



You are free: to copy, distribute and transmit the work; to adapt the work.
You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor

LEVEDURAS ASSOCIADAS A FRUTOS DE ABACAXI (*ANANAS COMOSUS*) E SUA UTILIZAÇÃO COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Gabriel Brum Tristão¹; Camilla Martins Malta²; Ana Kleiber Pessoa Borges³; Paula Benevides de Moraes³; Juliana Fonseca Moreira da Silva³ e Raphael Sanzio Pimenta^{4*}

RESUMO

O Brasil tem se destacado como maior produtor mundial de abacaxi. Este possui características nutricionais, rico em minerais e vitaminas, pode ser consumido *in natura* ou processado. Porém, suas propriedades nutricionais e seu valor comercial podem ser reduzidos consideravelmente pela ação de fitopatógenos. O uso de fungicidas tem sido eficaz ferramenta para a prevenção de doenças pós-colheita. O seu uso tem sofrido crescentes restrições devido a sua toxicidade. Neste estudo foram obtidas 100 isolados pertencentes a 18 espécies de leveduras provenientes de abacaxis cultivados na região central do Estado do Tocantins. Entre as espécies obtidas, somente quatro puderam ser consideradas endofíticas. Após testes preliminares, somente a espécie *Pseudozyma flocculosa* foi selecionada para ensaios de controle biológico de doenças pós-colheita. Uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* (YEF 186), foi incluída nos testes devido a sua ampla utilização pela indústria de alimentos. *S. cerevisiae* e *P. flocculosa* ampliaram o tempo de prateleira do abacaxi em seis dias e reduziram a incidência de lesões em 57,1% e 71,4%, respectivamente, após 12 dias de incubação e permaneceram viáveis na superfície dos frutos por mais de duas semanas. Estes resultados indicam uma alternativa viável ao uso de fungicidas para o controle de doenças pós-colheita do abacaxi.

Palavras – chave: *Ananas comosus*, levedura, *Pseudozyma flocculosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, controle biológico.

ABSTRACT

Brazil is the world biggest producer of pineapple. It has important nutritional factors, like minerals and vitamins, and can be ingested *in natura* or in processed form. These nutritional factors and the commercial value of the fruit can be reduced by decay produced by phytopathogens. The use of fungicides has been an important tool to prevent postharvest diseases, but their use has been decreased, in part due to their toxic properties. In this study one hundred different strains of yeast representing 18 species were obtained from pineapple fruits sampled from the Central Region of Tocantins, Brazil. Among the species obtained, only four could be considered endophytic. After the yeasts were screened, only *Pseudozyma flocculosa* was selected for biological control of postharvest disease assays. One strain of *Saccharomyces cerevisiae* (YEF 186) was added to the tests due to its wide utilization by the food factories. *S. cerevisiae* and *P. flocculosa* improved the stock time of pineapples by 6 days, decreased lesion incidence in 57.1 and 71.4 %, respectively, after 12 days of incubation and remained viable on fruit surface for more than two weeks. These results show a viable alternative to the use of fungicides for postharvest disease control of pineapple.

Keywords: *Ananas comosus*, yeast, *Pseudozyma flocculosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, biological control

Trabalho recebido em 23/0/2011 e aceito para publicação em 28/06/2012.

¹ Graduando do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, TO, Brasil. Email: gabriel_brumtr@hotmail.com

² Mestranda em Ecologia de Ecótonos da Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMBIO), Palmas, TO, Brasil. E-mail: camillamalita@yahoo.com.br

³ Professores da Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMBIO), Palmas, TO, Brasil. E-mail: anakleiber@uft.edu.br

^{4*} Professor da Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMBIO), Bloco II, Sala 5, ACNO 14, NS 15, Palmas, TO, CEP 77.020-220, Brasil. E-mail: raphael.pimenta@pq.cnpq.br

1. INTRODUÇÃO

Frutos são alimentos que constituem um importante recurso nutricional devido a sua composição rica em componentes essenciais, como vitaminas, minerais e substâncias antioxidantes (SPADARO & GULLINO, 2004; CRESTANI et al., 2010). No entanto, o valor comercial de frutos e outros alimentos vegetais podem ser reduzidos consideravelmente pela presença de manchas e lesões produzidas por insetos e fitopatógenos (DAL-BELLO et al., 2001). Atualmente são conhecidas cerca de 8 mil espécies de fungos fitopatogênicos, que podem causar cerca de 100 mil tipos de doenças em vegetais. Todas as plantas podem ser infectadas por alguma espécie de fungo e alguns podem infectar várias espécies de plantas (AGRIOS, 2005). A deterioração de alimentos por microrganismos resulta em perdas de 5 a 20 % da produção em países desenvolvidos e pode atingir 50% da produção em países em desenvolvimento, principalmente em regiões de clima tropical (VARMA & DUBEY, 2001; JANISIEWICZ & KORSTEN, 2002).

