

SÔBRE UMA LEVEDURA PRETA ISOLADA DO SAPOTI (*Achras sapota* L). OBSERVAÇÕES COMPARATIVAS COM UMA CEPA DE *Pullularia pullulans* (DE BARY) BERKHOUT

S. JOLY

Departamento de Microbiologia, Instituto Zimotécnico
Piracicaba — São Paulo

GENERALIDADES

As leveduras pretas são organismos mencionados na literatura científica desde meados do século XIX: tudo que há registrado a seu respeito não encerra detalhes pois o assunto é tratado de maneira um tanto sumária.

Alguns "strains" apresentam predominância de caráter fungiforme e outros, predominância de caráter leveduriforme; entretanto, isto não lhes confere importância de modo que LODDER KREJ-Van RIJ não registram êsse organismo como membro desse grupo de fungos.

Há certas características fundamentais para a devida situação de um organismo na escala taxonômica. Um fungo apresenta colônia com aspecto filamentosos; o talo vegetativo é formado exclusivamente de filamentos nucleares; o talo reprodutivo tem crescimento essencialmente limitado quanto à formação de órgãos esporóforos; os esporos, ao germinar, resultam uma protuberância que se desenvolve em tubo germinativo, o qual se prolonga até atingir uma determinada dimensão. Nesta ocasião forma-se o septo e de novo o tubo se põe a crescer. Em consequência forma-se o micélio verdadeiro. Num levedura o aspecto da colônia é geralmente cremoso. O talo vegetativo é constituído de células esparsas ou em cadeias. O esporo, ao germinar, não forma tubo germinativo, mas emite brotas cujas gemas permanecem presas umas às outras. Nas

espécies formadoras de hifas, estas não se constituem em tubo primitivamente contínuo, mas é de certo modo pré-formado; os elementos se ajustam ponta a ponta constituindo as cadeias micelianas. Oferecem dêste modo pouca resistência, fragmentando-se em seus elementos unitários.

A levedura preta isolada do sapoti é dotada de um fenômeno biológico que não é mencionado nos registros bibliográficos das demais leveduras pretas. Isto lhe confere um certo destaque das demais, constituindo a razão das cogitações do presente estudo.

HISTÓRICO

Há apenas um gênero para as leveduras pretas, o qual teve inicialmente duas espécies. Quem classificou originalmente êsse gênero foi BARY, em 1868, com uma só espécie, a qual chamou de *Dematium pullulans*.

Em 1898, outra espécie foi descrita por MONTOYA Y FLOREZ, que a denominou de *Caraté noir* (1).

CASTELLANI & CHALMERS (1913), ao estudar moléstias tropicais, redescreram a espécie precedente, dando-lhe a denominação de *Montoyella nigra*.

HORTA (1921), estudando uma tinha preta, deu ao agente etiológico o nome de *Cladosporium werneckii*, o qual nada mais era que a própria *Montoyella nigra*.

BERKHOUT (1923), estudando o *Dematium pullulans* classificado por BARY, chamou-o de *Pullularia pullulans*.

CIFERRI & ASHFORD (1929), realizaram um estudo sobre dois "strains" de *P. pullulans*, ambos isolados de pele humana.

HAYTHORN et al (1932) constataram que muitos organismos encontrados num caso de moléstia de Hodking (2) era uma *Monilia*.

DODGE (1935), em seu livro sobre micologia médica, alterou a denominação de *Cladosporium werneckii* para *Dematium werneckii*.

-
- (1) *Caraté* — moléstia que grassava na Colúmbia, produzindo descamação epidérmica e atribuída a *Aspergillus*, *Penicillium* e *Monilia*.
 - (2) Moléstia de Hodking — moléstia que produz engorgitamento das glândulas linfáticas com descoloração dos glóbulos vermelhos.

HOSTER et al. (1948) encontraram *Torula* entre outros organismos infectando um caso de moléstia de Hodking.

DE VRIES (1952), reclassificou o *Dematium werneckii* para *Pullularia werneckii*.

Sumarizando êsses fatos, pode-se resumir o seguinte :

Dematium pullulans de Bary, 1868.

Pullularia pullulans Berkhout, 1923.

Caraté noir Montoya & Florez, 1898.

Montoyella nigra Castellani & Chalmers, 1913.

Cladosporium werneckii Horta, 1921.

Dematium werneckii Dodge, 1935.

Pullularia werneckii de Vries, 1952.

Resultou pois duas espécies para o gênero *Pullularia*: *P. pullulans* e *P. werneckii*.

