

## Caracterização morfológica de fungos em arbóreas para isolamento de leveduras

### Morphological characterization of tree fungi for yeast isolation

#### RESUMO

Entendendo a magnitude da biotecnologia no sistema atual, foi realizado um estudo piloto com objetivo de avaliar técnicas para o isolamento de leveduras para que possa colaborar com pesquisas acerca da bioprospecção nacional. Para ser realizado, o projeto contou com procedimento de coleta de 8 amostras de súberes de diferentes arbóreas, as quais foram transferidas para meio líquido e incubadas. Após dado o tempo para os microrganismos presentes nas amostras passarem ao meio, o líquido e o material foram estriados em meio sólido, divididos em dois tratamentos distintos em relação ao inóculo, os quais ainda foram diferenciados entre o uso e não uso de antibiótico. Por fim, houve a padronização na forma de tabela e leitura dos resultados para a orientação de futuros trabalhos. Considerando os recursos utilizados, o tratamento com transferência unicamente do material em solução líquida e sem antibiótico foi o que apresentou maior índice de colônias características de leveduras. Avaliando os resultados, recomenda-se a aplicação de condições anaeróbicas antes da incubação visando o crescimento direcionado de colônias de leveduras, além de utilizar antibióticos laboratoriais para um resultado com maior pureza em relação à classe microbiológica em demanda.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioprospecção. Coleta. Morfologia.

#### ABSTRACT

Understanding biotechnology's magnitude on the actual system, a primary study was performed to evaluate techniques in order to obtain a yeast isolation and contribute to national bioprospecting research. In first place, the project required an eight sample collection of suber from different trees, which were transferred to liquid medium and incubated. After the time the microorganisms pass from the sample to the medium, the liquid and the plant material were striated in solid medium through two treatments, which were still divided into two more, the use and non-use of antibiotic. Finally standardization in table form and the reading of results were made to guide future projects. Considering the resources used, the treatment which only the solution material was transferred and without antibiotic presented a higher rate of characteristic yeast colonies. Evaluating the results, application of anaerobic conditions is recommended before the incubation, aiming the growth of yeast colonies, besides using laboratorial antibiotics for a more pure colony result.

**KEYWORDS:** Bioprospecting. Collect. Morphology.

**Natan Wiele**

[nwiele@gmail.com](mailto:nwiele@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Amanda Edling de Barros**

[Edlingamanda0@gmail.com](mailto:Edlingamanda0@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Juliana Vitória Messias**

**Bittencourt**

[julianavitoria@utfpr.edu.br](mailto:julianavitoria@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO Página | 2

A flora, apesar de apresentar imensa diversidade, ainda possui uma microfauna capaz de modificar todo um processo industrial, intensificando-o; bactérias e leveduras estão presentes nesta categoria, exibindo funções para o próprio benefício dos vegetais, em relações simbióticas, assim abrindo um novo olhar para as vias metabólicas evidenciadas nestas vinculações em virtude do uso industrial após coleta e cultivo destes microrganismos (PEDROSA et al., 2015).

As descobertas acerca do potencial microbiológico, principalmente de leveduras, nas últimas décadas proporcionaram melhor utilização de processos biológicos atuantes na produtividade industrial.

As leveduras são microrganismos eucarióticos e unicelulares, possuem elevada capacidade de realizar fermentação e produção de macromoléculas (MARTINS, 2011). Sua identificação pode ser realizada através de provas bioquímicas, análise de macro e micro morfologia e adicionalmente por sequenciamento de DNA.

Com o avanço da biotecnologia, as leveduras vêm tomando espaço nas indústrias. Estes microrganismos influenciam economicamente em setores comerciais como indústrias de alimentos, bebidas e biocombustíveis. Um exemplo é a *Saccharomyces cerevisiae* que pode produzir, a partir de diferentes matérias-primas, vinho, cerveja e proteínas microbianas (GUIMARÃES, 2005).

Tendo em vista a magnitude da biotecnologia no sistema atual, foi realizado um estudo piloto com objetivo de avaliar técnicas para o isolamento de leveduras em súber de oito arbóreas nativas presentes no campus da UTFPR de Ponta Grossa. Assim, estes procedimentos podem corroborar futuras pesquisas acerca da biodiversidade microbiológica, utilizando como fontes árvores presentes nas formações vegetais, para que, desta forma, os processos tenham cada vez mais eficiência.

## MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de súberes foi realizada de forma aleatória, visto que se tratava de testes, no Campus de Ponta Grossa da UTFPR em oito diferentes espécies de árvores: *Tabebuia* sp., *Araucaria angustifolia*, *Eugenia pyriformis*, *Cedrus* sp., *Acacia* sp. (Mimosa), *Acacia* sp. (Mimosa scabrella), *Schinus* sp. e *Cassia ferruginea*, como mostra a figura 1.

Figura 1 – Arbóreas utilizadas para o isolamento de leveduras, em que A é *Tabebuia* sp. (Ipê Roxo). B é *Araucaria angustifolia* (Araucária). C é *Eugenia pyriformis* (Uvaia). D é *Cedrus* sp. (Cedro). E é *Acacia* sp. (Mimosa). F é *Acacia* sp. (Mimosa scabrella). G é *Schinus* sp. (Aroeira). H é *Cassia ferruginea* (Chuva de Ouro).



As amostras de súber de 1 cm<sup>2</sup> foram retiradas das árvores com o uso de uma faca de chefe (não serrilhada), transferidas a oito sacos plásticos identificados e posteriormente, no laboratório em cabine fluxo laminar, transferidas sem esterilização (visando a variedade microbiológica) para tubo Falcon com meio YM líquido autoclavado previamente. As amostras foram incubadas em estufa por três dias à 25°C.

Para cada tratamento, as amostras foram testadas com e sem adição de antibiótico. Foi adicionada a concentração de 0,01% (p/v) de amoxicilina com auxílio de uma seringa esterilizada no meio YM sólido. Após, o meio foi transferido para Placa de Petri e inoculado com base no tratamento 1 ou 2.

Após as 72 horas de incubação a 25°C, as amostras foram transferidas para a Placa de Petri, contendo o meio YM sólido. A partir do material incubado foram testados dois tipos de tratamento: material em solução (tratamento 1) e material vegetal (tratamento 2). O tratamento 1 consistiu na transferência da amostra de solução, por meio de estriamento com alça, para a Placa de Petri com meio sólido. No tratamento 2 houve transferência de pedaço do material vegetal em meio líquido do tubo Falcon para a Placa de Petri também com meio sólido. A tabela 1 explicita cada um dos respectivos tratamentos:

Tabela 1 – Testes Efetuados

Teste	Amostra
Tratamento 1 (T 1)	Solução sem antibiótico
Tratamento 1.1 (T 1.1)	Solução com antibiótico
Tratamento 2 (T 2)	Amostra de súber sem antibiótico
Tratamento 2.1 (T 2.2)	Amostra de súber com antibiótico

Fonte: Autoria própria (2019).

A partir da inoculação, as amostras foram mantidas durante cinco dias na estufa para uma primeira avaliação e posteriormente mais dois dias até a análise final. Com sete dias de crescimento, foram realizadas as leituras de crescimento das placas em relação à diversidade morfológica das colônias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de incubação, foi observado um alto índice de proliferação de microrganismos nas Placas de Petri, depois de isoladas e implantadas nos quatro diferentes tratamentos estabelecidos, os resultados obtidos foram os seguintes:

Quadro 1 – Crescimento microbiológico nas diferentes espécies vegetais perante os quatro tratamentos

Espécie Vegetal	Solução Sem Antibiótico (T 1)	Solução Com Antibiótico (T 1.1)	Súber Sem Antibiótico (T 2)	Súber Com Antibiótico (T 2.2)
Ipê roxo	+	-	+	+
	Colônias filamentosas e redondas isoladas		Colônias filamentosas brancas (houve avermelhamento do ágar)	Colônias filamentosas brancas (houve escurecimento do ágar)
Mimosa escabrela	+	+	+	+
	Muitos filamentos brancos, poucos pretos e pequenas colônias pretas isoladas	Muitas colônias filamentosas cinzas e uma preta isolada	Menor quantidade de filamentos brancos e grande mancha de coloração escura	Maior quantidades de filamentos brancos e poucos escuros
Aroeira	+	+		+
	Quantidades proporcionais de filamentos brancos e pretos	Filamentos brancos e poucos pretos	Liquefação do meio	Filamentos brancos e pretos
Araucária	+	+	+	+
	Filamentos brancos e avermelhados	Colônias circulares brancas ao redor da placa e filamentos brancos	Filamentos, colônias brancas circulares, pretas e colônia vermelha em formato de anel	Pequenas colônias circulares brancas com poros, 1 preta e filamentos brancos e avermelhados
Cedro	+	+		+
	Filamentos brancos espessos, colônias circulares e 1 em formato de granola	Colônias brancas e pretas ao redor da placa e filamentos	Liquefação do meio	Grande quantidade de filamentos, cama de algodão (houve amarelamento do ágar)
Mimosa	+	+		+

