ Prof. Dr. da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP. E-mail: pagnocca@rc.unesp.br

⁴ Prof. Dr. do Curso de Engenharia de Alimentos, UNESP, São José do Rio Preto, SP. E-mail: hoffmann@ibilce.unesp.br

⁵ Prof. Dr. da Faculty of Pharmacy, Meijo University, Nagoya, Japan. E-mail: kiharada@ccmfs.meijo-u.ac.jp

⁶ Prof^a Dr^a do Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, UEL, Londrina, PR. E-mail: hirooka@uel.br

* Autor para correspondência

focused on killer toxins is an appreciable alternative to the chemical fungicides, due to the low possibility of toxic residues demonstrated during fermentative processes. Twenty out of 44 yeasts (16 isolated from fruits, 10 from corn silage and 18 from laboratory anthill), showed antagonism against spores of *P. expansum*. The assay in solid medium pointed the strongest nutrient competition antagonism by *D. hansenii* strain C1 (31 mm inhibition diameter), while *D. hansenii* strain C7 (15 mm) showed higher antibiosis and parasitism pattern. In the following step the extracellular activity was tested performing the assay with culture supernatant in Yeast Medium agar, where *C. guilliermondii* P3 was more effective against conidia germination (inhibition rate of 58.15%) while *P. ohmeri* showed better inhibition on micelial growth (66.17%). The antibiosis showed by both yeasts could suggest probable mechanism associated with killer phenomenon, once both strains were killer positive against sensitive reference strains (*S. cerevisiae* NCYC 1006 and *P. kluyveri* CAY-15). In order to enhance the production of antifungal substance, these yeasts were cultivated with *P. expansum*, but the difference between culture supernatant obtained from yeasts cultivated alone and with mould was not significant ($P > 0.05$). The results demonstrated that the yeasts application constitute a promising tool, enhancing the biological control of *P. expansum* in post-harvest diseases of apple fruit.

Key words: *Penicillium expansum*, antagonist yeasts, biocontrol

Introdução

As perdas na armazenagem de maçã decorrem principalmente por deteriorações microbianas (JANISIEWICZ et al., 1998), principalmente bolores (BRACKETT, 1993). Devido a perdas substanciais no processamento industrial (SUGAR et al., 1994), *Penicillium* spp representa o principal agente deteriorante, com destaque a *Penicillium expansum*, que além de colonizar o fruto e causar dano à polpa, produz a patulina, micotoxina teratogênica e cancerígena (PRIETA et al., 1994; SYDENHAM et al., 1997).

A aplicação indiscriminada de fungicidas químicos no controle de frutas pós-colheita vem sendo desencorajada por afetar a saúde humana e o ecossistema, aliado ao surgimento de cepas resistentes (SUGAR; SPOTTS, 1999; SANTOS; SANCHEZ; MARQUINA, 2004). O biocontrole com leveduras constitui método alternativo apreciável, cujo mecanismo baseia-se na competição por nutrientes (WILSON et al., 1994; JANISIEWICZ; TWOROSKI; SHARER, 2000), antibiose e hiperparasitismo (DROBY; CHALUTZ, 1994; CASTORIA et al., 1997; CHAN; TIAN, 2005). A exemplo citam-se *Candida oleophila* em ASPIRE® (Ecogen) e BioNext (SynTech Global), e *Cryptococcus*

albidus em YIELD PLUS® (Ancor Yeast), no controle de maçãs pós-colheita, com atuação caracterizada por competição de nutrientes ou hiperparasitismo (SUGAR; SPOTTS, 1999; EL GHAOUTH et al., 2000; DROBY et al., 2003, DROBY et al., 2009). O tratamento de maçã com *Candida sake* controlou *P. expansum* efetivamente, reduzindo o diâmetro da lesão em 80% e ocorrência de lesões em 50% (TEIXIDO; USALL; VINAS, 1999). A constatação da letalidade de fator *killer* em determinadas leveduras perante fungos filamentosos ampliou as perspectivas de aplicação, sob o ponto de vista de biocontrole dos fitopatógenos e bolores deteriorantes de alimentos (JACOBS; VAN VUOREN, 1991). Sendo assim, o controle de doenças de fruto pós-colheita devido a fungos deteriorantes/toxigênicos, aliado à investigação de compostos bioativos inócuos compatíveis com a aplicação prática, é assunto prioritário para garantir a qualidade e segurança de produtos oriundos da fruticultura. Neste trabalho propôs-se avaliar o potencial antagônico *in vitro* de leveduras produtoras de substâncias antifúngicas, isoladas de frutas, silagem de milho e formigueiro de laboratório, visando biocontrole da deterioração de maçãs por *P. expansum*.

Material e Métodos

Fungo teste

Foi utilizada a cepa toxigênica de *P. expansum* nº 2, isolada de maçã cv. Gala, produtora de patulina, mantida na micoteca no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos-TAM, Universidade Estadual de Londrina-PR. O fungo, proveniente de cultura monospórica (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983), foi mantido em Ágar Batata Dextrose-BDA inclinado a 4°C na ausência de luz, e o inóculo padronizado com auxílio de câmara de Newbauer (10^5 esporos/mL) para os testes subseqüentes.

