

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PIBIC - PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIODIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A BEBIDAS  
FERMENTADAS CONSUMIDAS NA REGIÃO DO MÉDIO AMAZONAS

Bolsista: Edinaira Sulany Oliveira de Sousa, CNPq

ITACOATIARA-AM  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PIBIC - PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL  
PIB-B/0019/2011

BIODIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A BEBIDAS  
FERMENTADAS CONSUMIDAS NA REGIÃO DO MÉDIO AMAZONAS

Bolsista: Edinaira Sulany Oliveira de Sousa, CNPq  
Orientador: Prof. Dr. Maxwell Adriano Abegg

ITACOATIARA-AM  
2012

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Local de coleta da bebida tarubá.....	10
Figura 2 – População de leveduras em meio MEA e meio WLN .....	15
Figura 3 – Unidades formadoras de colônias (UFC) em placas contendo o meio MEA .....	15
Figura 4 – Observação da morfologia celular em microscópio óptico em 400x .....	18
Figura 5 – Observação microscópica de pseudohifas .....	20
Figura 6 – Curva de crescimento de isolados em meio contendo 15% de etanol.....	21
Figura 7 – Curva de crescimento de isolados em meio contendo 50% de glicose.....	22

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Locais de coleta das bebidas fermentadas.....	10
Tabela 2 – Total de isolados obtidos de cada bebida fermentada .....	14
Tabela 3 – Caracterização da morfologia colonial dos isolados .....	16
Tabela 4 – Caracterização da morfologia celular dos isolados .....	18

## RESUMO

Leveduras fermentadoras selvagens têm sido isoladas de fontes naturais por décadas e são utilizadas em vários processos de fermentação. Em função das características fermentativas distintas das leveduras, existe sempre a busca de cepas com características melhores de fermentação, como a tolerância alta ao álcool para a produção de etanol, por exemplo. Neste estudo, considerando a importância da análise da biodiversidade de leveduras em bebidas fermentadas para emprego comercial de cepas promissoras, analisou-se a diversidade de leveduras em cinco bebidas fermentadas (aluá de abacaxi, aluá de jenipapo, gengibirra, saracura-mirá e tarubá) consumidas em Itacoatiara-AM e comunidades ribeirinhas próximas à cidade. Um total de 43 isolados sugestivos de leveduras foi obtido a partir dessas bebidas, sendo a maior parte destas (13 isolados ou 30,2%) provenientes da bebida saracura-mirá. A identificação fenotípica preliminar mostrou que 39 (90,69%) isolados apresentaram reprodução assexuada por brotamento unipolar. Na sequência, foram realizadas provas preliminares de caracterização do potencial biotecnológico dos isolados, particularmente: tolerância ao etanol, tolerância à glicose 50% e termotolerância. Dos 43 isolados testados com relação à tolerância ao etanol, 10 (23,25%) cresceram em placas contendo 15% de álcool e apenas um (2,32%) cresceu em placa contendo 30% de álcool. Um total de 22 (51,16%) isolados cresceu em ágar extrato de levedura-peptona-dextrose (YEPD) contendo 50% de glicose. Nenhum dos isolados obtidos e testados apresentou crescimento visível em placa incubada à 60°C. O crescimento em caldo frente a 15% de etanol foi equivalente, quando comparados os 10 isolados testados, enquanto que frente a glicose 50% a variação de crescimento observada entre os 7 isolados testados foi maior. Para fins de caracterização molecular, a seleção das leveduras foi realizada preliminarmente considerando diferenças macro e micromorfológicas e os isolados foram enviados à Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS, para análise inicial por meio de PCR *fingerprinting* e sequenciamento de segmentos de DNA. Resultados parciais da análise molecular demonstram a presença de diferentes espécies e padrões de PCR *fingerprinting*. Parece importante a seleção de cepas com potencial biotecnológico para uso na produção de bebidas fermentadas com padrão de qualidade.

**Palavras-chaves:** leveduras; bebidas fermentadas; biodiversidade.

## ABSTRACT

Fermenting wild yeasts have been isolated from natural sources for decades and are used in various fermentation processes. Depending on the fermentation characteristics of yeast separate, there is always a search for strains with top fermentation characteristics such as high tolerance to alcohol for ethanol production, for example. In this study, considering the importance of analyzing the biodiversity of yeasts in fermented beverages for commercial employment of promising strains, we analyzed the diversity of yeasts in five fermented beverages (aluá pineapple, aluá genipap, ginger ale, and saracura-mirá tarubá) consumed in Itacoatiara-AM and coastal communities near the city. A total of 43 isolates suggesting yeast was obtained from these drinks, the major part thereof (13 or 30.2% isolated) from the beverage saracura-sight. A preliminary phenotypic identification showed that 39 (90.69%) isolates showed asexual reproduction by budding unipolar. Further, preliminary tests were performed to characterize the biotechnological potential of the isolates, particularly: ethanol tolerance, glucose tolerance and 50% thermotolerance. Of the 43 isolates tested regarding tolerance to ethanol, 10 (23.25%) grew on plates containing 15% alcohol and one (2.32%) grew on plates containing 30% alcohol. A total of 22 (51.16%) isolates grown on agar yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) containing 50% glucose. None of the isolates tested and showed visible growth plate incubated at 60 ° C. Growth in broth against 15% ethanol was equivalent when comparing the 10 isolates tested, whereas 50% glucose compared to the growth observed variation among seven isolates tested was greater. For purposes of molecular characterization, selection of yeasts was performed preliminarily considering macro and micromorphological differences and the isolates were sent to the Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre - RS, for initial analysis by PCR fingerprinting and sequencing DNA segments. Partial results of the analysis demonstrated the presence of molecular species and different patterns of PCR fingerprinting. It seems important to the selection of strains with biotechnological potential for use in the production of fermented beverages with quality standards.

