

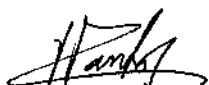
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**LEVEDURAS CONTAMINANTES DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA: DIVERSIDADE TAXONÔMICA E METABÓLICA**

Parecer

Este exemplar corresponde a reatada final da Tese defendida por Mônica Maria de Sillos Castro e aprovada pela comissão julgadora em 14.07.95.

Mônica Maria de Sillos Castro



Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos  
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção de título de mestre em Ciência de Alimentos

Campinas  
1995

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	
	T/UNICAMP
	C279L
V.	
	25451
	433/95
	<input type="checkbox"/> X
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/09/95
N.º CPD	

CM-00076443-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

C355L  
C279L

Castro, Mônica Maria de Sillos

Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica / Mônica Maria de Sillos Castro. Campinas, SP: [s.n.], 1995.

Orientador: Vanderlei Perez Canhos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Microbiologia - Classificação. 2. Levedos. 3. Fermentação alcoólica. 4. Metabolismo microbiano. I. Canhos, Vanderlei Perez. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

**BANCA EXAMINADORA**



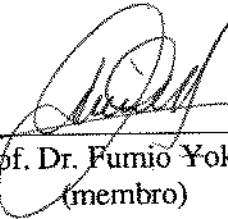
---

Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos  
(orientador)



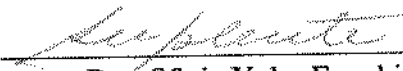
---

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
(membro)



---

Prof. Dr. Fumio Yokoya  
(membro)



---

Dra. Sílvia Yuko Eguchi  
(membro)

Campinas, 14 de junho de 1995.

Aos meus pais,  
Antonio Augusto e Miriam  
e aos meus irmãos,  
Gut e Reinaldo  
dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos pela orientação e pelo estímulo recebido durante o mestrado.

À Dra. Sílvia Yuko Eguchi pela amizade, pelo incentivo e pelo acompanhamento deste trabalho.

À Usina Costa Pinto Açúcar e Álcool S/A e à Usina Açucareira Santa Cruz S/A pelas visitas e permissões das coletas de amostras, indispensáveis para a realização desta pesquisa.

À Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” que proporcionou as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho, pelo auxílio de seus pesquisadores e corpo técnico-administrativo sempre solidários em todos os momentos.

Ao RHAE/CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos técnicos da Coleção de Culturas Tropical pelo trabalho de liofilização das culturas.

À Cristina Y. Umino pelo trabalho de fotomicrografia e pela amizade e carinho que sempre demonstrou.

À Marinez F. de Siqueira pelo auxílio na elaboração das tabelas e gráficos.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência, companherismo e auxílio mútuo.

À Gisele M. Mecate Prada pelas valiosas sugestões, pelo apoio nos momentos difíceis e pela amizade durante nossos longos anos de convivência.

À Luciana M. Baiocco por compartilhar dos meus momentos de alegria e incentivar-me nos momentos de dificuldade.

A todos que, de alguma forma, participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

## CONTEÚDO

CONTEÚDO .....	i
CONTEÚDO DAS TABELAS.....	iii
CONTEÚDO DAS FIGURAS .....	iv
RESUMO .....	v
SUMMARY .....	vi
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1- Aspectos gerais da taxonomia de leveduras.....	3
2.2- Microrganismos contaminantes do processo de produção de álcool .....	8
2.3- Leveduras contaminantes em usinas de açúcar e álcool e em outros processos fermentativos.....	14
2.4- Meios de cultura para detecção de leveduras em processos fermentativos .....	20
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1- Coleta das amostras.....	23
3.2- Processamento das amostras.....	24
3.2.1- Contagem de microrganismos.....	24
3.2.2- Isolamento e purificação de leveduras.....	25
3.2.3- Preservação dos isolados .....	25
3.3- Caracterização das leveduras .....	26
3.3.1- Características da reprodução vegetativa .....	27
3.3.1.1- Morfologia das células vegetativas.....	27
3.3.1.2- Microcultivo.....	28
3.3.1.3- Formação de balistosporos .....	28
3.3.2- Características da reprodução sexuada.....	28
3.3.3- Características fisiológicas e bioquímicas .....	29
3.3.3.1- Fermentação de carboidratos .....	29
3.3.3.2- Assimilação de compostos de carbono .....	30
3.3.3.3- Assimilação de compostos de nitrogênio.....	32

3.3.3.4- Resistência à cicloheximida.....	32
3.3.3.5- Crescimento a diferentes temperaturas.....	32
3.3.3.6- Crescimento em meio sem vitaminas.....	33
3.3.3.7- Osmotolerância a 50% de glicose e a 10% de NaCl.....	33
3.3.3.8- Produção de ácido a partir da glicose.....	33
3.3.3.9- Síntese de compostos amilóides.....	33
3.3.3.10- Hidrólise de uréia + DBB.....	34
3.3.3.11- Atividade da arbutina.....	35
3.3.4- Seleção das culturas.....	35
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1- Contagem microbiana.....	36
4.2- Ocorrência de gêneros de leveduras nas diferentes amostras.....	36
4.3- Ocorrência de espécies de <i>Candida</i> nas diferentes amostras.....	39
4.4- Ocorrência de leveduras durante a safra 92/93.....	44
4.4.1- Leveduras contaminantes na primeira coleta.....	45
4.4.2- Leveduras contaminantes na segunda coleta.....	46
4.4.3- Leveduras contaminantes na terceira coleta.....	48
4.5- Variação da microbiota em relação aos meios de cultura.....	49
4.5.1- Eficiência do meio WLN ágar.....	50
4.5.2- Eficiência do meio WLD ágar.....	51
4.5.3- Eficiência do meio Lisina ágar.....	53
4.5.4- Eficiência do meio Lin ágar.....	55
4.6- Diversidade taxonômica.....	56
4.6.1- Taxonomia das leveduras em nível de Gênero.....	56
4.6.2- Taxonomia das leveduras do Gênero <i>Candida</i> .....	61
4.7- Diversidade metabólica.....	65
5- CONCLUSÕES.....	107
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ANEXO 1.....	118
ANEXO 2.....	122

## CONTEÚDO DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros físico-químicos das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool.....	67
TABELA 2 - Parâmetros físico-químicos das amostras coletadas na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.....	67
TABELA 3 - Contagem microbiana em UFC/ml das amostras coletadas .....	68
TABELA 4 - Total de linhagens de leveduras isoladas em cada uma das 6 coletas realizadas em duas usinas de açúcar e álcool.....	68
TABELA 5 - Lista de gêneros e número de linhagens de leveduras isoladas das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.....	69
TABELA 6 - Lista de espécies e número de linhagens de <i>Candida</i> isoladas a partir das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.....	70
TABELA 7 - Número total de linhagens isoladas a partir das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A, durante a safra 92/93.....	71
TABELA 8 - Porcentagem de gêneros isolados em cada coleta realizada na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.....	72
TABELA 9 - Porcentagem de espécies de <i>Candida</i> isoladas em cada coleta realizada na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.....	72
TABELA 10 - Número de linhagens isoladas através dos diferentes meios de cultura, em amostras coletadas nas duas usinas em estudo.....	73
TABELA 11 - Resultados dos testes preliminares dos gêneros de leveduras isoladas da Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e da Usina Açucareira Santa Cruz S/A .....	74
TABELA 12 - Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das leveduras pertencentes ao gênero <i>Candida</i> , isoladas da Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool.....	78
TABELA 13 - Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das leveduras pertencentes ao gênero <i>Candida</i> , isoladas da Usina Açucareira Santa Cruz S/A.....	89



## CONTEÚDO DAS FIGURAS

<b>FIGURA 1a</b> - Vista geral do multinoculador utilizado na técnica de “replica plate”.....	<b>101</b>
<b>FIGURA 1b</b> - Placa de YM ágar inoculada através do multinoculador (21 dias/27°C)....	<b>101</b>
<b>FIGURA 2</b> - Frequência dos gêneros isolados das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool.....	<b>102</b>
<b>FIGURA 3</b> - Frequência dos gêneros isolados das amostras coletadas na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.....	<b>102</b>
<b>FIGURA 4</b> - Frequência das espécies de <i>Candida</i> isoladas das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool.....	<b>103</b>
<b>FIGURA 5</b> - Frequência das espécies de <i>Candida</i> isoladas das amostras coletadas na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.....	<b>103</b>
<b>FIGURA 6</b> - Frequência dos gêneros isolados em cada uma das coletas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool.....	<b>104</b>
<b>FIGURA 7</b> - Frequência dos gêneros isolados em cada uma das coletas na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.....	<b>104</b>
<b>FIGURA 8</b> - Placa de contagem e isolamento em meio WLN ágar (amostra de mosto coletada na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool) .....	<b>105</b>
<b>FIGURA 9</b> - Placa de contagem e isolamento em meio WLD ágar (amostra de leite levedurado coletada na Usina Açucareira Santa Cruz S/A).....	<b>105</b>
<b>FIGURA 10</b> - Placa de contagem e isolamento em meio Lisina ágar (amostra de leite levedurado coletada na Usina Açucareira Santa Cruz S/A).....	<b>106</b>
<b>FIGURA 11</b> - Placa de contagem e isolamento em meio Lin ágar (amostra de mosto coletada na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool) .....	<b>106</b>