Leveduras antagonistas

Um total de 44 leveduras (16 isoladas de

frutas, 10 de silagem de milho, 18 de formigueiro de laboratório), foi utilizado para o estudo de características antagonísticas (antibiose, competição por nutrientes, aderência à superfície do patógeno) em relação à presença de fator *killer*, conforme apresentado na Tabela 1. As leveduras isoladas de frutas com o código A consistiram de cepas cujos estudos preliminares foram realizados por Levy et al. (2002). As de código C foram isoladas de silagem de milho por Levy (2003), enquanto que dezoito isoladas de formigueiro de laboratório foram fornecidas pelo Centro de Estudos de Insetos Sociais-CEIS, UNESP, Rio Claro-SP (cepas 04, 11, 19, 25, 31, 42, 54, 55, 61, 69, 72, 73, 90, 102, 142, 145, 158, 166). Aquelas de código G e P foram isoladas de uva e mamão, respectivamente, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos - UEL, Londrina-PR.

Tabela 1. Leveduras isoladas e respectivos códigos empregados nos ensaios.

Leveduras	Código dos isolados
<i>Aureobasidium</i> spp	102* ^k
<i>Candida homilientoma</i>	11* ^k ; 69* ^k
<i>Candida guilliermondii</i>	P1 ^k ; P2 ^k ; P3 ^k
<i>Candida sake</i>	90* ^k
<i>Cryptococcus aerius</i>	19* ^k
<i>Cryptococcus albidus</i>	145* ^k
<i>Debaryomyces hansenii</i>	31* ^k ; 61* ^k ; C1; C2; C3; C4; C5; C6; C7; C8; C9; C10
<i>Kloeckera</i> spp	G1
<i>Pichia anomala</i>	142* ^k
<i>Pichia guilliermondii</i>	42* ^k ; 72* ^k
<i>Pichia ohmeri</i>	158* ^k
<i>Pichia membranifaciens</i>	A1; A2 ^k ; A4 ^k ; A5; A6; A7 ^k ; A8
<i>Rhodotorula glutinis</i>	73* ^k ; 166* ^k
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	G2; G3; G4; G5
<i>Sporobolomyces roseus</i>	A3 ^k
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	04* ^k ; 54* ^k ; 55* ^k
<i>Tremella foliacea</i>	25* ^k

* Leveduras fornecidas pelo Laboratório do CEIS-UNESP, Rio Claro; cepas de código A (isoladas de maçã) e C (isoladas de silagem de milho) são provenientes de estudos realizados por Levy et al. (2002) e Levy (2003); as cepas de código G e P foram isoladas de uva e mamão, respectivamente; ^k leveduras *killer*.

Para o isolamento, 10 g da parte deteriorada da fruta foram diluídos em 90 mL de água peptonada estéril a 0,1%, seguido de diluições decimais seriadas até 10^{-5} . Um volume de 0,1 mL das diluições foi assepticamente pipetado e distribuído em placas de Petri estéreis previamente inoculadas com 10^5 esporos de *P. expansum* (suspendidos em Tween 80 e contagem realizada em câmara de Neubauer) em 20 mL de Ágar Meio Para Levedura-MPL pH 3,5 (glicose 2,0%; extrato de levedura 0,5%; NaH_2PO_4 0,23%; NaCl 1,0%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%; ágar 1,8%), acidificado com ácido tartárico 10%. As leveduras foram isoladas após incubação a 25°C por 5 dias e mantidas em Ágar GYMP inclinado (glucose 2,0%, extrato de malte 1,0%, extrato de levedura 0,5%, NaHPO_4 0,2% e ágar 1,8%) a 4°C; para os testes subseqüentes, reativou-se em Meio MPL a 25°C/48 horas.

A identificação das leveduras isoladas por Levy et al. (2002) e Levy (2003), no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos-UNESP-São José do Rio Preto-SP), bem como daquelas pertencentes ao Laboratório CEIS-UNESP-Rio Claro-SP, seguiu metodologia convencional descrita por Barnett, Payne e Yarrow (1990) e Kurtzman e Fell (1998), enquanto que as leveduras isoladas de mamão e uva foram identificadas utilizando Kit API 20 C AUX System (BioMérieux Vitek, Marcy-l'Etoile, França).

Caracterização de leveduras killer

As leveduras promissoras no controle de *P. expansum* foram caracterizadas quanto ao fator *killer*. Uma alçada da cultura sensível cultivada em ágar Sabouraud glicose foi suspensa em 3 mL de solução salina a 0,85% e padronizada na Escala nº 1 de McFarland. As culturas sensíveis ($3,0 \times 10^6$ células) foram plaqueadas pela técnica de "Pour Plate" em placas de Petri contendo 20

mL de ágar Sabouraud adicionado de 0,003% de azul de metileno (POLONELLI et al., 1983). Em seguida, inoculou-se uma alçada de leveduras testes previamente cultivadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud glicose sob forma de pequenos pontos (2,0 mm de diâmetro) na superfície do meio. Após incubação a 20°C por 72 horas, a presença de fator *killer* foi evidenciada pela formação do halo de inibição ao redor das leveduras testes (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995). As cepas padrão de leveduras sensíveis utilizadas para a caracterização do fator *killer* consistiram de *Candida glabrata* NCYC 366, *C. glabrata* NCYC 388, *Candida albicans* 12A, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006, *Pichia kluyveri* CAY 15 e *P. kluyveri* CAY 270.

