



INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA EXPRESSÃO DO FENÓTIPO “KILLER” EM LEVEDURAS

J.R. Lima¹, F. M. P. Viana², S.R. Ceccato-Antonini³, L.R.B. Gonçalves⁴

¹ Mestre em Tecnologia de Alimentos. Profa. do Dep. de Biologia, FAEC/ Universidade Estadual do Ceará - UECE, CEP:83.700.000, Crateús-CE- Brasil.

² Doutor em Fitopatologia. Pesquisador da EMBRAPA Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Planalto do Pici CEP 60511-110, Fortaleza-CE, Brasil.

³ Doutora em Ciências Biológicas. Profa. do Dep. de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias - UFSCar/Campus de Araras CEP: 13600-970 – Araras-SP, Brasil.

⁴ Doutora em Engenharia Química. Profa do Dep. De Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará - UFC, Campus do PICI, CEP: 80455 – 760, Fortaleza-CE, Brasil.

jackrabelo@uece.br

RESUMO

Várias pesquisas tem sugerido que a composição do meio, e principalmente o pH de cultivo apresentam grande influência na produção e liberação da toxina “killer”. A utilização de meio/métodos inadequados pode ocasionar respostas falso-negativas em trabalhos de bioprospecção de leveduras “killer”, por vezes inviabilizando projetos de pesquisas. Nesse contexto, investigou-se a influência da composição de diferentes meios de cultura na expressão do fator “killer”. Para isto foram utilizadas duas cepas padrões sensíveis, *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) e *Candida glabrata* (NCYC 055) e quatro cepas padrões “killer”, K₁ (NCYC 232) *Saccharomyces cerevisiae*, K₂ (NCYC 732) *Saccharomyces cerevisiae*, K₄ (NCYC 388) *Candida glabrata* e K₅ (NCYC 587) *Kluveromyces fragilis*. A expressão do fenótipo foi avaliada em três diferentes meios (YM, YEPD e BDA) todos suplementados com 0,003% de azul de metileno. Os resultados encontrados confirmam a influência da composição de meio sobre a expressão do fenótipo “killer” e reforçam a necessidade de padronização de metodologias e necessidade de testes adicionais na confirmação do fenótipo.

Palavras-chave: Bioprospecção, metodologia, padronização.

INTRODUÇÃO

O interesse no isolamento de leveduras que expressem o fenótipo “killer” têm crescido, nos últimos em função de sua ampla perspectivas de aplicação, dentre as quais destacam-se: biocontrole de leveduras e fungos filamentosos fitopatogênicos (COELHO et al.; GORETTI, 2009; MOHAMED HASHEM et al., 2009); proteção contra infecções causadas por *Candida* e *Pneumocystis* (BANERJEE; VERMAT, 2000) ação antimicótica (MAGLIANI et al., 1997) além de ação potencial na biotipagem de microrganismos patogênicas (FUENTEFRIA, 2008);

A expressão do fenótipo “killer” é influenciada por vários fatores ambientais, sobretudo pelo pH do meio (SILVA 2006; LIMA et al, 2007; SANTOS e MARQUINA 2004).

Além do pH do mosto, Poli (2009), estudando a expressão do fenótipo em diferentes meios de cultura e mostos de fermentação para a produção de vinho,



observou que alguns meios podem favorecer a produção de enzimas proteolíticas que destroem a toxina ou mesmo apresentarem fatores de proteção para as células sensíveis.

Assim, este trabalho objetivou avaliar a influência da composição do meio de cultura na expressão do fenótipo "killer", utilizando cepas padrões sensíveis e produtoras da toxina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados três diferentes meios de cultura, YEPD (extrato de levedura 10g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, glicose 20 g L⁻¹, ágar 20 g L⁻¹, pH 4,2, ajustado com tampão citrato-fosfato 100 mM), YM (extrato de levedura 3 g L⁻¹, extrato de malte 3 g L⁻¹, peptona 5 g L⁻¹, glicose 10 g L⁻¹, ágar 20 g L⁻¹, pH 4,2 ajustado com tampão citrato de potássio 1M) e BDA (acidificado com ácido tartárico pH 4,2) todos os meios foram suplementados com 0,003% de azul de metileno e todos as placas incubadas a 26 °C por 72 horas.

Utilizou-se duas linhagens de leveduras padrões sensíveis *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) e *Candida glabrata* (NCYC 055) e 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*.

Para realização do teste "killer", células padrões sensíveis e "killer" foram ativadas em BDA a 25 °C por 24 horas e suspensas em solução salina, numa concentração de aproximadamente 4,0 x 10⁵ células mL⁻¹. As cepas sensíveis foram espalhadas com swab estéril sob a superfície dos meios a serem testados e as placas incubadas a 25 °C por 30 minutos. As leveduras padrões "killer" foram inoculadas como um único ponto na superfície das placas semeadas com as leveduras sensíveis. Em seguida as placas foram incubadas a 25 °C por 72 horas. A presença de halo de inibição ao redor do ponto de inoculação indicou a positividade do teste (LIMA, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 01 permitem afirmar que a expressão do fator "killer" é extremamente variável, e que esta variação está associada não só a composição do meio de cultura, mas também a cepa sensível utilizada. Estes resultados estão em conformidade com os descritos por Poli (2009) que avaliando a influência da composição de diferentes meios de cultura sobre a expressão do fator "killer" verificou ampla variação na expressão do fenótipo.

Tabela 1. Expressão do fenótipo killer nos diferentes meios analisados.