## Leveduras Contaminantes do Processo de Fermentação Alcoólica: Diversidade Taxonômica e Metabólica.

### Resumo

Amostras de mosto, vinho levedurado e leite levedurado foram coletadas durante o período de maio a dezembro de 1992, em duas usinas de açúcar e álcool da região de Piracicaba e Capivari no Estado de São Paulo. O estudo teve por objetivo o levantamento da diversidade de leveduras presentes na fermentação alcoólica. Foram utilizados os meios WLN ágar (para contagem total de leveduras), WLD ágar (para contagem de leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae*), Lisina ágar (para detecção de leveduras não-*Saccharomyces*) e Lin ágar (para detecção de leveduras tipo *Saccharomyces*). Foram isoladas 439 linhagens, sendo 221 da usina de Piracicaba e 218 da Usina de Capivari. Na Usina de Piracicaba o gênero *Saccharomyces* se constituiu o contaminante mais freqüente (44,8%), seguido de *Candida* (38,9%), *Pichia* (5,4%), *Zygosaccharomyces/Torulaspóra* (2,7%), *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (1,8%), *Cryptococcus* (1,4%), *Issatchenkia* (1,4%), *Schizosaccharomyces* (1,4%), *Trichosporon* (1,4%), e *Rhodotorula* (0,9%). As linhagens de *Candida* isoladas foram as leveduras contaminantes mais significativas e consistiram de *C. tropicalis* (30,2%), *C. stellata* (25,6%), *C. rugosa* (12,8%), *C. krusei* (10,5%), *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* (5,8%), *C. colliculosa* (3,5%), *C. milleri/C. holmii* (3,5%), *C. guilliermondii* (2,3%), *C. lusitaniae* (2,3%), *C. magnoliae* (2,3%) e *C. utilis* (1,2%). Na Usina de Capivari o gênero *Candida* foi o contaminante mais freqüente (43,6%), seguido por *Saccharomyces* (33,0%), *Zygosaccharomyces/Torulaspóra* (10,1%), *Kluyveromyces* (8,7%), *Issatchenkia* (1,8%), *Rhodotorula* (0,9%), *Schizosaccharomyces* (0,9%), *Pichia* (0,5%) e *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (0,5%). As linhagens de *Candida* foram classificadas como *C. stellata* (46,3%), *C. tropicalis* (20,0%), *C. krusei* (10,5%), *C. rugosa* (9,5%), *C. colliculosa* (6,3%), *C. kefir* (4,2%), *C. dattila* (1,1%), *C. lipolytica* (1,1%) e *C. parapsilosis* (1,1%). As *Saccharomyces* detectadas incluem também as linhagens selvagens. A maioria das linhagens contaminantes foram caracterizadas como fermentadoras, assimiladoras do etanol, osmotolerantes, termotolerantes, urease e DBB negativos e com brotamento multipolar. Espera-se, com estes resultados, obter melhor conhecimento da microbiota contaminante, e por conseguinte estabelecer sistemas de monitoramento mais eficazes nos processos de fermentação utilizados.

## Contaminating Yeasts in Ethanol Fermentation Industries: Metabolic and Taxonomic Diversity

### Summary

Samples of cane juice (mosto), fermenting broth (vinho) and yeast cell slurry (leite levedurado), were collected during the period of 1992 May to December, in 2 ethanol fermentation industries in São Paulo State, from 2 different cities: Piracicaba and Capivari. Both them had a pure strain as the starting inoculum. This study aims the survey of the yeasts diversity present in ethanol fermentation processes. Medium WLN-agar (total yeast count), WLD-agar (non-*Saccharomyces cerevisiae* cells count), Lysine-agar (detection of non-*Saccharomyces*) and Lin-agar (detection of *Saccharomyces* type cells), were used for enumeration and isolation of the yeasts. 439 strains were isolated, namely 221 from Piracicaba e 218 from Capivari. Among the 221 strains isolated from Piracicaba, the genus *Saccharomyces* was the most frequent (44,8%), followed by *Candida* (38,9%), *Pichia* (5,4%), *Zygosaccharomyces/Torulaspora* (2,7%), *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (1,8%), *Schizosaccharomyces* (1,4%), *Issatchenkia* (1,4%), *Trichosporon* (1,4%), *Cryptococcus* (1,4%) e *Rhodotorula* (0,9%). Yeasts belonging to *Candida* sp. were the most significant contaminant, and consisted of: *C. tropicalis* (30,2%), *C. stellata* (25,6%), *C. rugosa* (12,8%), *C. krusei* (10,5%), *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* (5,8%), *C. colliculosa* (3,5%), *C. milleri/C. holmii* (3,5%), *C. guilliermondii* (2,3%), *C. lusitaniae* (2,3%), *C. magnoliae* (2,3%) and *C. utilis* (1,2%). Among the 218 strains isolated from Capivari, the genus *Candida* was the most frequent contaminant (43,6%), followed by *Saccharomyces* (33,0%), *Zygosaccharomyces/Torulaspora* (10,1%), *Kluyveromyces* (8,7%), *Issatchenkia* (1,8%), *Schizosaccharomyces* (0,9%), *Rhodotorula* (0,9%), *Pichia* (0,5%) and *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (0,5%). *Candida* strains were classified as *C. stellata* (46,3%), *C. tropicalis* (20,0%), *C. krusei* (10,5%), *C. rugosa* (9,5%), *C. colliculosa* (6,3%), *C. kefir* (4,2%), *C. dattila* (1,1%), *C. lipolytica* (1,1%) e *C. parapsilosis* (1,1%). The detected *Saccharomyces* include also the wild strains. Most of the strains were fermentative, ethanol tolerant, osmotolerant, thermotolerant, urease and DBB negatives and vegetative reproduction by multipolar budding. It is expected that these results will be useful to improve the knowledge on the contaminating yeasts in ethanol production plants, and that this will be of help to establish more efficient systems for microbial control and monitoring in the ethanol fermentation processes.

## 1- INTRODUÇÃO

Os problemas de contaminação microbiológica associados com os processos de produção de açúcar e álcool em usinas devem ser rigorosamente analisados desde a matéria prima, e os processos de obtenção e moagem da cana de açúcar, onde qualquer contaminação é considerada relevante, até a obtenção do açúcar e a destilação do álcool.

Estudos de caracterização taxonômica e metabólica de microrganismos contaminantes presentes nos processos industriais são de extrema importância na tentativa de diminuir ou evitar os problemas causados à produtividade, conseqüentemente reduzindo os danos econômicos implicados no processo.

A redução da produtividade na fermentação alcoólica pode ser ocasionada pelos seguintes efeitos acarretados por microrganismos contaminantes: consumo de sacarose e de nutrientes do mosto; consumo de álcool produzido no processo; alterações desfavoráveis às células de leveduras devido a produtos de metabolismo indesejáveis; obstrução de equipamentos devido a produção de gomas; floculação do fermento, que acarreta em perdas de células de levedura no fundo das dornas ou nas centrífugas; e excesso de ácidos ou outros produtos químicos utilizados para combater a infecção (AMORIM & OLIVEIRA, 1982).

Embora os microrganismos contaminantes de várias etapas do processo fermentativo tenham sido estudados, pouco se conhece sobre a contaminação por leveduras, já que a maioria dos trabalhos abordam o levantamento de bactérias infectantes.

A diferenciação entre leveduras do processo e leveduras contaminantes (leveduras selvagens) é um problema muito complexo. Existe uma série de técnicas que podem ser utilizadas para diferenciar células de leveduras das células de bactérias contaminantes do processo fermentativo, como contagem de células ao microscópio (FINGUERUT *et alii*, 1986), coloração de células com azul de metileno (LEE *et alii*, 1981), coloração diferencial com safranina O e azul de metileno (MORAES *et alii*, 1989). Porém a diferenciação entre leveduras do processo e leveduras contaminantes pode ser conseguida com a utilização de meios de cultura seletivos para certos grupos de leveduras. Há também inúmeros fatores que influenciam estes processos de monitoramento de leveduras contaminantes e alguns parâmetros são insuficientes ou pouco precisos na identificação

destas leveduras. A simples observação visual, a microscopia óptica e o uso de meios seletivos são importantes para a constatação de contaminantes, mas não fornecem dados confiáveis para a identificação destes microrganismos.

Com base nesses parâmetros, os objetivos principais deste trabalho são:

- Detectar e isolar leveduras contaminantes do processo fermentativo de duas usinas de açúcar e álcool durante o período da safra 92/93.
- Caracterizar taxonomicamente os grupos de leveduras isolados.
- Caracterizar o perfil metabólico dos principais grupos de leveduras contaminantes do processo fermentativo.

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1- Aspectos Gerais da Taxonomia de Leveduras

Leveduras são fungos predominantemente unicelulares que possuem reprodução vegetativa por brotamento ou fissão. A sua distribuição na natureza é ampla, podendo, na sua maioria ser encontradas em folhas, flores, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares (CARMO DE SOUZA, 1969). Podem também ser encontradas no solo, no ar, em águas de lagos, rios e mares, sobre a pele e no intestino de animais e de alguns insetos. A distribuição na natureza ocorre por vários vetores, como ventos e correntes de água e de ar (PHAFF *et alii*, 1978; PHAFF & STARMER, 1987). Algumas leveduras são causadoras de doenças em plantas e animais, enquanto outras são deterioradoras de alimentos, bebidas e outros materiais.

