

ISOLAMENTO E CONTAGEM DA MICROBIOTA DA CASCA E POLPA DO FRUTO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) EM DOIS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

Tiago Iglesias Machado²; Marcos Vinícius Pereira Barros³; Larissa Márcia Anastácio⁴; Vilian Borchardt Bullergahn⁵; Tomás Gomes Reis Veloso⁶; Marliane de Cássia Soares Silva⁷; Maria Catarina Megmuni Kasuya⁸; Aldemar Polonini Moreli⁹; Lucas Louzada Pereira¹⁰.

1. Trabalho financiado pela Cooperativa de Crédito de Livre Admissão Sul Serrana do Espírito Santo - Sicoob e pelo CNPq.
2. Estudante do curso de Agronomia. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. tiagomiglesias@gmail.com
3. Estudante do curso de Agronomia. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. marcosvinifda@hotmail.com
4. Estudante do curso de Engenharia Agrícola e Ambiental. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. larissa.anastacio@ufv.br
5. Estudante do curso de Agronomia. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. vilianborchardt@gmail.com
6. Doutorando. Ms. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. tomasgomesrv@gmail.com
7. Pós doutora Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. mcassiabio@yahoo.com.br
8. Professora Dra. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. mkasuya@ufv.br
9. Professor Dr. do Instituto Federal Do Espírito Santo, Departamento de Administração, Venda Nova Do Imigrante. aldemar.moreli@ifes.edu.br
10. Professor Dr. Do Instituto Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciência E Tecnologia De Alimentos, Venda Nova Do Imigrante. lucaslozada@hotmail.com

RESUMO: A expressão final da qualidade da bebida do café é o resultado de um conjunto complexo de interações de fatores bióticos e abióticos, entre os quais se destaca a microbiota presente nos frutos durante os vários estádios de maturação. Este trabalho teve como objetivo quantificar e isolar populações microbianas encontradas na superfície da casca e polpa dos frutos durante dois estágios de desenvolvimento maduro e verdoengo. As amostras de frutos de café arábica foram coletadas em no Estado do Espírito Santo em duas propriedades. A propriedade 1 está localizada a 1005 metros de altitude com Face de sol ao Leste e a Propriedade 2 está localizada a 1021 metros de altitude com Face de sol ao Sul. Os grãos foram lavados com solução salina e essa foi plaqueada para determinar o número de células viáveis da casca pela técnica de contagem de colônias em placas de Petri. Para isolamento dos microrganismos oriundos da polpa do fruto de café, imergiu-se os grãos de café em álcool 70 % por 1 minuto, NaClO 2.5 % por 10 min e lavou-os cinco vezes em água destilada estéril. Os frutos foram transferidos para uma placa de petri estéril e abertos com bisturi e pinça. O grão foi transferido para um microtubo de 2 mL, o qual foi agitado em vortex por 30 segundos. O homogeneizado foi utilizado para fazer 3 diluições: 10-1, 10-2 e 10-3 e plaqueadas em BDA. A seguir foi feito o isolamento de microrganismos, a partir de colônias morfológicamente distintas, em cada uma das placas. Como resultado, as unidades formadoras de colônias (UFC) na superfície da casca mostraram que em ambas as propriedades, o número de colônias foi maior nos frutos maduros em comparação aos frutos verdoengos, sendo que, ao contrastar as duas propriedades observou-se que a propriedade 1 obteve 24,1 vezes mais UFC no fruto maduro do que no verdoengo e já na propriedade 2 essa relação foi de 88,6 vezes. E na parte interna da polpa do fruto, essa relação foi de 13,8 x maior no fruto maduro do que no verdoengo. Fatores como a maior presença de lignina e polifenóis como o tanino e outras e substâncias que inibem o ataque e desenvolvimento de microrganismos corroboram com os dados obtidos. As culturas microbianas isoladas foram cultivadas em meio BDA com glicerol e armazenadas no ultrafreezer do Laboratório de Associações Micorrízicas da UFV, para futuras análises.

PALAVRAS-CHAVE: café, bactérias, leveduras, fungos filamentosos, contagem.

