Influência do meio de cultura e da presença de L-prolina sobre o comportamento de *Cryptococcus laurentii*

Gildo A. da Silva*[1], Marina S. Possebon[2]

RESUMO

Este trabalho avaliou o comportamento do *Cryptococcus laurentii* em diferentes meios de cultura e sua relação com a L-prolina. Foram utilizados meios complexo (batata dextrose - BD) e sintético (G65) com e sem adição de L-prolina comercial. Utilizou-se ainda o meio complexo à base de mosto de uva (MM) no qual a L-prolina está naturalmente presente. Os meios foram inoculados e incubados em agitador giratório (150 rpm, 25 °C por 16 horas). O crescimento foi monitorado por espectrofotometria (600 nm) e por microscopia. Houve boa relação logarítmica entre estes dois métodos mas a contagem de células forneceu maiores contrastes. Enquanto a espectrofotometria mostrou diferença significativa apenas entre o crescimento no meio MM e aquele observado no meio BD ($P<0,05$), a microscopia detectou diferenças altamente significativas ($P<0,01$) entre o crescimento no meio MM e o obtido nos dois meios BD e no meio G65 com L-prolina. O meio BD foi o melhor para o crescimento. Os resultados sugerem não haver envolvimento da L-prolina no crescimento da levedura e nem no processo de brotamento, mas algum componente da uva parece atuar como um fator negativo nos processos de amadurecimento e liberação dos brotos.

Palavras-chave: *Cryptococcus laurentii,* meio de cultura, crescimento, brotamento.

SUMMARY

Influence of culture medium and presence of L-proline on *Cryptococcus laurentii* behaviour

This research evaluates the impact of L-proline and different culture media on the behaviour of *Cryptococcus laurentii*. Complex (potato dextrose – PD) and synthetic (G65) media with and without commercial L-proline were used. Medium made with grape must (MM) was also used as a natural source of L-proline. Yeast cells were transferred to the respective media and incubated in an orbital shaker (150 rpm, 25 °C for 16 hours). The growth was evaluated by measuring the absorbance (600nm) and by microscopy. The growth monitored by spectrophotometry and by microscopy has presented good logarithmic relationship, but the later have provided greater contrasts. By spectrophotometry, the growth in MM was significantly different only from that obtained in PD irrespective of presence of L-proline (0,05). By microscopy, however, the growth in MM has shown highly significant difference from those observed in both PD media and in G65 medium with L-proline ($P<0,01$). The PD medium was the best for growth.

[1] *Biomédico PhD. Pesquisador III Embrapa Uva e Vinho, R. Livramento, 515, Bento Gonçalves–RS. gildo@cnpuv.embrapa.br

[2] Estagiária da Embrapa Uva e Vinho – Engenharia de Alimentos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (Unisinos) São Leopoldo - RS possebon@redesul.com.br

The results suggest that L-proline does not affect either the growth or budding process, but some component of the grape appears to act as a negative factor in budding maturation and release processes.

Keywords: *Cryptococcus laurentii,* culture medium, growth, budding cells

1. Introdução

Um dos passos fundamentais para a obtenção de microrganismos é o meio de cultivo no qual vão crescer. A composição química e a concentração dos componentes do meio incidem de forma decisiva sobre o crescimento de microrganismos (Nochur et al [3]). Janisiewicz et al [2] observaram que, para inibição do crescimento do *Penicillium expansum* em maçã, não apenas a composição química mas também a concentração de nutrientes podem afetar a eficiência do controle. *Cryptococcus laurentii* é uma levedura que desde há muito se sabe possuir atividades antagônicas a determinados microrganismos (Fokkema e Van der Meulen [1]. Foi estabelecido, mais recentemente, o envolvimento desta levedura no processo de controle biológico de fungos filamentosos (Schisler et al [4]). Trabalhos efetuados no Brasil, para o controle de patógenos que causam podridões de maçãs, demonstram que linhagens de *Cryptococcus laurentii* apresentam potencial para uso em pós-colheita (Valdebenito-Sanhueza e Silva [8]). Como a prolina mostrou-se importante na manutenção da viabilidade celular quando as células estão submetidas a condições desfavoráveis (Takagi et al [7]) e como o aminoácido aumentou o controle efetuado pelo antagonista Janisiewicz et al [2], este trabalho investiga a ação de diferentes meios de cultura e a influência da L-prolina sobre o crescimento da levedura *Cryptococcus laurentii*.

