

ESTUDOS PRELIMINARES DO CULTIVO DE *ASPERGILLUS NIGER* COLETADO EM CEBOLAS

Aryandson da Silva¹; Renata da Silva Bonfim¹; Luiz Antônio Nascimento¹; Petrucia Karine Santos de Brito Bezerra¹

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte – IFRN, Campus Nova Cruz
Aryandson2011@gmail.com; Renatasilva.bonfim009@gmail.com; luiz.nascimento@ifrn.edu.br;
petrucia.bezerra@ifrn.edu.br.

INTRODUÇÃO

O *Aspergillus* é um gênero de fungo bastante estudado na literatura. As espécies que compõem este gênero estão amplamente distribuídas pelo mundo, tanto em organismos vegetais como animais, como também associados na decomposição de materiais, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. A taxonomia reconhece cerca de 150 espécies, porém, somente 30 são bem definidas (ALVES, 2012). *Aspergillus niger* é um dos fungos filamentosos mais utilizados em processos industriais, sendo ele o mais conhecido de seu gênero, destacando-se principalmente na produção de ácido cítrico e enzimas (WORDELL FILHO e BOFF, 2006). É uma espécie classificada como segura para o manuseio, tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial, pois, diferente das outras espécies de *Aspergillus*, ela não produz aflatoxinas (AMARAL, 2017).

O mofo preto, também conhecido como falso-carvão ou carvão do bulbo, é proveniente do *Aspergillus niger* e tem sido uma das principais causas de decomposição de cebolas durante a fase de pós-colheita no Brasil (IGNACZUK e MARCUZZO, 2016). Entretanto, a cebola pode ser atacada por outros tipos de doenças (bacterianas, virais, etc.), sendo a fúngica mais destrutiva, podendo ocorrer também durante o armazenamento e comercialização (BERTOLDO, 2015). De acordo com Marques e Marcuzzo (2018) a variação de temperatura e umidade no armazenamento favorece a infecção. A temperatura ótima de crescimento é de 28°C a 34°C e a umidade acima de 80% possibilita a germinação dos esporos por períodos entre três horas a seis horas. Em condições laboratoriais o desenvolvimento do fungo geralmente ocorre a 30°C.

Para que seja possível o cultivo do *A. niger* em laboratório é necessário o preparo de um meio de cultura adequado, o qual é composto por nutrientes de extrema importância para seu crescimento, além de condições assépticas que evitem a contaminação do meio. Os meios de cultura podem ser líquidos e sólidos: os meios líquidos são feitos com água purificada e esterilizados para eliminação total dos microrganismos presentes, enquanto os meios sólidos são, geralmente, preparados da mesma forma que o líquido, porém com a adição de agar-agar, um reagente que solidifica o meio. O meio sólido paralisa as células dos microrganismos e faz com que elas cresçam e originem massas isoladas e visíveis, chamadas colônias (MADIGAN *et al.*, 2010).

Neste trabalho avaliou-se o crescimento do *A. niger*, coletado a partir de uma amostra de cebola, objetivando verificar indícios de contaminação nos meios de cultura e isolar o fungo durante os próximos cultivos. O desenvolvimento deste trabalho possibilitará outros estudos envolvendo o *A. niger* e suas possíveis aplicações em processos biotecnológicos.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado no laboratório de biologia e química do IFRN Campus Nova Cruz. Amostras de mofo preto foram coletadas de cebolas, doadas por um mercado local. Para o cultivo do *A. niger* proveniente das cebolas utilizou-se caldo nutritivo DNB (Difcon Nutrient Broth) para a composição

do meio líquido e PDA (Potato Dextrose Agar) para a composição do meio sólido. Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos para esterilização do material.

Inicialmente, foi preparado um meio sólido adicionando-se 4,2 g de PDA em 100 mL de água destilada, sendo que para este caso houve um acréscimo de 1% de agar-agar. Para uma completa dissolução e homogeneização do meio utilizou-se um agitador magnético com aquecimento durante 1 minuto. Em seguida, o meio foi distribuído em 4 placas de Petri. O caldo nutritivo foi preparado com 0,8 g de DNB em 100 mL de água destilada, seguindo-se o mesmo procedimento para homogeneização do meio. Após a esterilização em autoclave, os meios foram resfriados a temperatura ambiente para posterior utilização.

