

Aspéctos morfológicos de leveduras isoladas de frutas e flores

Morphological aspects of yeasts isolated from fruits and flowers

DOI:10.34117/bjdv7n4-475

Recebimento dos originais: 10/03/2021

Aceitação para publicação: 19/04/2021

Nádia Maria de Souza

Acadêmica de Engenharia De Alimentos. Universidade Do Estado De Mato Grosso, Departamento de Engenharia de Alimentos, Rua A, S/N, Bairro São Raimundo, Barra Do Bugres-MT, Brasil. CEP: 78390-000
E-mail: nadia.maarouz@gmail.com

Meirieleme do Nascimento Serpa

Bacharel em Engenharia De Alimentos. Universidade Do Estado De Mato Grosso, Departamento de Engenharia de Alimentos, Rua A, S/N, Bairro São Raimundo, Barra Do Bugres-MT, Brasil. CEP: 78390-000
E-mail: meirieleme-serpa@hotmail.com

Maria Clara Oenning da Silva

Aluna do Ensino Médio do Instituto Federal Do Mato Grosso
Rua Vinte e Oito A, 980-N, Bairro Vila Horizonte, Tangará da Serra - MT, Brasil.
CEP:78300-000
E-mail: mariaclaraoenning@gmail.com

Rosimeire Oenning da Silva

Doutorado em Microbiologia. Universidade Do Estado De Mato Grosso, Departamento de Engenharia de Alimentos, Rua A, S/N, Bairro São Raimundo, Barra Do Bugres-MT, Brasil. CEP: 78390-000
E-mail: rosimeireoenning@unemat.br

RESUMO

Leveduras são microrganismos de importância em laboratórios de pesquisa de microbiologia industrial, justificando a necessidade de seleções e identificações constantes para descoberta de novas cepas. Para identificações destes, a nível de gênero, características fenotípicas são frequentemente utilizadas como base principal. A observação de estruturas microscópicas, e macroscópicas são partes de um conjunto de métodos, com as quais pode-se identificar uma espécie, definir o comportamento da mesma em diferentes condições e assim definir as diversas características de uma levedura. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi fazer a caracterização micro e macroscópica de leveduras isoladas de frutas e flores a partir da técnica de microcultivo em lâminas e estriamento em placas. Para esse fim foram avaliadas 13 cepas isoladas de frutas e flores armazenadas em tubos com YEPD inclinados, preservados pela técnica de Castellani no laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado do Mato Grosso – Campus de Barra do Bugres. Este artigo avaliou as características macro e micromorfológicas das leveduras a fim de conhecê-las melhor e disponibilizar informações que possam contribuir com futuros trabalhos de identificação destas cepas. Houve uma variação morfológica tanto no comportamento das leveduras no microcultivo

como nas colônias em placas. Das 13 leveduras 5 apresentaram formação de hifas verdadeiras e 3 formações de artrósporos. Todas as colônias são de cor creme, 3 lisas com bordas regulares, 10 rugosa com bordas irregulares.

Palavras-chave: microrganismo, microcultivo, morfologia.

ABSTRACT

Yeasts are microorganisms of importance in industrial microbiology research laboratories, justifying the need for constant selections and identifications for the discovery of new strains. For gender identifications, phenotypic characteristics are often used as the main basis. The observation of microscopic and macroscopic structures are part of a set of methods, with which one can identify a species, define its behavior under different conditions and thus define the different characteristics of a yeast. Thus, the objective of this work was to make the micro and macroscopic characterization of yeasts isolated from fruits and flowers using the technique of microcultivation in slides and striation in plates. To this end, 13 isolated strains of fruits and flowers were stored in tubes with tilted YEPD, preserved by the Castellani technique in the Microbiology laboratory of the University of the State of Mato Grosso - Barra do Bugres Campus. This article evaluated the macro and micromorphological characteristics of yeasts in order to get to know them better and provide information that can contribute to future work to identify these strains. There was a morphological variation both in the behavior of yeasts in the microculture and in the colonies in plates. Of the 13 yeasts, 5 presented true hyphae formation and 3 arthrospore formations. All colonies are cream colored, 3 smooth with regular edges, 10 rough with irregular edges.

Keywords: microorganism, microculture, morphology.