A história das leveduras está intimamente associada aos fenômenos da fermentação e a utilização de substratos contendo açúcar. O uso destes microrganismos para o processamento de alimentos à base de frutas e extratos de grãos de cereais é conhecido desde os primórdios das civilizações, se estendendo até nos dias de hoje, onde ainda são utilizadas para a fabricação de vários tipos de bebidas alcoólicas como o vinho e a cerveja (PHAFF *et alii*, 1978).

As primeiras observações microscópicas de leveduras foram feitas por Antoine van Leeuwenhoek, em 1680, analisando a fermentação de cerveja. Em 1825, Cagniard de la Tour, Kützing e Schwann, estudando leveduras em cerveja e vinho demonstraram que tais microrganismos apresentavam capacidade de reprodução por gemulação.

Mais tarde, Pasteur demonstrou que as leveduras possuem habilidade respiratória e fermentativa, e introduziu métodos de obtenção de culturas puras. Em decorrência desses estudos, Emil Christian Hansen descreveu características morfológicas e fisiológicas das leveduras, estabelecendo o primeiro sistema de identificação em 1896, que abordou a caracterização de um grande número de espécies, muitas das quais reconhecidas até hoje. Guilliermondii, em trabalhos realizados entre 1920 e 1928, expandiu o conhecimento das relações sistemáticas e ciclos vitais das leveduras, criando várias chaves dicotômicas para o uso em identificação destes microrganismos (PHAFF *et alii*, 1978).

O primeiro esquema de classificação completo e acessível para leveduras esporulantes foi proposto por Stelling-Dekker em 1931. Lodder, em 1934 e Diddens e Lodder, em 1941, desenvolveram sistemas de classificação para leveduras não esporulantes (PHAFF *et alii*, 1978; KURTZMAN & PHAFF, 1987). Nestes esquemas foram discutidos alguns aspectos fisiológicos importantes da classificação, como a habilidade das leveduras em fermentar glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose e rafinose, e em crescer em determinados açúcares e alguns compostos nitrogenados, tais como sulfato de amônia, asparagina, uréia, peptona e nitrato. Bedford (1942), Wickerham e Burton (1948) e Wickerham (1951) incluíram nas chaves de classificação testes de assimilação com 40 compostos de carbono, aceitos até hoje na sistemática de leveduras (KURTZMAN & PHAFF, 1987). Em 1952, Lodder e Kreger-van Rij escreveram a mais extensa publicação sobre taxonomia de leveduras, revisada por LODDER (1970), BARNETT *et alii* (1983), KREGER-VAN RIJ (1984b) e recentemente por BARNETT *et alii* (1990). Na tentativa de simplificar os processos de identificação de leveduras foi editado um programa para computadores de acordo com as publicações de BARNETT *et alii* (1983 e 1990), utilizando-se predominantemente de testes fisiológicos. Este programa permite a seleção de espécies com resultados semelhantes às espécies não conhecidas, e pode ser utilizado para espécies com características individuais ou para um número de espécies com características em comum.

As leveduras são classificadas como fungos pertencentes à divisão Eumycota (Eumycetes), classes Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes. As leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas produzem esporos e apresentam um ciclo sexual já conhecido. As leveduras deuteromicéticas, também conhecidas como leveduras imperfeitas, não possuem ciclo sexual conhecido ou descrito, apresentando características morfológicas semelhantes às leveduras ascomicéticas ou basidiomicéticas (KREGER-VAN RIJ, 1984a; KURTZMAN, 1988; PHAFF, 1990). Atualmente existem cerca de 550 espécies de leveduras descritas, sendo que a maior parte dessas descrições está baseada em poucos isolados (BARNETT *et alii*, 1990).

Leveduras são tradicionalmente caracterizadas, classificadas e identificadas através de características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genérica. Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras. Esses microrganismos apresentam uma variação na habilidade

de fermentação de açúcares. Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose, como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* são estritamente não-fermentativos (VAN DER WALT & YARROW, 1984). As leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. Alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimilados por todas as espécies estudadas (CARMO DE SOUZA, 1969), enquanto que alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies (PHAFF, 1990). As leveduras são capazes de utilizar diversas fontes de nitrogênio para seu crescimento. Normalmente apresentam habilidade de assimilar amônia, mas nem sempre de assimilar nitratos, nitritos, amins ou alguns aminoácidos. Muitos gêneros são caracterizados pela incapacidade de utilizar o nitrato como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Debaryomyces*, enquanto que nos gêneros *Hansenula*, *Pachysolen*, *Citeromyces* e *Wickerhamiella* todas as espécies utilizam o nitrato. Entre as leveduras imperfeitas podem ocorrer linhagens nitrato-positivo e nitrato-negativo, como nos gêneros *Candida* e *Trichosporon* (VAN DER WALT & YARROW, 1984).

O crescimento a temperaturas elevadas, em meios com altos teores de açúcares ou cloreto de sódio, o requerimento de vitaminas, a susceptibilidade a certas drogas como a cicloheximida e a produção de determinados metabólitos são critérios também utilizados na descrição e classificação de leveduras, e são importantes uma vez que auxiliam no agrupamento das linhagens de acordo com o habitat da levedura.

Embora muitos estudos sobre a caracterização de leveduras já tenham sido elaborados, uma classificação perfeita é ainda um grande objetivo a ser alcançado. A classificação ideal deve estar baseada na filogenia destes microrganismos. Esta interação classificação-filogenia é de grande importância pois permite prever similaridades genéticas entre os microrganismos, fornecendo informações necessárias para a descoberta e avaliação de parentescos entre linhagens e espécies, resultando em uma maior compreensão da evolução das leveduras (KREGER-VAN RIJ, 1980; 1984a; KURTZMAM, 1988). Grandes progressos na taxonomia de leveduras vem ocorrendo em função do emprego de técnicas moleculares que fornecem informações essenciais sobre a composição química da parede celular e seqüências de ácidos nucléicos e proteínas (MEYER, 1991), o que têm resultado na descoberta de novas espécies e rearranjos de gêneros e espécies já conhecidos.



A determinação da composição de bases de DNA, estabelecida pela porcentagem de guanina mais citosina (G+C), tem aberto novos caminhos para uma melhor separação das espécies de leveduras. KURTZMAN & PHAFF (1987), em uma revisão da composição de DNA de leveduras, mencionaram que leveduras ascomicéticas apresentam um conteúdo de G+C abaixo de 50% (entre 27-50%), enquanto que as basidiomicéticas apresentam valores superiores (entre 50-70%), embora algumas espécies de ascomicetos tenham sido encontrados com valores de G+C pouco acima de 50%. As leveduras ascomicéticas são freqüentemente fermentativas e não possuem as enzimas urease e DNase. As leveduras basidiomicéticas, com raras exceções, são estritamente oxidativas, apresentam urease e DNase, e quando reagem com o sal diazonium blue B (DBB) revelam uma coloração vermelho-violeta.

Nos últimos anos técnicas de identificação de leveduras foram aprimoradas e novos gêneros e espécies foram descritos ou rearranjados.

Os testes fisiológicos DBB e hidrólise da uréia são de grande importância para classificar e distinguir estados anamórficos de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas (HAGLER & AHEARN, 1981). HAGLER & MENDONÇA-HAGLER (1991) propuseram um método alternativo em que estes testes são realizados simultaneamente. A reação positiva ocorre apenas para leveduras basidiomicéticas e seus anamórficos, apresentando um resultado rápido e seguro.

Estudos realizados por FONSECA (1992) indicaram que a habilidade das leveduras em assimilar ácido tartárico tem valor taxonômico. A maioria das linhagens que cresce em meios contendo ácido tartárico como única fonte de carbono são leveduras basidiomicéticas. Poucas leveduras ascomicéticas utilizam estes compostos.

Recentemente, leveduras e "yeast-like-fungi" associados a substratos naturais, pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula* foram estudados e rearranjados em outros gêneros e sub-gêneros, originados pela heterogeneidade do grupo e confirmado por análises taxonômicas mais profundas. Assim, o gênero *Pichia* foi dividido em dois sub-gêneros: *Pichia* e *Hansenula*. Sugeriu-se que linhagens com esporos em forma de chapéu pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula* fossem consideradas do gênero *Pichia*. As espécies de *Pichia* com esporos em forma de saturno foram excluídas deste gênero e incluídas no gênero *Williopsis*. Foram excluídas também espécies de *Pichia* com esporos globosos, que foram colocadas no gênero *Zygopichia*. As espécies com esporos em forma

de chapéu e formadoras de micélio verdadeiro foram colocadas no gênero *Hyphopichia* (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ *et alii*, 1989).

