

## PERFIL DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS E FUNGOS EM FRUTOS DE CAFÉ LOCALIZADOS EM DIFERENTES ALTITUDES E FACES DE EXPOSIÇÃO AO SOL.

Marliane de Cássia Soares Silva<sup>2</sup>; Tomás Gomes Reis Veloso<sup>3</sup>; Edynei Miguel Cristino<sup>4</sup>; Wilton Soares Cardoso<sup>5</sup>; Maria Catarina Megumi Kasuya<sup>6</sup>; Lucas Louzada Pereira<sup>7</sup>;

1. Trabalho financiado pela Cooperativa de Crédito de Livre Admissão Sul Serrana do Espírito Santo – Sicoob e CNPq.

2. Pós doutora da Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. [mcassiabio@yahoo.com.br](mailto:mcassiabio@yahoo.com.br)

3. Doutorando. Ms. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. [tomasgomesrv@gmail.com](mailto:tomasgomesrv@gmail.com)

4. Bolsista. Graduado em Licenciatura em Educação no Campo. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. [edyneimiguel@yahoo.com.br](mailto:edyneimiguel@yahoo.com.br)

5. Professor Dr. do Instituto Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciência E Tecnologia de Alimentos, Venda Nova do Imigrante. [wiltonscardoso@yahoo.com.br](mailto:wiltonscardoso@yahoo.com.br)

6. Professora Dra. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. [mkasuya@ufv.br](mailto:mkasuya@ufv.br)

7. Professor Dr. do Instituto Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Venda Nova do Imigrante. [lucaslozada@hotmail.com](mailto:lucaslozada@hotmail.com)

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil da comunidade de fungos e bactérias presentes no fruto de *Coffea arabica* L. coletados em diferentes propriedades, localizados em diferentes altitudes, no Estado do Espírito Santo. Os frutos foram coletados três locais em cada propriedade. Cada local onde foi realizada a coleta era composto por 3 plantas e foram coletados 10 frutos por planta. Foram avaliadas quatro áreas experimentais com altitude variando de 735 a 1.078 m de altitude. O DNA genômico das amostras compostas foi extraído utilizando o kit Nucleo Spin Soil, de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi aplicada a técnica nested PCR-DGGE para obter o perfil da comunidade. A análise do dendrograma mostrou dois grupos principais para bactérias. O primeiro grupo (FC e FA) com 75 % de similaridade envolvendo as amostras com altirude variando de 735 a 799 m e o segundo (LP e DB) com 85 % de similaridade envolvendo as amostras com altitude variando de 969 a 1068 m. Já para a comunidade de fungos o perfil foi mais homogêneo, onde um grupo com 80 % de similaridade foi observado e as réplicas foram mais distribuídas ao longo do gel. A análise de cordenadas principais mostrou grande influência da altitude na comunidade presente na face sul. Conclui-se que a altitude e a face de exposição ao sol afetam o perfil da comunidade de bactérias. Os fungos são menos sensíveis às mudanças no perfil devido a estas variações. Assim, considera-se necessário entender os fatores que afetam a comunidade de microrganismos presentes nos frutos de café podem auxiliar na promoção da qualidade destes cafés.

**PALAVRAS-CHAVE:** microrganismos, DGGE, diversidade, *Coffea arabica*

## PROFILE OF THE COMMUNITY OF BACTERIA AND FUNGI IN COFFEE FRUITS LOCATED AT DIFFERENT ELEVATIONS AND SLOPE FACES WITH RESPECT TO THE SUN.