Obtenção do extrato bruto

Para o pré-inóculo, uma alçada de levedura foi transferida para Erlenmeyer com 25 mL de Caldo Meio Para Levedura e incubado a 25°C por 24 horas a 150 rpm. O inóculo foi preparado baseando-se na escala de McFarland para bactérias (ITAL, 1995) adaptada para leveduras, recalculando-se para obter os valores de 3×10^7 (escala nº 1) a 3×10^8 leveduras/mL (escala nº 10), considerando que o tamanho de uma levedura equivale a 10 vezes ao bacteriano (LEVY, 2003). A seguir $3,0 \times 10^6$ células de leveduras foram inoculadas em 5 Erlenmeyers contendo 50 mL de Caldo MPL e em 5 Erlenmeyers contendo 50 mL do mesmo caldo com 10^5 esporos de fungo teste. Após 24, 48, 72, 96 e 120 horas a 25°C, os cultivos foram centrifugados ($6.500 \times g/15$ min, 10°C) e o extrato bruto obtido.

Atividade antifúngica em meio sólido

A atividade antifúngica no meio sólido foi analisada pela técnica de semeadura em profundidade (placas de Petri contendo 25 mL de Ágar MPL inoculado com 10^5 esporos de *P.*

expansum). Após a solidificação procedeu-se a uma perfuração no centro da placa (diâmetro, 8 mm) e introduziram-se 100 µL ($3,0 \times 10^6$ células) do cultivo de levedura (Caldo MPL a 25°C/48 horas). As placas de Petri foram incubadas a 25°C e os diâmetros de inibição medidos após 5 dias com auxílio de paquímetro (MOTOMURA; HIROOKA, 1996). Para o teste com sobrenadante de cultivo utilizaram-se procedimentos semelhantes, porém inoculando 100 µL do sobrenadante preparado conforme item 2.4. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Atividade antifúngica em meio líquido

A atividade antifúngica em meio líquido foi realizada baseando-se essencialmente nas metodologias descritas por Janisiewicz, Tworkoski e Sharer (2000) e Chen et al. (1999). O extrato bruto obtido no item 2.4. foi filtrado (membrana “Millipore” 0,20 µm) e inoculado em volume igual (1,0 mL) de Caldo MPL previamente inoculado com 10^5 esporos de fungo teste. Os tubos de ensaio foram incubados a 25°C e procedeu-se à microscopia após 12 horas, determinando-se a germinação dos esporos e tamanho das hifas. Paralelamente preparou-se o controle (branco), inoculando-se 10^5 esporos de *P. expansum* em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de Caldo MPL e 1,0 mL de água destilada estéril. Os resultados foram obtidos perfazendo três repetições, cada uma constituída de quatro dados para a porcentagem de esporos germinados e 40 para a determinação do tamanho de hifas.

Análise Estatística

Os dados da atividade antifúngica exercida pelas leveduras antagonistas sobre a germinação de esporos e o desenvolvimento de hifas de *P.*

expansum foram analisados pelo programa ANOVA/MANOVA (STATISTICA 5.0, 1995) mediante teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta o resultado do antifungigrama em meio sólido, utilizado como método de triagem inicial de leveduras antagonistas de interesse na produção de compostos extracelulares bioativos na inibição de *P. expansum*. Das quarenta e quatro leveduras testadas empregando células íntegras no ágar MPL inoculado com 10^5 esporos de *P. expansum*, 20 (45,5%) apresentaram antagonismo, sendo 15 por competição de nutrientes (cepas G3; G5; A1; A2; A3; A5; A6; A7; C1; C5; 31; 42; 69; 102; 142) e 5 com indícios de antibiose (cepas A4; A8; C7; P3; 158). O diâmetro de inibição caracterizado por competição de nutrientes (desenvolvimento de massa celular) variou de 10 a 31 mm, sendo *D. hansenii* C1 responsável pela formação de maior halo. Em relação aos antagonistas produtores de compostos extracelulares (halos de inibição evidenciados por antibiose), o diâmetro variou de 13 a 17 mm (Tabela 2).

As cepas com indício de antibiose (A4; A8; C7; P3; 158) foram submetidas ao mesmo ensaio (antifungigrama em meio sólido), porém empregando o sobrenadante de cultivo das leveduras. *C. guilliermondii* (cepa P3) e *Pichia ohmeri* (cepa 158) apresentaram os maiores diâmetros de inibição (COELHO et al., 2004), sendo portanto, selecionadas para o ensaio em meio líquido, devido à sensibilidade do método, que permite análise microscópica de hifas e a contagem de esporos germinados (JANISIEWICZ; TWORKOSKI; SHARER, 2000).

Tabela 2. Efeito antagônico de leveduras (células íntegras)* no desenvolvimento de *P. expansum*.