**Keywords:** yeast, fermented beverages; biodiversity.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	9
3.1	Objetivo geral.....	9
3.2	Objetivos específicos.....	9
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	10
4.1	Amostragem.....	10
4.2	Isolamento das leveduras.....	11
4.3	Identificação fenotípica preliminar das leveduras.....	11
4.3.1	Caracterização da morfologia colonial e celular dos isolados.....	11
4.3.2	Verificação da afinidade ascomicética.....	12
4.3.3	Microcultivo em ágar fubá.....	12
4.4	Armazenamento das culturas fúngicas.....	13
4.5	Caracterização fenotípica dos isolados.....	13
4.5.1	Tolerância ao etanol.....	13
4.5.2	Tolerância à glicose 50%.....	13
4.5.3	Termotolerância.....	13
4.6	Envio das cepas selecionadas para caracterização molecular.....	14
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	14
5.1	Amostragem.....	14
5.2	Isolamento das leveduras.....	15
5.3	Armazenamento das leveduras.....	16
5.4	Identificação fenotípica dos isolados.....	16
5.4.1	Caracterização da morfologia colonial e celular dos isolados.....	16
5.4.2	Verificação da afinidade ascomicética.....	20
5.4.3	Microcultivo em ágar fubá.....	21
5.5	Caracterização fenotípica dos isolados.....	21
5.5.1	Tolerância ao etanol.....	21
5.5.2	Tolerância à glicose 50%.....	22
5.5.3	Termotolerância.....	23
5.6	Envio das cepas selecionadas para caracterização molecular.....	23
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	24
	AGRADECIMENTOS.....	24
	REFERÊNCIAS.....	24
	ANEXO.....	26

## 1. INTRODUÇÃO

As leveduras constituem um grupo de microrganismos unicelulares pertencentes ao Reino Fungi que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por fissão binária. Possuem núcleo organizado com membrana nuclear (célula eucariótica), são aclorofiladas, a nutrição é heterotrófica através de absorção dos nutrientes, a parede celular é rígida, podem produzir células especializadas: os esporos. Mas, ao contrário dos fungos filamentosos, elas não formam corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998).

Atualmente em torno de 100 gêneros e 1500 espécies de leveduras estão descritas. No entanto, evidências correntes sugerem que essas espécies representam menos de 1% das que ocorrem na natureza (KURTZMAN & FELL, 1998; LATHAR et al., 2010). As leveduras são geralmente encontradas em folhas, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares, mas também podem ser isoladas do ar, do solo, de águas de lagos, rios e mares; da pele e do intestino de animais, incluindo associações com insetos. De fato, leveduras são comumente distribuídas ao longo da biosfera (WEBSTER & WEBER, 2007).

Leveduras fermentadoras selvagens têm sido isoladas de fontes naturais por décadas e são utilizadas em vários processos de fermentação. A importância comercial de cepas de leveduras da espécie *S. cerevisiae* tornou o organismo modelo de estudo e principal agente de processos fermentativos. Porém, à parte de *S. cerevisiae*, existe sempre procura por espécies de leveduras fermentativas selvagens/não tóxicas para sua exploração industrial, em fermentação, panificação, produção de agentes terapêuticos, etc. (LATHAR et al., 2010).

Steele & Stowers (1991) ressaltam que produtos oriundos de fungos e leveduras, pela sua ocorrência natural, apresentam a vantagem de serem mais facilmente aceitos e aprovados para comercialização que os microrganismos manipulados geneticamente. Alimentos fermentados são de grande importância mundialmente em função de que suas propriedades nutricionais e organolépticas são significativamente melhoradas em comparação com os

materiais crus usados para o seu preparo, e possuem um prazo de validade prolongado (SANTOS et al., 2012). No entanto, segundo Ramos et al. (2011), muitos destes produtos não receberam suficiente atenção científica.

Atualmente, sequências de DNA de cepas desconhecidas de leveduras têm sido comparadas com aquelas de cepas de referência autênticas para a identificação de espécies. É claro que métodos genético-moleculares precisam ser usados para a identificação de leveduras se quisermos obter uma estimativa adequada de sua biodiversidade. Ainda, métodos moleculares mais rápidos de identificação serão necessários se grandes números de isolados devem ser examinados (LANDELL, 2006; FUENTEFRIA, 2007).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Um dos maiores impedimentos para determinar as distribuições de leveduras em diferentes microambientes é a resolução taxonômica pobre disponibilizada pelos métodos de identificação correntemente usados. Frequentemente, espécie e gênero são definidos com base em características fenotípicas como morfologia celular e resposta a vários testes de crescimento. Nos últimos anos, no entanto, pesquisas com cruzamentos genéticos bem como comparações moleculares, tem demonstrado que muitos dos caracteres fenotípicos considerados como sendo taxonomicamente definitivos variam entre cepas da mesma espécie, como consequência, isolados mal caracterizados podem fazer com que novas espécies não sejam reconhecidas (FUENTEFRIA, 2007).

O mercado de bebidas fermentadas é expressivo, sendo desejável que as bebidas nacionais tenham características próprias das regiões onde são produzidas, conferindo um diferencial em relação a outras bebidas fermentadas disponíveis no comércio. Este diferencial é dado pela matéria-prima utilizada para a fermentação, pelo próprio processo fermentativo,

que pode ter características únicas em cada região, e pelo agente de fermentação utilizado (levedura).

Pelo fato de que leveduras são metabolicamente diversas, as mesmas são usadas em muitos processos industriais, como na produção de etanol (bebidas, industrial e combustível), vitaminas, ácidos orgânicos, carotenóides e enzimas. Um vasto número de leveduras catabolizam compostos benzênicos e podem possivelmente provarem-se valorosas para a limpeza de dejetos de indústrias químicas bem como para biossintetizarem novos compostos úteis para humanos. Avanços em técnicas moleculares tornaram leveduras também altamente atrativas para a síntese de proteínas farmacologicamente ativas e outros compostos (WEBSTER & WEBER, 2007).

Considerando a importância da análise da biodiversidade de leveduras em bebidas fermentadas para emprego comercial de cepas promissoras obtidas, o objetivo deste trabalho foi executar a análise da biodiversidade de leveduras encontradas em bebidas fermentadas consumidas na Região do Médio Amazonas, mais especificamente em Itacoatiara-AM e comunidades situadas na região próxima à cidade.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Prospectar leveduras a partir de bebidas fermentadas consumidas na Região do Médio Amazonas, mais especificamente em Itacoatiara-AM e comunidades situadas na região próxima a cidade e avaliação do potencial dos isolados para aplicações biotecnológicas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- isolar leveduras a partir de bebidas fermentadas consumidas na Região do Médio Amazonas;

- executar provas preliminares de identificação das leveduras isoladas por métodos fenotípicos convencionais e enviar isolados selecionados para caracterização e identificação por métodos moleculares;
- caracterizar a tolerância ao etanol, a altas concentrações de glicose e ao estresse térmico nos isolados obtidos e selecionar cepas com potencial biotecnológico.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Amostragem

As bebidas fermentadas foram coletadas em Itacoatiara-AM e em comunidades situadas próximas à sede deste município, no período entre agosto de 2011 e abril de 2012 (Tabela 1). Em cada coleta foram obtidos 250 mL de produto fermentado em recipiente estéril. As amostras foram transportadas ao laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) Itacoatiara – AM, para dar início ao processamento. A figura 1 mostra a Comunidade Aparecida do Correnteza Saterê Mawé - Itacoatiara-AM, um dos locais de coleta das bebidas fermentadas. A coleta da bebida fermentada tarubá nesta comunidade foi possível através de autorização do líder comunitário da aldeia, Tuxaua, Senhor Ademo Nascimento de Araújo. A autorização da FUNAI (Fundação Nacional do Índio) não foi buscada, em função de que, por informação de uma colaboradora do grupo com maior experiência na área, Profa. Rosane F. Schwan (UFLA), a autorização por parte da FUNAI não é expedida em tempo hábil para PIBIC; o grupo buscará esta autorização, no entanto, para propósitos futuros. Ainda, a autorização do líder comunitário da aldeia, segundo esta fonte, permite a publicação dos resultados.

