

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DA MICROBIOTA DO BESOURO POLINÍVORO *Astylus variegatus*

Eduardo Dias Fenner

*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Campus Cerro Largo,
Universidade Federal da Fronteira Sul.
Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul.
eduardo.dfenner@outlook.com*

Mariana C. Diniz

Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul.

Larissa Werlang

Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul.

, Stéfany K. Bressan

Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul.

, Gabriel do Amaral Minussi

*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Campus Cerro Largo,
Universidade Federal da Fronteira Sul.
Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul.*

, Camila G. Oliveira

Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul.

, Marco A. Tramontin

Laboratório de Entomologia Agrícola, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul.

Sérgio Luiz Alves Júnior

*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Campus Cerro Largo,
Universidade Federal da Fronteira Sul.
Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul.
slalvesjr@uffs.edu.br*

Eixo 02: Ciências Biológicas

RESUMO

As leveduras são utilizadas em processos fermentativos desde a Revolução Neolítica. Neste trabalho, o objetivo foi isolar leveduras do besouro *Astylus variegatus*, que se alimenta de pólen e submetê-las a diferentes meios de cultura que simulam o néctar das flores. Foram isoladas 19 cepas da microbiota do besouro. Dessas linhagens, seis foram submetidas a meios de cultura contendo 0,2 % de peptona de caseína e, alternadamente, 15 % de sacarose, 2 % de glicose ou 2 % de frutose. Todas as linhagens analisadas foram capazes de crescer metabolizando os carboidratos ofertados. No entanto, apesar da maior disponibilidade de sacarose, apenas duas leveduras geraram mais biomassa celular diante dessa fonte de carbono, o que sugere sensibilidade das células ao estresse osmótico causado pelo excesso de substrato.

Palavras-chave: Frutose. Glicose. Néctar. Sacarose. Pólen.

INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos unicelulares empregados em diversas indústrias de grande impacto econômico e social, como de vinho, cerveja, pão e bioetanol, e até mesmo na

produção de vacinas, hormônios e medicamentos (ALVES *et al.*, 2022). Na natureza, as leveduras podem ser encontradas em diversos ambientes, estabelecendo relações ecológicas com outros microrganismos e com organismos superiores. Dentre essas relações, é particularmente importante para este trabalho o elo que as leveduras estabelecem com insetos e plantas. Nos nectários, as leveduras metabolizam açúcares e aminoácidos ali presentes, gerando compostos voláteis que atraem insetos às flores. Por sua vez, esses invertebrados transportam não apenas pólen, mas também leveduras entre as angiospermas. Assim, esses microrganismos se beneficiam tanto dos nutrientes que compõem o néctar quanto daqueles que fazem parte da alimentação dos referidos invertebrados (FENNER *et al.*, 2022).

O besouro *Astylus variegatus* é um inseto que visita flores e se alimenta principalmente de pólen. Alguns estudos revelaram que esse besouro é atraído por 1,4-dimetoxibenzeno e cinamaldeído, ambos compostos de interesse comercial (SILVA *et al.*, 2011; VENTURA *et al.*, 2007). O objetivo desse estudo foi isolar leveduras do *A. variegatus* e analisar seus perfis de crescimento em meios de cultura que mimetizam o néctar das flores, que é rico em açúcares e pobre em aminoácidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Na área experimental do *Campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul *campus* Chapecó, foram coletados 50 besouros da espécie *Astylus variegatus*. Metade dos indivíduos foram diretamente inoculados em cinco frascos Erlenmeyer contendo meio YNB (0,67 % de base nitrogenada de leveduras) com 1 % de xilose e 0,02 % de cloranfenicol. Outros 25 besouros foram macerados e então inoculados em outros cinco frascos. Os frascos foram incubados em shaker a 30 °C e 145 rpm durante seis dias. Depois disso, uma alçada de cada frasco foi estriada por esgotamento em placas de Petri com o mesmo meio, porém acrescido de 2 % de ágar. Após 48 h a 30 °C, colônias isoladas com morfologia típica de levedura foram armazenadas em criotubos a -80 °C para posteriores procedimentos (ALBARELLO *et al.*, 2023).