Leveduras/códigos	Diâmetro de inibição (mm) ^E	
	Competição por nutrientes ^a	Antibiose
<i>Debaryomyces hansenii</i> C1	31,00	
<i>D. hansenii</i> C5	11,00	
<i>D. hansenii</i> C7		15,00**
<i>Pichia membranifaciens</i> A1	29,30	
<i>P. membranifaciens</i> A2	22,00 ^k	
<i>Sporobolomyces roseus</i> A3	18,00 ^k	
<i>P. membranifaciens</i> A4		14,00 ^k
<i>P. membranifaciens</i> A5	14,00	
<i>P. membranifaciens</i> A6	25,00	
<i>P. membranifaciens</i> A7	28,00 ^k	
<i>P. membranifaciens</i> A8		13,00
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> G3	14,00	
<i>R. mucilaginosa</i> G5	14,00	
<i>Candida guilliermondii</i> P3		17,00 ^k
<i>C. homilentoma</i> 31	13,00 ^k	
<i>P. guilliermondii</i> 42	10,00	
<i>C. homilentoma</i> 69	16,00	
<i>Aureobasidium</i> sp. 102	10,00 ^k	
<i>P. anomala</i> 142	10,00 ^k	
<i>P. ohmeri</i> 158		17,00 ^k

*:Células íntegras: leveduras cultivadas em Caldo MPL a 25°C/48 h.

**Antagonismo por antibiose e hiperparasitismo.

^a: Diâmetro caracterizado por desenvolvimento de massa celular.

^E: Ensaio com inóculo de células íntegras (3,0 x 10⁶ células) em orifício de 8 mm no ágar MPL previamente inoculado "Pour Plate" com 10⁵ esporos de *P. expansum* (25°C/5 dias), em triplicata.

^k:Leveduras *killer*.

A Tabela 3 apresenta as 13 leveduras *killer* positivas (cepas A2, A3, A4, A7, P1, P2, P3, 31, 102, 142, 145, 158 e 166), do total de 44 analisadas. As cepas A2, A3, A4, P3, 31, 102, 142 e 158 mostraram maior espectro de ação *killer*, com resultados positivos contra duas ou mais leveduras sensíveis. Cinco leveduras (cepas A2, A3, A4, A7 e 142) foram *killer* positivas contra *C. glabrata* NCYC 366 e *C. glabrata* NCYC 388, sugerindo que esta similaridade poderia indicar produção de uma mesma substância antagônica (POLONELLI et al., 1983).

Das treze leveduras identificadas como *killer* positivas, nove (69,23%) apresentaram antagonismo contra *P. expansum* (Tabela 2), seja por competição de nutrientes (cepas A2, A3, A7, 31, 102 e 142) ou por antibiose (cepas A4, P3 e 158). Este fato poderia ampliar a aplicação de leveduras antagonistas em produtos alimentícios evitando a proliferação de bolores e leveduras selvagens (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995).

Tabela 3. Identificação de leveduras positivas para o fator *killer** empregando leveduras sensíveis de referência.

Leveduras sensíveis	Leveduras (+) para fator <i>killer</i>
<i>Pichia kluyveri</i> CAY-15	P1; P2; P3; 31; 102; 142; 145; 158; 166
<i>Pichia kluyveri</i> CAY-270	A2; A4; 102
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC-1006	A2; A3; P3; 102; 142; 158
<i>Candida glabrata</i> NCYC 366	A2; A3; A4; A7; 142
<i>Candida glabrata</i> NCYC 388	A2; A3; A4; A7; 31; 102; 142; 158
<i>Candida albicans</i> 12 ^A	A3; A4

* Ensaio em ágar Sabouraud adicionado de 0,003% de azul de metileno (POLONELLI et al., 1983) com culturas sensíveis ($3,0 \times 10^6$ células) incubadas a 20°C por 72 horas, em triplicata.

A = leveduras isoladas de maçã.

P = leveduras isoladas de mamão.

A Tabela 4 e Figura 1 apresentam as médias gerais dos resultados de três repetições (realizadas ao longo de 4 meses), do antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo de *C. guilliermondii* P3 e *P. ohmeri* 158 contra o desenvolvimento de hifas do fungo teste e a germinação de esporos. Em adição, cultivou-se *C. guilliermondii* P3 e *P. ohmeri* 158 em interação com *P. expansum*, e os sobrenadantes obtidos foram inoculados novamente com o fungo, visando estimular maior produção de substância antagônica, associada a um processo induzido. O sobrenadante obtido dos cultivos de 48 e 72 horas de ambas as leveduras testadas inibiram *P. expansum* com maior intensidade (Tabela 4, Figura 1). O melhor efeito inibitório ocorreu sobre o desenvolvimento de hifas, porém não houve diferença significativa entre o sobrenadante do cultivo de levedura e da interação levedura/fungo ($P > 0,05$, Tabela 4). Com o intuito de analisar se o cultivo simultâneo com *P. expansum* poderia induzir estímulo adicional à antibiose, Levy (2003) também observou atividades similares para ambos os sobrenadantes, confirmando que a produção de substâncias antagônicas pelas leveduras testadas não é estimulada pela presença de fungo teste (Tabela 4, Figura 1A,

1C). Por outro lado, a inibição da germinação de esporos foi significativamente maior utilizando o sobrenadante obtido exclusivamente com cultivo de levedura ($P < 0,05$, Tabela 4), sugerindo que o sobrenadante do cultivo da interação levedura/*P. expansum*, continha produtos do metabolismo do fungo teste que dificultavam a atuação da substância antagônica sobre os esporos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003).