Bebida Fermentada	Local da Coleta
aluá de abacaxi	Rua Antônio Serudo Martins Nº 1073, Santa Luzia – Itacoatiara-AM
aluá de genipapo	Feira do Produtor Rural – Itacoatiara-AM
Gengibirra	Rua Antônio Serudo Martins Nº 1073, Santa Luzia –Itacoatiara-AM
saracura-mirá	Comunidade Murucupuzinho Km 52 da AM-010-Itacoatiara-AM
Tarubá	Comunidade Aldeia Aparecida do Correnteza Saterê Mawé- Itacoatiara-AM

**Tabela 1 – Locais de coleta das bebidas fermentada**



**Figura 1 – Local de coleta da bebida fermentada tarubá**

## **4.2. Isolamento das leveduras**

Os meios de cultura utilizados para o processamento das amostras de bebidas fermentadas foram os meios: MEA – ágar extrato de malte (extrato de malte 20g/L, peptona 1,0g/L, glicose 20g/L, ágar 20g/L), acrescido de 0,1 g/L de cloranfenicol, para inibir o crescimento bacteriano, e WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar). Alíquotas das amostras das bebidas fermentadas foram diluídas em solução salina 0,85% em diluições decimais seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e 0,1mL destas diluições foram semeadas em placas de Petri por espalhamento com alça de Drigalsky. As placas foram então incubadas a 30°C e observadas para a ocorrência de colônias por até 7 dias. As colônias observadas na placa foram contadas e posteriormente repicadas para obtenção de cultivos isolados, assim a concentração de leveduras na amostra foi expressa por aproximação em unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, considerando o número médio de colônias contadas por placa e a diluição e volume de amostra semeados.

## **4.3. Identificação fenotípica preliminar das leveduras**

### **4.3.1. Caracterização da morfologia colonial e celular dos isolados**

As cepas de leveduras selecionadas de cada bebida fermentada foram caracterizadas preliminarmente em termos morfológicos, segundo Yarrow (1998). Nesta etapa, as cepas armazenadas foram semeadas para placas de Petri contendo o meio extrato de levedura-peptona-dextrose-YEPD (peptona 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L, glicose 20 g/L, ágar 20

g/L, pH=4,5) e incubadas à 30°C por 24 horas. Após, foi realizada a caracterização da morfologia colonial macroscópica com respeito à: cor, brilho, forma, margem, superfície, elevação e consistência.

Para a análise da morfologia celular, foram feitas lâminas à fresco com salina estéril 0,9%, a partir do crescimento de culturas em ágar YEPD com um dia de incubação a 30°C. A observação celular foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400 e 1000x. As características celulares observadas foram: forma da célula, presença ou não de pseudomicélio, tipo de reprodução vegetativa (brotamento e/ou fissão) e, caso seja por brotamento, o tipo de brotamento, presença de ascósporos e/ou de balistosporos e tipos de ascos, segundo Barnett et al. (2000) e Kurtzman & Fell (1998).

#### 4.3.2. Verificação da afinidade ascomicética

A produção de ascósporos pelas leveduras com afinidade ascomicética foi verificada utilizando como meio para induzir a sua produção o ágar acetato (0,4% acetato de sódio anidro, 2% ágar) e incubação a 30°C por até um mês. A pequena quantidade de carboidratos nesse meio de indução restringe o crescimento vegetativo e aumenta a produção de ascósporos. Após o tempo de incubação necessário, fez-se lâminas à fresco com salina estéril 0,9% e observou-se com aumento de 400 e 1000x quanta à presença ou ausência de conjugação, forma e número de ascósporos por asca e liberação ou não de esporos logo após a sua formação (LANDELL, 2006).

#### 4.3.3. Microcultivo em ágar fubá

O microcultivo em lâmina foi utilizado para a observação de pseudohifa ou de hifa verdadeira, utilizando o meio de cultura ágar fubá (1,7% fubá de milho, 0,5% ágar, 0,04% cloranfenicol, pH 4,0). Depois de sementeado o meio adicionou-se água destilada estéril sobre o algodão e incubou-se a placa por 7 dias a 30°C (BARNETT et al., 2000). Após, observou-se as lâminas em microscópio óptico em objetiva de 400x e 1000x.

#### **4.4. Armazenamento das culturas fúngicas**

Como meio de manutenção dos isolados obtidos, foi utilizado o meio YEPD (extrato de levedura-peptona-dextrose). Os isolados puros foram semeados em tubos de ensaio contendo o meio sólido inclinado, conservados em geladeira a 4-8°C e repicados bimestralmente. Ainda, os isolados foram transferidos com alça de platina para tubos com água destilada estéril e foram mantidos igualmente a 4-8°C (ODDS, 1991).

#### **4.5. Caracterização fenotípica dos isolados**

##### **4.5.1. Tolerância ao etanol**

Os isolados foram examinados para sua tolerância a alto conteúdo de álcool cultivando-os em placas com ágar YEPD contendo 15% e 30% de álcool, incubados a 30°C. As cepas que conseguiram crescer em placas com álcool foram ainda testadas por cultura em caldo YEPD contendo 15% de álcool sob agitação e comparadas em termos de crescimento a uma  $OD_{600nm}$  em espectrofotômetro (LEE et al., 2011).

##### **4.5.2. Tolerância à glicose 50%**

Para testar a capacidade de cepas selvagens de leveduras de crescer em meio com alta concentração de glicose, os isolados foram cultivados em placas contendo ágar YEPD modificado (acrescido de glicose 50%). Para controle positivo foi utilizado o meio com glicose 2%. As cepas que conseguiram crescer em placas foram ainda testadas em caldo YEPD contendo glicose 50%, sob agitação e comparadas em termos de crescimento a uma  $OD_{600nm}$  em espectrofotômetro (LEE et al., 2011).