Espécie Vegetal	Solução Sem Antibiótico (T 1)	Solução Com Antibiótico (T 1.1)	Súber Sem Antibiótico (T 2)	Súber Com Antibiótico (T 2.2)
	Filamentos circulares e poucas colônias circulares	Pequenas colônias circulares brancas e pretas, além de filamentos brancos	Liquefação do meio	Filamentos brancos e 2 pequenas colônias circulares pretas
Uvaia	+	-	-	-
	Colônias circulares brancas com aspecto úmido			
Chuva de ouro	+	-	+	+
	Filamentos brancos e amarelos e uma colônia vermelha (houve escurecimento do ágar)		Diversos filamentos em torno da amostra (houve avermelhamento do ágar)	Filamentos em torno da amostra (houve escurecimento do ágar)

Nota: (+): houve crescimento e (-): não houve crescimento

Fonte: A autoria própria (2019).

Houve diferentes resultados entre o tratamento com os súberes e apenas a solução, em relação à quantidade de filamentos observados, coloração e forma das colônias formadas, assim como indica a Figura 2.

Figura 1 – Aspecto geral do crescimento microbiológico



Fonte: A autoria Própria (2019).

Considerando análises macroscópicas de colônia (cor, aspecto, textura, etc.), 8 amostras apresentaram colônias características de levedura, ou seja, formato circular, coloração esbranquiçada e, em alguns casos, aspecto úmido. O tratamento T1 foi o que apresentou maior índice de colônias características, nas espécies vegetais Ipê roxo, Cedro, Mimosa e Uvaia. O tratamento T2 apresentou

2 possíveis colônias de levedura nas espécies vegetais Araucária e Mimosa. Já os tratamentos T3 e T4 apenas apresentaram resultados na Araucária.

A uvaia, no entanto, foi a que apresentou maior semelhança entre as características padrões de colônias de levedura, característica esperada, uma vez que já foi descrito isolamentos provenientes desta espécie vegetal e dado que de acordo com Neto, Rêgo e Padilha (2016), tais microrganismos apresentam interação simbiótica com árvores de frutas cítricas pela alta concentração de açúcares e baixo pH, aspectos os quais favorecem seu crescimento.

Visto que o tratamento T1 foi o que apresentou maior porcentagem dos resultados esperados (50%) e o que apontou a mais provável colônia de levedura, tal metodologia, portanto, pode ser desenvolvida para futura utilização em pesquisas ou procedimentos de âmbito biotecnológico.

## CONCLUSÃO

Tratando-se do processo de cultivo, entende-se que sete dias acabam sendo tempo demasiado, assim indica-se análises diárias para determinar o melhor estágio de crescimento para o posterior estriamento. Com base na leitura das placas, foi observada uma grande proliferação de microrganismos, assim indica-se tratamento de anaerobiose nos tubos Falcon que conterão as amostras, visto que leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* crescem em ambas as condições aeróbicas ou não, resultando em uma inibição desejada de colônias filamentosas; ou ainda uma diluição em série, levando, desta forma, à obtenção de colônias mais isoladas.

## REFERÊNCIAS

PEDROSA, Manoel V. B. et al. **Importância ecológica dos microrganismos do solo**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Alegre, ES. 2015. Disponível em:

<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015E/importancia%20ecologica.pdf>.

Acesso em: 15 jan. 2019.

MARTINS, Gisele M. **Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose**. Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2011. Disponível em: [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94856/martins\\_gm\\_me\\_sjrp.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94856/martins_gm_me_sjrp.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 15 jan. 2019.

GUIMARÃES, Thais M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2005. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/1919/Isolamento,%20identificacao%20e%20selecao%20de%20cepas%20de%20levedura%20Sac.pdf?jsessionid=15D152420A3AFD1697F07BDB43A547AC?sequence=1>. Acesso em: 15 jan. 2019.

NETO, Agenor G. S.; RÊGO, Ester S. B.; PADILHA, Francine F. **Isolamento de Leveduras de Frutas Cítricas**. Anais da **Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes**. Aracaju, 2016.