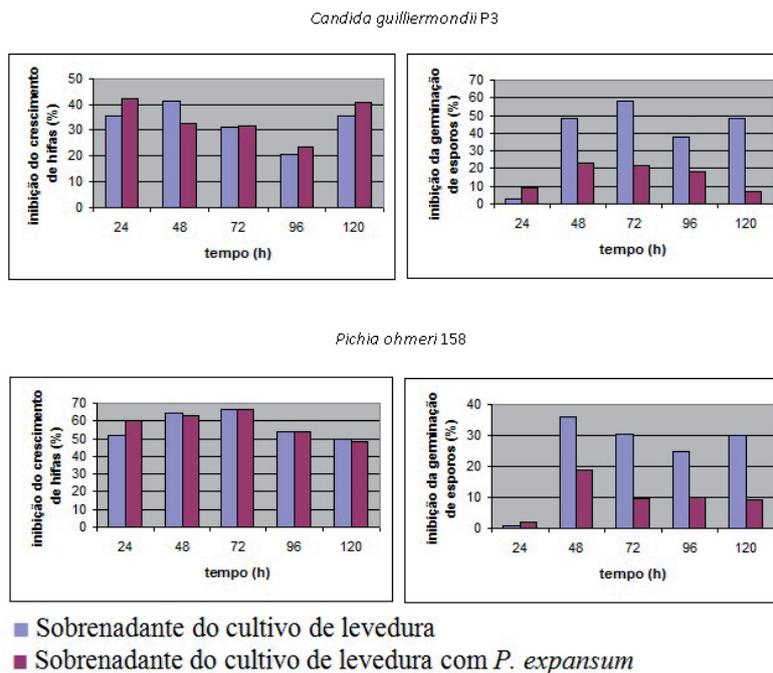
O sobrenadante do cultivo de *C. guilliermondii* obtido após 72 horas de incubação a 25°C inibiu 31,29% do desenvolvimento de hifas e 58,15% da germinação de esporos de *P. expansum*, enquanto que o sobrenadante da interação levedura/fungo inibiu 31,37% do desenvolvimento de hifas e 21,41% dos esporos (Figura 1A, 1B). Com relação à atividade do sobrenadante do cultivo de *P. ohmeri* (25°C/48 horas), este inibiu o desenvolvimento de hifas em 64,37% e a germinação dos esporos de *P. expansum* em 36,17% (Figura 1C, 1D). Não obstante, o sobrenadante derivado da interação *P. ohmeri*/*P. expansum* inibiu o desenvolvimento de hifas em 62,68% e a germinação dos esporos em 18,96%, também após 48 horas de incubação (Figura 1C, 1D).

Tabela 4. Antibiógrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/*P. expansum*.

Incubação (horas)	Comprimento de hifas (µm)				Germinação de esporos (%)			
	Controle		Sobrenadante		Controle		Sobrenadante	
	levedura	levedura/ <i>P. expansum</i>	levedura/ <i>P. expansum</i>	levedura/ <i>P. expansum</i>	levedura	levedura	levedura/ <i>P. expansum</i>	levedura/ <i>P. expansum</i>
<i>Candida guilliermondii</i> P3								
24	93,10±29,97 ^{BB}	60,32±24,86 ^{BA}	53,73±27,38 ^{abA}	69,50±6,45 ^{aA}	67,38±6,23 ^{ba}	63,12±2,36 ^{abA}		
48	91,40±29,77 ^{BC}	53,51±23,89 ^{abA}	61,69±36,82 ^{BB}	81,17±5,27 ^{abB}	42,00±21,10 ^{aA}	62,67±10,66 ^{ab}		
72	76,42±16,55 ^{AB}	52,51±21,43 ^{aA}	52,45±19,01 ^{aA}	84,83±7,83 ^{BB}	35,50±21,21 ^{aA}	66,67±11,17 ^{ab}		
96	95,97±26,29 ^{BB}	76,17±19,20 ^{cA}	73,61±38,74 ^{cA}	85,17±5,42 ^{BC}	53,25±1,71 ^{abA}	69,75±4,24 ^{abB}		
120	94,19±34,90 ^{BB}	60,63±24,27 ^{ba}	55,87±29,32 ^{abA}	86,50±3,11 ^{BB}	44,75±13,68 ^{abA}	80,37±7,42 ^{BB}		
<i>Pichia ohmeri</i> 158								
24	149,55±58,57 ^{aC}	69,13±33,80 ^{BB}	59,07±32,74 ^{aA}	73,67±9,16 ^{aA}	73,17±8,79 ^{ba}	72,08±12,90 ^{ba}		
48	148,45±58,00 ^{ab}	52,90±24,21 ^{aA}	55,42±25,62 ^{aA}	71,67±5,68 ^{ab}	45,75±6,82 ^{aA}	58,08±12,85 ^{ab}		
72	164,27±59,64 ^{abB}	55,58±30,47 ^{aA}	54,95±27,45 ^{aA}	75,67±7,81 ^{ab}	52,58±10,41 ^{aA}	68,33±11,71 ^{abB}		
96	175,77±57,04 ^{BB}	81,06±45,40 ^{cA}	81,40±42,22 ^{ba}	80,33±11,50 ^{abB}	60,25±17,44 ^{abA}	72,33±7,30 ^{baB}		
120	165,98±62,41 ^{abB}	83,12±43,68 ^{cA}	85,57±45,77 ^{ba}	79,00±6,90 ^{ab}	55,42±17,13 ^{aA}	71,75±7,39 ^{BB}		