##### **4.5.3. Termotolerância**

Para caracterização da resposta ao estresse térmico, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo ágar YMA (Yeast Extract Malt Agar) e incubados na temperatura de 40°C e 60°C. Os isolados que conseguirem crescer em placas serão ainda testados em caldo

YMA, sendo a densidade óptica monitorada a 600nm em espectrofotômetro (LEE et al., 2011).

#### 4.6. Envio das cepas selecionadas para caracterização molecular

Os isolados que apresentaram características morfológicas coloniais e celulares diferenciadas foram selecionados e enviados em tubos estéreis contendo ágar YEPD para a Profa. Dra. Patrícia Valente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS para análise inicial por meio de fingerprinting com pelo menos dois dos oligonucleotídeos iniciadores M13, (GTG)<sub>5</sub> e/ou (GACA)<sub>4</sub>.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Amostragem

Das bebidas propostas inicialmente no projeto para análise quanto à presença de leveduras, (3) três bebidas não foram coletadas até o momento da redação deste relatório final, sendo elas: caxiri (bebida fermentada à base de mandioca ou batata); sem produção pela comunidade até o momento; cauim (bebida fermentada à base de mandioca, arroz, milho e frutas); que segundo informações iniciais não é mais produzida na região e por fim, a bebida tiquira, excluída da proposta inicial por tratar-se de bebida destilada, cuja microbiota de leveduras é restrita e assim, os resultados não acrescentariam para uma publicação posterior.

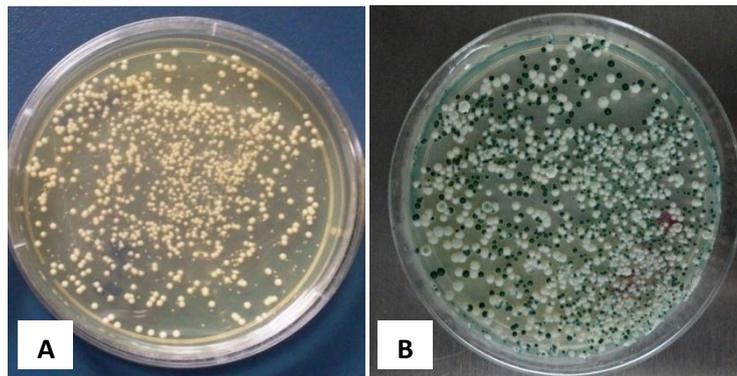
A tabela 2 mostra o total de leveduras isoladas das 5 bebidas fermentadas analisadas.

BEBIDA FERMENTADA	ISOLADOS (%)
aluá de abacaxi (bebida fermentada à base de abacaxi)	10 (23,2%)
gingibirra (bebida fermentada do gengibre)	10 (23,2%)
aluá de genipapo (bebida fermentada à base de jenipapo)	3 (6,9%)
saracura-mirá (bebida fermentada à base de raiz de saracura)	13 (30,2%)
tarubá (bebida fermentada à base de mandioca)	7 (16,2%)
<b>TOTAL</b>	<b>43 (100%)</b>

**Tabela 2 – Total de isolados obtidos de cada bebida fermentada**

## 5.2. Isolamento das leveduras

Considerando que a associação de mais de um meio permite uma caracterização mais detalhada da presença da população de leveduras pela diferente morfologia das colônias (ANDREWS, 1992), optou-se por utilizar além do meio WLN, o meio MEA para o isolamento preliminar de leveduras. Entre os dois meios (MEA e WLN) utilizados para o processamento das bebidas, o meio WLN foi o que permitiu melhor avaliar as populações de leveduras presentes nas bebidas fermentadas. Segundo Schuller (1998), o meio WLN permite avaliar com uma boa aproximação as populações de leveduras presentes ao longo do processo de fermentação, sendo específico para a enumeração e identificação de leveduras a partir de produtos fermentados (figura 2).



**Figura 2- População de leveduras em (A) meio MEA e em (B) meio WLN**

Ainda, o procedimento de isolamento das leveduras, realizado em triplicata, mostrou que as diluições  $10^{-3}$  em meio MEA foram as que apresentaram melhores resultados em placas (figura 3), possibilitando a contagem de UFC entre 30 e 300 por placa, de acordo com o recomendado (KURTZMANN & FELL, 1998). Em contrapartida, quando semeado em meio WLN a diluição  $10^{-3}$  apresentou colônias consideradas incontáveis, sendo necessária diluição até  $10^{-4}$  para procedência dos isolamentos. Provavelmente isto ocorre em função da

capacidade de recuperação de leveduras a partir de bebidas fermentadas serem melhor no meio WLN (ANDREWS, 1992).



**Figura 3 – Unidades formadoras de colônias (UFC) em placas contendo o meio MEA com diluições decimais seriadas -  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , respectivamente, obtidas a partir da semeadura das amostras de bebidas fermentadas.**

### **5.3. Armazenamento das leveduras**

A partir de observações e informação pessoal (Profa. Patrícia Valente – UFRGS) da relativa ineficiência do meio GYMP no armazenamento de culturas puras de leveduras, optou-se por usar tubos contendo ágar YEPD inclinados e mantidos em geladeira (4-8°C). Os tubos são repicados bimestralmente e têm mostrado bons resultados na preservação das cepas. Além disso, o método de manter culturas fúngicas em água destilada estéril por períodos estendidos de tempo é simples, barato e confiável (MCGINNIS, 1974).

### **5.4. Identificação fenotípica preliminar dos isolados**

#### **5.4.1. Caracterização da morfologia colonial e celular**

Um dos maiores impedimentos para determinar as distribuições de leveduras em diferentes microambientes é a resolução taxonômica pobre disponibilizada pelos métodos de identificação correntemente usados. Nos últimos anos, pesquisas com cruzamentos genéticos bem como comparações moleculares, tem demonstrado que muitos dos caracteres fenotípicos considerados como sendo taxonomicamente definitivos variam entre cepas da mesma espécie (FUENTEFRÍA, 2007). Dessa forma, considerando que caracteres morfológicos apresentam pouco poder discriminatório no caso de leveduras e que não existe uma uniformidade na

literatura de análise por cladogramas, a similaridade das cepas somente poderia ser avaliada com base em dados moleculares. O grupo pretende obter estes resultados associados ao Projeto Universal CNPq.

