

Tolerância de Isolados de Levedura a Elevadas Temperaturas e Baixo Potencial Osmótico

Tolerance of Yeast Isolates to High Temperature and Low Osmotic Potential

Ítala Layanne de Souza Alves¹, Jéssica de Souza Lima², Naiane Cilira Duarte⁴, Paula Fernanda de Souza Tavares³, Carlos Alberto Tuão Gava⁴

Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a tolerância de isolados de levedura para aplicação no controle biológico de podridões pós-colheita de frutos em elevadas temperaturas e baixa disponibilidade de água. As leveduras foram inoculadas em meio de cultivo líquido contendo um gradiente de concentrações de polietilenoglicol 6000 de forma a alcançar potenciais osmóticos de 0 Mpa, -2 Mpa, -5 Mpa, -10 Mpa, -15, -20 Mpa, e incubados em BOD nas temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C. A partir da análise das curvas de crescimento obtidas, verificou-se que os isolados *Sacharomyces* sp. L10 e *S. boulardi* L7K apresentaram a maior suscetibilidade aos estresses abióticos, com crescimento próximo à zero nas condições restritivas de cultivo. O isolado *Sacharomyces*

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), bolsista Pibic-CNPq, Petrolina, PE.

²Doutoranda em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA.

³Mestranda da Universidade do Estado da Bahia (Uneb), Juazeiro, BA.

⁴Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), estagiária da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁵Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, carlos.gava@embrapa.br.

cerevisiae LF apresentou a maior tolerância à combinação dos fatores analisados, seguido de *Pichia kudriavzevii* L9, demonstrando maior potencial para aplicação em condições de campo para a prevenção de infecções de patógenos quiescentes.

Palavras-chave: controle biológico, estresse abiótico, potencial osmótico.

Introdução

As podridões pós-colheita da manga têm causado elevados prejuízos no Submédio do Vale do São Francisco e as estratégias de controle recaem no uso de fungicidas sintéticos, entretanto há sérias limitações ao uso em pós-colheita por causa do risco de contaminação do consumidor. Com isso, os principais mercados importadores vêm restringindo o seu uso e registro, incentivando a busca por alternativas eficientes que sejam inócuas ao ambiente e ao consumidor. O controle biológico vem mostrando potencial no combate aos patógenos causadores de podridões, tornando-se uma estratégia viável a ser incorporada ao manejo integrado (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002).

Considerando que parte significativa dos patógenos pós-colheita têm infecção quiescente, as estratégias de manejo integrado demandam a aplicação preventiva de produtos ainda na fase pré-colheita, de forma a reduzir as infecções por patógenos durante o desenvolvimento dos frutos (PRUSKY et al., 2013). Portanto, o processo de seleção dos agentes a serem aplicados em fruteiras no Submédio do Vale do São Francisco requer uma etapa de avaliação da tolerância às condições ambientais reinantes na região. A sobrevivência dos agentes de controle biológico (ACB) em condições ambientais é um desafio, uma vez que são expostos a fatores abióticos tais como baixa disponibilidade de água, elevadas temperaturas e radiação UV, que podem comprometer a sua eficiência (SUI et al., 2015).

Neste trabalho, avaliou-se o efeito da redução do potencial osmótico e aumento da temperatura sobre o desenvolvimento de isolados de levedura previamente selecionados como agentes de controle de podridões pós-colheita.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Os isolados de leveduras L9 e LF foram obtidos através de isolamentos em frutos nativos ou coletados em áreas comerciais no polo Petrolina/Juazeiro. As leveduras utilizadas no experimento são oriundas de isolamentos de manga e uva cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco (Tabela 1). Os isolados *P. kudriavzevii* L9, *Sacharomyces sp.* L10, *S. boulardi* L7K e *S. cerevisiae* LF foram identificados com base nos sequenciamento de fragmentos de DNA nas regiões ITS1/ITS4 e D1/D2.

As leveduras foram ativadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo Sabouraud suplementado com 1% de extrato de levedura (Difco) a 28 °C por 24h. Decorrido esse período, uma alíquota contendo 1% (v/v) de inóculo foi transferida para frascos de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultura incubada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 150 rpm, em shaker orbital, por um período de 24 horas.