ISOLATION AND COUNTING OF COFFEE FRUIT (*Coffea arabica* L.) SHELL AND PULP MICROBIOTA IN TWO DEVELOPMENT STAGES

ABSTRACT: The final expression of coffee drink quality is the result of a complex set of interactions of biotic and abiotic factors, among which stands out the microbiota present in the fruits during the various ripening stages. This work aimed to quantify and isolate microbial populations found on the surface of the peel and pulp of fruits during two stages of mature and verdoengo development. The samples of arabica coffee fruits were collected in the state of Espírito Santo in two properties. Property 1 is located at 1005 meters altitude with Sun Face to the East and Property 2 is located at 1021 meters altitude with Sun Face to the South. Grains were washed with saline and plated to determine the number of viable bark cells by colony counting technique in Petri dishes. To isolate the microorganisms from the coffee fruit pulp, the coffee beans were immersed in 70% alcohol for 1 minute, 2.5% NaClO for 10 min and washed five times in sterile distilled water. The fruits were transferred to a sterile petri dish and opened with scalpel and forceps. The grain was transferred to a 2 mL microtube, which was vortexed for 30 seconds. The homogenate was used to make 3

dilutions: 10-1, 10-2 and 10-3 and plated on BDA. Next, microorganisms were isolated from morphologically distinct colonies in each plate. As a result, the colony forming units (CFU) on the surface of the peel showed that in both properties, the number of colonies was higher in the ripe fruits compared to the verdoengos fruits. Property 1 obtained 24.1 times more CFU in ripe fruit than in verdoengos and in property 2 this ratio was 88.6 times. And in the inner part of the fruit pulp, this ratio was 13.8 x higher in ripe fruit than in verdoengo. Factors such as increased presence of lignin and polyphenols such as tannin and others and substances that inhibit the attack and development of microorganisms corroborate the data obtained. The isolated microbial cultures were grown in glycerol BDA medium and stored in the ultrafreezer of the UFV Mycorrhizal Associations Laboratory for future analysis.

KEY WORDS: coffee, bacteria, yeast, filamentous fungi, counting.

INTRODUÇÃO

Por muitas décadas o café constitui-se como um dos cultivos mais rentáveis na América Latina. O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador mundial de café e segundos dados da OIC. A expressão final da qualidade da bebida do café é o resultado de um conjunto complexo de interação de fatores bióticos e abióticos, entre os quais se destaca a microbiota presente nos frutos durante os vários estádios de maturação. A decomposição natural da mucilagem de frutos de café envolve diferentes microrganismos provenientes da superfície do fruto e do solo (Thompson et al., 1997). A microbiota natural presente no grão de café é composta por fungos, leveduras e bactérias, e suas atividades metabólicas podem influenciar na qualidade final da bebida. A diversidade microbiana presente nos grãos de café depende de fatores ambientais da região de cultivo como umidade, temperatura, época do ano, população do solo e variedade do café cultivado e forma de manejo da cultura. As contaminações microbianas são geralmente favorecidas pela falta de cuidado durante as operações agrícolas. Essas contaminações podem comprometer a qualidade do produto principalmente em situações como a secagem desuniforme dos grãos de café, grãos colhidos do chão ou grãos que permanecem sob chuva durante o processo de secagem, portanto, a predominância de um determinado grupo microbiano durante o tempo de secagem pode condicionar diferentes alterações no produto final. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram quantificar e isolar populações de microrganismos na superfície dos frutos durante os estádios de desenvolvimento verdoengo e maduro de frutos de café (*Coffea arabica* L.) produzidos em duas lavouras oriundas do Estado do Espírito Santo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem: As amostras de frutos de café (*Coffea arabica* L.) foram coletadas em junho de 2019, em duas lavouras localizadas no estado do Espírito Santo, sendo a Propriedade 01 está localizada a 1005 metros de altitude com Face de sol ao Sul e a Propriedade 02, localizada a 1021 metros de altitude com Face de sol ao Sul. Os frutos foram amostrados nos estádios de desenvolvimento denominados de verdoengo e maduro. Em cada estágio de desenvolvimento foram coletados 10 frutos sadios provenientes de três plantas. Os frutos foram coletados e transportadas para o Laboratório de Associações Micorrízicas - BIOAGRO/Universidade Federal de Viçosa. Processamento das amostras: No laboratório, cada amostra composta por 10 frutos foram utilizadas para isolar microrganismos da parte externa do fruto de café. Os frutos foram colocados em tubo falcon e lavados em 10 mL de solução salina. O tubo foi agitado em Vortex por 30 segundos. Após a homogeneização foi utilizado para realizar diluições de até 1000 X (10^{-3}). Para isso foram utilizados microtubos de 2 mL onde 900 μ L de solução salina foram misturadas com 100 μ L do homogeneizado. As diluições foram plaqueadas em meio BDA. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas e o número de colônias foi determinado.