2. Materiais e métodos

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma linhagem de *Cryptococcus laurentii* utilizada para controle biológico de *Penicillium expansum* (Valdebenito-Sanhueza e Silva [8]). Os meios de cultura foram: Batata dextrose com L-prolina (BDcp); Batata dextrose sem L-prolina (BDsp); Meio Mosto (MM) (Silva [6], com redução no teor de mosto para 5%; Meio G65 sem prolina (G65sp), de composição química estabelecida por Silva [5]; Meio G65 com L-prolina (G65cp). Aos meios com prolina foi adicionado 0,2 mL da solução estoque contendo 20 mg/L do aminoácido para cada 200 mL de meio. Os meios foram esterilizados e distribuídos em três frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Uma alíquota de 100 μL de uma suspensão de células, contendo aproximadamente 10^3 células/mL, foi adicionada. Os frascos foram mantidos a 25°C, a uma rotação de 150 rpm por 16 horas. O crescimento foi avaliado por medição da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro Lambda-Bio (Perkin Elmer) e por microscopia (Carl Zeiss). Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias foi efetuada pelo teste de Tukey (P = 0,05 e P = 0,01).

3. ~~3.~~ Resultados e discussão ~~Minúscula~~

Observa-se que apenas a absorbância do meio MM diferiu daquela obtida no meio BD independentemente da adição da L-prolina (P<0,05) (Figura 1. 1). A L-prolina parece não influenciar o crescimento da levedura. Quando a avaliação é efetuada por microscopia (Figura 1. 2), as diferenças entre MM e os demais meios são mais evidentes. Foram detectadas diferenças altamente significativas (P<0,01) entre o número total de células em MM e os obtidos nos meios BDcp, BDsp, e G65cp. O crescimento no meio G65sp diferiu significativamente daquele obtido no meio BDsp (P<0,05) e apresentou diferença altamente significativa (P<0,01) com relação ao meio BDcp. A L-prolina não afetou o crescimento da levedura mas este é influenciado por outros componentes no meio de cultura. Os dois métodos de avaliação do crescimento, espectrofotométrico e microscópico, exibiram boa relação logarítmica ($NCT(10^6)=5,63*Ln(absorbância_{600nm})+10,61$; r^2 = 0,91), mas o último revelou maiores contrastes. Com relação ao brotamento, podem-se observar dois grupos distintos com diferenças altamente significativas (Figura 2. 1). A L-prolina também não exerceu influência sobre o brotamento da levedura.

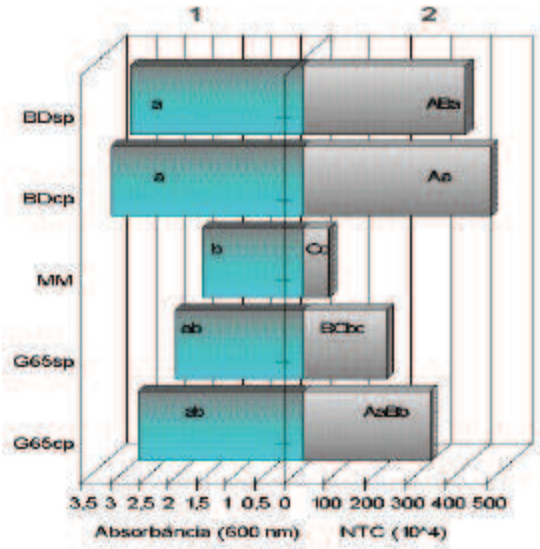

Figura 1. 1- Absorbância de cultura de *Cryptococcus laurentii* em diferentes meios. 2- Número total de células (NTC) nos diferentes meios. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) e altamente significativas (P<0,01).