Dentre as leveduras isoladas, seis linhagens foram escolhidas aleatoriamente e submetidas a meios de cultura que mimetizam o néctar das flores. Os meios foram compostos de 1 % de extrato de levedura, 0,2 % de peptona de caseína (como fonte de aminoácidos) e, alternadamente, 15 % de sacarose, 2 % glicose ou 2 % de frutose. Os cultivos foram mantidos a 30 °C e 145 rpm por 90 h. A cada 12 h, foram retiradas amostras para a determinação do

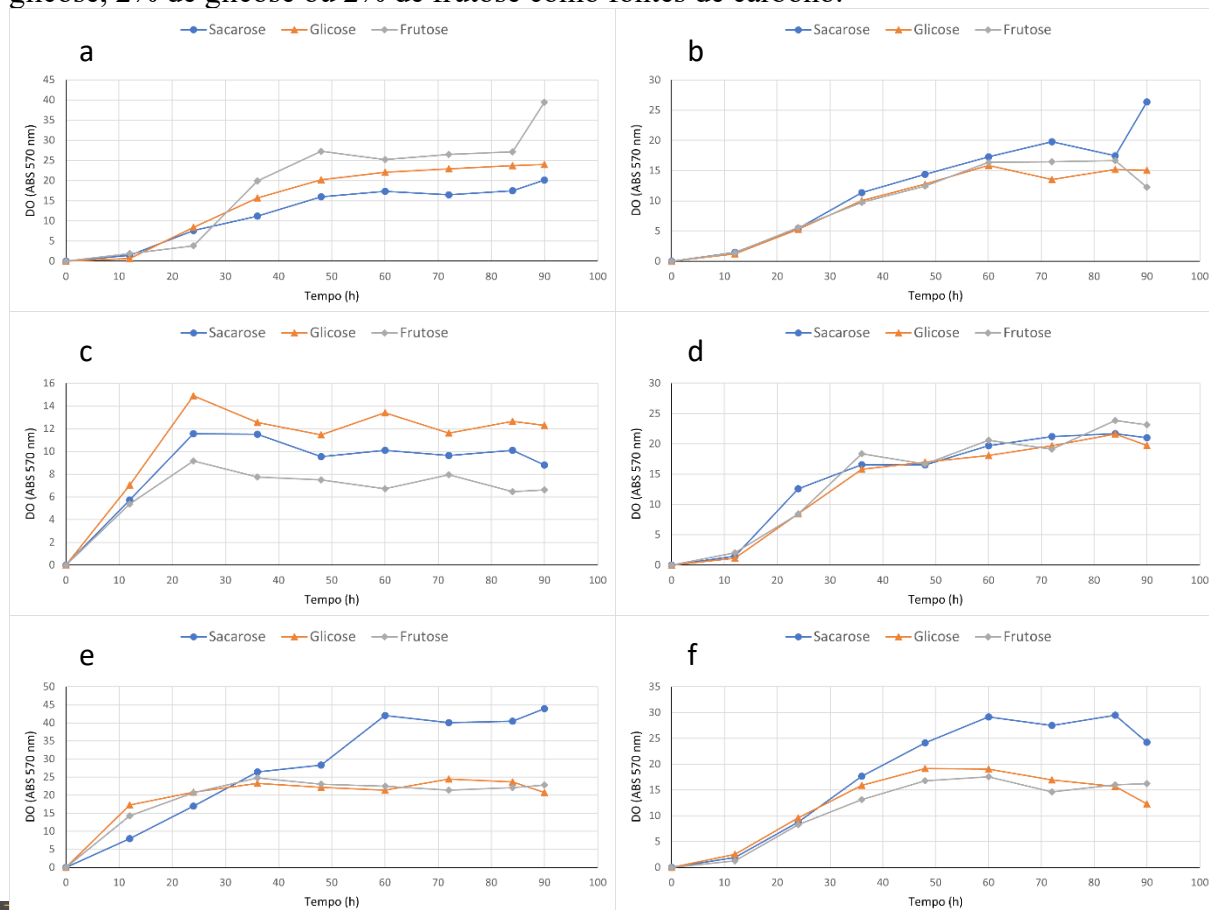
crescimento celular pela medida da densidade óptica (DO), por absorvância, a 570 nm (ALBARELLO *et al.*, 2023).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos besouros coletados, foram isoladas 19 cepas de leveduras, das quais seis foram provenientes dos besouros inteiros e as outras 13 foram do inseto macerado. Elas foram depositadas na coleção do Laboratório de Bioquímica de Leveduras do *Campus* Chapecó da UFFS e numeradas sequencialmente (CHAP-223 a CHAP-241).