* Ensaio realizado em caldo MPL incubado a 25°C/12 horas; cada valor corresponde à média dos valores de 120 dados para crescimento de hifas (triplicata, 40 dados por repetição) e 12 dados para germinação de esporos (triplicata, 4 dados por repetição). Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Figura 1. Efeito inibitório do sobrenadante dos cultivos* (24 a 120 h) de A) *C. guilliermondii* P3 e interação *C. guilliermondii* P3/*P. expansum* no desenvolvimento de hifas do fungo teste, B) *C. guilliermondii* P3 e interação *C. guilliermondii* P3/*P. expansum* na germinação de esporos do fungo teste, C) *P. ohmeri* 158 e interação *P. ohmeri* 158/*P. expansum* no desenvolvimento de hifas do fungo teste, D) *P. ohmeri* 158 e interação *P. ohmeri* 158/*P. expansum* na germinação de esporos do fungo teste, após 12 horas de incubação a 25°C.



*Cultivo estático realizado em 50 mL de Caldo MPL durante cinco períodos diferentes a 25°C, seguido de centrifugação (6.500 x g/15 min, 10°C).

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se a utilização dos sobrenadantes do cultivo isolado de *P. ohmeri* (48 horas) e *C. guilliermondii* (72 horas), que além de inibirem a germinação de esporos e retardarem o desenvolvimento de *P. expansum*, não conteriam metabólitos do fungo teste, a exemplo de patulina, micotoxina teratogênica e cancerígena (PRIETA et al., 1994; SYDENHAM et al., 1997). Testes de antifungigrama em meio líquido realizados com leveduras do gênero *Aureobasidium* spp incubados a 25°C por 24 horas, inibiram a germinação dos esporos de *P. expansum* em 98% (JANISIEWICZ; TWORKOSKI; SHARER, 2000). Entretanto, Zhang et al. (2005) não obtiveram resultados satisfatórios no controle de *Botrytis cinerea* com o sobrenadante do cultivo

de *C. laurentii*, embora atingisse o controle total ao utilizar uma suspensão de células íntegras, indicando atuação por competição de nutrientes.

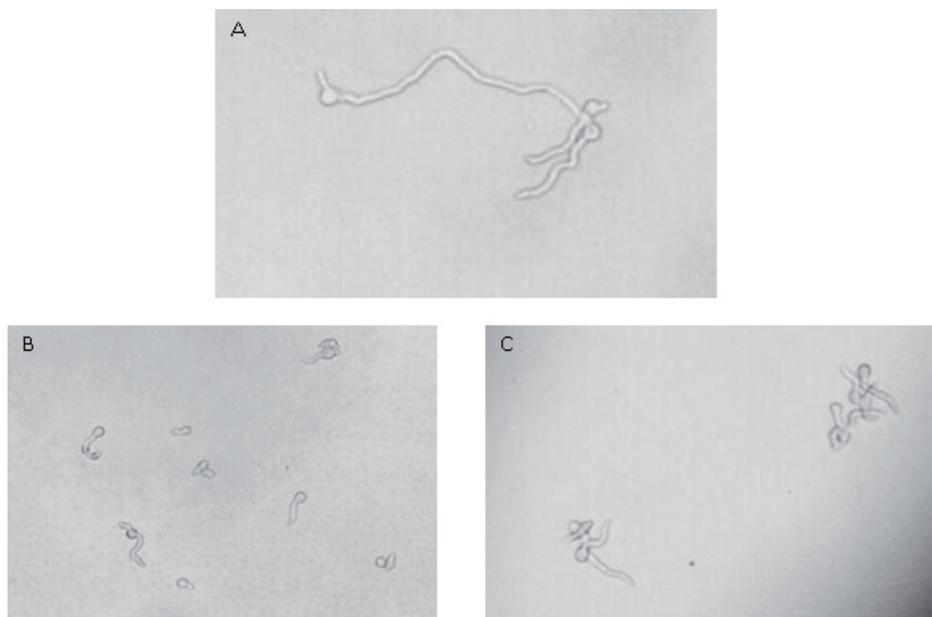
Wisniewsky et al. (1991) atribuíram o sucesso da aplicação de leveduras à facilidade de integrar o uso ao ambiente e sistema de manejo da fruta. Usall et al. (2001) obtiveram ótimos resultados utilizando *C. sake* (cepa CPA-1) no biocontrole de doenças pós-colheita causadas por *P. expansum* em maçãs, com redução na ocorrência de frutas deterioradas superior a 70%. Guinebretiere et al. (2000) também obtiveram sucesso no tratamento contra *B. cinerea* em morangos armazenados, aplicando 10³ UFC/lesão de *Candida reukaufii* cepas 5L3, 10CL4, 10L2 e *Candida pulcherima* 10L8 isoladas da própria fruta. A aplicação de 10⁷ células por mL de *Candida*

membranifaciens e *Rhodotorula mucilaginosa* mostrou uma variação de inibição de 20,6 a 61,4% no controle de *P. expansum* (GHOLAMNEJAD; ETEBARIAN; SAHEBANI, 2010).

A Figura 2 demonstra a ótima atuação dos sobrenadantes dos cultivos de *C. guilliermondii* e *P. ohmeri* sobre o desenvolvimento de hifas de *P. expansum*. A análise microscópica foi padronizada em 12 horas de incubação a 25°C, após inoculação

dos esporos fúngicos no sobrenadante de cultivo, visto que a leitura em 24 horas mostrava intenso desenvolvimento micelial, impossibilitando determinar o desenvolvimento das hifas. O fato sugere instabilidade da substância antifúngica devido à redução dos componentes presentes no meio de cultivo após utilização por *P. expansum* na fase log, caracterizando assim um efeito fungistático.