Em 1956, WYNNE & GOTT isolaram de um granuloma de um paciente portador da moléstia de Hodking uma cultura em tudo semelhante a uma *Pullularia* sp.; notaram, entretanto que essa cepa produzia ácido a partir de carboidratos o que permitia uma discordância com a descrição oficial do gênero. Então estudaram essa nova cepa, daí resultando uma modificação para o gênero, que passa a ter uma nova espécie que é a *Pullularia fermentans*.

Êsses mesmos autores procederam a uma revisão das variedades da espécie *pullulans* e encontraram nelas o mesmo caráter fermentativo e por isso colocaram essas variedades na dependência da espécie *fermentans*.

Em 1959, ULSON apresentou uma tese sôbre as leveduras pretas, incluindo nesse grupo os gêneros: *Torula*, *Hormiscium*, *Dematium*, *Cladosporium*, *Acrotheca*, *Phialophora*, *Fonsecae*, *Sporotrichum* e *Pullularia*.

Como se pode perceber, a descrição desse gênero é integrante frequente da literatura médica, pois tem muitas vezes sido estudada por ter sido isolada de casos patológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Em 1954, isolamos um organismo de um fruto maduro de sapoti. Usamos métodos de nossa rotina, isto é, enriquecimento em meio de LAURENT e posteriormente procedemos ao isolamento e purificação até cultura pura.

A amostra de *Pullularia pullulans* com a qual estabelece-

mos nossa comparação procede da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo, por gentileza da Dra. C. M. ULSON, cujo registro está sob número 12 de sua coleção, cepa que está cadastrada com a denominação de *P. pullulans* (de Bary e Loewy) Berkhout.

Métodos

Caracteres micromorfológicos

Para a apreciação dos caracteres micromorfológicos realizamos cultura em lâmina, crescendo em meio de batata e cultura em gota pendente, usando solução nutritiva de Sabouraud e caldo com 0,1% de KNO₃.

A cultura em lâmina se fez por estria, recobrando-se com laminula, mantendo-se em temperatura ambiente, 28-30° C, em câmara úmida até o desenvolvimento conveniente.

A cultura em gota pendente se fez nos meios nutritivos já mencionados, conservando-se as mesmas condições ambientais da cultura anterior. Realizamos também outra observação micromorfológica, cultivando as cepas em suco de cenoura. Após o desenvolvimento pudemos examinar ao microscópio.

Caracteres morfológicos culturais

Fizemos culturas em tubos, usando os seguintes meios: a) meio de ágar-malte; b) meio de ágar-Sabouraud; e c) meio de ágar-Czapek.

Inoculadas as culturas foram mantidas igualmente as mesmas condições ambientais anteriores.

Caracteres bioquímicos

O aspecto bioquímico foi observado segundo seu comportamento biológico, cultivando-se nos meios apropriados.

a) Produção de H₂S; b) nitratase; c) urease; d) utilização do etanol como única fonte de carbônio; e) auxanograma do nitrogênio proveniente de várias fontes; f) auxanograma dos açúcares; g) zimograma de carboidratos; h) produção de ácido capaz de decompor o carbonato de cálcio; i) ação sobre o leite tornassolado e leite simples; j) hidrólise da arbutina e asculina; e, k) hidrólise da gelatina.

RESULTADOS

Caracteres micromorfológicos

Meio de batata em lâmina

A *Pullularia pullulans* apresenta hifas ora tipo pseudo micélio ora tipo micélio verdadeiro.

Forma clamidosporo com muita frequência, ou marrom ou hialino; formam-se também células esparsas hialinas ou marrons, atingindo estas $22,5 \times 15,0$ micros e as brancas alcançam $15,0 \times 6,25$ micros. As células marrons podem emitir broto que forma pseudo micélio, sem ruptura do envólucro escuro. As células marrons isoladas ou as do clamidosporo, se avolumam tanto que provocam a ruptura do envólucro. Então formam ou um micélio hialino ou clamidosporo hialino, ou ainda clamidosporo marrom.

A levedura preta do sapoti apresenta também micélio verdadeiro e falso. Três tipos de células isoladas se formam: células hialinas, células marrons e células totalmente pretas. As células hialinas medem $15,0 \times 6,25$ micros, as marrons $27,5 \times 15,0$ micros e as células pretas medem $35,0 \times 22,5$ micros. São estas revestidas de parede celular espessa e equinulada. A célula quando madura começa a fendilhar o envólucro preto e essa abertura vai aumentando até que há expulsão da célula interior que é hialina e apta à reprodução.