YAMADA & BANNO (1984) excluíram espécies anamórficas do gênero *Sterigmatomyces*, que se reproduzem por conídios e não desenvolvem balistosporos, estabelecendo um novo gênero, *Fellomyces*. Mais tarde, o gênero *Kurtzmanomyces* foi descrito constituindo-se de linhagens anteriormente denominadas de *Fellomyces nectairei* (YAMADA *et alii*, 1988a). YAMADA *et alii* (1988b) agruparam linhagens pertencentes à *Sterigmatomyces wingfieldii*, descrevendo um novo gênero, *Tsuchiyaea*. Estes três novos gêneros (*Fellomyces*, *Kurtzmanomyces* e *Tsuchiyaea*) apresentam espécies produtoras de conídias, que não desenvolvem balistosporos e são anamórficas.

NAKASE *et alii* (1989) descreveram um novo gênero de leveduras, *Ballistosporomyces*, constituído por duas espécies: *Ballistosporomyces xanthus* e *Ballistosporomyces ruber*. Essas leveduras foram isoladas respectivamente de folhas de *Acer rufinerve* e *Vitis ficifolia* var. *lobata*, e se reproduzem por balistosporos e esterigmaconídias, mas não por gemulação.

Uma nova espécie de levedura, *Candida fragi*, foi descrita por SUZUKI *et alii* (1991). Essa linhagem foi isolada em 1962 da fermentação de morangos, e estava depositada em uma coleção de culturas como *C. sake* ou *C. natalensis*. A distinção entre *C. fragi* e as demais espécies foi possível em função do emprego de novas técnicas quimiotaxonômicas.

Através da homologia e composição de bases de DNA, SPAAIJ *et alii* (1993), descobriram uma nova espécie de levedura, descrita como *Mixozyma vanderwaltii*. Essa linhagem foi isolada de um inseto encontrado em inflorescência de *Protea repens* no sul da África. Estes autores propuseram uma nova chave de identificação para as espécies do gênero *Myxozyma*.

## 2.2- Microrganismos Contaminantes do Processo de Produção de Álcool

Na obtenção de álcool pela fermentação de matérias primas que contenham carboidratos são realizadas duas operações distintas: a fermentação e a destilação. Delas dependem a qualidade e a quantidade de álcool produzido. A fermentação é uma etapa importante do processo e envolve a transformação dos açúcares em álcool através da ação de leveduras fermentativas. Nessa fase são inúmeras as formas de perdas que contribuem para a redução do rendimento e da produtividade industrial. A destilação consiste na separação do álcool produzido na fermentação, que quando bem controlada não causa grandes perdas para o processo.

O processo de produção de etanol utilizado pela maioria das usinas de açúcar e álcool é o Melle-Boinot, o qual baseia-se na alimentação semi-contínua de uma série de dornas de fermentação onde se adiciona um inóculo de leveduras proveniente de um ciclo anterior. Neste processo a cana de açúcar é lavada para a remoção de solo ou impurezas antes de se proceder a extração do caldo, que é então tratado pelos métodos químico (calagem) e térmico. O mosto é constituído basicamente de caldo tratado e em alguns casos de caldo suplementado de melão e nutrientes. Após a adição do inóculo de leveduras, os açúcares do mosto são convertidos em álcool, dióxido de carbono e outros subprodutos. O mosto fermentado (vinho levedurado) é centrifugado resultando em duas fases, a fase leve (vinho delevurado) e a fase pesada (leite). O vinho delevurado, rico em álcool, é direcionado à destilação, e o leite, rico em leveduras, é tratado com ácido sulfúrico e retorna ao ciclo seguinte (LIMA *et alii*, 1982; FINGUERUT *et alii*, 1983).

A utilização de um inóculo de leveduras adequado é de extrema importância para o bom desenvolvimento do processo fermentativo, pois as leveduras estão intimamente relacionadas com a conversão dos açúcares da matéria prima em álcool. Portanto, a escolha do fermento de leveduras empregado pelas usinas de açúcar e álcool deve atender a certos requisitos básicos, como: resistência às condições adversas do meio, estabilidade e rapidez fermentativa, tolerância ao álcool e boa produtividade.

A qualidade da matéria prima; a avaliação do controle microbiológico; a seleção de leveduras mais resistentes a alterações químicas e físicas; bem como a otimização da fermentação alcoólica através do controle da temperatura, pH, composição e concentração de nutrientes no mosto, são alguns aspectos sugeridos por FINGUERUT *et alii* (1983) para um melhor aproveitamento do processo fermentativo das usinas.

Segundo SERRA *et alii* (1979), as primeiras informações a respeito de contaminantes da fermentação alcoólica são descritas por Dejonghe em 1889, Guichard em 1896 e Monvoison em 1910, relatando a ocorrência de microrganismos em mostos de grãos e de beterrabas, e citando as fermentações lática, acética e butírica como indesejáveis. Ainda de acordo com SERRA *et alii* (1979), Neves em 1938 constatou as mesmas infecções acidentais em fermentações alcoólicas a partir de caldo de cana de açúcar e melão, inferindo a presença de bactérias láticas, acéticas e butíricas no processo fermentativo, e descrevendo os principais sintomas característicos de cada tipo de contaminação, como acidez do mosto e diminuição da velocidade de liberação de gás carbônico.

As infecções acidentais, paralelas à fermentação alcoólica, podem provocar problemas ao processamento, acarretando em perdas no rendimento alcoólico. Os gêneros de bactérias comumente associadas com essas fermentações são *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (fermentação lática), *Acetobacter* (fermentação acética) e *Clostridium* (fermentação butírica) (GALLI, 1961 *apud* GALLO, 1990). Nos setores de fermentação e destilação os principais microrganismos encontrados são as bactérias láticas promotoras de fermentações indesejáveis (COPERSUCAR, 1983).

Segundo AMORIM & OLIVEIRA (1982) as bactérias contaminantes comumente encontradas na fermentação alcoólica são *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*, o que ocasiona uma diminuição do rendimento alcoólico e da porcentagem de células de leveduras viáveis. GALLO (1990) estudando a contaminação bacteriana em leite levedurado antes e após a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mosto resfriado e vinho final verificou uma maior predominância de bastonetes Gram positivos identificados como *Lactobacillus* e *Bacillus*. Os gêneros *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc* e *Enterobacter* foram isolados em menor frequência.

A preocupação com os contaminantes nos processos de fermentação está relacionada aos transtornos que tais microrganismos podem provocar. Nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar as causas de redução da produtividade, e desta forma, aperfeiçoar o processo de fermentação etanólica.

Um problema bastante comum encontrado no processamento devido a ação de microrganismos é a formação de goma. Muitas espécies de microrganismos produzem polissacarídeos capsulares e excretam suas gomas, elevando a viscosidade do caldo e causando entupimentos nas tubulações, bombas, centrífugas, peneiras e trocadores de calor (TILBURY, 1975). Um microrganismo bastante estudado como produtor de goma é o *Leuconostoc mesenteroides*. Ele transforma a sacarose e glicose em dextranas dando formação a massa gelatinosa.

Além do *Leuconostoc* outros microrganismos são também importantes e em determinadas condições podem comprometer seriamente o processo de fermentação. Alguns gêneros como *Klebsiella* e *Enterobacter*, habitantes naturais da cana de açúcar, são capazes de se desenvolver nos equipamentos de extração e transporte do caldo de cana, e desencadear um processo de produção de goma. De acordo com YOKOYA (1989), outras bactérias, pertencentes ao gênero *Acetobacter*, normalmente se desenvolvem em equipamentos onde o contato com o ar é mais intenso. Para reduzir o acúmulo de gomas é necessário que haja boas condições de sanitização e limpeza dos equipamentos, embora isto não evite o crescimento de microrganismos no caldo e posterior contaminação.

A floculação, formação de flocos compostos de células de leveduras e bactérias, é um outro problema que ocorre na fermentação alcoólica levando a perdas significativas na produtividade do álcool (ROSE, 1980). A ocorrência deste fenômeno pode ser causada pela presença de linhagens floculentas de leveduras e por bactérias contaminantes, principalmente *Lactobacillus fermentum*. O mecanismo de floculação não é totalmente esclarecido, mas um modelo proposto é o "modelo das lecitinas", no qual há uma ligação específica entre as proteínas (lecitinas) das células floculantes e os receptores da parede celular das células bacterianas. Há relatos de que com a floculação aumenta o tempo de fermentação e diminui a superfície útil das células de leveduras, ocorrendo um decréscimo no rendimento fermentativo de aproximadamente 15% (SERRA *et alii*, 1979).

Muitos microrganismos infectantes na fermentação alcoólica são provenientes do solo e da flora epífita aderida a cana de açúcar e são transportados até as destilarias onde se multiplicam. O gênero *Bacillus*, habitante natural do solo, pode ser transportado aos equipamentos de extração do caldo através do solo aderido a cana de açúcar. Havendo condições favoráveis, estes microrganismos podem se multiplicar causando problemas ao processamento da usina (YOKOYA, 1989).

Estudos demonstram que as folhas e colmos de cana de açúcar sadia podem conter cerca de  $10^4$  a  $10^8$  bactérias/g e  $10^2$  a  $10^4$  fungos filamentosos e leveduras/g (DUNCAN & COLMER, 1964). Embora a cana sofra um processo de lavagem antes de ser submetida a moagem, nem sempre este processo é eficiente e muitos microrganismos podem ser carregados por águas contaminadas.