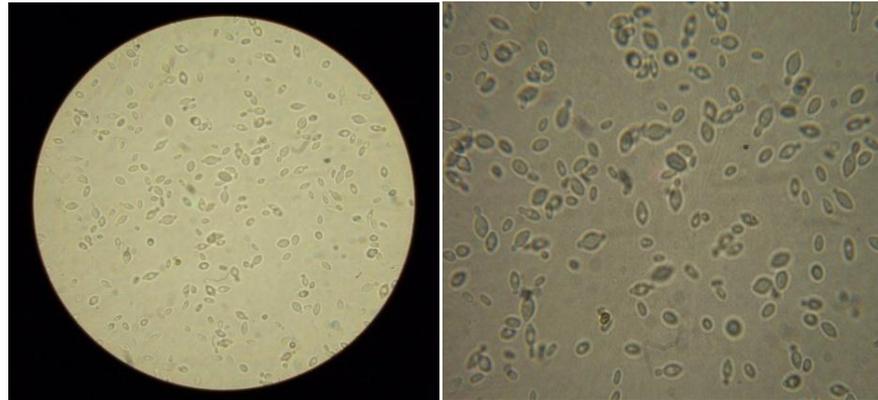
A identificação taxonômica preliminar das cepas de leveduras se deu utilizando características morfológicas coloniais segundo Yarrow (1998). A morfologia colonial das leveduras seguiu praticamente o mesmo padrão. Das 43 leveduras isoladas, 42 (97,67%) apresentaram margem regular, 30 (69,76) apresentaram superfície lisa e 20 (46,51%) apresentaram elevação do tipo côncava. Isto possivelmente ocorre em função da população de leveduras estudadas terem sido provenientes de bebidas fermentadas prontas para o consumo, resultando em menos variação nas características macro e micromorfológicas. Acredita-se que certos gêneros e espécies de leveduras sejam predominantes na fase final do processo de fermentação (MORRISSEY et al., 2004), ou ainda, que as características morfológicas e fisiológicas estão fortemente influenciadas pelas condições de cultivo (RATÓN, 2004).

MORFOLOGIA COLONIAL							
CEPA	COR	BRILHO	FORMA	MARGEM	SUPERFÍCIE	ELEVAÇÃO	CONSISTÊNCIA
<b>Bebida Fermentada-aluá de abacaxi</b>							
1221	Creme	Opaca	Oval	Regular	Rugosa	Côncava	Membranosa
1311	Creme	Opaca	Oval	Regular	Rugosa	Côncava	Membranosa
1321	Creme	Opaca	Oval	Regular	Rugosa	Côncava	Membranosa
1331	Creme	Opaca	Oval	Regular	Rugosa	Côncava	Membranosa
w-1311	Bege	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Côncava	Cremosa
w-1312	Bege	Opaca	Oval	Regular	Lisa	Côncava	Cremosa
w-1313	Creme	Brilho	Oval	Regular	Lisa	Côncava	Cremosa
w-1314	Branca	Opaca	Circular	Regular	Rugosa	Côncava	Seca
w-1315	Branca	Opaca	Circular	Regular	Rugosa	Côncava	Seca
w-1316	Branca	Opaca	Circular	Regular	Rugosa	Côncava	Membranosa
<b>Bebida Fermentada-gengibirra</b>							
2211	Creme	Opaca	Circular	Regular	Rugosa	Côncava	Membranosa
2311	Creme	Opaca	Circular	Regular	Rugosa	Côncava	Membranosa
2321	Creme	Opaca	Circular	Regular	Rugosa	Côncava	Membranosa
2331	Creme	Opaca	Circular	Regular	Rugosa	Côncava	Membranosa
w-2411	Creme	Brilho	Circular	Regular	Lisa	Plana	Cremosa
w-2412	Creme	Brilho	Oval	Regular	Lisa	Plana	Cremosa
w-2113	Creme	Opaca	Oval	C/ Raiz	Lisa	Plana	Cremosa
w-2414	Branca	Opaca	Oval	Regular	Lisa	Elevada	Cremosa
w-2415	Creme	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Elevada	Cremosa

w-2416	Bege	Brilho	Oval	Regular	Lisa	Plana	Cremosa
<b>Bebida Fermentada - saracura-mirá</b>							
3111	Bege	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Plana	Membranosa
3112	Branca	Opaca	Circular	Regular	Rugosa	Plana	Seca
3115	Bege	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Plana	Cremosa
3116	Branca	Brilhosa	Circular	Regular	Lisa	Plana	Cremosa
3117	Branca	Opaca	Oval	Regular	Lisa	Plana	Seca
3118	Branca	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Plana	Seca
3119	Branca	Opaca	Oval	Regular	Rugosa	Côncava	Seca
3110	Branca	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Plana	Seca
3321	Branca	Opaca	Esférica	Regular	Lisa	Plana	Seca
3211	Branca	Opaca	Oval	Regular	Lisa	Côncava	Seca
3221	Creme	Opaca	Esférica	Regular	Lisa	Plana	Seca
3231	Branca	Opaca	Esférica	Regular	Lisa	Côncava	Seca
3232	Branca	Opaca	Oval	Regular	Lisa	Côncava	Seca
<b>Bebida Fermentada-aluá de genipapo</b>							
4311	Branca	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Reta	Cremosa
4321	Branca	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Côncava	Seca
4322	Branca	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Côncava	Seca
<b>Bebida Fermentada-tarubá</b>							
w-5511	Bege	Brilho	Oval	Regular	Lisa	Elevada	Cremosa
w-5513	Creme	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Plana	Seca
w-5516	Creme	Opaca	Oval	Regular	Lisa	Elevada	Cremosa
w-5521	Bege	Brilho	Oval	Regular	Lisa	Elevada	Cremosa
5412	Creme	Opaca	Oval	Regular	Lisa	Plana	Esfarelada
5421	Branca	Brilho	Oval	Regular	Lisa	Elevada	Cremosa
5422	Creme	Opaca	Circular	Regular	Lisa	Plana	Cremosa

**Tabela 3 – Caracterização da morfologia colonial**

Quanto à morfologia celular (figura 4) as características observadas também variaram pouco. Das 43 leveduras isoladas 39 (90,69%) apresentaram reprodução por brotamento do tipo unipolar. A forma celular predominante foi elipsoidal, do total de 43 isolados, 21 apresentaram essa forma celular (48,83%).



