

DIVERSIDADE DE ISOLADOS INDÍGENAS DE *Saccharomyces cerevisiae* E OUTRAS LEVEDURAS PROVENIENTES DA FLORESTA AMAZÔNICA

Juliana D. Moreira^{1*}, Ana Raquel de O. Santos², Carlos A. Rosa³

1. Estudante de IC do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2. Instituto de Ciências Biológicas – UFMG / Co-orientador

3. ICB-UFMG - Departamento de Microbiologia / Orientador

Resumo:

A Floresta Amazônica é um bioma de grande importância biológica e vasta biodiversidade. Possui substratos vegetais como cascas de árvores, flores e frutos que são ambientes onde ocorre o crescimento de leveduras, as quais assimilam açúcares, como a rafinose, presente nesses compostos. Biotecnologicamente as leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, são microorganismos frequentemente utilizados para a produção do etanol. A domesticação da *Saccharomyces cerevisiae* pelo homem levou à utilização dessa levedura em diversos processos industriais e apesar do uso intenso desse microrganismo em processos biotecnológicos, ainda há poucas informações sobre sua origem e ecologia. Este estudo buscou isolar novos isolados de *Saccharomyces cerevisiae* por meio da utilização de meio seletivo contendo rafinose como fonte de carbono e etanol. Os substratos utilizados foram casca de árvores (30 amostras), flores (56) e frutos (48), coletados na Floresta Nacional (FLONA) de Caxiuanã, no estado do Pará. Cada amostra foi inoculada em meio seletivo para *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast Nitrogen Base 0,67 % suplementado com 1% de rafinose, 6% de etanol e 0,02% de cloranfenicol), e incubadas a 10°C e a 30°C. Dentre as amostras que apresentaram turbidez, um mililitro foi transferido para novo frasco contendo o mesmo meio. Observado novo crescimento, as amostras foram plaqueadas em meio sólido YMA (glicose 1%, peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, ágar 2% e cloranfenicol 0,01%). As leveduras obtidas foram isoladas, purificadas e criopreservadas com glicerol 20% a -80°C. Posteriormente, os isolados foram agrupados de acordo com a

morfologia das colônias, para posterior agrupamento molecular, por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *fingerprinting* utilizando-se o iniciador (GTG)₅. Um representante de cada grupo molecular obtido foi selecionado para identificação molecular por meio do sequenciamento dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal. As sequências de DNA foram comparadas com as sequências depositadas no GenBank utilizando o programa BLASTn. Um total de 77 isolados foi obtido, sendo 41 provenientes de amostras de casca de árvore, 21 de amostras de flores e 9 de amostras de frutos. Três isolados de *Saccharomyces cerevisiae* foram obtidos a partir de amostras de casca de Breu Branco (*Protium heptaphyllum*). Um total de 17 diferentes espécies foram obtidas, sendo as mais frequentes *Pichia manshurica* (6 isolados), *Meyerozyma guilliermondii* (5) e *Hanseniaspora opuntiae* (5). Sete possíveis novas espécies de leveduras foram identificadas: *Clavispora* sp. (um isolado), *Cyberlindnera* sp. 1 (1), *Cyberlindnera* sp. 2 (15), *Hanseniaspora* sp. (1), *Wickerhamomyces* sp.1 (1), *Wickerhamomyces* sp.2 (9) e *Wickerhamomyces* sp.3 (6).

Esses resultados indicam que o bioma amazônico talvez possa ser um ambiente favorável para o isolamento de novas espécies de leveduras e, além disso, o isolamento de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de casca de árvores indica que essa levedura, possivelmente, esteja associada a esse substrato.

Palavras-chave: Leveduras; Diversidade; Amazônia.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Introdução:

Leveduras são microrganismos unicelulares conhecidos por colonizar substratos ricos em nutrientes, atuando na transformação de nutrientes e na decomposição da matéria orgânica. Encontram-se distribuídas amplamente por todos os biomas do planeta, onde desempenham processos complexos no ecossistema, interagindo com outros organismos como mutualistas, parasitas, competidores ou patógenos (STARMER and LACHANCE, 2011). A compreensão da ecologia de leveduras tem se tornado importante, uma vez que estima-se que 99% da potencial biodiversidade desses microrganismos no planeta ainda não seja conhecida. Ambientes como as regiões tropicais têm despertado interesse científico para o isolamento de leveduras devido à sua vasta diversidade biótica, como na América do Sul, onde leveduras têm sido isoladas de habitats nunca antes explorados (BARRIGA et al., 2011).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é um micro-organismo unicelular, tipicamente diploide e que se reproduz assexuadamente por crescimento vegetativo por meio de divisão celular mitótica (PLECH, 2014). Sua utilização pela civilização humana ocorre há mais de nove mil anos, sendo empregada na fabricação de bebidas e alimentos (STEFANINIA, 2012), além disso, é também amplamente utilizada na produção de bioetanol, produtos químicos, farmacêuticos (NIELSEN, 2008) e é bastante manipulada em estudos genéticos, sendo o organismo eucariótico mais estudado (BOYTON, 2014).

