

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

## SAZONALIDADE NO ISOLAMENTO DE LEVEDURAS EM ARBÓREAS NATIVAS

L.E.P Barreto<sup>1</sup>, M.M.F. do Nascimento<sup>1</sup>, J.V.M. Bittencourt<sup>1</sup>

1- Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 84017-220 - Ponta Grossa – PR- Brasil, Telefone: 55 (42) 3220-4800 – Fax: (42) 3220-4810 – e-mail: (lucasbarreto477@gmail.com @gmail.com)

2- Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 84017-220 - Ponta Grossa – PR- Brasil, Telefone: 55 (42) 3220-4800 – Fax: (42) 3220-4810 – e-mail: (marianam@utfpr.edu.br)

3 - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 84017-220 - Ponta Grossa – PR- Brasil, Telefone: 55 (42) 3220-4800 – Fax: (42) 3220-4810 – e-mail: (julianavitoria@utfpr.edu.br)

**RESUMO** – Leveduras do gênero *Saccharomyces* são os microrganismos mais utilizados em processos fermentativos, por isso têm uma ampla bibliografia de estudos científicos. Entretanto, pouca informação existe sobre a distribuição natural desta espécie. O objetivo deste trabalho foi o isolamento das leveduras *Saccharomyces* em arbóreas brasileiras e avaliar a influência das condições abióticas. Os isolamentos foram feitos a partir do suber de árvores selecionadas na UTFPR Campus Ponta Grossa. A amostragem foi realizada pela retirada de um centímetro quadrado das suber e transferidas para tubos com meio Sniegowski, o qual foi incubado a 32°C por 10 dias. Na sequência 100µL do meio foram transferidos para placas com meios de cultura YPD para crescimento. Após período de crescimento, realizou-se análise microscópica das culturas. Obteve-se resultados com desenvolvimento de colônias leveduriformes em duas das três espécies de arbóreas estudadas, sugerindo a presença de leveduras do gênero *Saccharomyces* nas arbóreas coletadas.

**ABSTRACT** – Yeasts of the genus *Saccharomyces* are the microorganisms most applied in fermentation processes, so they have an extensive bibliography of scientific studies. However, there is little information on the natural distribution of this species. The objective of this work was to isolate *Saccharomyces* yeasts from Brazilian trees and evaluate the influence of abiotic conditions. The isolations were performed from the selected trees at UTFPR Campus Ponta Grossa. Sampling was performed by removing a square centimeter from the suber and transferred to tubes with Sniegowski medium, which was incubated at 32 °C during 10 days. Then, 100µL of the medium was transferred to plates with YPD agar and incubated at 32 °C. After the growth period, the microscopic analysis of the cultures was performed. Development of yeast colonies' was observed in two s of the three tree species studied, suggesting the presence of yeasts of the genus *Saccharomyces* in the sampled trees.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Saccharomyces*; leveduras; arbóreas.

**KEYWORDS:** *Saccharomyces*; yeasts; arbóreas.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



## 1. INTRODUÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, integrante do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, é o principal micro-organismo utilizado na atualidade (Teixeira, 2015), principalmente nos processos de fermentação alcoólica industriais de alimentos e bebidas (Borneman, Pretorius, 2015). O vinho é uma bebida muito consumida ao redor do mundo e tem um papel econômico muito importante, sendo produzidos mais de 26 bilhões de litros anualmente (Teixeira, 2015). Devido a demanda do mercado por produtos com aroma e sabor cada vez mais aprimorados, fez-se necessário o desenvolvimento de técnicas e pesquisas para o melhoramento destas características, além do aperfeiçoamento dos processos de produção (Pretorius, 2000, Teixeira, 2015).