O controle biológico de doenças pós-colheita de frutos, tem se mostrado, uma das principais estratégias adotadas para maximizar a produção de alimentos e vem se consolidando como uma alternativa para a substituição total ou parcial de fungicidas

químicos (CHAND-GOYAL & SPOTTS, 1997; PIMENTA, et al., 2010). Entre os microrganismos que podem ser utilizados como agentes de controle biológico, as leveduras se destacam devido a sua habilidade de rápida colonização de substratos vegetais, permanecendo viáveis nestes substratos por grandes períodos de tempo em diferentes condições ambientais (CARTWRIGHT & SUPURR Jr., 1998; DROBY et al., 2003; JANISIEWICZ, 1991). Este estudo teve por objetivos: a obtenção de linhagens de leveduras associadas ao abacaxi e demonstrar a viabilidade de utilização do controle biológico para o tratamento pós-colheita do abacaxi.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram amostrados 30 frutos de *Ananas comosus* (abacaxi), provenientes de uma propriedade, localizada na região central do Estado do Tocantins. Para a obtenção das leveduras endofíticas, foi utilizada a metodologia proposta por ROSA, et al., (2010), com modificações. Para tanto, foram retirados fragmentos circulares com aproximadamente 10 mm das folhas e casca dos frutos. Os fragmentos foram desinfetados superficialmente por meio da imersão em álcool 70 % (1 min.), seguido por imersão em hipoclorito de sódio 2% (3 min.) e lavados em água destilada esterilizada (2 min.). Em seguida os fragmentos foram

transferidos (em triplicata), para placas de Petri contendo ágar YMA (0,3% extrato de levedura, 0,5% Peptona, 2% Glicose, 0,3% Extrato de malte e 2% Ágar) suplementado com cloranfenicol (100 µg/mL) e incubados a $25 \pm 0,5$ °C por um período de até 60 dias.

Para o isolamento das demais leveduras, fragmentos com aproximadamente 10 cm de diâmetro do fruto foram retirados e transferidos para frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de água destilada estéril acrescida de 1 mL de Tween 20 a 20% e agitados por 10 min. a 150 rpm. Em seguida foram realizadas diluições seriadas até a concentração de 10^{-3} e uma alíquota de 100 µL foi plaqueada em meio YMA e incubada a $25 \pm 0,5$ °C por 48 h.

Todas as leveduras isoladas foram identificadas por meio de chaves taxonômicas presentes em KURTZMAN & FELL (1998), e os isolados foram armazenados em tubos criogênicos, contendo caldo GYMP (glicose 1%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 0,3% e fosfato monobásico de potássio 0,2%) acrescido de 20 % de glicerol a -80°C . Uma linhagem de *S. cerevisiae* (YEF 186), isolada a partir de dornas de fermentação de caldo de cana foi acrescentada ao estudo. *S. cerevisiae* tem uma antiga relação de utilização pelo homem, e sua reconhecida inocuidade,

associada ao seu potencial probiótico contribuíram positivamente para a seleção desta espécie.

Para a determinação da temperatura máxima de crescimento, todos os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo caldo Sabouraud (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%) e incubados a 25, 30, 35 e 37°C por até 72 h e os resultados foram determinados pela presença ou ausência de crescimento microbiano. Os isolados que não apresentaram crescimento a 37°C foram selecionados e testados quanto ao tempo de permanência viável na superfície do fruto e quanto à capacidade de reduzir a incidência de doenças pós-colheita. Sendo assim, estes isolados foram transferidos para frascos Erlemyeres contendo 200 mL de caldo Sabouraud e incubadas a $25 \pm 0,5$ °C por 24 h, a 150 rpm para obtenção de biomassa. Em seguida a concentração celular foi ajustada para 5×10^8 células/mL, com o auxílio de uma câmara de Neubauer, em 5 L de caldo GY (0,1% glicose, 0,01 % extrato de levedura). Em seguida os frutos foram imersos na cultura, secos em fluxo laminar por aproximadamente 10 min. e incubados á 22 °C por 20 dias.