A queima da cana de açúcar, uma prática utilizada para facilitar o processo de colheita e diminuir as impurezas vegetais, eleva a temperatura do caule a 55-85°C mas não parece destruir bactérias termorresistentes. É o caso do gênero *Leuconostoc*, encontrado com igual frequência antes e depois da queima da cana (BEVAN & BOND, 1971). Acredita-se que a cera que envolve o colmo da cana apresente uma atividade bacteriostática e, com a sua retirada pelo calor através da queima da cana, os microrganismos possam crescer mais livremente, utilizando como meio o próprio caldo exsudato da cana.

Os processos de colheita da cana de açúcar e de extração do caldo de cana podem envolver a participação de microrganismos contaminantes, em maior ou menor intensidade dependendo do tipo e das condições de operações utilizadas. Os contaminantes no setor de extração do caldo de cana são essencialmente fungos filamentosos, leveduras, bactérias lácticas e bactérias esporuladas. As bactérias acéticas são normalmente encontradas em moendas e peneiras (COPERSUCAR, 1983).

SILVA (1988) realizou um levantamento da variação quantitativa e qualitativa dos microrganismos aeróbicos presentes no caldo de cana clarificado, pasteurizado e pré-resfriado, coletados na entrada e saída da torre de resfriamento em uma usina do Estado de São Paulo. Os resultados demonstraram que o número e a variação de contaminantes aumentou paralelamente com uma pequena redução dos valores de pH do caldo. O contaminante mais frequente foi *Lactobacillus*, seguido de bactérias pertencentes à família Micrococcaceae, dos gêneros *Leuconostoc* e *Bacillus* e de linhagens pertencentes à família Enterobacteriaceae, além de linhagens de leveduras.

Por apresentar altos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, altos teores de açúcares,  $a_w$ , pH e temperatura favoráveis, o caldo de cana permite o desenvolvimento de microrganismos contaminantes por se tratar de um ótimo substrato de crescimento (COPERSUCAR, 1983; GALLO & CANHOS, 1991). Os microrganismos presentes no caldo podem ser originados não só da cana, como também de focos de contaminação das moendas, difusores, esteiras e outros equipamentos. Apesar de ser um meio propício, não

são todos os microrganismos capazes de competir e crescer no caldo de cana. O número e o tipo de microrganismo presente dependem das condições peculiares de cada etapa do processo de fermentação, selecionando o desenvolvimento de certos grupos de microrganismos. No caldo misto, que é uma mistura de caldos dos diferentes estágios das moendas, as bactérias lácticas são altamente adaptadas a se desenvolverem devido ao pH relativamente baixo. Por outro lado, altas temperaturas associadas aos valores de pH ácidos limitam o crescimento microbiano, mas favorecem o desenvolvimento de bactérias termófilas esporuladas, como *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus* e espécies de *Clostridium* (BEVAN & BOND, 1971; TILBURY, 1975; CLARK *et alii*, 1980).

Além destes, outros fatores contribuem para o aumento da população de microrganismos, como: falta de assepsia da sala de fermentação, falta de limpeza das dornas e canalizações, refrigeração insuficiente das dornas de fermentação, dornas abertas e expostas ao ambiente, ausência de controle da acidez e nutrientes do mosto (SERRA *et alii*, 1979), variações nas formas de colheita, qualidade da cana de açúcar, pragas e doenças, condições climáticas oscilantes, armazenamento inadequado do melão etc (GALLO & CANHOS, 1991).

A degradação da sacarose por microrganismos pode resultar na formação de ácidos láctico e acético. Estes ácidos orgânicos juntamente com outros metabólitos (álcoois superiores e polissacarídeos) são indesejáveis e podem afetar a atividade fermentativa da levedura envolvida no processo (BEVAN & BOND, 1971; AMORIM & OLIVEIRA, 1982; YOKOYA, 1989).

Estudos indicam que 13% da perda de sacarose na fermentação alcoólica é devido a inversão química, 25% devido à atividade de enzimas extracelulares e 62% devido ao crescimento microbiano nas moendas. (TILBURY *et alii*, 1977). Teoricamente é possível eliminar essa perda de 62% de sacarose através de medidas adequadas de sanitização. Porém, na prática esse limite quase nunca é atingido. Com o uso de métodos apropriados de limpeza e aplicação correta de agentes antimicrobianos têm-se conseguido reduzir em 17 a 35% as perdas de sacarose por causas microbianas (YOKOYA, 1989).

Para se obter um melhor rendimento na fermentação é preciso que se dê ao mosto condições que minimizem o desenvolvimento de microrganismos infecciosos, sem interferir no metabolismo normal da levedura. Além de tratamentos higiênicos preventivos, estas condições podem ser conseguidas com o uso de agentes antimicrobianos. Muitos produtos químicos e antibióticos são utilizados em baixas concentrações na tentativa de

controlar a infecção bacteriana na fermentação alcoólica, sem interferir na capacidade fermentativa da levedura empregada no processo. O ácido sulfúrico é usualmente empregado como agente de desinfecção, podendo estar também associado com outros tipos de produtos químicos.

Uma associação de antibióticos recomendada é a de penicilina e cloranfenicol (AQUARONE *et alii*, 1968).

Sato *et alii* (1980a) utilizaram na desinfecção do mosto sulfato de aminosidina e lucensomicina na concentração de 0,4 mg/l, porém sem apresentar nenhuma ação antimicrobiana. Estudos comparativos de SATO *et alii* (1980b) mostraram que vinhos levedurados de mostos tratados com diversas associações de antibióticos, como penicilina G potássica, hexaclorofeno e cloranfenicol nas concentrações de 1000 U, 4 mg e 3 mg/l, respectivamente, se mostraram mais eficientes que os antibióticos anteriores e apresentaram rendimento alcoólico de 10 a 12% superiores aos vinhos não tratados.

FURLETTI *et alii* (1981) estudaram a desinfecção do melaço de cana de açúcar através da ação antibiótica da penicilina cristalina V ácida e de dois produtos contendo como princípio ativo 2-(tiocianometiltio) benzotiazol e 2-hidroxietil 2,3-dibromopropionato. Estes autores verificaram que as substâncias pesquisadas não interferem no processo biológico da fermentação, apresentando um grande potencial de emprego na desinfecção de usinas.

Para o controle do desenvolvimento de cocos e micrococos recomenda-se o uso de penicilina V ácida (AMORIM & OLIVEIRA, 1982).

Visando alcançar melhores resultados na produção de álcool, PATERSON *et alii* (1988), avaliaram o processo de fermentação etanólica em uma destilaria no Estado da Paraíba. Através de controles físico-químicos e microbiológicos do caldo de cana, vinho, leite de levedura e fermento tratado, verificaram que o sistema convencional de recuperação de fermento com abaixamento de pH pela adição de ácido sulfúrico apresentou melhores resultados de eficiência, produtividade e rendimento da fermentação, quando foi utilizada a cepa *Saccharomyces uvarum* IZ 1904.



O emprego de produtos químicos e antibióticos em mostos de fermentação, com o objetivo de impedir ou controlar o desenvolvimento de microrganismos contaminantes, tem aumentado consideravelmente. Normalmente as usinas estão equipadas para realizar um controle preventivo e corretivo de infecções, mas devido a altas taxas de reprodução microbiana, nem sempre é possível modificar as condições do processo industrial em tempo suficiente, justificando-se o uso destes antibióticos. Na grande maioria, a utilização de agentes antimicrobianos visa controlar apenas o crescimento bacteriano, e pouco é feito em nível de leveduras contaminantes. Portanto, a simples tentativa na redução de bactérias pode não melhorar o rendimento alcoólico e até mesmo agravar o problema da contaminação. A aplicação destes produtos deve ser feita através de critérios rigorosos de dosagem visando controlar a infecção e evitando aplicações que levem ao estabelecimento de microrganismos resistentes.

### 2.3 - Leveduras Contaminantes em Usinas de Açúcar e Álcool e em Outros Processos Fermentativos

Para que o rendimento, a produtividade e a flexibilidade do processo de fermentação sejam maximizados, deve-se procurar manter o equilíbrio entre as populações microbianas em meio favorável às leveduras, e neste sentido o controle microbiológico é considerado um instrumento extremamente importante.

Estudos da biodeterioração da cana colhida demonstraram que a população microbiana presente pode elevar-se em quantidades significativas. Lactobacilos, leveduras e bactérias acidófilas apresentam uma relação direta entre o grau de contaminação e o tempo de estocagem da cana. Os lactobacilos mostraram ser os principais microrganismos responsáveis pela deterioração da cana estocada por 10 dias. Alguns grupos de leveduras foram também capazes de deteriorar a cana (TILBURY, 1968 *apud* GALLO, 1990).

Estudando microrganismos presentes desde a cana verde até a fábrica, BEVAN & BOND (1971) isolaram várias bactérias (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*), alguns gêneros de leveduras (*Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*) e um fungo filamentososo (*Penicillium*). Esses microrganismos metabolizam o açúcar rapidamente e são resistentes a temperaturas de 50-55°C. Os mesmos autores conseguiram isolar do colmo da cana várias espécies de *Saccharomyces* e bactérias do gênero *Leuconostoc*. Todos os microrganismos

se mostraram muito ativos, revelando que as fissões dos colmos constituem um excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos. Do caldo de cana misto em flocculação detectaram a presença de *Leuconostoc mesenteroides* e de uma levedura não identificada, podendo se tratar de *Hansenula* ou *Pichia*. Esta levedura suplementa os fatores de crescimento para o *Leuconostoc*, que em troca fornece um meio ácido.