Longe dos processos fermentativos, as espécies de *Saccharomyces* são isoladas principalmente de habitats arbóreos. Tais as espécies de leveduras são constantemente isoladas de casca, folhas e solo circundante de *Quercus* (carvalho) e outras espécies de arbóreas (Teixeira, 2015). Tanto *S. cerevisiae* quanto *S. paradoxus* são amplamente distribuídas e têm sido isolados a partir de florestas temperadas na América do Norte (Sniegowski et al., 2002; Charron et al., 2014), na Europa (Sampaio e Gonçalves, 2008; Almeida et al., 2015), Ásia (Wang et al., 2012; Almeida et al., 2015) e Oceania (Zhang et al., 2010). Muitas pesquisas, tem sido desenvolvidas para entender a distribuição das espécies de *Saccharomyces* (Boyton et al., 2014; Charron et al., 2014), entretanto ainda não se sabe ao certo se os habitats arbóreos são um habitat primário ou se dos muitos ambientes onde tais espécies já foram isoladas anteriormente (Teixeira, 2015).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo não-patogênico, e tem sido amplamente aplicado na produção de produtos consumíveis como cerveja, vinho e o pão. Além disso, os processos fermentativo e tecnológico bem estabelecidos para a produção em larga escala com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ostergaard et al., 2000), tornam este microrganismo bastante atrativo para muitos processos biotecnológicos. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo principal avaliar se condições abióticas refletem no isolamento diferencial de leveduras em arbóreas nativas brasileiras, contribuindo para o conhecimento da biodiversidade da ecologia associada às arbóreas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas coletas em três arbóreas nativas localizadas na UTFPR-Ponta Grossa. As espécies de arbóreas selecionadas foram: *Handroanthus albus* (Ipê Amarelo), *Plinia cauliflora* (Jabuticabeira) e *Schinus terebinthifolia* (Aroeira). A localização aproximada das arbóreas são destacadas em vermelho na figura 1 (A, B e C). As coletas foram realizadas seguindo o protocolo proposto por Bensasson (2016), no qual as árvores são selecionadas, fotografadas, assim como o ambiente ao seu redor. Luvas de látex foram utilizadas para fazer a coleta das amostras onde 1 cm<sup>2</sup> foram retiradas manualmente das árvores na altura de 1,5 m e acondicionadas em tubos universais de 7 mL contendo o meio Sniegowski (Extrato de levedura 3 g/L; extrato de malte 3 g/L, pacto peptona 5 g/L, sucrose 10 g/L; etano 76 mL/L, ácido clorídrico 1 mL/L e finalmente como antibiótico Cloranfenicol 400 ug/L e água destilada p.s.p). Após a coleta foi realizado um controle negativo, no qual passou-se álcool na luva de látex e tocou-se o fundo de um tubo universal de 7 mL em condição estéril também contendo meio Sniegowski.

As coletas de material vegetal para os experimentos de isolamento foram realizadas em três datas distintas em 2019, essa datas visam esclarecer se há influência de condições edafoclimáticas para o isolamento destas leveduras. Assim houve coleta em abril, setembro e novembro, estes meses tem temperaturas e umidade distinta, sendo abril o mês mais frio e novembro o mais quente.

Figura 1 – Localização aproximada das arbóreas utilizadas no estudo na UTFPR Campus Ponta Grossa. A - Localização aproximada da arbórea “Ipê Amarelo”. B - Localização aproximada da arbórea “Jabuticabeira”. C – Localização aproximada da arbórea “Aroeira”. Nota: Em vermelho região onde localiza-se as arbóreas do estudo. Fonte: Google Earth (2020).



O material coletado foi incubado por 10 dias a 32 °C, após esse período, foram repicadas em meio YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) para que fosse feita a identificação das colônias individualmente. As colônias foram novamente incubadas a uma temperatura ótima de 32°C, tendo seu crescimento acompanhado nos dias 3, 5 e 10 após o plaqueamento, observando assim crescimento gradual nos respectivos dias e melhor visualização de colônias leveduriformes, exceto na Aroeira que não apresentou crescimento. Em seguida à obtenção das colônias isoladas, foi feito o procedimento coloração de Gram para obter a confirmação de ser ou não levedura. Os isolados obtidos foram repicados para meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar - Himedia) para seu armazenamento a longo prazo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

