

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

SELEÇÃO DE LEVEDURAS HÁBEIS EM METABOLIZAR HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE MADEIRA ASSOCIADAS A BESOUROS XILÓFAGOS

Bolsista: Verena Makarem Soares, FAPEAM.

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

SELEÇÃO DE LEVEDURAS HÁBEIS EM METABOLIZAR HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE MADEIRA ASSOCIADAS A BESOUROS XILÓFAGOS

RELATÓRIO PARCIAL

PIB-B/0014/2012

Bolsista: Verena Makarem Soares, FAPEAM.

Orientador: Prof. Msc. Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos

MANAUS

2013

Sumário

LISTA DE FIGURAS	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
CONCLUSÕES.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva padrão para cálculo da concentração de açúcares redutores totais (ART).6
Figura 2: Exemplar de <i>Veturius transversus</i> ,9
Figura 3: Intestino de <i>V. transversus</i> dissecado.9
Figura 4: Tabela de qualidade das sequências, evidenciando que somente uma destas apresentou qualidade para identificação taxonômica.10

INTRODUÇÃO

Leveduras são microrganismos integrantes do reino Fungi, distribuídos entre os filos Ascomycota, Basidiomycota e no filo-forma Deuteromycota (Alexopoulos et al., 1996). Caracterizam-se por serem predominantemente unicelulares, realizando reprodução assexuada por brotamento, com ocorrência de dimorfismo em algumas espécies. Alguns fungos filamentosos, quando submetidos à escassez de O₂ e abundância de CO₂, podem crescer com forma leveduróide. Apresentam hábito cosmopolita, sendo capazes de colonizar os mais diversos habitats, crescendo em condição comensal, parasita ou inquilina de outros organismos como plantas e animais. Várias espécies apresentam aplicações industriais, sendo a maioria destas pertencentes ao subfilo Saccharomycotina (Stajich et al., 2009).

Entre as aplicações biotecnológicas de leveduras, a fermentação alcoólica é a mais disseminada, sendo empregada pela humanidade desde os tempos mais remotos, na panificação e produção de cerveja (Demain e Solomon, 1981). Estes processos baseiam-se na utilização de hexoses pela via glicolítica para a produção de etanol e dióxido de carbono. Face ao limitado número de espécies capazes de fermentar os açúcares resultantes da hidrólise de hemicelulose (Hahn-Hägerdal et al., 2007), a busca por novas espécies/linhagens microbianas selvagens dotadas desta habilidade é um importante passo.

Besouros são animais da ordem Coleoptera (Insecta, Artropoda, Metazoa). Segundo Lelej e Storozhenko (2010), esta é a ordem mais diversa dentro da classe Insectae, composta por pelo menos 400.000 espécies atualmente descritas. A associação

endossimbionte entre besouros e microrganismos foi decisiva na evolução destes, sendo indispensável para manutenção da vida. Estes invertebrados contam com os microrganismos para várias funções metabólicas, incluindo síntese de aminoácidos, vitaminas, lipídios, esteroides, feromônios, degradação de polímeros nutricionais e detoxificação de compostos inibitórios (Suh et al., 2003). Breznak (1982) afirmou que o estudo de microrganismos associados a insetos xilófagos forneceria novas ferramentas na bioconversão anaeróbia de madeira a combustíveis e outros produtos químicos de valor agregado.

Mais recentemente, Blackwell et al. (2004) mencionaram que a associação entre besouros xilófagos e leveduras fermentadoras de D-xilose implica em benefício aos besouros no que diz respeito ao sucesso na assimilação dos nutrientes presentes na biomassa lignocelulósica. Segundo Suh et al. (2005), o intestino de besouros xilófagos é uma fonte hiperdiversa de novas espécies de leveduras. Em se tratando de espécies amazônicas, tal diversidade segue inexplorada.