Para os ensaios de controle biológico foram utilizados 10 frutos por tratamento, sendo que no controle (Tratamento 1), os frutos foram imersos apenas em água destilada esterilizada;

(Tratamento 2) os frutos foram imersos em uma cultura contendo 5×10^8 células/mL de *S. cerevisiae*; e (Tratamento 3) os frutos foram imersos em uma cultura contendo 5×10^8 células/mL de *Ps. flocculosa*. A incidência de doenças foi obtida pela observação diária dos frutos por 20 dias e o percentual de redução da doença foi calculada pela expressão:

$$(\%)RI = \frac{CP-T}{CP} \times 100$$

Onde: (%) RI = Percentual de redução da incidência; CP = Controle positivo; T = Tratamento. Todos os tratamentos foram delineados em blocos ao acaso.

Para a verificação do tempo de permanência viável nos frutos, um fragmento de aproximadamente 1 cm^2 da superfície do fruto foi retirado imediatamente após a inoculação e depois de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 20 dias da imersão dos frutos nas culturas e transferidos para tubos contendo 10 mL de GY acrescido de Tween 20 a 20%, agitado em vortéx por 1 min. Em seguida 100 μL da diluição foi inoculado na superfície de placas de Petri contendo ágar Sabouraud e incubados a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por até 48 h em triplicata e os resultados expressos em UFC.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada uma baixa frequência de levedura por fruto (média de 3,3 isolados). Segundo CAMATTI-SARTORI

et al. (2005) o número de leveduras endofíticas é cerca de três vezes maior em frutos orgânicos. Sendo assim, a baixa frequência observada provavelmente está relacionada ao uso intensivo de antifúngicos durante diferentes etapas do cultivo do abacaxi. Contudo, foram obtidos 100 isolados de leveduras pertencentes a 18 espécies (Tabela 1), sendo que três espécies foram provenientes apenas do interior do fruto e uma foi recuperada pelas duas metodologias empregadas. Para as demais 14 espécies não foi possível determinar sua precisa localização, pois a metodologia não permitiu a obtenção de leveduras exclusivamente do ambiente epifítico.

Pichia. ofunaensis foi à espécie mais freqüente (15 isolados) e foi recuperada somente do ambiente endofítico. A segunda espécie mais freqüente, *Kloeckera africana* (13 isolados), não foi obtida a partir do ambiente endofítico; *Candida versatilis*, foi isolada a partir das duas metodologias empregadas, podendo ser considerada uma levedura endofítica. Entre as espécies obtidas, somente *C.versatilis*, *P. ofunaensis*, *Pseudozyma. aphidis* e *Pseudozyma flocculosa* não foram capazes de crescer a 37°C (Tabela 2). A ausência de crescimento a 37°C é interessante para a seleção de agentes de biocontrole, por que dificulta a colonização em humanos (CHAND-GOYAL & SPOTTS, 1997).

Apesar do reduzido número de espécies com esta peculiaridade, o somatório destes isolados representou 40 % do total obtido.

Tabela 1. Espécies de leveduras, frequência de isolamento e origem de isolamento nos frutos de abacaxi, n = 30 abacaxis

Espécie	Frequência (%)	Origem
<i>Candida bertae</i>	2	-
<i>C. bombicola</i>	1	-
<i>C. incommunis</i>	6	Endofítica
<i>C. krissii</i>	7	-
<i>C. valdiviana</i>	2	-
<i>C. versatilis</i>	12	Endofítica e Epifítica
<i>C. zeylanoides</i>	1	-
<i>Cryptococcus aerius</i>	1	-
<i>Kloeckera africana</i>	13	-
<i>K. apis</i>	5	-
<i>Pichia ofunaensis</i>	15	Endofítica
<i>P. membranaefaciens</i>	5	-
<i>Pseudozyma aphidis</i>	8	Endofítica
<i>Ps. flocculosa</i>	5	-
<i>Rhodotorula fragaria</i>	2	-
<i>R. graminis</i>	8	-
<i>R. lactosa</i>	1	-
<i>R. marina</i>	6	-
Total	100	X

No entanto, *C. versatilis*, foi descartada dos testes de controle biológico por apresentar uma relativa atividade patogênica em seres humanos, uma vez que esta levedura já foi isolada de espécimes clínicos e descrita como causadora de vaginose (GOMES, et al., 2010). *Ps. aphidis*, normalmente é isolada de substratos vegetais, mas recentemente foi identificada como agente etiológico de fungemia pediátrica (LIN, et al., 2008). *P. ofunaensis* foi isolada pela primeira vez, a partir de amostras de solo. No entanto,

estudos envolvendo esta espécie são ainda escassos e existem relatos desta espécie exibindo crescimento a 37 °C. Sendo assim, *P. ofunaensis* não foi utilizada nos testes posteriores (KURTZMAN & FELL, 1998). Entretanto, *Ps. flocculosa* vem sendo utilizada com sucesso no controle de diversos fitopatógenos, sendo inclusive utilizada em um produto comercial (Sporodex®) (NEVEU, et al., 2007).