Embora amplamente utilizada em diversos processos pelo homem, pouco é conhecido sobre a distribuição natural e estrutura populacional da *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que, algumas linhagens já foram isoladas de substratos naturais como exsudatos de carvalho, cascas e solo (SNIÉGOWSKI et al., 2002). O pouco já registrado sobre esse microrganismo, evidencia sua associação em Carvalhos (*Quercus* spp.) no hemisfério norte e em árvores de faia no hemisfério sul (Sampaio and Gonçalves, 2008).

Substratos vegetais como caule, flores

e frutos são ricos em compostos orgânicos e umidade, fornecendo um ambiente propício para o crescimento de leveduras. A partir desses substratos, a utilização oxidativa de uma diversidade de compostos de carbono orgânico, permitiu uma expansão significativa de inúmeros nichos pelas leveduras (STARMER and LACHANCE, 2011). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza como fonte energética uma variedade de açúcares como a glicose e a frutose, metabolizados na glicólise e a galactose que é convertida em glicose-1-P e posteriormente, glicose-6-P. Esses açúcares também podem ser obtidos pela levedura por meio de dissacarídeos e trissacarídeos como a sacarose, melbiose e rafinose. A rafinose é o segundo açúcar mais abundante encontrado na natureza e é intensamente encontrado em plantas (ATIYEH and DUVNJAK, 2003).

O álcool etílico, comumente conhecido como etanol, é um produto metabólico gerado pela fermentação da glicose em leveduras a partir de matérias-primas como substratos vegetais e é usado como um dos principais combustíveis na utilização em motores ou suplemento de combustíveis (MANDIGAN et al., 2016). Concomitantemente, o etanol é conhecido por ser um inibidor do crescimento dos micro-organismos. Durante o processo de fermentação dos açúcares pelas leveduras, a acumulação do etanol produzido pode levar à inibição da própria fermentação e também pode promover outros efeitos prejudiciais às células da levedura (ALEXANDRE and CHARPENTIER, 1998). Em vista disso, linhagens de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, que apresentem altos níveis de tolerância ao etanol, possuem vantagens para uma alta eficiência de fermentação, e conseqüentemente um alto rendimento em etanol (HU, 2007).

Além da tolerância ao etanol, outro fator importante para os processos fermentativos é a temperatura. As reações bioquímicas das leveduras e a ecologia da microbiota presente em mostos de uva são diretamente afetadas pela temperatura de fermentação (FLEET and HEARD, 1993). Baixas temperaturas de crescimento e fermentação são importantes para leveduras na fermentação do vinho, podendo contribuir para realçar o aroma e tornar a bebida com traços desejáveis às indústrias (GARCÍA-RÍOS et al., 2017). Em contrapartida, temperaturas

elevadas na produção do etanol tem se tornado de grande interesse industrial devido a diminuição dos custos com processos de resfriamento (FONSECA et al., 2008).

Dessa forma o objetivo do trabalho foi isolar linhagens selvagens de *S. cerevisiae*, para melhor compreensão da biologia desses organismos, os quais podem apresentar propriedades tecnológicas favoráveis para ao emprego em processos biotecnológicos e assim também, serem fontes de novos genes para melhoramento de linhagens industriais.

Metodologia:

A coleta foi realizada no bioma da Floresta Amazônica na Floresta Nacional (FLONA) de Caxiuanã, no estado do Pará. Foram coletadas casca de árvores (30 amostras), flores (56) e frutos (48). As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis, identificados e conduzidos à refrigeração para posteriormente serem processadas em laboratório.