Figura 2. Desenvolvimento de *P. expansum* após incubação a 25°C/12 horas em A: Caldo MPL e água destilada estéril (controle); B: Caldo MPL e sobrenadante do cultivo de *C. guilliermondii* P3 (25°C/72 h.); C: Caldo MPL e sobrenadante do cultivo de *P. ohmeri* (25°C/48 h.); aumento 100 X.



Linardi e Machado (1990), salientaram a importância comercial da produção de substâncias antifúngicas por leveduras, constituídas de grupo microbiano relevante nos estudos de aplicação industrial. A constatação da letalidade do fator *killer* contra fungos filamentosos em determinadas leveduras ampliou ainda mais as perspectivas de aplicação no biocontrole de fitopatógenos e bolores deteriorantes de alimentos (JACOBS; VAN VUOREN, 1991). Walker, McLeod e Hodgson (1995) realizaram os trabalhos pioneiros,

constatando a susceptibilidade de fungos filamentosos deteriorantes a leveduras *killer*. *S. cerevisiae* enquadrou-se entre os agentes com maior potencial antagonico, cuja exposição causou vacuolização da hifa e pigmentação do micélio, indicando lise celular (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995). Santos, Sanchez e Marquina (2004) relataram a inibição de *B. cinerea* CYC 20010 por *Pichia membranifaciens* CYC 1106 utilizando-se tanto células íntegras (diâmetro de inibição de 32 mm), como a toxina *killer* pura. Os

metabólitos produzidos por *C. membranfaciens* e *R. mucilaginoso* apresentaram ótima atuação no controle de *P. expansum*, com inibição de até 89,1 e 86,0% do desenvolvimento do fungo teste, respectivamente. Em estudo realizado por Levy (2003) com células íntegras de *D. hansenii* C7 em caldo MPL contendo 10^5 esporos de *P. expansum*, observou-se aderência de células aos propágulos fúngicos, indicando atividade antifúngica associada ao hiperparasitismo, além de antibiose.

Entretanto, este estudo enfoca o avanço na utilização de compostos extracelulares produzidos por leveduras antagonistas contra *P. expansum*, isto é, sem aplicação direta da levedura com o fungo. Embora neste trabalho e no realizado por Levy (2003), a produção de exocompostos não fosse estimulada pela presença do fungo teste, Castoria et al. (2001) demonstraram a inibição de *P. expansum* e *B. cinerea* por *A. pullulans* em maçã e pêra devido à competição de nutrientes, aliado a hidrólise da parede celular por β -1-3 glucanase e N acetil β -D-glucosaminidase (nagase), induzida pela adição de extrato micelial seco de *P. expansum*. A ineficácia do filtrado produzido somente com o cultivo de *A. pullulans* confirmou os resultados, sendo o processo similar à produção de quitinase desencadeado no mecanismo natural de defesa em fruta pós-colheita. Chan e Tian (2005), relataram maior interação direta de *P. membranfaciens* com hifas de *Monilinia fructicola*, *P. expansum* e *Rhizopus stolonifer*, quando comparado com o efeito interativo de *C. albidus*, associado à produção de β -1,3-glucanase e quitinase.

Em suma, a prevenção precoce empregando procedimentos de controle inócuos à saúde humana seria uma decisão perspicaz e coerente, ou seja, prevenir a proliferação/invasão de agentes deteriorantes/toxigênicos em nível de superfície externa do fruto, sem afetar a qualidade nutricional e características físicas e químicas internas (COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003). Conclui-se que as leveduras constituem agentes promissores contra fungos deteriorantes na pós-

colheita, porém requerem-se estudos posteriores *in vivo* para avaliar o perfil antagonístico no hospedeiro, além de caracterização estrutural das substâncias antagonísticas visando garantir a inocuidade, principalmente no que se refere à aplicação direta em alimentos.

Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão de bolsa de Doutorado e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa de Doutorado sanduíche.

Referências

- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Yeasts: characteristics and identification*. 2. ed. [S.l.]: Cambridge University Press, 1990. 1002 p.
- BRACKETT, R. E. *Microbial quality*. In: Post-harvest handling. A system approach, shewfelt and prussia. [S.l.]: Academic Press, 1993. cap. 6, 356 p.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCIO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of post-harvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Post-harvest Biology and Technology*, The Netherlands, v. 22, p. 7-17, 2001.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCIO, V. Beta-1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against post-harvest diseases. *Post-harvest Biology and Technology*, The Netherlands, v. 12, n. 3, p. 293-300, 1997.
- CHAN, Z.; TIAN, S. Interaction of antagonistic yeasts against post-harvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Post-harvest Biology and Technology*, The Netherlands, v. 36, n. 2, p. 215-223, 2005.
- CHEN, Z.; BROWN, R. L.; LAX, A. R.; CLEVELAND, T. E. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n. 3, p. 1320-1324, 1999.
- COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas

- por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 24, n. 2, p. 347-368, 2003.
- COELHO, A. R.; LEVY, R. M.; HOFFMANN, F. L.; TANIWAKI, M. H.; KEMMELMEIER, C.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. Patulin producing *Penicillium expansum* vs. antagonistic yeasts with perspectives of biocontrol in the post-harvest of fruits. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 11., 2004, Bethesda, Maryland, USA. *Proceeding...* Maryland, USA, 2004. p. 99.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents of post-harvest diseases. In: WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. (Ed.). *Biological control of post-harvest diseases-theory and practice*. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1994. p. 63-75.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; EL GHAOUTH, A.; WILSON, C. Influence of food additives on the control of post-harvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Post-harvest Biology and Technology*, The Netherlands, v. 27, n. 2, p. 127-135, 2003.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Post-harvest Biology and Technology*, The Netherlands, v. 52, n. 2, p. 137-145, 2009.
- EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; WISNIEWSKI, M.; WILSON, C. L. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant Disease*, St. Paul, v. 84, n. 3, p. 249-253, 2000.
- GHOLAMNEJAD, J.; ETEBARIAN, H. R.; SAHEBANI, N. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food Science*, Lagos, South Africa, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2010.
- GUINEBRETIERE, M. H.; NGUYEN-THE, C.; MORRISON, N.; REICH, M.; NICOT, P. Isolation and characterization of antagonists for the biocontrol of the post-harvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Journal of Food Protection*, Des Moines, USA, v. 63, n. 3, p. 386-394, 2000.
- INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - ITAL. *Metodologia de análise microbiológica de alimentos*. 1995. p. 45. (Manual técnico, n. 14).
- JACOBS, C. J.; VAN VUOREN, H. J. J. Effects of different killer yeast on wine fermentations. *Journal of Amsterdam Society Brewing*, Austrália, v. 42, n. 4, p. 295-299, 1991.
- JANISIEWICZ, W. J.; CONWAY, W.; GLENN, M.; SAMS, C. Integrating biological control and calcium treatment for controlling post-harvest decay of apples. *Hortscience*, Alexandria, v. 33, n. 1, p. 105-109, 1998.
- JANISIEWICZ, W. J.; TWORKOSKI, T. J.; SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of post-harvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 90, n. 11, p. 1196-1200, 2000.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The yeasts, a taxonomic study*. 4. ed. London, UK: Elsevier, 1998. 1055 p.
- LEVY, R. M. *Aplicação de leveduras no controle de Penicillium expansum*. 2003. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- LEVY, R. M.; HAYASHI, L.; CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. Inhibition of mycotoxigenic *Penicillium* sp. and patulin biodegradation by yeast strains. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 41-47, 2002.
- LINARDI, V. R.; MACHADO, K. M. G. Production of amylases by yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, Ontario, Canada, v. 36, n. 11, p. 751-753, 1990.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. USA: Southern Illinois University Carbondale, 2003. 1019 p.
- MOTOMURA, M.; HIROOKA, E. Y. Método rápido para o isolamento de microrganismos de solo com atividade antifúngica sobre *Fusarium moniliforme*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v. 39, n. 2, p. 313-322, 1996.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species-an illustrated manual for identification*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
- POLONELLI, L.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, Barcelona, Spain, v. 17, n. 5, p. 774-780, 1983.
- PRIETA, J.; MORENO, A.; DÍAZ, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, USA, v. 42, n. 8, p. 1701-1703, 1994.
- SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, London, UK, v. 159, n. 4, p.

331-338, 2004.

SUGAR, D.; ROBERTS, R. G.; HILTON, R. J.; RIGHETTI, T. L.; SANCHEZ, E. E. Integration of cultural methods with yeast treatment for control of post-harvest fruit decay in pear. *Plant Disease*, St. Paul, v. 78, n. 7, p. 791-795, 1994.

SUGAR, D.; SPOTTS, R. A. Control of post-harvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. *Plant Disease*, St. Paul, v. 83, n. 2, p. 155-158, 1999.

SYDENHAM, E. W.; VISMER, H. F.; MARASAS, W. F.; BROWN, N. L.; SCHLECHTER, M.; RHEEDER, J. P. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. *Food Additives and Contaminants*, London, UK, v. 14, n. 5, p. 429-434, 1997.

TEIXIDO, N.; USALL, J.; VINAS, I. Efficacy of pre-harvest and post-harvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, London, UK, v. 50, n. 3, p. 203-210, 1999.

USALL, J.; TEIXIDO, N.; TORRES, R.; DE ERIBE, X. O.; VINAS, I. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control post-harvest blue mold on apple fruit. *Post-harvest Biology and Technology*, The Netherlands, v. 21, n. 2, p. 147-156, 2001.

WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology*, The Netherlands, v. 127, n. 3, p. 213-222, 1995.

WILSON, C. L.; EL GHAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J.Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control post-harvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease*, St. Paul, v. 78, n. 9, p. 837-844, 1994.

WISNIEWSKY, M. E.; BILES, C.; DROBY, S.; McLAUGHLIN, R.; WILSON, C. L.; CHALUTZ, E. Mode of action of the post-harvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiology Molecular Plant Pathology*, London, UK, v. 39, n. 4, p. 245-258, 1991.

ZHANG, H.; ZHENG, X.; FU, C.; XI, Y. Post-harvest biological control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii*. *Post-harvest Biology and Technology*, The Netherlands, v. 35, n. 1, p. 79-86, 2005.