A avaliação da tolerância dos isolados a baixa disponibilidade de água foi realizada pela adição de uma suspensão contendo 10^3 céls mL^{-1} em meio de cultura líquido com gradiente de concentrações de polietilenoglicol 6000 (PEG6000) de 0, 119,6; 202,2; 295,7; 380,53; 428,38 g.L⁻¹, equivalentes a potenciais osmóticos de 0, -2, -5, -10, -15, -20 Mpa, em meio de cultivo SDY (extrato de levedura 10,0 g/L, peptona 10,0 g/L, dextrose 10,0 g/L).

Tabela 1. Identificação e origem do isolamento de leveduras previamente selecionadas para o controle biológico de podridões pós-colheita em manga.

Isolado	Identificação	Origem do isolamento
L7K	<i>Sacharomyces boulardi</i>	Uva, epiderme
L9	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Manga, epiderme
L10	<i>Sacharomyces sp</i>	Uva, epiderme
LF	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Uva, macerado de polpa

Os isolados foram inoculados em meio de cultura contendo diferentes concentrações do osmólito de forma a alcançar 10^3 céls mL^{-1} . Os

frascos foram transferidos para estufas de crescimento tipo BOD ajustadas para as temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C, e mantidas em agitação em 150 rpm em shaker orbital por 24 horas. Após este prazo, registrou-se através de leitura de densidade óptica (DO) a variação da densidade óptica do meio de cultura em relação a uma leitura inicial tomada no início do experimento.

As leituras de DO foram transformados em culturabilidade relativa estimando-se a proporção (%) do crescimento nas diferentes condições em relação ao tratamento referência, meio de cultivo sem osmólito incubado à 25 °C. Os dados foram transformados utilizando a equação $X' = \text{arcoseno}(X_i/100)$, no qual X_i é o valor da culturabilidade relativa (%), e a seguir foram analisados utilizando-se teste F com um arranjo fatorial em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, seguido de regressão polinomial multivariada para a obtenção de uma superfície de resposta. O experimento foi repetido duas vezes.

Resultados e Discussão

Neste estudo, observou-se variação significativa dos diferentes agentes de controle aos tratamentos. Houve a interação significativa entre levedura, temperatura e potencial osmótico do meio de crescimento pelo teste F. A avaliação das superfícies de resposta mostradas na Figura 1 permite identificar que *Pichia kudriavzevii* L9 apresenta um plano de crescimento linear (Figura 1a), reduzindo a taxa de crescimento logo no início da pressão exercida pelo meio de cultivo, apresentando intercepto do plano maior que zero no eixo da culturabilidade no tratamento mais restritivo (Z).

Sacharomyces sp. L10 e *S. boulardi* L7K (Figura 1b e 1c) são mais suscetíveis à combinação de elevada temperatura e baixa potencial de água do meio de crescimento. Em ambos os casos os planos que descrevem os seus crescimentos declinam logo nas combinações iniciais dos tratamentos e atingem zero antes da aplicação das condições mais restritivas. A análise da resposta microbiana a estresses múltiplos é complexa, no entanto em *Sacharomyces* a resistência à temperatura e a presença de compostos tóxicos no meio é resultado da expressão de proteínas relacionadas à choque térmico e acúmulo de trealose (PIPER, 1993). As respostas de leveduras ao estresse osmótico estão associadas ao acúmulo interno de polióis, como o glicerol, e o nível de tolerância pode variar significativamente entre as espécies (TEKOLO et al., 2010).

Nas condições do estudo, o isolado *S. cerevisiae* LF destacou-se significativamente dos demais, com a superfície de resposta apresentando comportamento parabólico. O isolado apresentou tolerância a baixa disponibilidade hídrica (A_w) nas temperaturas ótimas de crescimento e elevada tolerância a combinação dos fatores, como mostrado na Figura 1d. Observou-se a formação de grumos de células das leveduras com o aumento da concentração de osmólito no meio de cultivo a partir de -5 Mpa, uma resposta previamente relacionada à tolerância a estresse osmótico entre espécies do gênero (JIMOH et al., 2013).