**ABSTRACT.** The aim of this study was to evaluate the fungi and bacteria community profile present on fruits of *Coffea arabica* L. collected in farms located at different elevations. Fruits were sample at three sites in each farm and each site was composed by three coffee plants and we have collected ten fruits per plant. Four farms were evaluated in elevations ranging from 735 to 1,078 m. The genomic DNA from the assembled samples was extracted using the Nucleo Spin Soil Kit according to the manufacturer's recommendations. Later, we have used the nested PCR-DGGE technique to analyze the community profile. Dendrogram analysis showed two major groups to bacteria. The first group (FC and FA) whit 75 % of similarity, involves the farms located in elevations ranging from 735 to 799 m and the second (LP and DB) whit 85 % of similarity, involves the farms located in elevations ranging from 969 to 1068 m. The fungi community showed to be more homogeneous where a larger group with 80 % similarity was observed and the replications were more distributed along the gel. In the analysis of main coordinates (PCA), we also observed a greater influence of elevation in the south-facing slope. The elevation and the face of exposure to the sun affect the profile of the community of bacteria. Fungi are less sensitive to changes in the profile due to these variations. Understanding the factors that affect the community of microorganisms present in coffee fruits can help in promoting the quality of these coffees.

**KEY WORDS:** microorganism, DGGE, diversity, *Coffea arabica*

## INTRODUÇÃO

O cafeeiro é originário de regiões montanhosas da Etiópia, entre 1000 a 2000 m de altitude (Daba et al., 2019). É a segunda bebida mais consumida em todo mundo. Entender os parâmetros que afetam a qualidade da bebida é o que tem incentivado diversas pesquisas nos últimos anos (Chalfoun et al., 2018). No Brasil a produção de café ocorre



% de formamida). Os géis foram submetidos à eletroforese vertical por 10 min a 120 V seguidos de 12 h a 100 V à temperatura de 60 °C, e posteriormente corado por 40 min com SYBR Gold (1x) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) e fotografado sob luz ultravioleta no fotodocumentador Molecular Imaging (Loccus biotecnologic L-Pix Chemi). Os perfis das bandas foram analisados e comparados usando o software BioNumerics (Version 5.1, Applied Maths NV). As análises estatísticas foram realizadas no software R (v. 3.5.1; R Core Team, 2018).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comunidade bacteriana presente nos frutos de café formou dois grupos principais (Figura 2 A). Um formado por FC e FA com 75 % de similaridade (sendo um da face leste e outro oeste) e outro formado por LP e DB com 85 % de similaridade e estão na face sul). As amostras da face sul são também as que estão localizadas a maiores altitudes (LP 1078,08 m e DB a 969 m). Sabe-se que alterações climáticas e microclimáticas influenciam diretamente a microbiota associada ao café. Por exemplo, a estrutura da comunidade bacteriana pode variar em função da declividade, uma vez que fatores topográficos provocam diferenças no microclima (Yuan et al., 2015). Em localidades com temperaturas mais amenas, as quais normalmente são encontradas em altas elevações, ocorre influência na fase de alocação de fotoassimilados em frutos e folhas de cafeeiro (Laviola et al. 2007). Já a comunidade de fungos mostrou-se mais homogênea entre as áreas avaliadas, onde observou-se um grupo maior com 80 % de similaridade e as repetições ficaram mais distribuídas ao longo do gel (Figura 2 B).