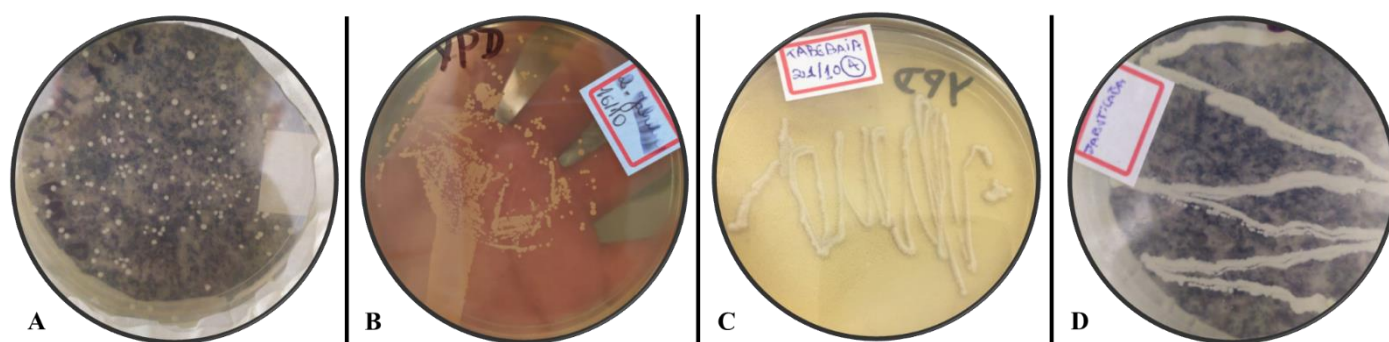
Do material coletado para isolamento neste, apresentaram crescimento de colônias leveduriformes nas amostras obtidas de Ipê amarelo e Jabuticabeira (tabela 1) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Ponta Grossa. As colônias isoladas da Jabuticabeira e do Ipê Amarelo (popularmente conhecido como Tabebuia). As colônias isoladas apresentaram cor branca, brilho opaco, forma circular Figura 2 (A e B). De acordo com Yarrow et al., (1998), as colônias das leveduras do gênero *Saccharomyces* são caracterizadas por apresentarem colônias de cor branca ou creme, opaca, de forma circular, superfície lisa e elevação plana. Neste sentido, todo o crescimento de levedura isolada a partir de suber de Ipê amarelo e Jabuticabeira foram observados para este descritivo, como mostram as figura 2 (A, B, C e D).

Entre as três coletas realizadas, a espécie arbórea Aroeira não apresentou crescimento de colônias com características leveduriformes em nenhuma das três coletas, distintamente dos isolados obtidos nas coletas realizadas com o suber de Ipê amarelo e Jabuticabeira, para ambas as espécies foi possível isolar microrganismos leveduriformes nas três datas de coletas utilizadas neste trabalho. Até o presente momento as condições edafoclimáticas não se mostrou-se o principal fator para isolamento e sim a espécie em que o material foi coletado conforme é possível observar na tabela 1.

Tabela 1 – Datas das coletas e resultados do isolamento de colônias leveduriformes em arbóreas

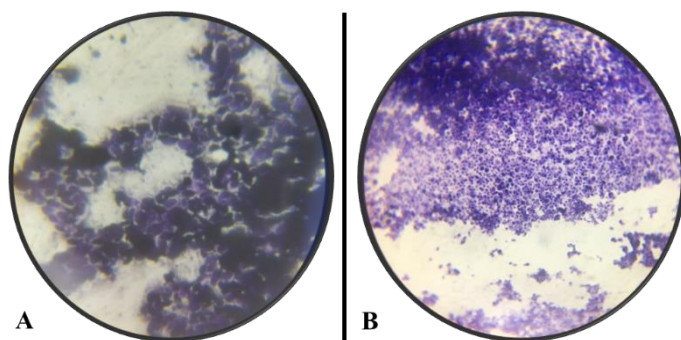
Árborea	Datas das coletas		
	10/04/2019	31/09/2019	13/11/2019
Ipê amarelo	2 colônias	3 colônias	3 colônias
Jabuticabeira	3 colônias	2 colônias	3 colônias
Aroeira	Sem colônia isolada	Sem colônia isolada	Sem colônia isolada

Figura 2 – Crescimento em placa das leveduras obtidas neste estudo. **A e B** – Característica de crescimento da etapa de isolamento **C** - Isolado obtido a partir de casca de Ipê amarelo (Tabebuia) – placa frente, dia 5. **D** – Isolado obtido a partir de casca de Ipê Amarelo – placa frente, dia 5. Fonte: Autoria Própria.