Tabela 2. Verificação da temperatura de crescimento por espécie

Espécie	Temperatura (°C)			
	25	30	35	37
<i>Candida bertae</i>	+	+	+	+
<i>C. bombicola</i>	-	+	+	+
<i>C. incommunis</i>	+	+	+	+
<i>C. krissi</i>	+	+	+	+
<i>C. valdiviana</i>	+	+	+	+
<i>C. versatilis</i>	+	+	+	-
<i>C. zeylanoides</i>	+	+	+	+
<i>Cryptococcus aerius</i>	+	+	+	+
<i>Kloeckera africana</i>	+	+	+	+
<i>K. apis</i>	+	+	+	+
<i>Pichia ofunaensis</i>	+	+	+	-
<i>P. membranaefaciens</i>	+	+	+	+
<i>Pseudozyma aphidis</i>	+	+	-	-
<i>Ps. flocculosa</i>	+	+	-	-
<i>Rhodotorula fragaria</i>	+	+	+	+
<i>R. graminis</i>	-	-	+	+
<i>R. lactosa</i>	-	+	+	+
<i>R. marina</i>	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+

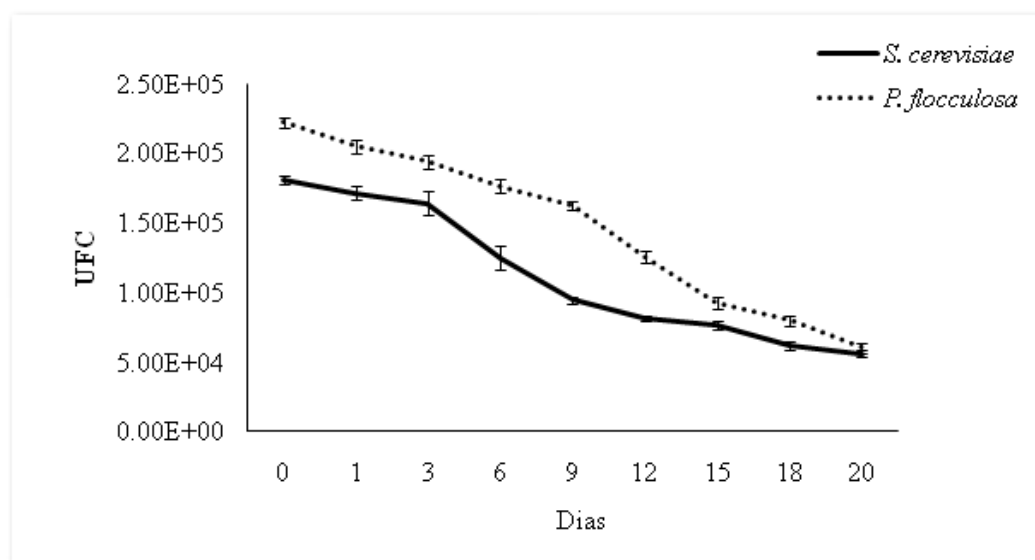


Figura 1. Tempo de permanência em dias em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *S. cerevisiae* e *P. flocculosa* na superfície dos frutos após a imersão em uma solução contendo 5×10^8 células/mL e incubação a 25°C.

Sendo assim, *Ps. flocculosa* e *S. cerevisiae* foram selecionadas para a

realização dos ensaios de controle biológico de doenças pós-colheita em

abacaxis. Entre os cinco isolados de *Ps. flocculosa* disponíveis, foi selecionada a que apresentou melhor crescimento em meios artificiais. As duas linhagens testadas permaneceram viáveis na superfície do fruto por até 20 dias (Figura 1). O tempo de permanência viável e em grandes populações é um critério importante para a seleção de biocontroladores, uma vez que estratégias de controle biológico normalmente necessitam de antagonistas em concentração superior a 10^6 células/mL para efetivar a proteção do substrato alvo.