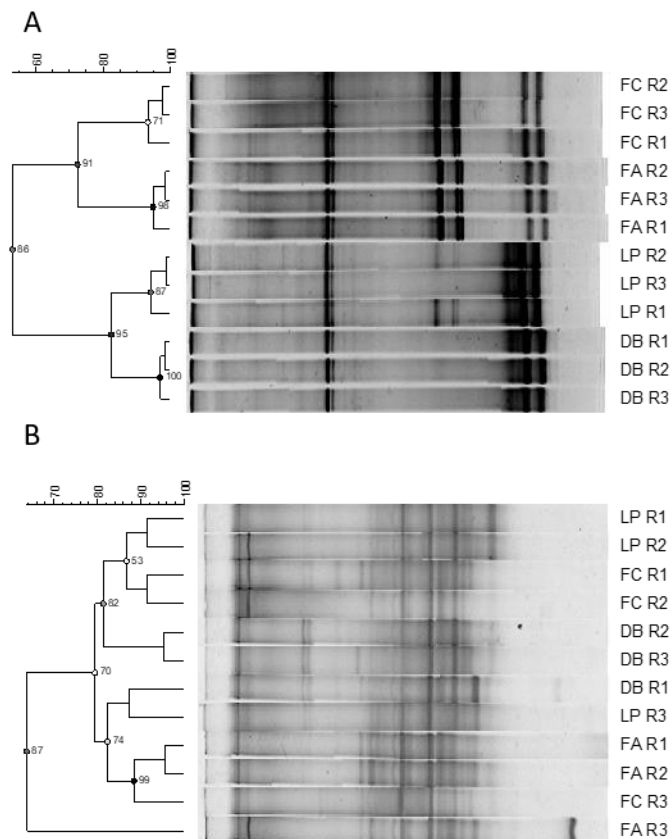


Fig. 2- Dendrograma do perfil da comunidade de Bacterias (A) e Fungos(B) obtidos pela técnica de DGGE. Utilizando a correção de Person UPGMA. FC (face oeste), FA (face leste), LP e DB (face sul) R1, R2, R3: réplicas das amostras.

Na análise de coordenadas principais (PCA), observamos também maior influência da altitude na comunidade microbiana presente na face sul (Figura 3 A e B). Estudos mostram que a qualidade do café depende de vários fatores como a altitude, a face de exposição ao sol, a declividade (Avelino et al., 2005; Guyot et al., 1996) entre outros fatores topográficos e microclimáticos, bem como da microbiota associada (Haile and Kang, 2019).

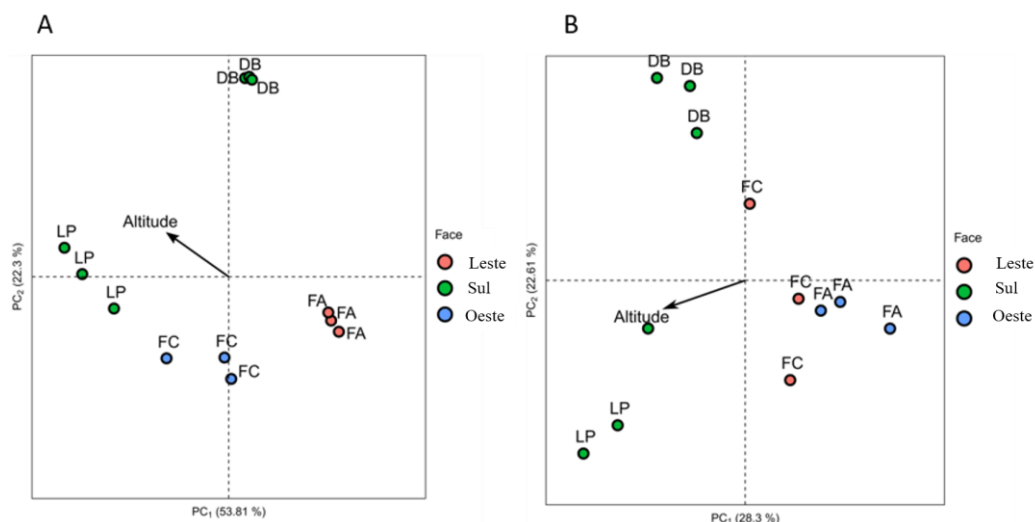


Fig. 3- Análise de correspondência canônica (CCA) para (A) bactérias e (B) fungos baseada no perfil de bandas obtidas pela técnica de DGGE. Setas indicam gradiente de variação ambiental e cores distintas indicam diferentes altitudes. FC (face oeste), FA (face leste), LP e DB (face sul).