Em caldo Sabouraud e em caldo com 0,1% de KNO₃

A *Pullularia* forma micélio verdadeiro e micélio retorcido em báculo. A levedura preta do sapoti não forma micélio, mas tem forte multiplicação por brotamento e essas células hialinas formam as células pretas.

Em suco de cenoura.

A *Pullularia* desenvolve micélio com tanta abundância que se forma um feltro muito espesso, com poucas células isoladas hialinas ou marrons. A levedura do sapoti nesse meio não forma absolutamente micélio, mas somente células isoladas hialinas, marrons e muito abundantemente células pretas. Os caracteres micromorfológicos estão representados nos desenhos esquemáticos respectivos.

Caracteres morfológicos

Ágar-malte

A *Pullularia pullulans* forma colônia preta, cotonosa, com pontos brilhantes, centro branco sujo. A levedura preta forma colônia creme rosado, com zonas escuras.

Ágar-Sabouraud

A *Pullularia* forma colônia preta muito resistente em consequência da predominância da fase fungiforme; aspecto rugoso. A levedura do sapoti forma colônia rugosa, branco-creme bordada de preto, resistente.

Agar-Czapek

A *Pullularia* forma colônia cremosa, rósea, superfície rugosa. A levedura do sapoti forma colônia marron que tende ao preto, superfície lisa, espessura muito delgada.

Caracteres bioquímicos

Os caracteres bioquímicos das duas cepas estão representados no quadro I.

QUADRO I

Caracteres bioquímicos da *Pullularia pullulans* e da Levedura preta

	P. pullulans	L. preta
a) Produção de H ₂ S	—	—
b) Nitrataze	—	+
c) Urease	—	+
d) Utilização do etanol como única fonte de C.	veu esp. e preto	cres. escasso e branco
e) Auxanograma do N		
Peptona	+	+
Asparagina	+	+
Ureia	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	+	+
KNO ₃	+	+
f) Auxanograma dos açúcares		
Glucose	+	+
Galactose	+	±
Sacarose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	—
Rafinose	+	+
g) Zimograma de carboidratos		
Glucose	+	+
Galactose	—	—
Sacarose	+	+
Maltose	+	+
Rafinose	+	+
h) Produção de ácido capaz de decompor o CaCO ₃	—	—
i) Ação sôbre o leite tornasolado	alcaliniza	pept. s/ ácido
j) Ação sôbre leite simples	—	peptoniza
k) Hidrólise da asculina	+	+
l) Hidrólise da arbutina	+	+
m) Hidrólise da gelatina	—	+

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Caracteres micromorfológicos

O exame dos caracteres micromorfológicos nos fazem encontrar uma diferença entre ambas as cepas estudadas.

A *P. pullulans* goza da predominância do caráter fungiforme, enquanto a levedura preta tem a predominância do caráter leveduriforme.

As células marrons de ambas as cepas funcionam como esporos assexuados. O que se passa é o seguinte: quando a célula da *Pullularia* se encontra apta à reprodução o envólucro se rompe e a célula emite uma germinação sem se desligar do envólucro escuro. Na levedura preta do sapoti abre-se uma fenda na parede celular e por ela sae a célula pronta para germinar.

As células pretas da levedura isolada do sapoti constituem o maior caráter micromorfológico diferencial porque a *Pullularia* não possui a faculdade de formar células desse tipo. Essas células também têm a função de esporos assexuados, porque só após a perda do envólucro que pôde se reproduzir. O mecanismo é o mesmo da célula marrom, isto é, abre-se uma fenda, expulsa-se a célula interior que então passa a reproduzir.

Caracteres morfológicos

Os caracteres morfológicos não constituem diferença notável nos 3 meios em que ambas as cepas foram cultivadas.

Caracteres bioquímicos

Os caracteres bioquímicos das duas cepas experimentadas apresentam certa disparidade quando comparados entre si, como se pode verificar pelo exame do quadro I.

Dentre 26 reações a que submetemos as duas cepas, observou-se um comportamento diferente entre ambas em oito dessas reações, correspondendo a 30,76% sôbre o total.

CONCLUSÕES

A *Pullularia pullulans* apresenta diferença morfológica e biológica da levedura preta do sapoti.

A *Pullularia pullulans* goza da predominância da fase fungiforme que é genêticamente diferente da fase leveduriforme, a qual caracteriza a levedura preta do sapoti, ora estudada.