As linhagens escolhidas para análise neste trabalho foram: CHAP-223, CHAP-227, CHAP-229, CHAP-231, CHAP-237 e CHAP-239. Os resultados obtidos estão compilados na Figura 1. Nota-se que todas as seis cepas foram capazes de crescer nos meios testados. No entanto, a extensão da fase *lag* (fase de adaptação das células ao meio) variou de modo expressivo: enquanto as linhagens CHAP-223 e CHAP-229 iniciaram seu crescimento exponencial imediatamente após o inóculo, as demais apresentaram pelo menos 12 h de adaptação.

Figura 1 – Perfis de crescimento celular de leveduras CHAP-223 (a), CHAP-227 (b), CHAP-229 (c), CHAP-231 (d), CHAP-237 (e) e CHAP-239 (f) em meios contendo 150 g/L de glicose, 2% de glicose ou 2% de frutose como fontes de carbono.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A quantidade de biomassa gerada (estimada pela densidade óptica) também variou entre as leveduras. A linhagem que apresentou o crescimento mais elevado (CHAP-237) produziu duas a três vezes mais células do que a que menos cresceu (CHAP-229). É importante notar também que apenas duas cepas (CHAP-237 e CHAP-239) tiraram proveito da concentração mais elevada da sacarose nos meios (açúcar presente em maior concentração nos nectários florais — FENNER *et al.*, 2022). Ainda assim, o crescimento nesta fonte de carbono foi no máximo o dobro do observado nos meios com glicose e frutose, apesar de a concentração disponível do dissacarídeo ser 7,5 vezes maior do que a dos monossacarídeos testados. De fato, trabalhos prévios já demonstraram que concentrações elevadas de açúcar podem ser nocivas às células, pois nessas condições os microrganismos têm o metabolismo prejudicado pela elevada pressão osmótica (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013; HOHMANN, 2002).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra ser possível obter leveduras selvagens, direto da natureza, com potencial biotecnológico. Os resultados obtidos indicam que essas leveduras podem metabolizar açúcares presentes em nectários florais. Nos próximos meses, o grupo irá avaliar os metabólitos produzidos durante os cultivos realizados.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com fomento das instituições UFFS, CNPq, FAPESC e CAPES.

REFERÊNCIAS

ALBARELLO, M. L. R.; GIEHL, A.; TADIOTO, V.; SANTOS, A. A.; MILANI, L. M.; BRISTOT, J. C. S.; TRAMONTIN, M. A.; TREICHEL, H.; BERNARDI, O.; STAMBUK, B. U.; ALVES JR, S. L. Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 1, p. 1–12, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-023-10616-4>.

ALVES JR, S. L.; TREICHEL, H.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U. Are Yeasts “Humanity’s Best Friends”? *In*: [S. l.: s. n.], 2022. p. 431–458.

DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 104, n. 6, p. 1083–1095, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-013-0030-2>.

HOHMANN, S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 300–372, 2002. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/membr.66.2.300-372.2002>.

FENNER, E. D.; SCAPINI, T.; DINIZ, M. C.; GIEHL, A.; TREICHEL, H.; ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; ALVES JR, S. L. Nature's Most Fruitful Threesome: The Relationship between Yeasts, Insects, and Angiosperms. **Journal of Fungi** 2022, Vol. 8, Page 984, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 984, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/10/984/html>.

SILVA, M. E. P. F; MUSSURY, R. M.; VIEIRA, M.C.; ALVES JR, V. V.; PEREIRA, Z. V.; SCALON, S. P. Q. Floral biology of *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) and its relation with *Astylus variegatus* activity (Germar 1824) (Coleoptera: Melyridae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 1251–1258, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/KsRx7LyHKHNZhnNYnkhG8Zw/?lang=en>.

VENTURA, M. U.; PEREIRA, T.; NUNES, D.H.; ARRUDA, I. C. Attraction of *Astylus variegatus* (Germ.) (Coleoptera: Melyridae) by volatile floral attractants. **Scientia Agricola**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 305–307, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/KkqGmwyJYpG7Njw57n6t4yJ/?lang=en>.