Para isolamento dos microrganismos oriundos da polpa do fruto de café, os grãos de café foram colocados em álcool 70 % por 1 minuto, NaClO 2.5 % por 10 min e lavados cinco vezes em água destilada estéril. Os frutos foram transferidos para uma placa de petri estéril e abertos com bisturi e pinça. O grão foi transferido para um microtubo de 2 mL, o qual foi agitado em vortex por 30 segundos. O homogeneizado foi utilizado para fazer 3 diluições: 10-1, 10-2 e 10-3. As diluições também foram plaqueadas em BDA. As populações microbianas foram expressas como unidades formadoras de colônias (UFC) em base logarítmica 10. O isolamento de cada cultura foi feito a partir de uma colônia representativa de cada tipo morfológico, a qual foi transferida para nova placa de meio BDA para obtenção de cultura pura. As culturas de bactérias e leveduras isoladas foram catalogadas e conservadas no ultrafreezer a -80°C.

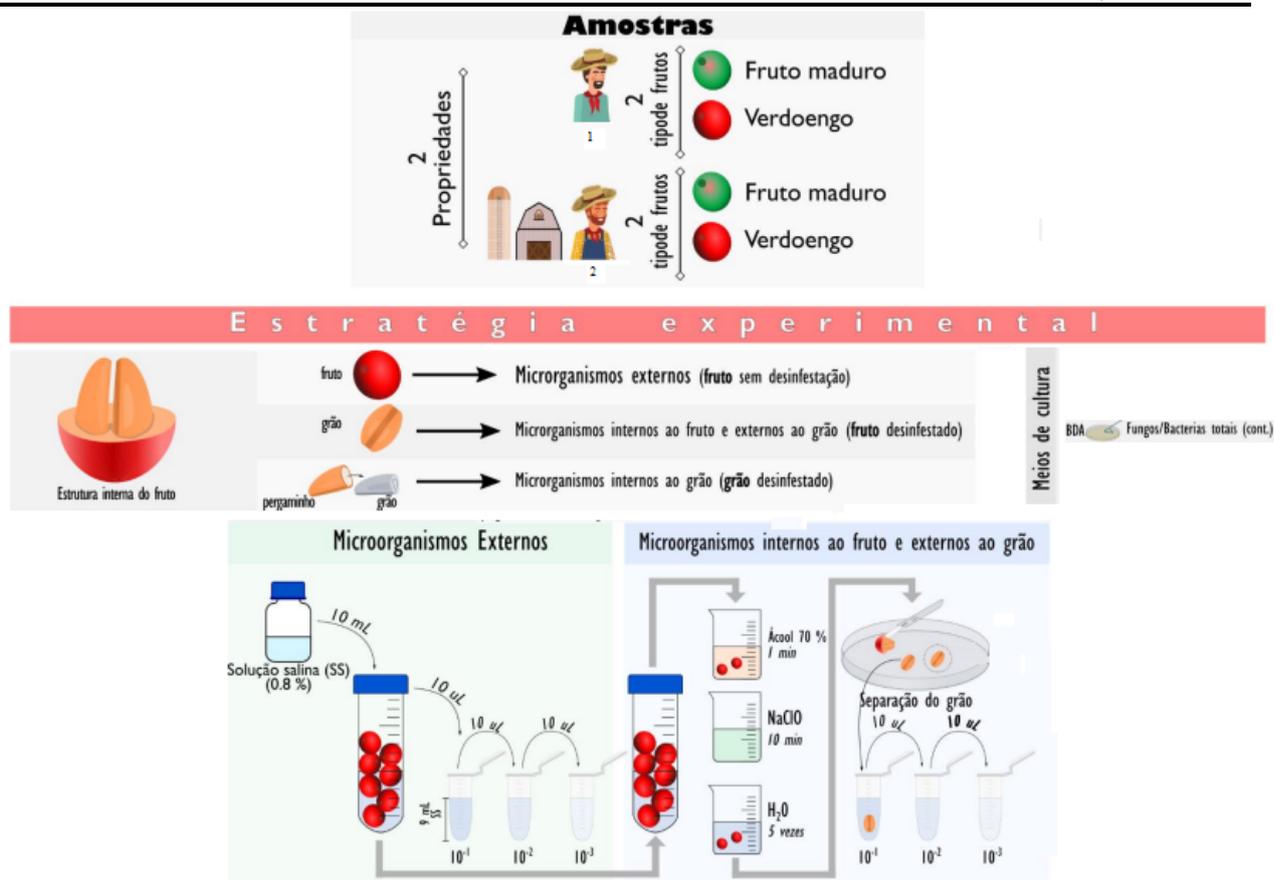


Figura 1. Protocolo de isolamento de microrganismos da casca e polpa do fruto de café (*Coffea arabica* L.). Primeira etapa seleção dos frutos maduros e verdeoengos de duas propriedades. Etapa 2. Desinfestação. Etapa 3. Diluição seriada. Etapa 4. Plaqueamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Thompson (1997), bactérias, leveduras e fungos filamentosos que participam da fermentação de frutos de café originam-se da superfície do fruto e do solo. O isolamento de microrganismos totais foi realizado a partir da superfície da casca e da polpa dos frutos de café nos dois estádios de desenvolvimento e em ambas as propriedades (Tabela 1 e 2). As Unidades formadoras de colônias (UFC) isoladas da casca mostraram que em ambas as propriedades, o número de colônias foi maior nos frutos maduros em comparação aos frutos verdeoengo, sendo que, ao contrastar as duas propriedades notamos que a propriedade 1 obteve 24,1 vezes mais UFC no fruto maduro do que no verdeoengo e já na propriedade 2 essa relação foi de 88,6 vezes a mais no maduro em comparação ao verdeoengo (Tabela 2), ou seja, é importante que o produtor de café priorize sempre a colheita dos frutos com estágio de maturação plena. E região da polpa do fruto da propriedade 1 essa relação foi de 13,8 vezes maior no fruto maduro do que no verdeoengo (Tabela 2). A contagem do número de colônias (UFC) na