Destaca-se também a presença de células pretas com parede celular espessa e equinulada, dotadas de mecanismo especial para expulsão da célula interior.

A discordância da habilidade bioquímica entre as duas cepas é outro caráter que consente admiti-las como duas cepas diferentes.

Considerando que existe diferença no caráter micromorfológico e na capacidade biológica, nos permitimos julgá-la como uma espécie diferente.

Apenas a habilidade fermentativa para destacar uma espécie e depois o aspecto fungiforme ou leveduriforme para colocar em relêvo as outras 2 espécies, segundo WYNNE & GOTT (1956) não nos parece indicação suficiente para a taxonomia.

Este alvitre é decorrente da situação criada por esta cepa isolada do sapoti, que é fermentativa como a *P. pullulans* também o é, mas possui a fase leveduriforme em predominância e vários caracteres biológicos em desacôrdo com a *P. pullulans*. Não há possibilidade de se colocar a levedura preta apenas como uma variedade dentro da espécie, uma vez que são muitos os caracteres diferenciais.

Compete pois criar uma nova espécie que esteja de acôrdo com todos os seus caracteres.

RIASSUNTO

L'A. ha stuadiato mediante prove di micromorfologia ed fisiologia la differenza tra um ceppo di *Pullularia pullulans* ed un altro di un lievito nero isolato da fruto maturo di *Achras sapota* L.

E' stato osservato le varie differenze tra la micromorfologia di ambedue, inoltre dalla differenza della rispettiva capacità biologica.

Anche é stato dimostrato la necessità d'essere istituito una nuova sp. che possa riaggiungere gli elementi che oltre alla capacità fermentativa abbiano differenze nella biologia; cioè, non é sufficiente soltanto lá capacità fermentativa nel riguardo della ricerca di una sp.

BIBLIOGRAFIA

- ULSON, E. M., 1959 — *Contribuição para o estudo das chamadas "Leveduras Pretas"*, Fac. Med. Univ. S. Paulo, tese.
- WYNNE, E. S. & C. L. GOTT, 1956 — A proposed revision of the genus *Pullularia*. *J. gen. Microbiol.* 14: 512-519.

LEVEDURA PRETA DO SAPOTI



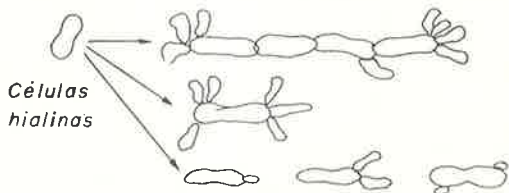
Células hialinas : (15,0 x 6,25) μ



Células pretas : (35,0 x 22,5) μ



Células marrons : (27,5 x 15,0) μ



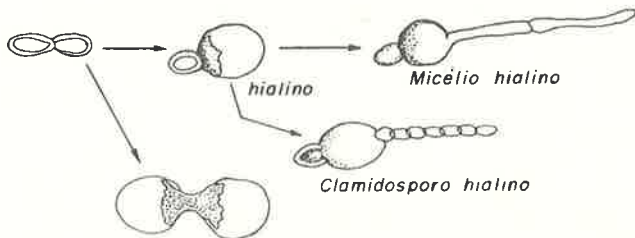
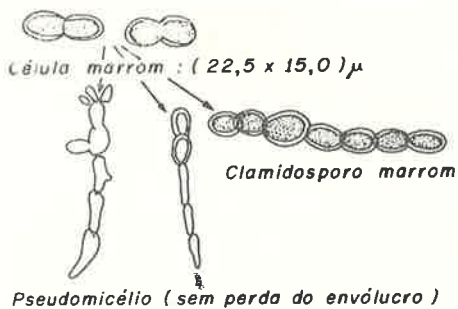
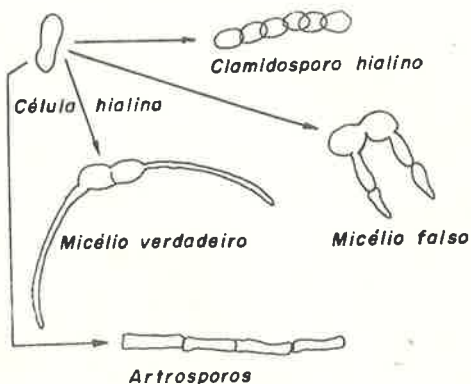
Células hialinas

Tendência a formação de gemas é predominância do caráter leveduriforme.

PULLULARIA PULLULANS



Célula hialina : (15,0 x 6,25) μ



Tendência a formação de micélio e predominância de caráter fungiforme