**Figura 4- Observação da morfologia celular em microscópio óptico em 400x.**

MORFOLOGIA CELULAR				
CEPA	FORMA CELULAR	TIPO DE REPRODUÇÃO ASSEXUADA	PSEUDOHIFA	ASCOSPOROS
<b>Bebida Fermentada-aluá de abacaxi</b>				
1221	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
1311	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
1321	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
1331	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-1311	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-1312	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-1313	Apiculada	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-1314	Elongada	Brotamento bipolar	Ausente	Presente
w-1315	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-1316	Cilíndrica	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
<b>Bebida Fermentada-gengibirra</b>				
2211	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
2311	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
2321	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
2331	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-2411	Apiculada	Brotamento unipolar	Ausente	Ausente
w-2412	Apiculada	Brotamento unipolar	Ausente	Ausente
w-2113	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Presente	Presente
w-2414	Globosa	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-2415	Globosa	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-2416	Apiculada	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
<b>Bebida Fermentada - saracura-mirá</b>				
3111	Elipsoidal	Brotamento bipolar	Ausente	Presente
3112	Elipsoidal	Brotamento multipolar	Ausente	Presente
3115	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
3116	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Ausente
3117	Elongada	Brotamento unipolar	Presente	Presente
3118	Globosa	Brotamento unipolar	Ausente	Ausente

3119	Elongada	Brotamento multipolar	Ausente	Presente
3110	Ovoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
3321	Ovoidal	Brotamento unipolar	Presente	Presente
3211	Ovoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
3221	Ovoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
3231	Globosa	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
3232	Ovoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
<b>Bebida Fermentada-alúva de genipapo</b>				
4311	Ovoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
4321	Ovoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
4322	Ovoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
<b>Bebida Fermentada-tarubá</b>				
w-5511	Globosa	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-5513	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-5516	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
w-5521	Globosa	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
5412	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
5421	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente
5422	Elipsoidal	Brotamento unipolar	Ausente	Presente

**Tabela 4 – Caracterização da morfologia celular**

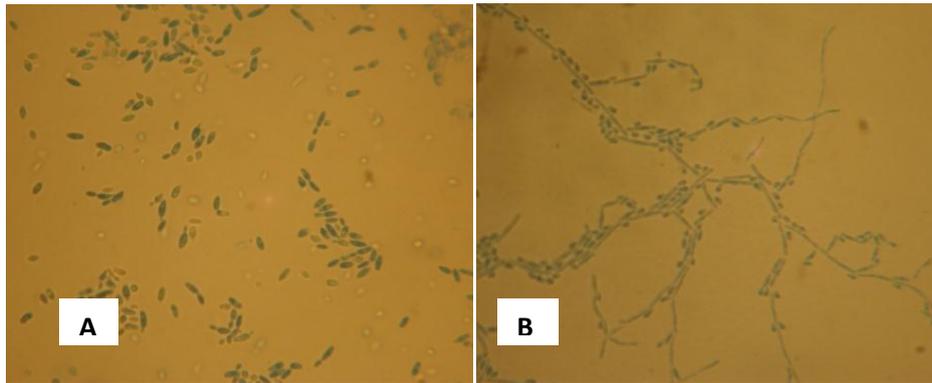
#### 5.4.2. Verificação da afinidade ascomicética

A visualização dos ascósporos em microscopia óptica direta com solução salina 0,9% foi de difícil visualização. Em razão disso, optou-se por empregar uma técnica de coloração de esporos, denominado método de Wirtz, onde os esporos coram-se de verde-azulado e as células vegetativas de vermelho (FUENTEFRÍA, 2007). Para a realização dessa metodologia, cobriu-se a lâmina com uma solução aquosa de verde de malaquita 5%, colocando a lâmina sobre uma chapa aquecedora aquecendo-a até emissão de vapores por 5 minutos. Após, lavou-se a lâmina suavemente com água e posteriormente foi realizada a contra coloração com uma solução aquosa de safranina 2,5% por 30 segundos. Após lavagem e secagem da lâmina, tentou-se observar em microscopia óptica a presença ou ausência de conjugação, forma e número de ascósporos por asca e liberação ou não de esporos logo após a sua formação (LANDELL, 2006). No entanto, mesmo adotando esta metodologia, as observações

micromorfológicas continuaram sendo de difícil visualização, não sendo possível observar detalhes.

#### 5.4.3. Microcultivo em ágar fubá

O resultado do microcultivo (figura 5) mostrou que 55,81% dos isolados testados apresentaram a morfologia de blastosporos isolados, sem ocorrência de pseudohifa ou de hifa verdadeira na análise microscópica e 44,18% apresentaram presença de pseudohifa.



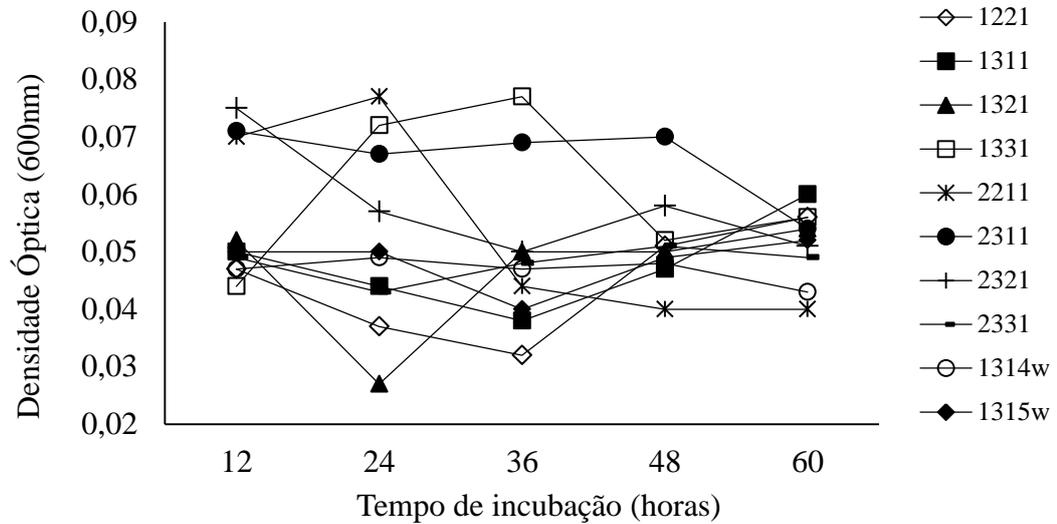
**Figura 5 – Observação microscópica de pseudohifas. (A) Ausência e (B) presença de pseudohifas em lâminas.**

### 5.5. Caracterização fenotípica dos isolados

#### 5.5.1. Tolerância ao etanol

Dos 43 isolados submetidos à triagem em placas, 10 (23,25%) cresceram em placas contendo 15% de álcool e apenas 1 (2,32%) tolerou o meio contendo 30% de álcool. As leveduras com tolerância ao álcool em placas foram ainda testadas por cultura em caldo YEPD contendo 15% de álcool, em agitador orbital a 150 rpm a temperatura ambiente. As leveduras foram comparadas a cada 12 horas em termos de crescimento a uma  $OD_{600nm}$  em espectrofotômetro (LEE et al., 2011).