Assim, é possível compreender que os estudos relativos as populações microbianas (bactérias, fungos e leveduras), presentes na microbiota do cafeeiro devem ter maior atenção no tocante a formulação de estratégias voltadas para a melhoria da qualidade do café, ou seja, estudos desta natureza poderão propor ações de otimização do pós-colheita, na fase de processamento, com aplicação de técnicas mais eficientes, em função da microbiota predominante em cada microrregião, abrindo assim, um leque de oportunidades para pesquisadores, extensionistas e finalmente, beneficiando produtores e consumidores de cafés especiais.

## CONCLUSÕES

A altitude e a face de exposição ao sol afetam o perfil da comunidade de bactérias. Por outro lado, os fungos são menos sensíveis as mudanças no perfil devido a estas variações. Entender os fatores que afetam a comunidade de microrganismos presentes nos frutos de café pode auxiliar na promoção da qualidade destes cafés.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVELINO, J.; BARBOZA, B.; ARAYA, J.C.; FONSECA, C.; DAVRIEUX, F.; GUYOT, B. AND CILAS, C. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosí and Santa Maria de Dota. *J Sci Food Agric* 85:1869–1876. 2005.
- DABA, G.; HELSEN, K.; BERECHA, G. LIEVENS, B.; DEBELA, A. HONNAY, O. Seasonal and altitudinal differences in coffee leaf rust epidemics on coffee berry disease-resistant varieties in Southwest Ethiopia. *Tropical Plant Pathology* DOI: 10.1007/s40858-018-0271-8. 2019.
- CHALFOUN, M. S.; ANGÉLICO, C. L. AND RESENDE, M. L. V. Brazilian Coffee Quality: Cultural, Microbiological and Bioactivity Aspects. *World Journal of Research and Review (WJRR)*, Volume-6, Issue-1, 50-58, 2018.
- CONAB. ISSN 2318-7913 Acomp. safra brasileira de café, v. 5– Safra 2019, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-61, maio 2019.
- GUYOT, B., GUEULE, D., MANEZ, J. C., PERRIOT, J. J., GIRON, J., & VILLAIN, L. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabica. *Plantations, Recherche, Développement*, 3, 272–280. 1996.
- HAILE, M AND KANG, W. H. Review Article: The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. *Journal of Food Quality* 1-6, 2019.
- LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M., (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley and Sons, p. 115-175. 1991.
- LAVIOLA, B. G.; MARTINEZ, H. E. P.; SALOMÃO, L. C. C.; CRUZ, C. D.; MENDONÇA, A. M. AND NETO, A. P. Assimilate allocation in fruits and leaves of coffee plants cultivated in two altitudes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.42, n.11, p.1521-1530, nov. 2007.
- NÜBEL U, ENGELEN B, FELSKE A, SNAIDR J, WIESHUBER A, AMANN RI, LUDWIG W & BACKHAUS H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178: 5636–5643.1996.

- PEREIRA, G. V. M.; SOCCOL, V. T.; PANDEY, A.; MEDEIROS, A. B. P.; LARA, J. M. R. A.; GOLLO, A. L. SOCCOL, C. R. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology* 188, 60–66 2014.
- PEREIRA, L. L., MORELI, A. P., MOREIRA, T. R., CATEN, C. S. TEN, MARCATE, J. P. P., DEBONA, D. G., & GUARÇONI, R.C.(2019). Improvement of the Quality of Brazilian Conilon through Wet Processing: A Sensorial Perspective. *Agricultural Sciences*. <https://doi.org/10.4236/as.2019.103032>
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna. 2018
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS, J.D.; WERNARD, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2614-2621. 1999.
- VAINIO EJ, HANTULA J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res*. 104:927–936. 2000.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. p. 315-322. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J., eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA. 1990.
- YUAN YL, SI GC, WANG J, ET AL. Effects of microclimate on soil bacterial communities across two contrasting timberline ecotones in southeast Tibet. *European Journal of Soil Science* 66: 1033–1043. 2015.