Cepas padrões "killer"	Cepa padrão sensível – <i>S. cerevisiae</i> (NCYC 1006)			Cepa padrão sensível – <i>C. glabrata</i> (NCYC 055)		
	YM	YEPD	BDA + AM	YM	YEPD	BDA + AM
K ₁ (NCYC 232) <i>S. cerevisiae</i>	+	+	-	-	+	-
K ₂ (NCYC 732) <i>S. cerevisiae</i>	+	+	-	-	-	-
K ₄ (NCYC 388) <i>C. glabrata</i>	-	+	-	-	+	+
K ₆ (NCYC 587) <i>K. fragilis</i>	-	+	-	-	-	-

+ Presença de expressão do fenótipo killer
- Ausência de expressão do fenótipo killer



É amplamente aceito que o principal mecanismo de ação da toxina "killer" é a lesão à parede celular de cepas sensíveis (HAMPSEY, 1997; BENITEZ et al, 1996), assim as diferenças de ação frente a diferentes cepas sensíveis avaliadas podem dever-se a ausência de receptores específicos presentes na parede celular destas cepas.

Apenas no meio YEPD verificou-se positividade para todos os padrões "killer" testados, o que era esperado já que este é o meio padrão utilizado para detecção do fenótipo "killer" (SANGORRIN et al 2001; SILVA et al 2006).

O BDA apresentou o pior resultado em comparação com os demais meios avaliados; o que pode estar relacionado não só a diferença na composição deste, em relação aos demais (YM e YEPD), mas, também nas diferenças de constituição dos insumos utilizados na composição de meios sintéticos; neste contexto, Revillon et al (2003) destaca que a composição do extrato de levedura utilizado na preparação de meios de cultura sintéticos podem apresentar grandes diferenças na composição de aminoácidos em função do meio utilizados no cultivo da levedura, além de variações importantes na composição de elementos maneriais (HERNAWAN & FLEET, 1995).

As diferenças na expressão do fenótipo podem estar relacionadas, não só ao comprometimento da produção da toxina, mas também ao possível efeito protetor de alguns componentes do meio sobre a cepa sensível (SILVA e ALMEIDA, 2006)

Poli (2009) acrescenta ainda que uma levedura "killer" pode expressar a toxina, sem que sua ação seja detectada, em função das modificações impostas a cepa sensível não só pelo meio de cultura, mas também pelas condições de cultivo utilizadas.

CONCLUSÃO

A expressão do fenótipo "killer" nem sempre é reprodutível, sendo esta amplamente influenciada pela composição do meio de cultura e pelas cepas sensíveis utilizadas. Assim os testes de isolamento de leveduras com propriedades mucocinogênicas devem ser precedidos de testes de validação de metodologia e sempre que possível o fenótipo deve ser confirmado através de ferramentas de biologia molecular.

REFERÊNCIAS

- BANERJEE, H.N.; VERMAT, M. Search for a novel "killer" toxin in yeast *Pichia pastoris*. *Plasmid*, v. 40, p. 181-183, 2000;
- BENITEZ, T. et al.. Development of new strains for the food industry. *Biotechnology Progress* , v.1, p. 149-163, 1996.
- COELHO, A.R. et al. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 2, n. 24, p.337-358, 2008. Jul./dez;
- FUENTEFRIA, A. M. **Bioprospecção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microorganismos patogênicos humanos**. 2008. 144 f. Tese (Doutor) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008;



- GORETTI, M. et al. 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;
- HAMPSEY, M. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 13, p.1099-1133, 1997;
- HERNAWAN, T. AND FLEET, G. Chemical and cytological changes during the autolysis of yeast. *Journal of industrial microbiology*. V. 14, p. 440-450, 1995;
- LIMA, J.R.; BRUNO, L.;M.; SILVA, J.L.A.; CASIMIRO, A. R.S. Potencial de utilização de leveduras "killer" para produção de cachaça. *Rev. Ciên. Agron.*, Fortaleza, v.38, n.4, p.366-371, Out.- Dez., 2007;
- MAGLIANI, W. et al. Yeast "killer" systems, *Clinical Microbiology Reviews*, v.10, n. 3, p. 369-400, 1997;
- MOHAMED HASHEM, SAAD ALAMRI The biocontrol of postharvest disease (*Botrydiodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. *Postharvest Biology and Technology* 53 p.123–130; 2009
- POLI, J.S. Condições para detecção e expressão do fator killer produzido por linhagens de *S. cerevisiae*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Porto Alegre- RS;
- REVILLION, J.P.P.; BRANDELLI, A.; AYUB, A.Z. production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marcianis*. *Braslian Archives of Biology and Technology*, v.46, p.121-127, 2003;
- Sangorin, M.P., Zajonskovsky, I.E., Lopes, C.A., Rodriguez, M.E., de van Giraudo Broock, M.R. & Caballero, C. Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). *Journal of Basic Microbiology* 41, 105–113. 2001;
- SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, v. 150, p. 2527-2534, 2004;
- SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control Botrytis cinerea. *Microbiological Research*, v. 159, p. 331-338, 2004
- SILVA, G. A. ; BALBINOTTE, J. ; POLI, J. S. ; BONA, G. ; MORINI, M. A. L. . Ação do SO₂ sobre a sensibilidade ao fator "killer" de linhagens K-R- e á capacidade "killer" de linhagens K+R+. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu/PR, 2006,
- SILVA, G.A.; ALMEIDA, E.A. production of yellow green fluorescent. *Braslian Archives of Biology and Technology*, v.49, p.411-419, 2006;

AGRADECIMENTOS

Os autores agradem a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pelo apoio financeiro a este trabalho e a EMBRAPA Agroindústria Tropical, onde este trabalho foi realizado.