

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS *KILLER* EM PLANTAS DA CAATINGA

Daniel Carlos Barbosa Patrocínio¹
Víctor Vinícius Batista dos Santos²
Lucas Fernandes Gomes³
Caio Antunes de Almeida Macário⁴
Rosália Severo de Medeiros⁵

INTRODUÇÃO

As toxinas *killer*, também denominadas fator *killer* ou proteínas *killer*, são substâncias proteicas tóxicas secretadas por certas cepas de leveduras que têm efeitos letais sobre outras leveduras e uma ampla variedade de bactérias, além de uma gama de fungos filamentosos, o que possibilita o biocontrole dos fitopatógenos e bolores deteriorantes de alimentos. As próprias leveduras produtoras dessas substâncias e o organismo humano são imunes à ação dessas toxinas. Dentre as linhagens desses microrganismos com maior potencial antagônico constata-se *Saccharomyces cerevisiae* e *Sporobolomyces roseus*. Todavia, a capacidade de produção de toxinas *killer* tem sido evidenciada entre várias outras espécies de leveduras (SCHMITT, 2002).

Os efeitos letais das toxinas *killer* sobre as células afetadas ocorrem após duas ações básicas. São elas a ligação da toxina aos receptores específicos da parede celular e membrana plasmática e transporte para o citoplasma. Uma vez dentro da célula, as toxinas provocam o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, causando: ruptura e consequente perda de íons potássio (K^+), ATP e metabólitos intracelulares; inibição de síntese dos principais componentes da parede celular como glicanas e quitina e de DNA, além do bloqueio da fase G1 do ciclo celular de reprodução (GOLUBEV et al., 2006).

Desde sua identificação, várias aplicações vêm sendo propostas para essas leveduras. Como exemplos, há sua atuação como agentes de preservação de alimentos, agentes de controle em fermentações industriais modelos para estudo em biologia molecular e

¹ Graduando do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, nieldaniel00@email.com;

² Graduando do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, santosvictorv@hotmail.com;

³ Graduando do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Lucasfernandesgomes25@gmail.com;

⁴ Graduando do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, caio_macario17@hotmail.com;

⁵ Professor orientador: Doutora, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, medeiros.rsm@gmail.com

classificação de microrganismos, ação antifúngica, estimulante para produção de anticorpos, com aplicação na produção de vacinas; e, mais recentemente, no controle de fitopatógenos em pós-colheita (LIU; ALAMRI, 2009).

As tendências de mercado atualmente orientam para um consumo de vegetais, como frutas e hortaliças, minimamente processados, com mitigação de manejo, desinfecção, embalagem, distribuição e venda, e ainda sem nenhuma alteração das características iniciais de produto fresco. Medidas são adotadas para a facilitação da comercialização de frutas, buscando o aumento de sua vida de prateleira através de várias técnicas amplamente conhecidas, como resfriamento e desenvolvimento de atmosfera controlada, usando-se filmes plásticos. Estes reduzem a perda de água e a velocidade de respiração, controlando a velocidade da migração de oxigênio e gás carbônico, cujo efeito de “atmosfera modificada” preserva a qualidade de alimentos e prolonga sua validade.

Além disso, baixa ou nula utilização de agrotóxicos ou pesticidas no campo, devido às várias consequências que estes podem ocasionar, como contaminação dos produtos, manipuladores e consumidores e degradação dos ecossistemas ampliam a importância do uso de substâncias orgânicas biodegradáveis produzidas por microrganismos que combatem pragas e não geram transtornos indesejáveis.

A observação sobre o possível efeito degradante de micotoxinas ligado à preservação de frutos no período de pós-colheita, utilizando-se de leveduras torna-se bastante interessante, devido ao caráter inócuo de utilidade frutífera, onde se desconhecem linhagens naturalmente micotoxigênicas. A atividade “*killer*” em meios de cultura é expressa sob condições ácidas (pH 3-6), com maior atuação em pH 4-5 e entre 15-20°C, podendo ser inativada sob temperaturas mais elevadas.

O fenótipo *killer* foi inicialmente descrito em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan e Makower, em 1963. Segundo a classificação desses pesquisadores, na natureza, é possível a ocorrência de três fenótipos distintos de leveduras: *killer*, sensível e neutro. Cepas com atividade *killer* são aquelas capazes de secretar proteínas que têm a capacidade de matar outras linhagens sensíveis. As linhagens neutras são as que não produzem toxinas e são imunes a elas. A expressão do fenótipo *killer* configura vantagem competitiva para obtenção de nutrientes, quando estes são limitados, sobre outros microrganismos (GORETTI et al., 2009).