MATERIAL E MÉTODOS

O hidrolisado hemicelulósico foi obtido a partir de bagaço de cana de açúcar coletado na Usina Jayoro, localizada no município de Presidente Figueiredo-AM. A hidrólise ácida foi conduzida conforme a metodologia descrita por Silva et al. (2011), com modificações. Os resíduos foram triturados (partícula <2,0 mm) e desidratados em estufa até obtenção de peso constante. Em seguida, o mesmo foi imerso em solução de ácido sulfúrico (3% v/v), com razão sólido:líquido de 1:5, isto é, 100 g de resíduo para

500 mL de ácido sulfúrico. A mistura permaneceu por 24 h a temperatura ambiente, sendo autoclavada em seguida a 121 °C por 40 minutos. O material foi prensado para separação das fases sólida e líquida, sendo esta última neutralizada pela adição de hidróxido de cálcio e, em seguida, filtrada a vácuo.

A concentração de açúcares redutores totais (ART) do hidrolisado hemicelulósico foi determinada pelo método Ácido 3, 5 - Dinitro-Salicílico (DNS), conforme descrito por Zhao et al.(2008). Foram adicionados 200 µL da amostra (diluída 100x) a 300 µL de DNS, submetendo à fervura por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 1600 µL de água destilada. A absorbância da solução foi analisada em espectrofotômetro a 540 nm, determinando-se a concentração de ART (g/L) conforme curva padrão (figura 1).

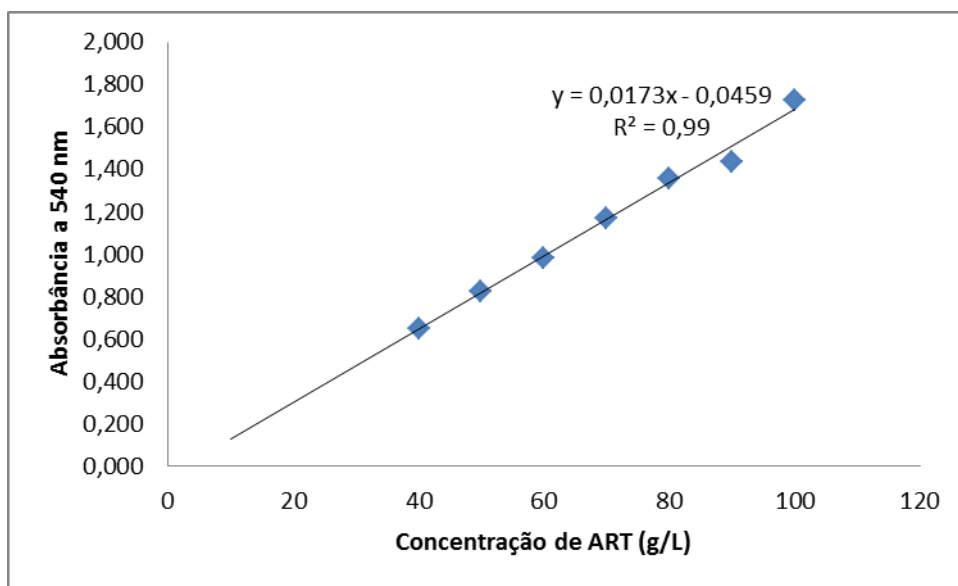


Figura 1: Curva padrão para cálculo da concentração de açúcares redutores totais (ART).

Foram coletados 15 besouros no campus da UFAM, município de Manaus, em galerias produzidas por estes nas regiões de cortex, e subcortex de troncos de árvores

em decomposição, conforme metodologia descrita por Bührnheim e Aguiar (1991). Um exemplar foi preservado e identificado por um especialista.

Para isolamento das leveduras, foi usada a metodologia descrita por Matos (2010). O tubo digestório dos besouros foi dissecado, fragmentado e inoculado em meio de isolamento composto de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (ART = 10 g/L) e Yeast Nitrogen Base (YNB, 6,7 g/L), mantido a 28 °C por 24 horas. Uma alíquota de 100 µL foi inoculada em placas de Petri contendo meio de isolamento adicionado de Agar (15 g/L), incubados a 28 °C por até 72 horas.