1 INTRODUÇÃO

Apesar das técnicas moleculares avançadas, a observação macroscópica e microscópica das características morfológicas clássicas continua a ser a base para a identificação fenotípica de um isolado fúngico (Freydiere et al., 2001). Há um interesse maior na estrutura dos corpos reprodutivos e na maneira como são produzidos, pois essas características constituem a base mais importante para a classificação e taxonomia dos fungos (Gorthi, 2019).

Existe uma imensidão de espécies de microrganismos na natureza, no entanto descritos na literatura só há uma pequena fração dessa diversidade (Manfio, 2003). Dentro deste grande universo de microrganismos destacam-se as leveduras (Madigan et al., 2016). Leveduras novas, ainda não estudadas e/ou descritas podem ser isoladas na natureza, com chances de ser encontradas cepas com grande potencial biotecnológico. O pouco conhecimento relativo a esses microrganismos encontrados em determinados

ambientes justifica a importância de estudos que venham contribuir para ampliação de informações acerca de leveduras.

As leveduras são células que, dependendo das condições de cultivo podem ser globosas, subglobosa, elipsoidal, ovoidal, obovoidal, cilíndrica, botuliforme, baciliforme, alongada, apiculada, ogival, lunada ou triangular. Alguns exemplos são: células em forma de limão são características das leveduras apiculadas *Hanseniaspora* e *Wickerhamia*, as células em forma de garrafa são *Malassezia*, as células triangulares de *Trigonopsis* e as células lunadas de *Metschnikowia lunata* e *Candida peltata* (Yarrow, 2011). Em condições inadequadas alguns gêneros têm como característica formar estrutura de resistência como artrósporos, clamidósporos e filamentação, e estas informações podem ser usadas para auxiliar na identificação de gêneros e/ou espécies.

Algumas espécies de leveduras têm a capacidade de formar pseudo-hifa, uma série de "blastosporos alongados", unidos entre si e que correspondem a um estágio intermediário entre a fase leveduriforme e filamentosa (Barbedo e Sgarbi, 2016), é portanto, definido como um filamento composto por uma cadeia de células que foram formadas por brotamento. Os filamentos podem se tornar desanexado como células discretas ou permanecer anexado a célula mãe e dar origem a aglomerações ou cadeias de células (Yarrow, 2011).

Dimorfismo em algumas leveduras é regulado pelo pH e condições nutricionais do meio. Sob condições de pH alto (Gomes, 2012) uma constrição no septo do filamento é iniciada meia hora após o início de um broto emergente (Yarrow, 2011). Há também evidências de que a nutrição pode afetar o tipo de morfologia que está sendo expressa (Barbedo et al., 2016). Células alongadas de pseudo-hifas são separadas por constrição de septos, cada um com poro (Yarrow, 2011). Quando essas células se separam, cada septo composto de duas placas quitinosas, são direcionados um para cada célula.

As pseudo-hifas podem ser rudimentares, formando células de tamanho e forma semelhantes, ou diferenciados. Cada uma podem produzir blastósporos de maneira regular com arranjo mais ou menos característico. O arranjo de blastosporos foi utilizado para a diferenciação de gêneros em sistemas taxonômicos anteriores. A forma de pseudo-hifas pode ser marcadamente afetada pelas condições culturais. Um tipo incomum de pseudo-hifa é restrito a algumas espécies de *Dekkera* e é chamado blastese.

Este termo descreve a chamada germinação de blastósporos em que o tubo germinativo resulta em filamentos delgados septados (Yarrow, 2011).

Algumas leveduras produzem hifas verdadeiras, uma célula cilíndrica com uma ponta característica cuja forma se aproxima de um hemielipsoide (Riquelme et al., 2018). Estas são alongadas pelo crescimento contínuo da ponta hifal [9], que podem ser seguidas pela formação de septos ou não. As hifas de algumas leveduras se quebram ou desarticulam para formarem artrósporos unicelulares (também chamados de arthroconídios). Artrósporos formados desta maneira em meios sólidos são frequentemente organizados de maneira característica em zigue-zague (Yarrow, 2011).