região externa a casca dos frutos maduros e verdeoengos de café nas duas propriedades e a contagem do número de colônias isoladas da polpa da propriedade 1 foram representados na base logarítmica 10 e obtiveram significância estatística pelo teste F a 0.05 de probabilidade (Figura 2). Assim, para os microrganismos isolados da casca, obtiveram-se na propriedade 1 valores expressos em $\text{Log}_{10}(\text{UFC}/\text{mL})$ de 4,9 oriundos de frutos verdeoengos e 6,3 para frutos maduros. Enquanto que na propriedade 2 esses valores foram de 3,9 para frutos verdeoengos e 5,9 para frutos maduros. Para a análise dos microrganismos da polpa avaliou-se apenas a propriedade 1 e esta relação foi de 4,2 para frutos verdeoengos e 5,3 para frutos maduros, também expressos em $\text{Log}_{10}(\text{UFC}/\text{mL})$. Alguns fatores que corroboram com tais resultados são as características físicas e bioquímicas de cada fruto, pois frutos mais verdes tendem a ter maior presença de lignina e polifenóis como o tanino além de substâncias que inibem o ataque e desenvolvimento de microrganismos [VIGNOLI et al., 2011](#). Além disso, os carboidratos complexos estão presentes nos frutos verdes e são mais difíceis de serem assimilados pelos microrganismos do que os carboidratos simples que predominam nos frutos maduros.

Tabela 1: Contagem do número de colônias da casca e polpa dos frutos de café maduros e verdoengos.

Nome da amostra	Local	Produtor	Tipo de fruto	Diluição	Repetição	Número de colônias	UFC	Log(UFC)
E1	externo	2	maduro	0,001	1	66	660000	5,819544
E1	externo	2	maduro	0,001	2	101	1010000	6,004321
E1	externo	2	maduro	0,001	3	67	670000	5,826075
E2	externo	2	verdoengo	0,1	1	96	9600	3,982271
E2	externo	2	verdoengo	0,1	2	74	7400	3,869232
E2	externo	2	verdoengo	0,1	3	94	9400	3,973128
E3	externo	1	maduro	0,001	1	198	1980000	6,296665
E3	externo	1	maduro	0,001	2	205	2050000	6,311754
E3	externo	1	maduro	0,001	3	184	1840000	6,264818
E4	externo	1	verdoengo	0,01	1	84	84000	4,924279
E4	externo	1	verdoengo	0,01	2	79	79000	4,897627
E4	externo	1	verdoengo	0,01	3	80	80000	4,90309
M3	mediano	1	maduro	0,01	1	206	206000	5,313867
M4	mediano	1	verdoengo	0,1	1	149	14900	4,173186

Tabela 2: Proporção do número de colônias formadas entre os frutos maduros e verdoengos da casca do café (*Coffea arabica* .L) nas duas propriedades.