As amostras coletadas foram inoculadas em duplicata cada uma em tubos falcons contendo 10 mL do meio seletivo para *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast Nitrogen Base 0,67 % suplementado com 1% de rafinose, 6% de etanol e 0,02% de cloranfenicol). Os tubos falcons foram mantidos vedados com filme plástico para evitar a evaporação do etanol. As amostras que apresentaram crescimento microbiano, evidenciado pela presença de turbidez e produção de bolhas de CO₂, foram homogêneas e um mililitro foi transferido para um novo frasco contendo o mesmo meio. Os tubos que apresentaram crescimento microbiano positivo após esta segunda passagem, foram semeados em placas de Petri contendo meio sólido de YMA (glicose 1%, peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, ágar 2% e cloranfenicol 0,01%). As placas foram incubadas a 25 °C até a observação do crescimento de colônias.

As colônias obtidas nas placas foram isoladas novamente em YMA para a obtenção de culturas puras, que foram em seguida preservadas a -80°C em criotubos contendo caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, Na₂PO₄ 0,2%) com 20% de glicerol e depositadas na Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

As leveduras foram agrupadas de acordo com suas características morfológicas para posterior identificação por métodos moleculares. Primeiramente, foi realizada a extração do DNA total a partir de isolados crescidos em placas de YM incubados a 25°C. Cada colônias foi ressuspensa em 100 µL (Tris-HCl 0,05M, EDTA 0,005M, NaCl 0,1M e SDS 1%) e incubadas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 200µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) aos eppendorfs e os mesmos foram homogêneos por inversão e centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado (v/v) de isopropanol. Os tubos foram deixados em repouso durante 15 minutos à temperatura ambiente, para precipitação do DNA. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e ao pellet formado foram acrescentados 200 µL de etanol 70% gelado. Efetuou-se novamente uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e os eppendorfs foram secos *overnight* à temperatura ambiente para evaporação total do etanol. O DNA foi ressuspensa em 50 µL de tampão Tris-EDTA 0,1M (TE) pH 8,0 e armazenado a -20 °C.

A partir do agrupamento morfológico, foi realizada a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) *fingerprinting* com o iniciador (GTG)₅ para um novo agrupamento das leveduras em perfis moleculares distintos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5 X (54 g de Tris-base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0) a 80 V durante uma hora. Os amplicons foram previamente corados com solução de GelRed (Biotium, USA) e visualizados sob luz ultravioleta.

A partir dos resultados obtidos na PCR com o iniciador GTG₅. Leveduras que apresentaram mesmo perfil de bandas foram consideradas como pertencentes às mesmas espécies. Dentro desses grupos, um representante Um representante de cada grupo foi submetido a PCR com os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') para o

sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal segundo Lachance e colaboradores (1999). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X a 130 V durante 20 minutos. Os amplicons foram corados pela adição de GelRed e os géis foram visualizados sob luz ultravioleta.

Para a purificação dos amplicons gerados pela reação de PCR com os iniciadores NL1 e NL4, foram adicionados 11,75µL de EDTA 125mM e 141µL de etanol absoluto aos 47 µL do produto de PCR, que foram em seguida deixados em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, para a precipitação do DNA. Após esse período, os tubos foram submetidos à centrifugação por 14.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 120µL de etanol 70%, e estes foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado por inversão e as amostras foram secas à temperatura ambiente até a total evaporação do etanol. O DNA foi ressuscitado em 10µL de água ultrapura. Em seguida o produto obtido foi quantificado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e utilizado nas reações de sequenciamento. O sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1

As seqüências foram verificadas utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI desenvolvido pelo National Center For Biothecology (ALTSCHUL et al., 1997) e as seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências tipo depositadas no GenBank.

Resultados e Discussão:

Um total de 77 isolados foram obtidos, sendo 41 provenientes de amostras de casca de árvore, 21 de amostras de flores e 9 de amostras de frutos. Setenta e um isolados já foram identificados e dentre eles ocorreram três isolados de *Saccharomyce cerevisiae*, obtidos a partir de amostras de casca de Breu Branco (*Protium heptaphyllum*), podendo ser um indicio de associação da levedura com esse vegetal. Outras 17 diferentes espécies foram obtidas: *Candida albicans* (um isolado); *Candida davenportii* (1), *Candida homilentoma* (2), *Candida parapsilosis* (1), *Candida*

pseudofloscolorum (1), *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*) (1), *Cyberlindnera bimundalis* (1), *Cyberlindnera xylosilytica* (2), *Hanseniaspora opuntiae* (5), *Hyphopichia burtonii* (1), *Kodamaea ohmeri* (3), *Lachancea thermotolerans* (1), *Meyerozyma guilliermondii* (5), *Pichia manshurica* (6), *Schwanniomyces polymorphus* (1), *Torulaspora pretoriensis* (1) e *Wickerhamomyces rabaulensis* (1). Sete possíveis espécies novas pertencentes aos gêneros: *Clavispora* sp. (um isolado), *Cyberlindnera* sp. 1 (1), *Cyberlindnera* sp. 2 (15), *Hanseniaspora* sp. (1), *Wickerhamomyces* sp.1 (1), *Wickerhamomyces* sp.2 (9) e *Wickerhamomyces* sp.3 (6) foram isoladas neste estudo.