LIMA *et alii* (1974) analisando a deterioração do caldo bruto, caldo misto e água de embebição, isolaram e identificaram várias espécies de *Bacillus* e *Leuconostoc*, além de *Aerobacter aerogenes* e *Pseudomonas incognita*. Dentre as leveduras encontradas predominaram os gêneros *Candida* (*C. diddensii*, *C. fabiani*, *C. intermedia*, *C. santamariae*) e *Rhodotorula* (*Rh. pallida* e *Rh. rubra*), além de *Cryptococcus kvetzingii*, *Hansenula polymorpha*, *Kloeckera corticis*, *Saccharomyces uvarum*, *Torulopsis norvegica* e *Trichosporon cutaneum*, isoladas pelo método de diluição em série, em meio de YM ágar.

Com o objetivo de se obter microrganismos mais adequados ao caldo de sorgo em fermentação natural, CEREDA *et alii* (1989) isolaram em meio de malte ágar, 65 linhagens de leveduras identificadas e distribuídas em 7 gêneros: *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces* e *Torulaspora*.

Várias leveduras utilizam o melaço como substrato para seu desenvolvimento com pouca ou nenhuma produção de etanol. Há relatos de que estas leveduras selvagens são introduzidas como contaminantes nas usinas através da cana de açúcar, e encontrando condições favoráveis de desenvolvimento, se instalam em moendas, equipamentos ou em galpões de armazenagem, caso as condições de sanitização não sejam adequadas (YOKOYA, 1989).

Analisando amostras de melaço de açúcar cristal e demerara armazenados durante três anos, SOUZA *et alii* (1977), verificaram a presença de 14 linhagens de leveduras, sendo elas: *Hansenula henricii*, *H. canadensis*, *Rhodotorula pallida*, *Sporobolomyces roseus* (isoladas do melaço de demerara), *Cryptococcus albidus* var. *albidus*, *Cr. infirmominiatus*, *Candida melinii*, *Debaryomyces cantarelli*, *Oosporidium margaritifera*, *Rhodotorula graminis*, duas linhagens de *Torulopsis candida* e duas espécies de *Torula* (isoladas de melaço de cristal). Estes autores constataram também a presença de vários gêneros de bactérias e fungos filamentosos, como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Sarcina*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Papulaspora*, *Monilia* e *Gliocladium*.

Nem sempre a presença de leveduras contaminantes implicam em problemas na redução da produtividade industrial. Muitas vezes essas leveduras podem auxiliar e até mesmo serem promissoras no processo fermentativo. Para uma eficiente produção de etanol a partir de carboidratos é necessária a utilização de linhagens de leveduras com alta capacidade fermentativa.

Novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram isoladas do processo de fermentação de amostras coletadas em usinas alcooleiras no final da safra da cana de açúcar (BERTOLINI *et alii*, 1991). Estas linhagens apresentaram capacidade fermentativa em altas concentrações de sacarose em meio sintético, sendo bastante promissoras se aplicadas em escala industrial.

A eficiência da produção de etanol depende também da utilização de linhagens de leveduras tolerantes tanto ao etanol como a altas temperaturas (ROSE, 1980) e altas concentrações de açúcares (LALUCE *et alii*, 1993). Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o propósito de selecionar de processos fermentativos leveduras termotolerantes (GARCIA & ALCINA, 1981; BARWALD & HAMAD, 1984 *apud* DÉAK, 1991; VAN UDEN, 1984; ANDERSON *et alii*, 1988) ou etanol-tolerantes (BENITEZ *et alii*, 1983; CASEY & INGLEDEW, 1986; D'AMORE & STEWART, 1987; ERNANDES *et alii*, 1990).

Linhagens de leveduras selecionadas de usinas de açúcar e álcool foram examinadas quanto as habilidades de crescimento e fermentação em mosto de cana de açúcar, até a produção de álcool em temperaturas de 40°C (LALUCE *et alii*, 1993). Normalmente a temperatura ótima para alta produção de álcool ocorre 5 a 10°C acima da temperatura ótima de crescimento celular; porém, em meios com alta concentração de etanol, a temperatura ótima para produção de álcool torna-se mais baixa.

GARCIA & ALCINA (1981), analisando a flora microbiana do bagaço de cana de açúcar, isolaram linhagens de *Kluyveromyces* e *Brettanomyces* capazes de crescerem em temperaturas de 40°C, além de várias espécies do gênero *Bacillus* e *Aspergillus*.

Em trabalhos de BARWALD & HAMAD (1984 *apud* DÉAK, 1991) amostras de caldo de cana de duas usinas de cana de açúcar, 23 linhagens de leveduras pertencentes a 9 gêneros e 11 espécies foram selecionadas. Dessas leveduras, 7 linhagens de *Kluyveromyces marxianus* mostraram-se tecnicamente importantes por serem tolerantes a

temperaturas de 55°C. As outras linhagens não apresentaram características termotolerantes e não assimilaram a sacarose.

ANDERSON *et alii* (1988) selecionaram através do meio YM ágar leveduras termotolerantes de usinas alcooleiras capazes de fermentar a sacarose em temperaturas superiores a 40°C. Através da taxonomia numérica verificaram que dentre os 44 isolados, 35 foram identificados como *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, alguns com capacidade de crescer em temperaturas de 47°C. Outros isolados foram distribuídos entre os gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Geotrichum* e *Saccharomyces*.

Observações realizadas por D'AMORE & STEWART (1987) mostraram que a maioria das linhagens etanol-tolerantes não produz altas concentrações de etanol e vice-versa, indicando que estas características são independentes.

Novas linhagens de leveduras etanol tolerantes foram isoladas da fermentação etanólica para produção de álcool combustível. Estudos revelam que essas linhagens foram capazes de produzir e tolerar concentrações de etanol acima de 20% na fermentação do mosto de cana de açúcar (ERNANDES *et alii*, 1990).

Estudos da biodeterioração da cana de açúcar mostraram perda de até 0,5% do teor de açúcar e problemas de refinação, devido a contaminação por leveduras osmófilas, capazes de crescer em valores de  $a_w$  abaixo de 0,65% (TILBURY, 1980). As leveduras foram isoladas em ágar Scarr osmófilo e as principais linhagens identificadas como *Saccharomyces rouxii* (após 3 dias de incubação) e *Torulopsis candida* (após 5 dias de incubação). Este meio restringe o crescimento de fungos filamentosos e bactérias, sendo que leveduras não osmófilas apresentam crescimento mais lento, normalmente bem superiores a 5 dias de incubação.

Ainda de acordo com TILBURY (1980), durante o processo de produção de açúcares de beterraba e de cana, leveduras encontram ótimas condições de crescimento, com  $a_w$  entre 0,575 a 0,825. Com essas características, leveduras osmofílicas (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida etchellsii*, *C. versatilis* e *C. gropengiesseri*) e leveduras não osmofílicas (*Pichia anomala*, *P. farinosa* e *Saccharomyces cerevisiae*) são largamente encontradas nesses tipos de açúcares.

DÉAK (1991) realizou uma revisão extensiva a respeito de leveduras contaminantes em diversos substratos, como frutas e vegetais, sucos de frutas, cereais e

produtos da panificação, produtos processados e fermentados, bebidas alcoólicas e produtos com altas concentrações de açúcares.

Alguns autores têm se preocupado com a deterioração microbiana de açúcares, constatando não somente a deterioração do açúcar armazenado, como também a decomposição dos produtos manufaturados com este açúcar. Os principais fatores de deterioração são o alto teor osmótico dos cristais de açúcar e os baixos valores de  $a_w$ , que facilitam o ataque de microrganismos, principalmente fungos filamentosos e leveduras xerotolerantes. Isto pode ser comprovado pelos estudos de JOLY (1968) que constatou um elevado número de fungos filamentosos (*Penicillium*, *Syncephalastrum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Mycelia*) e leveduras em amostras de açúcar mascavo. Dentre as leveduras encontradas destacam-se *Saccharomyces acidifaciens*, *Candida utilis*, *Torulopsis famata* e *Rhodotorula glutinis*.

Mais tarde, também em amostras de açúcares, verificou-se a presença de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Os gêneros de fungos filamentosos de maior ocorrência foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*, e de bactérias foram *Leuconostoc*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Clostridium*. As espécies de leveduras encontradas nas amostras estudadas foram *Saccharomyces rouxii*, *Sacch. bailii* var. *osmophilus*, *Sacch. bisporus* var. *mellis*, *Sacch. rosei*, *Kluyveromyces marxianus*, e os gêneros *Torulopsis* e *Rhodotorula* (BIDAN & HEITZ, 1973).

Verificando a qualidade microbiológica do açúcar cristal superior, SOUZA *et alii* (1983), detectaram a presença de colônias de *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, *Rhodotorula pilimanae* e micélios estéreis em 4 diferentes marcas de açúcar encontradas comercialmente no Estado de São Paulo.