Produtor	Tipo de Fruto	Médias		Aumento (Maduro/Verde)	
		UFV/mL	log(UFC/mL)	UFC	Log(UFC)
2	Maduro	780000	5.88	88.6	1.49
	Verde	8800	3.94		
1	Maduro	1956667	6.29	24.2	1.28
	Verde	81000	4.91		

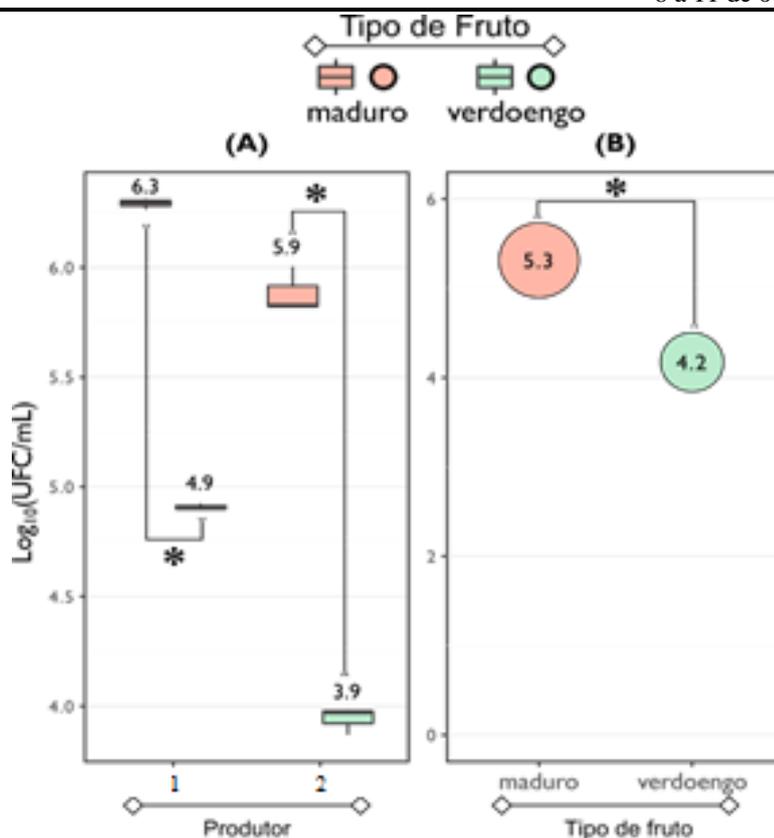


Figura 2: (A) Contagem do número de colônias na região externa a casca dos frutos maduros e verdoengos de café em duas propriedades. (B) Contagem interna referente a polpa da propriedade 1. Os valores estão representados na base logarítmica 10. Asteriscos (*) indicam significância estatística pelo teste F a 0.05 de probabilidade.

CONCLUSÕES

- 1 - Frutos maduros apresentam uma maior população de microrganismos na superfície que frutos verdoengos.
- 2 - No processo de isolamento dos frutos, observou-se uma grande quantidade de microrganismos que serão identificadas através de futuras análises de DNA e morfologia para que se avalie a diversidade e grupos presentes nessas regiões.
- 3 - Além disso, espera-se selecionar alguns isolados para futuras aplicações na fermentação e produção de café.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Cooperativa de Crédito de Livre Admissão Sul Serrana do Espírito Santo – Sicoob, pelo financiamento da pesquisa, pelo provimento de recursos para desenvolvimento das ações, bem como o Ifes, pelo suporte laboratorial para condução dos estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; SOUZA, S.M.C. Fatores que afetam a qualidade do café. Informe Agropecuário 18(187): 5-2, 1997.
- MCINROY J.A. & KLOPPER J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant and Soil 173: 337-342, 1995.
- ROUSSOS, S.; AQUIAHUATL, M. D. et al. Biotechnological management of coffee pulp: isolation, screening, characterization, selection of caffeine degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 42, n.5, p. 756-762, 1995