A maior parte dos isolados foram encontrados em associação a cascas de árvores, indicando que esse substrato é favorável para isolamento de leveduras.

Dentre as 77 linhagens isoladas, 56 foram provenientes de amostras incubadas a 10°C e as outras 21 de amostras incubadas 30°C. A ocorrência de mais isolados na temperatura mais baixa ocorreu em estudos como de Sampaio e Gonçalves (2008), em que os autores sugerem que a dificuldade de isolar espécies que crescem em temperaturas mais elevadas, termotolerantes, pode ser agravada com a presença do etanol. As espécies que cresceram a baixas temperaturas, no entanto, obtiveram crescimento mais lento e, portanto, mais tempo para tolerar e se adaptar a toxicidade do etanol.

Conclusões:

Vinte e cinco diferentes espécies foram obtidas dentre os setenta e sete isolados, sendo sete destas, possíveis novas espécies. Esse resultado indica como os substratos vegetais como casca, flores e frutos são promissores para o isolamento de leveduras, além de demonstrar a importância de estudos científicos dos ecossistemas brasileiros como a Floresta Amazônica, os quais abrigam uma vasta diversidade biológica.

Os poucos isolados de *S. cerevisiae* mostraram que é preciso aprimorar métodos e explorar mais ambientes naturais para elucidar a origem e ecologia deste microrganismo. Embora os isolados de *S. cerevisiae* ocorreram em espécies de Breu Branco

(*Protium heptaphyllum*) é necessário estudos para evidenciar a possível associação desta levedura a essa planta.

Referências bibliográficas

ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 20, p. 20–27, 1998.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST nad PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Utilization of raffinose and melibiose by a mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 78, p. 1068-1074, 2003.

BARRIGA, E.J.C.; LIBKIND, D.; BRIONES, A.I.; IRANZO, J.U.; PORTERO, P.; ROBERTS, I.; JAMES, S.; MORAIS, P.B.; ROSA, C. A. Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. In: Grillo, O., Venora, G. (Eds.), **Changing Diversity in Changing Environment**. p. 55–86, 2011.

BOYNTON, P. J.; GREIG, D. The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. **Yeast**. v. 31, p. 449–462, 2014.

FLEET, G.H.; HEARD, G. M. Yeast-Growth

during Fermentation. In: Fleet, G.H., Ed., Harwood Academic, Wine, Microbiology and Biotechnology, Lausanne, p. 27-54, 1993.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 79, p. 339–354, 2008.

GARCÍA-RÍOS, E.; MORARD, M.; PARTS, L.; LITI, G.; GUILLAMÓN, J. M. The genetic architecture of low-temperature adaptation in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomic**. p. 1-13, 2017.

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T.; BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeasts species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p.172-177, 1999.

MANDIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. Microorganismos e microbiologia. **Microbiologia de Brock**. p. 12, 2016.

NIELSEN, J.; JEWETT, M. C. Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.** v. 8, p. 122–131, 2008.

PLECH, M.; DE VISSER, J. A. G.M.; KORONA, R. Heterosis is prevalent among domesticated but not wild strains of *Saccharomyces cerevisiae*. v.4, p. 315–23, 2014.

SAMPAIO, J.P.; GONÇALVES, P. Natural Populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal Are Associated with Oak Bark and Are Sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2144–2152, 2008.

STARMER, W.T.; LACHANCE, M.-A. Yeast ecology. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T (Eds.), **The Yeasts: A Taxonomic Study**. fifth ed. Elsevier, p. 65–83, 2011.

STEFANINI, I.; DAPPORTO, L.; LEGRAS, J. L.; CALABRETTA, A.; PAOLAG, M.D.; DE FILIPPOH, C.; VIOLAH, R.; CAPRETTIC, P.; POLSINELLIB, M.; TURILLAZZIB, S.; CAVALIERI, D. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 109, p. 13398–13403, 2012.

SNIEGOWSKI, P.D.; DOMBROWSKI, P.G.; FINGERMAN, E. *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**. v. 1, p. 299–306, 2002.