As colônias de leveduras podem apresentar aparência cremosa ou seca, rugosa ou lisa, bordas regulares ou irregulares com coloração creme, branca, salmon, amarela, vermelha entre outras (Lacaz et al., 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar leveduras isoladas de flores e frutos por meio de microcultivo em lâminas e por estriamento placas de Petri, como forma de contribuir com o aumento de informações sobre a micro e macromorfologia de leveduras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO

Para realização desta pesquisa foram avaliadas 13 cepas de leveduras previamente isoladas de frutas e flores armazenadas em tubos com YEPD inclinados, preservados pela técnica de Castellani (Castellani, 1939) no laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado do Mato Grosso – Campus de Barra do Bugres. As leveduras foram designadas conforme descrito no quadro abaixo.

Quadro 1: Local e Substrato de Isolamento das Leveduras.

Fonte de isolamento	Substrato de isolamento	Designação levedura
Flores	<i>Plumeria rubra (Jasmim-manga)</i>	BB. 137
	<i>Mangifera indica</i>	BB. 140
Frutas	Morgote	BB. 146
	Morgote	BB. 147
	Morgote	BB. 148
	Pêssego	BB. 156
	Pêssego	BB. 158

	Nectarina	BB. 160
	Uva rubi	BB. 174
	Uva Niágara	BB. 175
	Uva Niágara	BB. 176
	Uva Niágara	BB. 177
	Manga	BB. 191

2.2 CONFIRMAÇÃO DA PUREZA DAS CULTURAS

Para início dos trabalhos foram verificadas a pureza das culturas. Cada cepa armazenada foi inoculada em solução salina 0.85% e repicadas para placas de petri com meio de YEPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e ágar 2%) adicionado de ampicilina na concentração de 500 mg L⁻¹ para impedir o crescimento de bactérias, e incubadas a 30°C por 48 horas. Após esse período foi observado se as culturas permaneciam puras. As cepas que apresentaram contaminação foram purificadas por meio de repiques no mesmo meio citado acima.

2.3 MICROCULTIVO

Esta técnica desenvolvida por Riddell (1950) é fundamental para o estudo morfológico detalhado das leveduras, a fim de determinar estruturas celulares como: clamidósporos, blastoconídeo, Artroconídios e Artrósporos. Nela é possível observar as características vegetativas das leveduras, como também a formação de pseudo-hifas, hifas verdadeiras presença ou ausência de septos nas hifas e dos esporos por multiplicação vegetativa (blastoconídios). Para realização desse método, foi utilizado o meio Agar fubá preparado conforme descrito por Kurtzman et al. (2011). Após ser autoclavado (por 15 minutos a 121 °C) e distribuído em placas, foram guardados na geladeira, conservando para o momento de uso.

Para inoculação foi previamente autoclavado placas de Petri contendo em seu interior duas lâminas e duas lamínulas dispostos sobre um suporte de vidro e um papel filtro umedecidos formando uma câmara úmida. O meio foi cortado com o auxílio de uma pinça estéril, em cubos com dimensão aproximada de 2,0 x 1,5 cm e colocado sobre as lâminas. O meio foi levemente tocado com uma alça de platina estéril, sendo feito duas estrias paralelas da cepa de levedura a ser observada sobre o ágar fubá. Cobriram-se as estrias, na sua porção central, com uma lamínula esterilizada pressionando delicadamente a lamínula com uma pinça para retirada do ar, nos dois cubos presentes na lâmina. As

placas com as colônias de levedura foram submetidas a crescimento a uma temperatura de 37°C durante 48 a 72 horas. A leitura foi feita diretamente com a lâmina pronta, usando a objetiva de 40x e 100x, em um microscópio óptico. Após a focalização, foram realizados os registros fotográficos de algumas lâminas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados o perfil morfológico das células e colônias de 13 cepas de leveduras, a partir de um microcultivo. As cepas foram sistematizadas em três grupos, conforme as características micromorfológicas.

3.1 LEVEDURAS COM BLASTOCONIDEO SEM FORMAÇÃO DE HIFAS VERDADEIRAS

No primeiro grupo estão dispostas as leveduras BB148, BB174, BB175, BB176 e BB177 que tiveram presença de apenas blastoconídios esféricos ou ovais, observados em lâminas de microcultivo em ágar fubá podendo ser visualizada a imagem das leveduras, obtida de microscópio óptico com aumento de 400x e 1000x.

Neste primeiro grupo, as leveduras apresentaram colônias com bordas, regulares e irregulares, textura rugosa exceto a BB177 (figura 1), sendo todas de cor creme.