As placas foram avaliadas a cada 24 horas para reconhecimento das colônias de leveduras. As mesmas foram repicadas para placas contendo Agar Sabouraud (peptona 10 g/L; glicose 40 g/L, pH 5,0), incubadas a 28 °C por 72 horas. Obteve-se a cultura pura e o isolado está sendo mantido preservado pelo método Castellani.

Para determinação da habilidade dos isolados em assimilar fontes de carbono e nitrogênio (perfil bioquímico), foi utilizado o kit ID 32 C da Biomerieux ®. As leveduras foram suspensas em solução aquosa de NaCl 0,9% esterilizada a turbidez nível 2 na escala MacFarland. Em seguida, 250 µL desta solução foram inoculados no meio API C, inoculando-se 135µL deste meio em cada poço do kit, conforme figura 2. O perfil bioquímico das leveduras foi definido pela observação do crescimento em cada poço após 48h. Os resultados foram plotados no aplicativo ApiWeb® (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>) para identificação taxonômica por similaridade com o banco de dados da Biomerieux ®.

A identificação taxonômica por métodos moleculares foi executada usando a sequência da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA genômico. O DNA foi amplificado utilizando os primer's ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3') e

ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), com 25µL de volume final de reação composta de MgCl₂ 50 mM (1,25 µL), tampão 10x (2,5 µL), DNTP's (2,5 µL), primer's (1,0 µL de cada), Taq Polimerase (0,3 µL), DNA (~25 ng) e água ultrapura filtrada (qsp).

O termociclo utilizado foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos com desnaturação a 94 °C (40 s), anelamento dos primer's a 58 °C (1 min) e elongação a 72 °C (2 min). A seguir, a etapa de elongação final a 72 °C por 2 minutos e interrupção da reação mantendo o sistema a 4 °C e posterior preservação por congelamento.

Para obtenção das sequências genômicas, os produtos de amplificação foram submetidos a reação de sequenciamento por terminação de cadeia utilizando o kit BigDye (Applied Biosciences®). As sequências obtidas foram submetidas a alinhamento com as sequências depositadas no banco de dados do *GenBank* utilizando a ferramenta BLAST, no portal do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 15 besouros coletados foram identificados pela Profa. Dra. Nair Otaviano Aguiar, curadora da coleção entomológica da UFAM, como exemplares da espécie *Veturius transversus* (Insecta, Coleoptera, Passalidae) (figura 3). Cinco exemplares tiveram os tubos digestórios dissecados (figura 4) e usados para obtenção de colônias de leveduras. Dois exemplares se encontram preservados intactos em etanol a 70%,

depositados no acervo da coleção entomológica Prof. Paulo Bührnheim (UFAM). Os demais tiveram o tubo digestório preservado a -80°C para serem utilizados em projetos posteriores.



Figura 2: Exemplo de *Veturius transversus*, tamanho aproximado: 5 cm.



Figura 4: Intestino de *V. transversus* dissecado.

Um total de vinte colônias de leveduras foram isoladas e mantidas preservadas pelo método Castellani. A identificação taxonômica destas é descrita na tabela 1.

Tabela 1: Espécies identificadas segundo perfil bioquímico, considerando similaridade com banco de dados ApiWeb ® (Biomerieux).

Identificação	Número de colônias isoladas	Identidade / similaridade (%)
<i>Cryptococcus humicola</i>	4	98,4% / 99,2% / 99,5% / 99,7%
<i>Cryptococcus curvatus</i>	1	-
<i>Debaryomyces etchellsii</i>	1	79,1%
<i>Candida membranifaciens</i>	2	-
<i>Candida parapsilosis</i>	2	83,1%
<i>Candida tropicalis</i>	2	53,6%
<i>Candida intermedia</i>	1	45,9%
<i>Candida famata</i>	1	-
<i>Candida sake</i>	3	98,4% / 99% / 99,5%
<i>Geotrichum capitatum</i>	2	97,7%
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	1	90,5%

A identificação molecular foi efetuada somente para alguns isolados, considerando a baixa qualidade das sequências obtidas, conforme análise da qualidade destas efetuada no software Phred ® (<http://www.biomol.unb.br/phph/index.html>), apresentado na figura 5.