TOKUOKA *et alii* (1985) isolaram de 265 amostras de produtos açucarados diversas linhagens de leveduras. *Zygosaccharomyces rouxii* apresentou o maior índice de frequência entre os isolados. Em 10 amostras de açúcar bruto e refinado, e em 125 amostras de melaço, encontraram espécies de *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schiz. pombe*, *Torulaspora globosa*, *Candida manniotfaciens* e diversas linhagens de *Zygosaccharomyces rouxii*.

Vários estudos sobre a fermentação da produção de vinho relatam a ocorrência de leveduras selvagens não-*Saccharomyces*, oriundas das próprias uvas, como é o caso de *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Issatchenckia orientalis*,

*Metschnikowia pulcherrima* e *Pichia anomala* (GOTO & YOKOTSUKA, 1977; KISH *et alii*, 1983; FLEET *et alii*, 1984; PARISH & CARROLL, 1985; HEARD & FLEET, 1986), resultando em uma microflora mista. O fator determinante na composição dessa microflora de leveduras está relacionado com o aumento na concentração de álcool devido a fermentação.

Pesquisas sobre a ocorrência de leveduras na fermentação de vinho revelaram que 40 a 72% da população era composta por *Hanseniaspora uvarum*, 13 a 19% por *Candida stellata* e a espécie *Metschnikowia pulcherrima* apresenta um baixo índice de frequência (GOTO & YOKOTSUKA, 1977). Mais tarde, PARISH & CARROLL (1985) verificaram a predominância de *H'spora uvarum* nos estágios iniciais da fermentação de vinho. Outras dez espécies pertencentes a seis gêneros também foram isoladas: *Hansenula osmophila*, *Candida albicans*, *C. edax*, *C. humicola*, *C. sake*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Rh. minuta* e *Saccharomyces cerevisiae*.

MORA *et alii* (1988) analisaram qualitativa e quantitativamente as leveduras presentes em mosto fermentado para a produção de vinho e selecionaram a partir de YM ágar várias linhagens contaminantes. Entre elas a mais predominante foi *Candida stellata*, seguida de *C. pulcherrima*, *Kloeckera apiculata*, *Kl. japonica*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Issatchenkia terricola*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces rouxii* e *Cryptococcus albidus*.

YANAGIDA *et alii* (1992) realizaram um levantamento da flora de leveduras em uvas associadas ao processo fermentativo, o que contribuiu para a discussão sobre a microflora do vinho. Analisando 11 amostras de uvas pertencentes a quatro variedades diferentes, constatou-se as espécies *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora occidentalis*, *Cryptococcus albidus*, *Cr. laurentii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rh. minuta*, *Candida pulcherrima*, *C. steatolytica* e mais 4 espécies de *Candida* não identificadas.

A maioria das leveduras contaminantes na fabricação de cervejas é pertencente ao gênero *Saccharomyces*, como é o caso de *Sacch. exiguus* e *Sacch. cerevisiae*. Apenas 20 a 30% das contaminações são membros de outros gêneros, como *Dekkera* (*D. intermedia* e *D. anomala*), *Candida* (*C. boidinii* e *C. sake*), *Pichia* (*P. jadinii* e *P. membranaefaciens*), *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula glutinis* e *Saccharomycodes ludwigii* (BACK, 1987 *apud* DEÁK, 1991).

## 2.4- Meios de Cultura para Detecção de Leveduras em Processos Fermentativos

Vários meios de cultura são recomendados para a enumeração de leveduras em bebidas alcoólicas, como Extrato de Malte, Oxitetraciclina Glicose Extrato de Levedura, Rose Bengal Cloranfenicol, YM, Universal Beer, Orange Serum e WLN (THOMAS & ACKERMAN, 1988). Estes meios não são seletivos para leveduras e nem são específicos para leveduras contaminantes de bebidas alcoólicas, porém apresentam resultados satisfatórios.

Muitos meios de cultura têm sido desenvolvidos com o propósito de selecionar e diferenciar leveduras do gênero *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* de processos de fermentação de vinhos e de cervejarias, já que nesses processos o número de leveduras contaminantes também é alto, e o controle da linhagem é essencial para obtenção do buquê e sabor das bebidas.

O emprego de compostos inibitórios ou nutrientes específicos aos meios de cultura permitem o desenvolvimento de apenas alguns grupos de leveduras. Espécies selvagens de leveduras *Saccharomyces* são detectadas em meios com cristal violeta em suas formulações, por exemplo, Schwarz Differential Medium (SDM), Cristal Violeta ágar, Lin ágar e Lin ágar modificado. Para diferenciar leveduras não-*Saccharomyces* o meio Lisina ágar é amplamente usado em processos fermentativos. Esse meio contém essencialmente lisina como única fonte de nitrogênio, o que impede o crescimento da maioria das espécies de *Saccharomyces*, por inibir a síntese de aminoácidos pelas leveduras. Uma desvantagem do meio Lisina ágar é que ele muitas vezes permite o crescimento de espécies do gênero *Saccharomyces*, que não se desenvolvem em meios com cristal violeta, assim como meios com cristal violeta muitas vezes permite também o crescimento de leveduras não-*Saccharomyces* (TAYLOR & MARSH, 1984).

Um meio contendo etanol e bisulfito (ESY ágar) foi desenvolvido por KISH *et alii* (1983) para suprimir o crescimento de leveduras não-*Saccharomyces* e permitir a contagem do gênero *Saccharomyces* durante os primeiros estágios de fermentação do vinho. HEARD & FLEET (1986), analisando um meio seletivo para a enumeração de leveduras durante a fermentação do vinho, determinaram que o meio Lisina ágar permite o desenvolvimento de espécies não-*Saccharomyces* como, *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* e *Saccharomycodes ludwiggi*, suprimindo o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. RODRIGUEZ (1987) desenvolveu um sistema de identificação baseado no

crescimento de leveduras contaminantes de vinho em meio livre de pantotenato e Lisina ágar.

Meios seletivos e diferenciais são utilizados com bastante frequência em indústrias de cerveja para detectar leveduras contaminantes em seus processos. Muitos desses estudos foram revisados por LIN (1975), LONGLEY *et alii* (1978), HARPER (1981) e HOPE (1987). Dentre estes meios destacam-se o Lisina ágar, Cristal Violeta ágar, Schwarz Differential Medium (SDM), Wallerstein Laboratories Nutrient (WLN), Lin ágar, Actidiona ágar, Sulfato de cobre ágar, entre outros.

Analisando a contaminação de cervejas, LIN (1975) testou a eficiência de 5 meios diferenciais para o isolamento de leveduras selvagens: Cristal Violeta, SDM, Lin, Lisina e Actidiona. Os meios Cristal Violeta, SDM e Lin mostraram-se indicados para o isolamento de leveduras selvagens pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. O meio Lin apresentou melhores resultados detectando linhagens de *Saccharomyces* como *Sacch. willianus*, *Sacch. pastorianus*, *Sacch. diastaticus*, *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* e *Sacch. fragilis*. Já os meios Actidiona e Lisina são indicados para a seleção de leveduras selvagens não-*Saccharomyces*, porém o meio Lisina mostrou-se mais promissor, detectando *Candida mycoderma*, *C. pseudotropicalis*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens* etc. Portanto, segundo este autor, os meios Lisina e Lin foram mais eficientes para a detecção de leveduras selvagens em cervejaria.

LONGLEY *et alii* (1978), na intenção de facilitar o controle microbiológico e de encontrar melhores resultados na detecção de leveduras contaminantes em cervejaria, modificaram os meios de Cristal Violeta ágar e WLN ágar adicionando uma mistura de ergosterol + Tween 80. Essa nova composição estimulou o crescimento do gênero *Saccharomyces*, permitindo o desenvolvimento de colônias maiores que a de outros gêneros.

Analisando os microrganismos presentes na cerveja, HARPER (1981) verificou a presença de bactérias acidófilas, coliformes e linhagens do gênero *Zymomonas*. Através do meio WLN acrescido de 25 ppm de clorotetraciclina, ele isolou várias leveduras pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis*, entre outros.



Estudos comparativos na detecção de leveduras contaminantes em cervejaria demonstraram que os meios Lisina ágar, Sulfato de Cobre ágar e Pantotenato ágar foram bastante confiáveis na busca de leveduras selvagens não-*Saccharomyces*. No entanto, estes meios avaliados não foram promissores em relação a leveduras selvagens do gênero *Saccharomyces* (RÖCKEN & MARG, 1983 *apud* DEÁK, 1991).

HOPE (1987) também sugere o uso dos meios Lisina e Lin para o isolamento de leveduras selvagens de cerveja. Este mesmo autor constatou que o ácido cinâmico, quando adicionado ao meio de cultura em concentração de 100 µg/ml, consegue selecionar um grande número de leveduras contaminantes do processo de produção de cerveja.