Figura 1 - Imagens das células (a) a partir de um microcultivo em ágar fubá e colônias em placas (b) da levedura BB.177 obtida em microscopia optica com aumento de 400 e 25 x respectivamente.

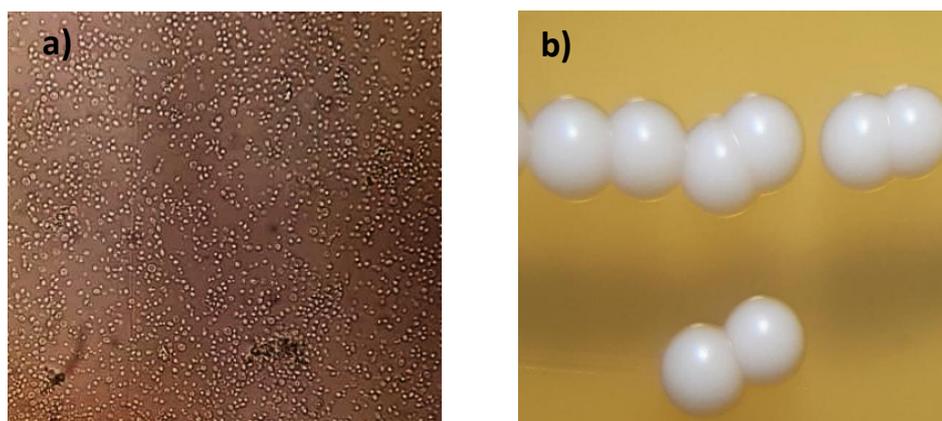


Foto: Jenifer Belo Rodrigues

Apenas a BB. 174 exibiu a formação de pseudohifa (Figura 2). Segundo Barbedo e Sgarb a fase leveduriforme, unicelular, pode eventualmente gerar uma gémula e formar tubos germinativos, ou hifas verdadeiras, evoluindo assim para a forma filamentosa. Entre esses dois extremos, de gemulação e de filamentação, o fungo pode ainda manifestar uma

variedade de morfologias durante o seu crescimento, formando assim as pseudohifas (não septadas), que são na realidade leveduras alongadas unidas entre si.

O termo hifa refere-se aos filamentos que contêm mais de um septo e ausência de constrições. As pseudohifas distinguem-se das hifas verdadeiras pela existência de uma constrição entre a célula mãe e a célula filha, assim como na organização dos seus ciclos celulares. No primeiro ciclo celular da pseudohifa, antes de surgir a gêmula, forma-se o anel do septo entre a célula mãe e a célula filha. Ocorre então a mitose e quando este processo se completa, as células separam-se completando a formação da parede celular em ambas as células que, exteriormente, podem permanecer ligadas. Na realidade, o processo de mitose e o processo de formação de pseudohifa não contêm muitas diferenças com exceção do alongamento e da separação da célula por completo, permitindo a formação do septo, sendo que na pseudohifa as formações do septo e da constrição coincidem no mesmo ponto (Barbedo et al., 2016).

Figura 2 - Imagens de aglomerado de células com pseudohifas (a) a partir de um microcultivo em ágar fubá e colônias em placas (b) da levedura BB.174 obtida em microscopia optica com aumento de 1000 e 25 x respectivamente.

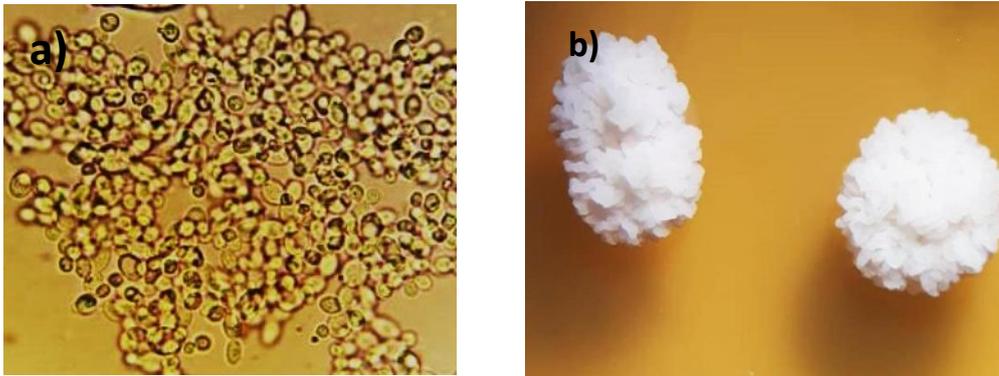


Foto: Bruna Machado Bervian

3.2 LEVEDURAS COM FILAMENTAÇÃO

No segundo grupo encontram-se as leveduras BB137, BB140, BB147, BB156 e BB158 que apresentaram formação de hifas verdadeiras. A primeira levedura supracitada apresentou hifas bastante ramificadas e entrelaçadas entre si.