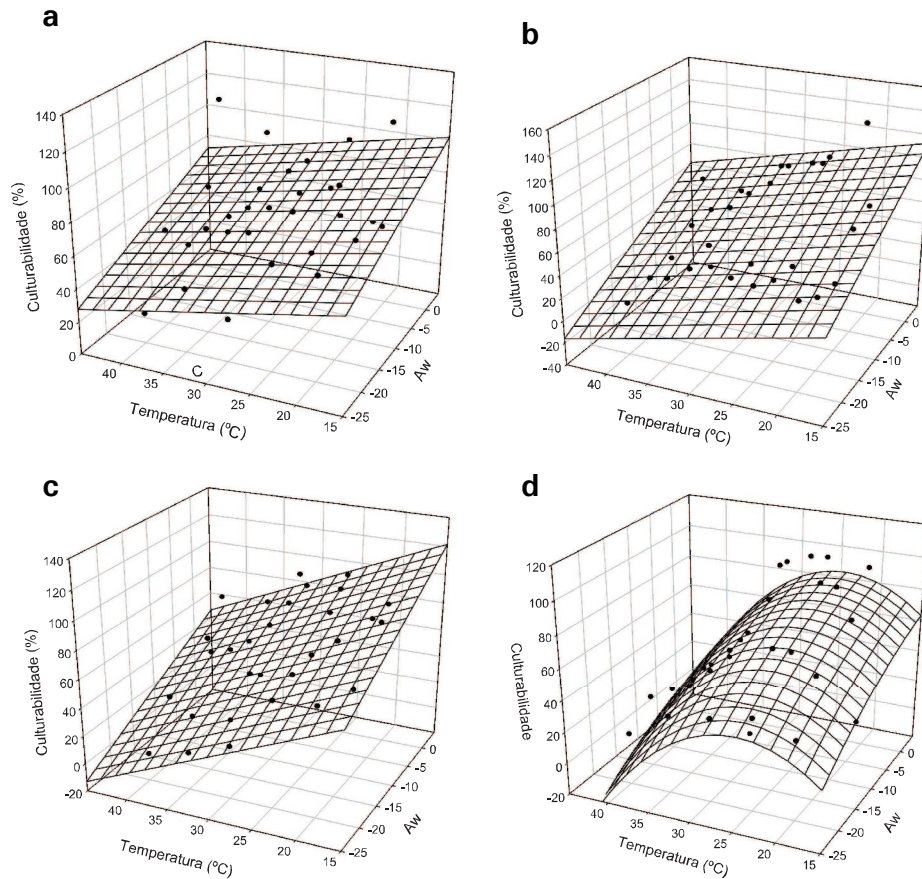


Figura 1. Culturabilidade relativa dos isolados de levedura antagonistas a fungos causadores de podridões da manga *P. kudriavzevii* L9 (a), *Sacharomyces* sp. L10 (b), *S. boulardi* L7K L10 (c) e *S. cerevisiae* LF (d) em condições de diferentes níveis de estresse térmico e de disponibilidade de água em meio de cultivo.

Conclusão

O isolado *Sacharomyces cerevisiae* LF apresentou a maior tolerância à combinação dos fatores analisados, seguido de *Pichia kudriavzevii* L9, demonstrando maior potencial para a aplicação em condições de campo para a prevenção de infecções de patógenos quiescentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica à primeira autora.

Referências

- JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 411-441, 2002.
- JIMOH, S. O.; ADO, S. A.; AMEH, J. B.; WHONG, C. M. Z. Heat-shock and ethanol-osmotic effect on fermentable yeast cells. **International Journal of Biological Sciences**, [Rockville Pike], v. 2, p. 91-96, 2013.
- PIPER, P. W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Hoboken, v. 4, p. 339-355, 1993.
- PRUSKY, D., ALKAN, N., MENGISTE, T., & FLUHR, R. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 155-176, 2013.
- SUI, Y., WISNIEWSKI, M., DROBY, S., LIU, J. Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. D.C., v. 81, p. 2.968-2.975, 2015.
- TEKOLO, O. M.; MCKENZIE, J.; BOTHA, A.; PRIOR, B. A. The osmotic stress tolerance of basidiomycetous yeasts. **FEMS Yeast Research**, Hoboken, v. 10, p. 482-491, 2010.