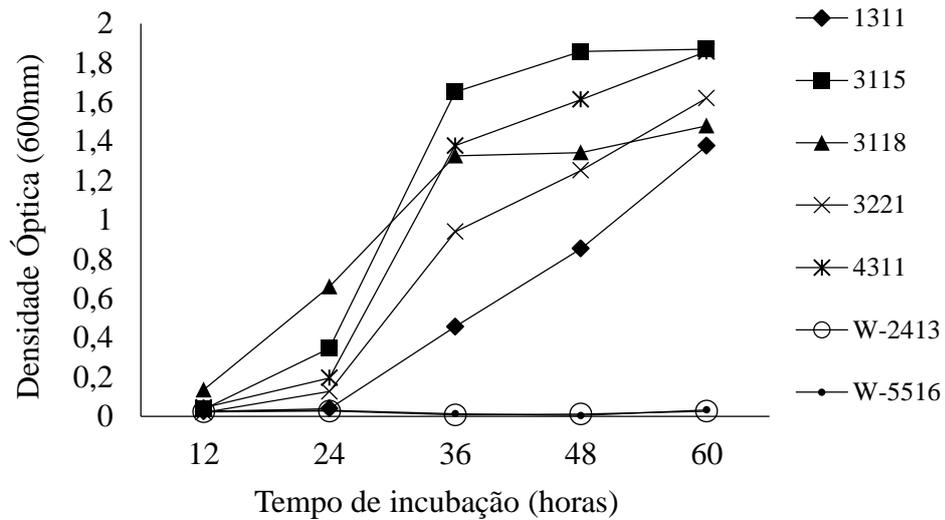
A figura 6 apresenta a curva de crescimento obtida dos isolados quando testados em caldo contendo 15% de etanol. Os resultados iniciais demonstram que dentre os 10 isolados testados, os mais tolerantes foram os provenientes da bebida que aparentava conter um maior teor de álcool ao fim da fermentação, aluá de abacaxi.



**Figura 6 - Curva de crescimento de isolados em meio contendo 15% de etanol**

### 5.5.2. Tolerância à glicose 50%

Um total de 22 (51,16%) isolados de leveduras cresceu em placas contendo YEPD 50% de glicose após 72 horas de incubação. Desses, sete (7) isolados, considerando características morfológicas coloniais e/ou celulares diferenciadas e ainda resultados parciais moleculares (PCR *fingerprinting*), foram selecionados e testados em caldo YEPD contendo glicose 50%, sob agitação a 150 rpm. A cada 12 horas os isolados foram comparados em termos de crescimento a uma OD<sub>600nm</sub> em espectrofotômetro (LEE et al., 2011). Neste teste, o uso da escala de Wickerham (BARNETT et al., 2000; LANDELL, 2006) proposto inicialmente, foi substituído pela leitura espectrofotométrica para a obtenção de resultados mais precisos. O isolado que apresentou maior tolerância em glicose 50% foi o 3115, proveniente da bebida fermentada saracura-mirá, bebida fermentada à base de raiz de saracura. O meio contendo altas concentrações de glicose não favoreceu o crescimento dos isolados (w-2413) e (w-5516).



**Figura 7- Curva de crescimento de isolados em meio contendo 50% de glicose**

### 5.5.3. Termotolerância

Dos 43 isolados testados, 38 (88,37%) tiveram crescimento ativo à temperatura de 40 °C. Em contrapartida, nenhum dos isolados obtidos e testados apresentou crescimento visível em placa incubada à 60°C. Um adicional para testar a resposta ao estresse térmico seria testar os isolados tolerantes em diferentes temperaturas entre 40°C e 60°C em caldo YMA sob agitação, sendo a densidade óptica monitorada a 600nm em espectrofotômetro (LEE et al., 2011). No entanto, não foi possível finalizar o teste em função de que o agitador orbital foi danificado, impossibilitando seu uso no momento.

### 5.6. Caracterização molecular dos isolados enviados

Um total de 39 isolados de leveduras, que apresentaram características morfológicas coloniais e celulares diferenciadas foram selecionadas e enviadas para iniciar a análise por meio de *fingerprinting*. A extração do DNA dos isolados foi realizada com sucesso. Entretanto, a caracterização molecular completa dos isolados em Porto Alegre, não poderá ser concluída em razão de dificuldades encontradas para acertar a metodologia, desistência e

demora na substituição da bolsista responsável na UFRGS pela parte molecular, permitindo assim, a apresentação somente de resultados preliminares, mostrados no anexo 1.

## 6. CONCLUSÃO

Isolaram-se diferentes morfotipos de leveduras a partir de bebidas fermentadas produzidas e consumidas em Itacoatiara-AM e em comunidades ribeirinhas, próximas a cidade. Espera-se finalizar a identificação molecular a partir do sequenciamento do DNA, selecionar cepas com potencial para uso na produção de bebidas fermentadas, assim como, em projetos posteriores, fazer uma análise mais detalhada dos isolados obtidos, visando aplicações biotecnológicas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Maxwell Adriano Abegg a minha gratidão pela orientação e oportunidade concedida no trabalho, à Profa. Dra. Patrícia Valente pelo auxílio na caracterização molecular dos isolados e discussão das metodologias e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

ANDREWS, S. Comparative study of WL Nutrient Agar with DRBC and OGY for yeast enumeration in foods. *In: Modern methods in food mycology*, pp. 61-67. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier, 1992.

BARNETT, J.A, et al. *Yeasts, Characteristics and Identification*. 4<sup>th</sup> Ed. Cambridge University Press, 2000. 811p.

FUENTEFRÍA, A.M. Bioprospeção de leveduras *killer* com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. 144p.

KURTZMAN, C.P & FELL, J.W. The yeasts, a taxonomic study. 4<sup>th</sup> Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. 1088 p.

LANDELL, M.F. Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do Parque de Itapuã – Viamão/RS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2006. 136p.

LATHAR, P.K; SHARMA, A; THAKUR, I. Isolation and random amplified polymorphic DNA analysis of wild yeast species from 17 different fruits. Journal of Yeast and Fungal Research, vol.1, n.8, p.146-151, 2010.

LEE, Y.J.; CHOI, Y.R.; LEE, S.Y.; PARK, J.T.; SHIM, J.H.; PARK K.H.; KIM, J.W. Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. Microbiology, vol.39, n.1, p.33-39, 2011.

McGINNIS, M.R; PADHYE, A.A; AJELLO.L. Storage of Stock Cultures of Filamentous Fungi, Yeasts, and Some Aerobic Actinomycetes in Sterile Distilled Water. Applied Microbiology, vol. 28, N.2, p. 218-222, 1974.