A expressão do fenótipo *killer* é influenciada por vários fatores do ambiente, primordialmente por pH e temperaturas de incubação. Portanto, a utilização desses

microrganismos está condicionada à manutenção de condições favoráveis à produção de sua toxina. A realização de prospecção dentro do nicho ecológico da levedura pode facilitar sua aplicação potencial reduzindo a necessidade de operações de controle e, conseqüentemente, os custos do processo, além de garantir a viabilidade dos microrganismos nas condições de uso pretendidas. Sob essa perspectiva, este trabalho objetiva o isolamento e a identificação de leveduras produtoras de toxinas *killer* associadas a frutos e folhas de plantas do bioma Caatinga, com posterior aplicação como agente preservador de condições primárias de fruto fresco, bem como biopesticida em plantações (LIMA et al., 2007).

METODOLOGIA

COLETA DE FRUTOS E FOLHAS E ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

As amostras vegetais serão coletadas do meio ambiente onde as mesmas são cultivadas podendo compreender pomares ou unidades de produção de frutas na região do Semiárido do estado da Paraíba e na Universidade Federal de Campina Grande - Campus de Patos. Espécies como caju (*Anacardium occidentale* L.), umbu (*Spondias tuberosa*), cajá (*Spondias mombin* L.) e outros frutos regionais ou característicos da Caatinga serão preferencialmente estudados.

Os frutos serão acondicionados em recipientes térmicos, depois, levados ao laboratório de Microbiologia da UFCG onde serão selecionados de acordo com o estágio de maturação e integridade.

Para as análises, realizadas imediatamente após a seleção, serão realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) a partir de 25 g de amostra da casca dos frutos ou folhas pesquisadas em 225 mL de solução salina fisiológica. Cada diluição será plaqueada em duplicata, utilizando a técnica do *spread plate* em ágar batata dextrose (BDA-Difco), de potencial hidrogeniônico (pH) 3,5; ajustado com ácido tartárico a 10%. As placas serão incubadas por 72 horas a 28 °C e, após a incubação, as colônias de cada placa serão isoladas e caracterizadas sendo, as que apresentarem características culturais e microscópicas, submetidas ao teste *killer*.

DESENVOLVIMENTO

DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO *KILLER* E CARACTERIZAÇÃO

A atividade *killer* será testada em triplicata, utilizando meio YEPD (extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, glicose 20 g L⁻¹, ágar 20 g L⁻¹), com 0,003% de azul de metileno e tamponado com tampão citrato 0,01 M., para pH 4,2. As cepas *Candida glabrata*

Y-55 (NCYC 388) e *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006), sensíveis à maioria das toxinas *killer* conhecidas, vão ser cultivadas por 24 horas a 28 °C em BDA, suspendidas em solução salina fisiológica até 4×10^5 células mL⁻¹, espalhadas na superfície do meio com cotonetes estéreis e incubadas a 25 °C por 30 minutos.

As leveduras a serem testadas serão inoculadas como um único ponto na superfície das placas semeadas com as leveduras sensíveis. Em seguida, as placas serão incubadas a 25 °C por 72 horas. A presença de halo de inibição ao redor do ponto de inoculação indicará a positividade do teste (CABRAL et al., 2009).

Para fins de controle, serão utilizadas, simultaneamente, em cada teste, quatro cepas padrões *killer*, K1 (NCYC 232) *Saccharomyces cerevisiae*, K2 (NCYC 732) *Saccharomyces cerevisiae*, K4 (NCYC 388) *Candida glabrata* e K6 (NCYC 587) *Kluveromyces fragilis*.

AVALIAÇÃO DA ATUAÇÃO DAS LEVEDURAS *KILLER* EM VEGETAIS NO PERÍODO PÓS-COLHEITA E COMO BIOPESTICIDA

Uma vez havendo a fenotipagem dos microrganismos das amostras como sendo pertencentes à classificação de leveduras *killer*, tais cepas serão cultivadas para obtenção em maiores quantidades fazendo-se uso dos meios adequados. Posteriormente, as leveduras serão aplicadas diretamente, por dispersão controlada, sobre vegetais recém-colhidos para avaliação de sua atuação. Paralelamente, grupos-controle, de vegetais recém-colhidos sem a aplicação de leveduras, também serão considerados para efetivação da metodologia científica e confirmação (AMABIS, 2010).

Quanto aos testes das leveduras *killer* como biopesticida, metodologia semelhante será aplicada: dispersão controlada sendo direcionada às folhas de plantas visivelmente afetadas pela atuação de seres fitopatógenos, como bactérias e outros fungos, considerando grupos-teste e grupos-controle de seres vegetais.