A inoculação das amostras de mofo preto foi feita de duas maneiras: a primeira foi retirando uma amostra diretamente da cebola e adicionando ao meio PDA; a segunda foi adicionando uma amostra do mofo preto para o caldo nutritivo DNB. Após 48h, foi feito o repique deste mosto para o meio PDA sólido, conforme será detalhada adiante. Em ambos os casos se utilizou uma alça de platina durante os procedimentos. Para evitar a contaminação por outros microrganismos, o procedimento foi executado em bancada previamente higienizada com álcool 70% e feito próximo a uma chama (Bico de Bunsen). Logo após a inoculação, os meios foram colocados em estufa bacteriológica a 30°C e acompanhados diariamente.

Após as primeiras 48h de incubação em meio líquido, uma alçada deste meio foi transferida para o meio PDA, utilizando o método de estrias por quadrante por esgotamento em placas. Em seguida, foram colocadas em estufa bacteriológica a 30°C e feitas as devidas observações. Após os períodos de incubação, para minimizar o crescimento do fungo e redução do seu metabolismo, as placas de Petri contendo *A. niger* foram acondicionadas sob refrigeração a 4°C. Após todas as observações as placas foram autoclavadas por 30 minutos para eliminar todos os microrganismos antes de descartá-las.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo do *Aspergillus niger* em meio sólido apresentou um grande crescimento, de ambas as formas, tanto quando foi retirado diretamente da cebola para o meio PDA, quanto do meio líquido para o meio PDA. As principais diferenças foram vistas no grau de contaminação e controle de crescimento.

O fungo retirado da cebola para o meio PDA apresentou um alto grau de contaminação, podendo ser comprovado pela observação de pigmentos diferentes na mesma placa, além de um crescimento consideravelmente rápido, tanto do *Aspergillus niger* quanto dos contaminantes, sendo observadas as primeiras colônias a partir de 48 horas de incubação.

O crescimento do fungo em meio líquido foi observado também a partir de 48 horas, com a turbidez da solução. Essa solução foi usada para fazer a inoculação no meio sólido (PDA). O grau de crescimento do meio PDA a partir do meio líquido foi lenta, sendo possível observar algumas colônias somente com 72 horas de incubação, porém, não foram observados indícios de contaminação, com possível crescimento apenas do *A. niger*.

O método de estriamento por quadrante para isolamento das colônias não foi bem observado quando o fungo passou mais de 4 dias incubado, pelo fato do *Aspergillus niger* possuir hifas aéreas, que possibilitam a locomoção e ocupação de todo o espaço da placa. Um melhor isolamento das colônias foi observado quando foi feito o repique do meio líquido (inóculo) para o meio sólido, no qual as colônias menores e mais espaçadas foram observadas após 84 horas de incubação.

CONCLUSÃO

O crescimento e desenvolvimento do *Aspergillus niger* em placas de Petri é possível de ambas as formas, porém, para obter um melhor isolamento do fungo, o método a ser seguido deve ser a inoculação do meio líquido para o meio sólido. A velocidade de crescimento pode ter sido afetada por outros microrganismos contaminantes, influenciando na velocidade de locomoção e crescimento do fungo.

O trabalho obteve resultados bastante importantes para a evolução de pesquisas na área microbiológica no IFRN – Campus Nova Cruz, mostrando que pode ser bastante simples e acessível o cultivo desses microrganismos, como também abre inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de novas pesquisas utilizando o *Aspergillus niger*.

REFERÊNCIAS

ALVES, G. F. *Solubilização do fosfato de rocha por Aspergillus niger*. 2012. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2012.

AMARAL, F. A. P. C. *Produção de protease por Aspergillus niger (SIS 18) através de fermentação submersa utilizando meios alternativos contendo resíduos agroindustriais*. 2017. 107f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, 2017.

BERTOLDO, R. *Aspergillus section Nigri em bulbos de cebola ocorrência, identificação e produção de Fumonisina B₂ e Ocratoxina A*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, SP, 2015.

IGNACZUK, J. T.; MARCUZZO, L. L. Efeito da temperatura e do fotoperíodo na germinação in vitro de conídios de *Cercospora beticola*, agente etiológico da cercosporiose da beterraba. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 3, p. 276–277, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. Artmed. 12^a ed., 2010. 1160 p.

WORDELL FILHO, J.A.; BOFF, P. Doenças de origem parasitária. In: Wordell Filho, J. A.; Rowe, E.; Gonçalves, P. A. S.; Debarba, J. F.; Boff, P.; Thomazelli, L. F. Manejo fitossanitário na cultura da cebola. Florianópolis: EPAGRI, 2006.

Marques, J. C.; Marcuzzo, L. L. *Efeito da temperatura e do fotoperíodo no desenvolvimento do mofo preto da cebola*. Hortifruti, 2018. Disponível em: < <https://bit.ly/2GRXvJJ> > Acesso em 26 de maio de 2018.