MORRISSEY, W.F, et al. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. Journal of Applied Microbiology, p.647-655, 2004.

ODDS, F.C. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. Medical Mycology, 29(6): 413-415, 1991.

RAMOS, C.L.; de ALMEIDA, E.G.; FREIRE, A.L.; SCHWAN, R.F. Diversity of bacteria and yeast in the naturally fermented cotton seed and rice beverage produced by Brazilian Amerindians. Food Microbiology, 28: 1380-1386, 2011.

RATÓN, T.O. Métodos moleculares de identificação de leveduras de interesse biotecnológico. Revista Iberoamericana de Micología, v. 21, p. 15-19, 2004.

SANTOS, C.C.A. do A.; de ALMEIDA, E.G.; de MELO, G.V.P.; SCHWAN, R.F. Microbiological and physicochemical characterization of caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Juruna people of Brazil. Int. Journal of Food Microbiol., accepted manuscript. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.010, 2012.

SCHULLER, D. E. Desenvolvimento de um meio de cultura selectivo/diferencial para a levedurade contaminação alimentar *zygosaccharomyces bailii*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, 1998.

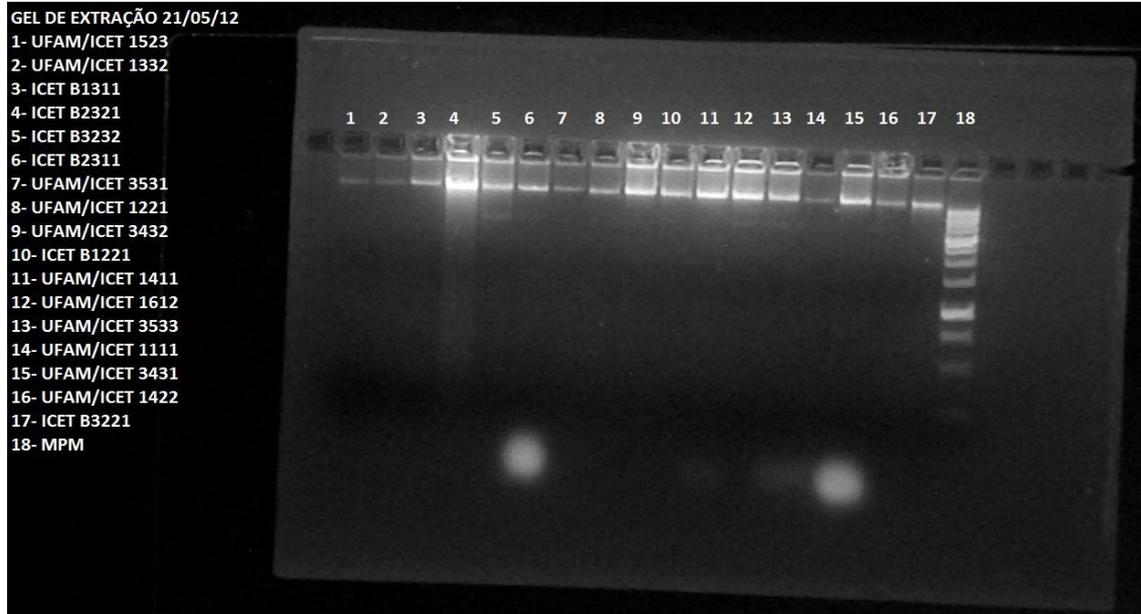
STEELE, D.B; STOWERS, M.K. Techniques for selection of industrially important microorganisms. Annual Review of Microbiology, vol.45, p.89-106, 1991.

WEBSTER, J; WEBER, R.W.S. Introduction to fungi. Third edition. Cambridge University Press. Cambridge, UK, 2007.

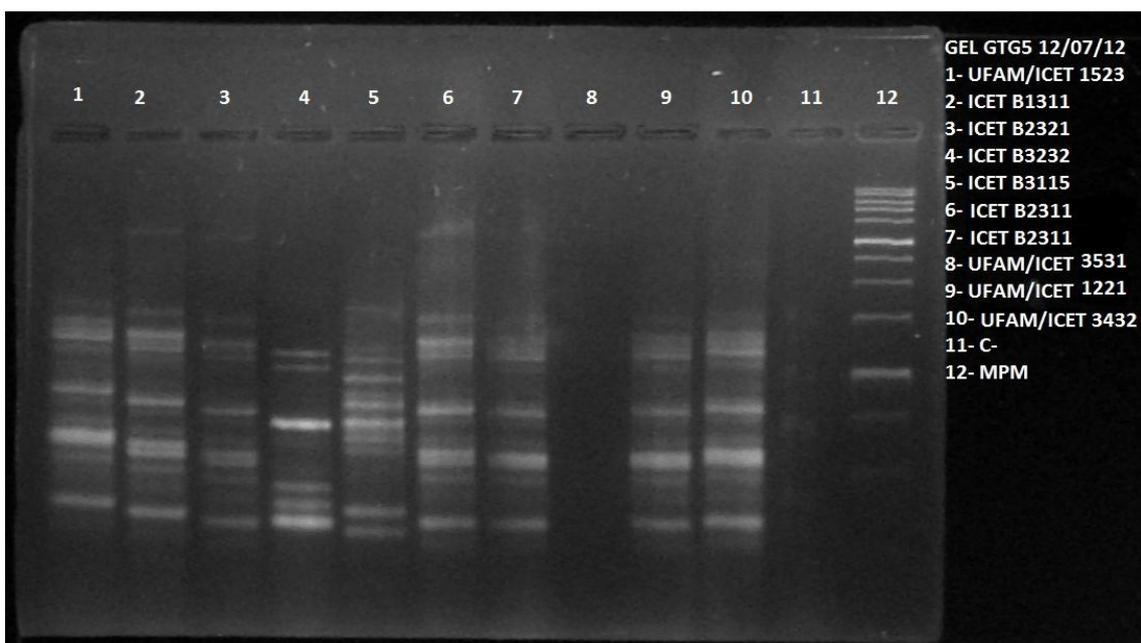
YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Em The Yeasts, a Taxonomic Study, 4<sup>a</sup> Edição. pp. 77-100. Editado por C.P. KURTZMAN & J. W. FELL. Amsterdam: Elsevier, 1998.

## ANEXO I - Resultados preliminares da caracterização molecular (PCR *fingerprinting*) de alguns isolados

### Extração do DNA das leveduras



### 1- Gel obtido com o iniciador GTG5



## 2- Gel obtido com o iniciador GTG5