Com exceção da BB. 147 as demais exibiram uma textura rugosa. Somente a levedura BB137 apresentou bordas irregulares, sendo todas de cor creme. As condições nutricionais do meio influenciam a morfologia das colônias e das células de algumas espécies de leveduras.

Este grupo formou filamentação em ágar fubá, um meio pobre em nutrientes. Essas leveduras apresentaram dimorfismo em ambiente controlado, com uma interconversão entre a fase leveduriforme e a fase filamentosa. De acordo com Kurtzman et al. (2011), as leveduras dimórficas tanto do grupo Ascomycetos como do grupo Basidiomycetos, na fase leveduriformes exibem formação de brotos (blastoconídios) e na fase filamentosa exibem formação de filamentos com uma região especializada na ponta das hifas chamada Spitzenkörper - uma organela esférica com vesículas que controla a taxa de crescimento e a posição das hifas (Kinnaer et al., 2019). Em fungos, a localização de fatores de polaridade em regiões corticais específicas conduz o crescimento celular localmente por meio da expansão e remodelação da parede celular para gerar morfologias celulares específicas. Muitas espécies de leveduras são dimórficas, exibindo morfologias distintas dependendo das condições de crescimento (Kinnaer et al., 2019).

Trabalhos anteriores estabeleceram que a indução da filimentação de *S. japonicus* é desencadeada por estresses ambientais como fome nutricional ou de nitrogênio, e estresses de danos ao DNA (Furuya et al., 2012), sugerindo que a mudança de uma célula pequena para uma hifa de rápido crescimento serve como um mecanismo de fuga de condições ambientais adversas. O crescimento filamentoso também é reprimido pela luz, pois a percepção da luz azul por dois receptores de luz do *colarinho branco* presentes em *S. japonicus* e não em *S. pombe* induz a divisão celular das hifas (Okamoto et al., 2013). Da mesma forma o dimorfismo em *Candida albicans* é influenciada pela interação de vários fatores, tais como a temperatura, o pH, e o equilíbrio nutricional (Nagyab et al., 2020).

Foi possível a observação dos septos nas hifas das leveduras BB.140 e BB. 156. De acordo com Nagyab (2020) a formação do septo em células de leveduras envolve a formação de um anel de actomiosina contrátil que deixa um poro central na parede cruzada entre as células adjacentes. De uma perspectiva evolutiva, existe um continuum de morfologias e diâmetros do septo; desde estreitas invaginações que dificilmente interferem com o fluxo, até o fechamento completo das células hifais vizinhas.

3.3 LEVEDURAS COM ARTRÓSPORO

Neste estão agrupadas apenas três leveduras que apresentaram artrósporos no microcultivo BB.146 BB.160 BB.191. Segundo a literatura KURTZMAN *et al.* (2011) os gêneros de leveduras conhecidos e descritos até o momento que são formadores de

artroconideos com blastoconideos são: *Trichosporon*, *Moniella*, *Dipodascus*, *Galactomyces*, *Pichia*, *Arxula*, *Saccharomyces* e algumas espécies de *Debaromyces*.

Todas as três leveduras apresentaram bordas regulares, cor creme e textura lisa exceto a levedura BB191 que apresentou textura rugosa.

Nesse grupo é possível observar a capacidade de produção de hifas hialinas ramificadas que são capazes de se fragmentar em esporos, chamados artroconídios. A formação de artrósporos pode possibilitar a identificação de *Geotrichum*, e quando são formados também blastoconídios pode pertencer ao Genero *Trichosporon* (Anvisa, 2004). O gênero *Geotrichum* é de levedura dimórfica que formam colônias de coloração crème (Alper et al., 2011), sendo caracterizado pela presença de artrósporos ovais em forma de barril, regulares de arestas arredondadas.