Quality table of: Italo_270513_2013-05-27.zip

Number of Reads: 16

Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality > 20
<input checked="" type="checkbox"/> 16_H12.ab1	633	273 (43%)	208 (33%)		Ok
<input type="checkbox"/> 13_E12.ab1	709	86 (12%)	27 (4%)		No
<input checked="" type="checkbox"/> 14_F12.ab1	681	189 (28%)	134 (20%)		Ok
<input type="checkbox"/> 15_G12.ab1	671	0 (0%)	0 (0%)		No
<input type="checkbox"/> 4_D11.ab1	633	21 (3%)	4 (1%)		No
<input type="checkbox"/> 12_D12.ab1	649	27 (4%)	9 (1%)		No
<input checked="" type="checkbox"/> 5_F11.ab1	633	255 (40%)	119 (19%)		Ok
<input type="checkbox"/> 11_C12.ab1	686	29 (4%)	17 (2%)		No
<input type="checkbox"/> 2_B11.ab1	882	18 (2%)	5 (1%)		No
<input type="checkbox"/> 3_C11.ab1	600	23 (4%)	5 (1%)		No
<input type="checkbox"/> 7_G11.ab1	704	9 (1%)	4 (1%)		No
<input type="checkbox"/> 10_B12.ab1	696	29 (4%)	3 (0%)		No
<input checked="" type="checkbox"/> 6_F11.ab1	664	181 (27%)	142 (21%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 9_A12.ab1	626	204 (33%)	160 (26%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 1_A11.ab1	700	167 (24%)	132 (19%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> 8_H11.ab1	656	253 (39%)	186 (28%)		Ok
Total	10823	1764 (16%)	1155 (11%)		No: 9 Ok: 7

Execute CAP3 for checked reads

Figura 4: Tabela de qualidade das sequências, evidenciando que somente uma destas apresentou qualidade para identificação taxonômica.

Entre os isolados, o gênero *Candida* foi o mais frequente durante a identificação das colônias, representando 55% dos isolados. Este fato deve-se provavelmente ao

grande número de espécies cuja fase assexuada (anamorfo) é identificada dentro do gênero *Candida*.

Leveduras do gênero *Cryptococcus* são descritas comumente como causadoras de doenças em pacientes imunodeprimidos (Huffnagle e Noverr, 2013), embora sejam reportadas com potencial biotecnológico na produção de biodiesel tendo em vista a capacidade de acumular óleos em sua biomassa, sendo referidas como leveduras oleaginosas (Ageitos et al., 2011).

Os isolados identificados como *Geotrichum capitatum* apresentaram sequência da região ITS com 98% de similaridade com *Geotrichum sp.*, isolado em 2010 associados a Scarabaeidae xilófagos da Costa Rica por Jimenez et al. (GenBank: GU827487.1, 2010).

O gênero *Debaryomyces* é amplamente conhecido por seu potencial biotecnológico na acumulação de lipídeos em sua biomassa, podendo ser utilizado na produção de biodiesel. Além disso, algumas espécies dentro deste gênero são hábeis em produzir xilitol a partir de xilose (Johnson, 2013).

CONCLUSÕES

A microbiota associada ao intestino de *Veturius transversus* (Passalidae) apresenta número razoável de espécies de leveduras, sendo obtido em uma única coleta pelo menos 11 perfis bioquímicos distintos.

O espécime identificado como membro do gênero *Geotrichum* é similar a outro isolado em associação a besouros xilófagos, o que pode indicar um habitat comum a este gênero.