Por conseguinte, todos os dados obtidos serão considerados, observando as diferenças entre as amostras dos grupos testados, para que se possa certificar o potencial *killer* existente em leveduras dos frutos obtidos do bioma Caatinga.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao fim do projeto foram isoladas um total de 15 cepas diferentes de leveduras, usando como material de suporte placas de Petri e codificadas da forma mais viável para facilitar a identificação da espécie cultivada. As amostras codificadas como MD003, MD007, MD009

foram originárias da espécie *Psidium guajava-goiabeira*. As folhas coletadas dessa espécie não evidenciaram um potencial killer significativo, manifestando através de sucessivos isolamentos uma prevalência baixa da fenotipagem Killer. Estas apresentavam aspecto filamentosos, elevação plana e suas bordas eram onduladas.

As placas identificadas com numeração MD001, MD002, MD0008 retiradas de folhas e cascas dos frutos da espécie *Citrus limon* - limoeiro também não evidenciaram uma fenotipagem Killer positiva, sendo que apenas a placa com identificação MD002 apresentou características da espécie Killer. Depois de efetuados novos testes a característica Killer continuou a se manifestar. Quanto à morfologia sua forma era puntiforme, a elevação convexa e suas bordas inteiras.

As cepas MD004, MD005, MD009 pertenciam à espécie *Cactus spp* - cacto. Essa espécie mostrou ter um excelente potencial a manifestação do fenótipo Killer, apesar das condições climáticas não estarem bem favoráveis ao seu crescimento. Grande parte das cepas isoladas da mesma foram identificadas com possível levedura killer. Tanto pelas suas características culturais, quanto morfológicas. Estas apresentaram forma circular, elevação plana e suas bordas variavam de ondulado a inteiro.

Por fim realizamos a última amostra. Desta vez escolhemos a espécie *Mimosa tenuiflora* - jurema. Identificamos as cepas com a marcação MD006, MD011 e MD012. Ao fim dos testes e isolamentos, não obtivemos manifestação da fenotipagem Killer. Constatando a presença de outros microrganismos, como fungos e bolores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As tendências de mercado atuais orientam para um consumo de vegetais, como frutas e hortaliças, minimamente processados e sem alteração das características iniciais de produto fresco. Medidas são adotadas a fim de facilitar a comercialização de frutas, buscando o aumento de sua vida de prateleira pelo uso de várias técnicas, como resfriamento e desenvolvimento de atmosfera controlada. Hoje, também as exigências de mercado guiam os produtores ao baixo ou nenhum uso de pesticidas no campo, devido às várias consequências que estes podem ocasionar, como contaminação de seres humanos e ecossistemas. As leveduras possuem várias aplicações potenciais, dentre as principais há sua utilização na preservação de frutos no período pós-colheita, impedindo a degradação do vegetal por fitopatógenos, e como biopesticida em plantações, eliminando pragas e, assim, impossibilitando sua proliferação.

Diante do apresentado, o presente projeto objetiva executar uma prospecção das leveduras naturalmente presentes na flora da Caatinga do semiárido Paraibano, em especial na cidade de Patos, assim como realizar o isolamento de leveduras que apresentem fenótipo *killer* e verificar a potencialidade destes microrganismos em atuar como inibidores de fitopatógenos no ecossistema. Ficando evidente a riqueza do nosso bioma e carecendo de mais pesquisas para que o mesmo seja explorado de forma segura e ecológica, reduzindo impactos nos ecossistemas.

REFERÊNCIAS

- AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R. Biologia: ciência e vida. **Biologia das células**, v. 1, p. 23-27, 2010.
- CABRAL, A. S.; CARVALHO, P. M. B.; PINOTTI, T.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; MACRAE, A. Killer yeasts inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p.108-110, 2009.
- FUENTEFRIA, A. M. **Bioprospecção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos**. 2008. 144 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- GOLUBEV, W. I, Antagonistic interactions among yeasts. In: ROSA, C.A.; PETER, G. (Org.). **The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer, 2006. p.197- 219.
- GORETTI, M.;TURCHETTI, B.; BURATTA, M.; BRANDA, E.; CORAZZI, L.; VAUGHAN- MARTINI, A.; BUZZINI, P. , In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.131, p. 178-182, 2009.
- HASHEM, M.; ALAMRI, S. The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, 123-130, 2009.
- LIU, S., M. Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 280-282, 2009.
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology**, v. 26, p. 257-276, 2002.