Para confirmarmos que os isolados obtidos eram leveduras e não bactérias, realizamos a coloração de Gram para visualização das características celulares com aumento de 40X, como pode ser observado na figura 3. Através da observação ao microscópio ótico verificamos tratar-se de leveduras a qual demonstrou agregados celulares gram positivos, indo de encontro com o descrito por Larone (1995).

Figura 3 – Visualização ao microscópio das leveduras obtidas no isolamento com aumento de 40 X e usando corante cristal violeta. **A** – Isolado obtido a partir da casca de Jabuticabeira visto ao microscópio. **B** - Isolado obtido a partir da casca de Ipê Amarelo visto ao microscópio. Fonte: Autoria Própria.



A fim de determinar identidade das espécies isoladas procederemos a identificação molecular das leveduras obtidas neste estudo, com o sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal.



## 4. CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento deste trabalho concluiu-se que foi possível o isolamento de leveduras com características de *Saccharomyces* em duas arbóreas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa mostrando a possibilidade de acessar a diversidade natural deste microrganismos com a procura de acesso endêmicos da flora brasileira. Quanto aos diferentes períodos do ano, pôde-se observar na tabela 1 os resultados provenientes das coletas e isolamentos. Este projeto prevê acompanhamento das coletas para avaliar como as leveduras se mantêm viáveis ao longo do ano, assim novas coletas são feitas na primavera e no verão. Além disso, é verificada a condição florestal e das árvores isoladas para saber como e se esta condição reflete no isolamento das leveduras.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, P., Barbosa, R., Zalar, P., Imanishi, Y., Shimizu, K., Turchetti, B., Legras, J. L., Serra, M., Dequin, S., Couloux, A., Guy, J., Bensasson, D., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P. (2015). A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication. *Molecular ecology*, 24(21), 5412–5427. <https://doi.org/10.1111/mec.13341>
- Borneman, A. R., & Pretorius, I.S. (2015). Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics*, 199, 281–291.
- Charron, G., Leducq, J. B., Bertin, C., Dube, A. K., & Landry, C. R. (2014). Exploring the northern limit of the distribution of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* in North America. *FEMS Yeast Research*, 14, 281–288
- Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, p. 34-50, 2000.
- Pretorius, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675–729, 2000.
- Robinson, H. A., Pinharanda, A., & Bensasson, D. (2016). Summer temperature can predict the distribution of wild yeast populations. *Ecology and evolution*, 6(4), 1236–1250. <https://doi.org/10.1002/ece3.1919>
- Sampaio, J. P., & Gonçalves, P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied Environmental Microbiology*, 74:2144–2152.
- Sniegowski, P. D., Dombrowski, P. G., & Fingerman, E. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Research*, 1, 299–306.
- Teixeira, J.F. (2015). *A levedura Saccharomyces cerevisiae: caracterização do gênero, domesticação e importância na composição de vinhos*. (Monografia especialização). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Wang, Q. M., Liu, W. Q., Liti, G., Wang, S. A., & Bai, F. Y. (2012). Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Molecular Ecology*, 21, 5404–5417.
- Yarrow, D. (1998). *Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts*. In: *The Yeasts, a Taxonomic Study*, (4 ed.), 77-100. Amsterdam: Elsevier.
- Zhang, H., Skelton, A., Gardner, R. C., and Goddard, M. R. (2010). *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* reside on oak trees in New Zealand: evidence for migration from Europe and interspecies hybrids. *FEMS Yeast Research*, 10, 941–947.