Pelo menos 9 dos 20 isolados apresenta potencial na acumulação de lipídeos, o que pode indicar que a associação a leveduras oleaginosas seja um padrão comum nesta espécie de besouro.

Novos esforços devem ser empregados no intuito de elucidar a diversidade e riqueza da microbiota associada à *Veturius transversus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ageitos, J.M.; Vallejo, J.A.; Veiga-Crespo, P.; Villa, T.G. 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Appl Microbiol Biotechnol.** 90:1219–1227. DOI: 10.1007/s00253-011-3200-z

Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; Blackwell, M. 1996. **Introductory Mycology.** 4^a ed. John Wiley & Sons, New York

Blackwell, M.; Suh, S. O; White, M. M.; Nguyen, N H. 2004. The status and characterization of *Enteroramus dimorphus*: a xylose-fermenting yeast attached to the gut of beetles. **Mycologia.** 96 (4): 756–760. eznak, J. A. 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. **Ann. Rev. Microbiol.** 36: 323-343.

Demain, A. L.; Solomon, N. A. 1981. Industrial microbiology: Introducing an issue on the making of food, drink, pharmaceuticals and industrial chemicals by microorganisms, with special reference to newer methods of programming the microorganisms for their task. **Scientific American.** 245 (3): 43–52.

Hahn-Hägerdal, B.; Karhumaa, K.; Fonseca, C.; Spencer-Martins, I.; Gorwa-Grauslund, M.F. 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology.** 74: 937–953. DOI 10.1007/s00253-006-0827-2

Huffnagle, G.B.; Noverr, M.C. 2013. The emerging world of the fungal microbiome. **Trends in Microbiology.** V. 21, n. 7. DOI: 10.1016/j.tim.2013.04.002

Johnson, E.A. 2013. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts - the ascomycetes. **Appl Microbiol Biotechnol.** 97:503–517 DOI 10.1007/s00253-012-4497-y

Lelej, A. S.; Storozhenko, S. Y. 2010. Insect Taxonomic Diversity in the Russian Far East. **Entomological Review.** 90 (2): 372–386. DOI: 10.1134/S001387381003005X

Matos, I. T. S. R. 2010. **Seleção de leveduras amazônicas capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico e fermentar D-xilose**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 68 pp.

Rojas-Jimenez,K.; Acuna, A.; Hernandez, M.; Tamayo-Castillo, G. 2010. Fungi and bacteria associated with the guts of wood-feeding Scarabaeidae larvae in different national parks of Costa Rica. **GenBank**: GU827487.1

Silva, N. L. C.; Betancur, G. J. V.; Vasquez, M. P.; Gomes, E. B.; Pereira Jr, N. 2011. Ethanol Production from Residual Wood Chips of Cellulose Industry: Acid Pretreatment Investigation, Hemicellulosic Hydrolysate Fermentation, and Remaining Solid Fraction Fermentation by SSF Process. **Appl Biochem Biotechnol**. 163: 928–936. DOI 10.1007/s12010-010-9096-8

Stajich, J. E.; Berbee, M. L.; Blackwell, M.; Hibbett, D. S.; James, T. Y. Spatafora, J. W.; Taylor, J. W. 2009. The Fungi. **Current Biology**. V. 19, Nº 18: 840-845.

Suh, S. O.; Marshall, C. J.; Mchugh, J. V.; Blackwell, M. 2003. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**. 12: 3137–3145. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2003.01973.x

Suh, S. O.; McHugh, J. V.; Pollock, D. D. e Blackwell, M. 2005. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycology Research**. 109 (3): 261–265. DOI: 10.1017/S0953756205002388

Zhao, L., Yu, J., Zhang, X., Tan, T. 2008. The Ethanol Tolerance of *Pachysolen tannophilus* in Fermentation on Xylose. **Appl Biochem Biotechnol**. DOI: 10.1007/s12010-008-8308-y