4 CONCLUSÃO

Este artigo avaliou as características macro e micromorfológicas das leveduras afim de conhece-las melhor e disponibilizar informações que possam contribuir com futuros trabalhos de identificação destas cepas. Houve uma variação morfológica tanto no comportamento das leveduras em microcultivo como nas colônias em placas. Em 38,5% das 13 leveduras foram observados apenas blastoconídios, 38,5 % formaram hifas verdadeiras e 23 % formaram artrósporos. Todas as colônias são de cor creme, 23 % lisas com bordas regulares e 77 % rugosa com bordas irregulares.

REFERÊNCIAS

- FREYDIERE AM, GUINET R, BOIRON P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* 2001 Feb; 39(1):9-33, doi: 10.1080/mmy.39.1.9.33. PMID: 11270413.
- GORTHI LV. Morphological Classification of Fungal Infections (Yeasts, Mold, Dimorphic). In: Turgut M., Challa S., Akhaddar A. (eds) *Fungal Infections of the Central Nervous System.* 2019. Springer, doi:10.1007/978-3-030-06088-6_3.
- MANFIO GP. Microbiota: versão premilinar. Centro puridisciplinas de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas/CPQBA. 2003 março;
- MADIGAN MT. et al. *Microbiologia de Brock.* 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.
- YARROW D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP and Fell JW (eds). *The yeasts. A taxonomic study.* 5th edn. Amsterdam: Elsevier; 2011. Pp. 77-99.
- BARBEDO LS, SGARBI DBG. Candidíase [Tese]. DST: *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis.* (2010) 22 (1), pp.22-38.
- GOMES, FCMB. Determinação e comparação de genótipos de *Candida albicans* pelo método de PCR, com base nos polimorfismos da região 25S rDNA e das sequências ALT/RPS. [dissertação]. Universidade Nova de Lisboa; 2012. 134 p.
- RIQUELME M, AGUIRRE J, BARTNICKI-GARCIA S, BRAUS GH, FELDBRUGGE M, FLEIG U, HANSBERG W, HERRERA-ESTRELLA A, KAMPER J, KUCK U, ET AL. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiol Mol Biol Rev* 82. June 2018. doi: 10.1128/MMBR.00068-17.
- KINNAER C, DUDIN O, MARTIN SG. Yeast-to-hypha transition of *Schizosaccharomyces japonicus* in response to environmental stimuli. *Molecular Biology of the Cell.* 2019 April 1; 30 (8): 975–991, doi: 10.1091/mbc.E18-12-0774.
- LACAZ CS, PORTO E, MARTINS JEC, VACCARI EMH, MELO NT. *Tratado de micologia médica; Prefácio: Bertrand Dupont.* 9. Ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p. Ilus. ISBN 85-7378-123-8.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.*, 42: 225-226, 1939.
- RIDDELL RW. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia.* 1950 April; 42 (2):265-270, doi:10.2307/3755439.
- KURTZMAN CP, FELL JW, BOEKHOUT T, ROBERT V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *The yeasts.* Elsevier; 2011. V. 1, pp.87–110, doi:10.1016/b978-0-444-52149-1.00007-0.

FURUYA K, NIKI H. Hyphal differentiation induced via a DNA damage checkpoint-dependent pathway engaged in crosstalk with nutrient stress signaling in *Schizosaccharomyces japonicus*. *Curr Genet* 58, 291–303 (2012), doi:10.1007/s00294-012-0384-4.

OKAMOTO S, FURUYA K, NOZAKI S, AOKI K, NIKI. Synchronous activation of cell division by light or temperature stimuli in the dimorphic yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Eukaryot Cell*. 2013 Sep; 12(9): 1235-1243. DOI: 10.1128/ec.00109-13.

NAGYAB LG, TORDA V, CSERNETICS A, VIRÁGH M. Fungi took a unique evolutionary route to multicellularity: Seven key challenges for fungal multicellular life. *Fungal biology*; 2020 december; 151-169, doi:10.1016/j.fbr.2020.07.002.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. Manual da anvisa. Módulo vii, 2004.

ALPER I, FRENETTE M, LABRIE S. Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum*. *Fungal Biol*. 2011 Dec;115(12):1259-69. doi: 10.1016/j.funbio.2011.09.002. Epub 2011 Sep 21. PMID: 22115445.