Tanto *S. cerevisiae* quanto *Ps. flocculosa* foram capazes de reduzir a

incidência de doenças nos frutos e ampliaram o tempo entre a colheita e o aparecimento dos sintomas de doenças em seis dias em comparação com o controle (dados não mostrados) (Tabela 3), reduzindo ainda a incidência da doença em 57,1% e 71,4%, respectivamente, após 12 dias de estocagem. Os dois isolados permaneceram viáveis em altas concentrações ($> 5 \times 10^4$ células/cm²) na superfície dos frutos por mais de duas semanas. Estes resultados indicam que o emprego desta metodologia pode aumentar o tempo de prateleira destes frutos sem a utilização de produtos tóxicos como os fungicidas convencionais.

Tabela 3. Número de frutos que apresentaram incidência de lesões após 12 dias de incubação. Sendo que: Tratamento 1 = água destilada estéril (controle); Tratamento 2 = *S. cerevisiae*; Tratamento 3 = *P. flocculosa*.

Tratamentos	Nº frutos	Frutos com lesão	Redução da incidência (%)
1	10	7	-
2	10	3	51,1
3	10	2	71,4

4. CONCLUSÕES

O tratamento pós-colheita de abacaxis com culturas de *S. cerevisiae* ou *Ps. flocculosa* aumenta o tempo de prateleira do fruto e evita a utilização de fungicidas no período pós-colheita.

A redução do uso de fungicidas é interessante do ponto de vista ambiental e

para a saúde pública, principalmente em períodos próximos ao consumo.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil e Secretaria Estadual de

Ciência e Tecnologia do Estado do Tocantins – SECT-TO.

6. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. New York NY. Academic Press, 5th Ed, 2005.
- CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**. 5, 397–402. 2005.
- CARTWRIGHT, D.K.; SPURR Jr, H.W. Biological control of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* on tobacco seedlings with non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia fungi*. **Soil Biology & Biochemistry**. 30, 1879-1884. 1998.
- CHAND-GOYAL, T.; SPOTTS, R. A. Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. **Biological control**. 10, 199-206. 1997.
- CRESTANI, M.; BARBIERI, R. L.; HAWERROTH, F. J.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**. V. 40, p.1473-1483, 2010.
- DAL BELLO, G.; PADIN, S.; LOPEZ LASTRA, C.; FABRIZIO, M. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. **Journal of Stored Products Research**. 37, 77-84. 2001.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; GHAOUTH, A. E.; WILSON, C. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. **Postharvest Biology and Technology**. 27, 127-135. 2003.
- GOMES, B. S.; LIMA, A. N.; NEVES, R. P.; MAGALHÃES, O. M. C.; GIAMPAOLI, V.; PORTO, A. L. F.; QUEIROZ, L. A. Prospecção de leveduras em secreção vaginal e correlação com hemograma e dosagem de glicose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42(1): 59-63, 2010.
- JANISIEWICZ, W.J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**. 40, 411-441. 2002.
- JANISIEWICZ, W. J. Control of postharvest diseases of fruits with biocontrol agents. The Biological Control of Plant Diseases, ed. J Bay-Petersen, p. 56-68. Taipei, Taiwan: Food Fertil Technol. Cent. Asian Pac. Reg. 1991.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier, 4 Ed. 1998.
- LIN, S. S.; PRANIKOFF, T.; SMITH, S. F.; BRANDT, M. E.; GILBERT, K.; PALAVECINO, E. L.; SHETTY, A. K. Central venous catheter infection associated with *Pseudozyma aphidis* in a child with short gut syndrome. **Journal of Medical Microbiology**. 57, 516–518. 2008.
- NEVEU, B.; LABBÉ, C.; BÉLANGE, R. R. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: A case study with *Pseudozyma flocculosa*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 68, 275–281, 2007.

- PIMENTA, R.S.; SILVA, J. F. M.; COELHO, C. M.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; CORRÊA JR, A. Integrated control of *Penicillium digitatum* by the predacious yeast *Saccharomyces crataegensis* and sodium bicarbonate on oranges. **Brazilian Journal of Microbiology**. 41, 404-410. 2010.
- ROSA, L.H.; GONÇALVES, V. N.; CALIGIORNE, R. B.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SALES, P. A.; ROMANHA, A. J.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 41, 420-430. 2010.
- SPADARO, D.; GULLINO, M. L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**. 91, 185-194, 2004.
- VARMA, J.; DUBEY, N. K. Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaries* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. **International Journal of Food Microbiology**. 68, 207-210. 2001.