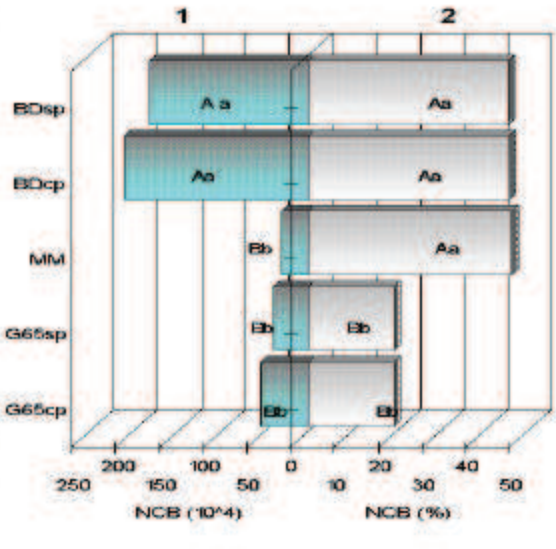

Figura 2. 1- Número de células de *Cryptococcus laurentii* em brotamento (NCB) nos diferentes meios. 2- Porcetagem de células em brotamento (NCB %) nos diferentes meios. Letras maiusculas e minúsculas diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) e altamente significativas (P<0,01).

Quanto à porcentagem de células em brotamento (Figura 2. 2), há dois grupos significativamente distintos. Um formado pelos meios G65 e o outro pelos demais meios. Estes resultados sugerem haver algum componente da uva, presente no meio MM, que age como fator negativo sobre o processo de maturação e liberação do broto. Isto pode explicar o fato de se ter obtido baixo crescimento da levedura neste meio. O meio BD foi aquele que maior

crescimento proporcionou. O crescimento da levedura independeu da presença de L-prolina no meio, embora não se descarte a influência da L-prolina sobre processos não relacionados com o crescimento, como a manutenção da viabilidade celular, observado em *Saccharomyces cerevisiae* (Takagi et al [7]), durante o período de estocagem ou até mesmo, o aumento de sua agressividade, quando atua como antagonista.

4. Conclusões

A L-prolina não afeta o crescimento da levedura *Cryptococcus laurentii,* não altera o processo de brotamento e nem se envolve com o sistema de liberação dos brotos. O mosto de uva não é um substrato adequado para o crescimento da levedura.

~~Acrescentar **Conclusões**, sob pena de não ter o aceite para publicação, já que são parte das normas gerais.~~

Referências Bibliográficas

[1] FOKKEMA, N.J.; van der MEULEN, F. Antagonism of yeastlike phyllosphere fungi against *Septoria nodorum* on wheat leaves. Netherlands Journal of Plant Pathology, v.82, p.13-16, 1976.

[2] JANISIEWICZ, W.J.; USALL, J.; BORS, B. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. Phytopahology, v.82, p.1364-1370, 1992.

[3] NOCHUR, S.V.; ROBERTS, M.F.; DEMAIN, A.L. True cellulase production by *Clostridium thermocellum* grown on different carbon sources. Biotechnology Letters, v.15, n.6, p.641-646, 1993.

[4] SCHISLER, D. A.; KURTZMAN, C. P.; BOTHAST, R. J.; SLININGER, P. J. Evaluation of yeasts for biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. American Potato Journal, v.72, n.6, p.339-353, 1995.

[5] SILVA, G.A. da *Bacillus stearothermophilus* lld-15: análise do metabolismo e das características cinéticas e adequação das condições de cultivo em quimiostato usando meio definido a base de sacarose e xilose. Campinas, 1993. 166p. Tese de Doutorado (Doutor em Ciências) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

[6] SILVA, G.A. da Bactérias de rizosfera de videira e sua relação com *Fusarium oxysporum* . VIII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, RS, 25-27 de setembro de 1996.

[7] TAKAGI, H.; IWAMATO, F.; NAKAMORI, S. Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. Applied Microbiology and Biotechnology, v.47, n.4, p.405 -411, 1997.

[8] VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; SILVA, G.A. da Uso de leveduras epífitas no controle de podridões de maçã em pós-colheita. Anais da VII Reunião de controle biológico de fitopatógenos, Bento Gonçalves, RS, 26-27 de Novembro de 2001.