Devido a escassez de literatura sobre metodologia para a seleção de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica, OLIVEIRA & PAGNOCCA (1988) analisaram vários meios de culturas utilizados em cervejarias e os adaptaram para usinas de açúcar e álcool. Os meios utilizados foram: WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar) para contagem total de leveduras; WLD (Wallerstein Laboratories Differential Agar) com adição de actidiona, para contagem de leveduras selvagens não-*Saccharomyces cerevisiae*; Lisina ágar indicado para detectar leveduras selvagens não-*Saccharomyces*; Lin ágar modificado pela adição de ergosterol + Tween 80 e pela alteração na concentração de cristal violeta, indicado para *Saccharomyces*; e Nakagawa ágar para detectar *Sacch. diastaticus*, contaminante de cerveja. Estudando usinas que operam com linhagem de *Sacch. uvarum*, selecionaram do fermento centrifugado, fermento tratado e do mosto em fermentação, linhagens de *Sacch. cerevisiae* (WLN e WLD), *Candida famata* (Lin ágar e Nakagawa ágar) e *Hansenula anomala* (Nakagawa ágar).

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Coleta das Amostras

As amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram coletadas no decorrer da safra 92/93 de cana de açúcar, em duas usinas: Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool, localizada na cidade de Piracicaba (SP) e Usina Açucareira Santa Cruz S/A, localizada na cidade de Capivari (SP). As duas usinas em estudo utilizam como fermento inicial o IZ 1904 por apresentar condições propícias para a fermentação alcoólica. Esse fermento é uma linhagem de *Saccharomyces uvarum*, atualmente classificada como sinônimo de *Saccharomyces cerevisiae* (KREGGER-VAN RIJ, 1984b), obtido pelo Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida" da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP.

No período de maio a novembro de 1992 foram realizadas seis coletas de amostras de mosto, vinho levedurado e leite levedurado utilizadas para o isolamento de leveduras contaminantes do processo fermentativo nas duas usinas de açúcar e álcool. As coletas foram definidas em um número de três coletas por usina, sendo a primeira coleta no início da safra 92/93, a segunda coleta em um período intermediário da safra e a terceira coleta no final da safra, totalizando 6 coletas de amostras.

As coletas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool foram realizadas nos dias 07 de maio (6<sup>o</sup> dia de safra), 24 de junho (49<sup>o</sup> dia) e 09 de outubro (149<sup>o</sup> dia) e as coletas na Usina Açucareira Santa Cruz S/A realizadas nos dias 01 de junho (7<sup>o</sup> dia), 15 de julho (51<sup>o</sup> dia) e 03 de novembro (162<sup>o</sup> dia).

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro (500ml) estéreis e suas respectivas temperaturas foram determinadas no local de coleta. As amostras foram transportadas ao laboratório em recipiente de isopor com gelo, onde foram imediatamente processadas, em um período máximo de 8 horas após a coleta.

Assepticamente foi separada uma alíquota de cada amostra para determinação do pH e Brix.

## 3.2 - Processamento das Amostras

As amostras coletadas foram submetidas a diluições seriadas e plaqueamento em diferentes meios de cultura. Após a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC's) foi realizado o isolamento, a purificação e a identificação das linhagens representativas.

### 3.2.1 - Contagem de Microrganismos

Para a contagem dos microrganismos, as amostras foram submetidas a diluições decimais em série, seguindo o método de transferência de 1 ml da amostra para tubos de ensaio com 9 ml de água destilada estéril, até atingir as diluições adequadas. As diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  foram plaqueadas em superfície.

Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- WLN ágar

5,0% de glicose, 0,055% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,0425% de KCl, 0,0125% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,0125% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,00025% de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,00025% de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,5% de casitona, 0,4% de extrato de levedura, 0,0022% de verde de bromocresol e 2,0% de ágar, pH=5,5.

- WLD ágar

WLN ágar suplementado de actidiona a 2,5 ppm.

- Lisina ágar

1,17% de YCB, 0,1% de Lisina e 2,0% de ágar.

- Lin ágar

0,4% de extrato de levedura, 0,2% de extrato de malte, 0,2% de peptona, 1,0% de glicose, 0,1% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05% de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,0006% de cristal violeta, 0,01% de fucsina sulfito e 2,0% de ágar.

Para inibir o crescimento de bactérias utilizou-se ácido nalidíxico e ampicilina a uma concentração final de 50 ppm para cada antibiótico. As placas, em duplicata, foram incubadas a  $30^\circ\text{C}$  por um período de 3 a 7 dias e as colônias foram contadas.

### **3.2.2 - Isolamento e Purificação de Leveduras**

Após a contagem dos microrganismos, colônias de diferentes meios de cultura foram selecionadas de forma a compor uma amostragem representativa da microbiota contaminante das amostras examinadas. As colônias morfológicamente distintas foram assepticamente transferidas para seus respectivos meios de isolamento, repicadas pelo método de estrias de esgotamento, purificadas e codificadas. Após a incubação a 30°C por 48-72 horas, foram caracterizadas quanto à coloração, brilho, textura, superfície, forma, margem e elevação das colônias. Os códigos das culturas isoladas e purificadas se encontram listados nos ANEXOS 1 e 2.

As culturas das placas de isolamento foram submetidas a uma segunda purificação pelo método de estrias de esgotamento em meio de GYP “Sabouraud” ágar (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de peptona e 2,0% de ágar). Após a incubação a 27°C por 72 horas, as colônias foram caracterizadas, em estereoscópio, quanto à coloração, brilho, textura, superfície, forma, margem e elevação das colônias.

As colônias foram transferidas também para caldo GYP “Sabouraud” (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 1,0% de peptona) e incubadas a 27°C por 24 horas. Após este período a pureza das linhagens foi constatada através de exame microscópico em preparação de lâmina à fresco.

### **3.2.3 - Preservação dos Isolados**

A minimização de perdas da viabilidade das culturas, visando a estabilidade das características genéticas e propriedades industriais das linhagens, foi obtida utilizando-se de três métodos distintos de preservação: repique e armazenamento a 4°C, preservação em óleo mineral e liofilização.

As culturas puras foram transferidas para tubos inclinados contendo meio GYMP ágar (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 0,2% de fosfato de sódio monobásico e 2,0% de ágar, pH=5,5) (HAGLER, 1978) e após o crescimento das linhagens foram estocados a 4°C. Essas culturas foram reativadas periodicamente para identificação.

As culturas foram também submetidas ao processo de preservação em óleo mineral, que consiste no crescimento das linhagens em tubos inclinados de GYMP ágar por 24 horas e estas então são recobertas com uma camada de óleo mineral estéril e mantidas a temperatura ambiente.

Para evitar a possibilidade de perdas as culturas foram também depositadas na Coleção de Culturas Tropical e preservadas pelo método de liofilização de acordo com KIRSOP & SNELL (1984). Os códigos das linhagens depositadas na Coleção de Culturas Tropical (CCT) estão listados no ANEXO 2.

### 3.3 - Caracterização das Leveduras

O estudo taxonômico das leveduras foi efetuado utilizando-se a metodologia recomendada por LODDER (1970), KREGER-VAN RIJ (1984b) e BARNETT *et alii* (1983 e 1990), que consiste na classificação baseada em características de reprodução vegetativa, reprodução sexuada e testes fisiológicos e bioquímicos. Além destas literaturas básicas, outros trabalhos dedicados à identificação de leveduras como HAGLER & MENDONÇA-HAGLER (1991), MORAIS (1991) e ROSA (1993) também foram consultados.

Utilizou-se a técnica de "replica plate" (replicação múltipla) para os testes de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, produção de esporos sexuais, formação de balistosporos, resistência à cicloheximida, crescimento em meio sem vitaminas, osmotolerância a 50% de glicose e a 10% de NaCl, produção de ácidos a partir da glicose, síntese de compostos amilóides e a reação com DBB (Diazonium Blue B). No caso de dúvidas na interpretação dos resultados, os testes foram repetidos em tubos de ensaio, especialmente para os testes de produção de ácidos e da assimilação de compostos nitrogenados, como nitrato de potássio.

A técnica de "replica plate" consiste na replicação simultânea de 25 linhagens diferentes contidas em uma placa matriz com o auxílio de um multinoculador (FIGURA 1a, 1b). Este sistema foi desenvolvido no Laboratório de Taxonomia e Ecologia Microbiana do Instituto de Microbiologia da U.F.R.J. (HAGLER, 1978).

O inóculo utilizado para estes testes foi preparado a partir de culturas crescidas em GYP "Sabouraud" ágar por 48 horas, que foram transferidas para tubos com "Yeast Nitrogen Base" (YNB) 10x (6,7g em 100ml de água destilada), contendo 0,1% de glicose, onde permaneceram por 5 dias a 27°C, sendo agitados diariamente para exaurir suas reservas nutritivas. Decorrido esse período, alíquotas de cerca de 0,3 ml dessa suspensão celular foram transferidas para os orifícios da placa matriz do multinoculador, para serem inoculadas nas placas-testes.

Linhagens de *Candida versatilis* (CCT 0098), *Saccharomyces cerevisiae* (CCT 0770), *Kluyveromyces lodderi* (CCT 0777), *Schizosaccharomyces pombe* (CCT 0780), *Trichosporon beigelli* (CCT 1903), *Candida krusei* (CCT 2635), *Pichia pastoris* (CCT 2644) e *Hansenula anomala* (CCT 2648) foram utilizados como culturas-padrão para confirmação e comparação dos resultados.

Para a apresentação dos resultados referentes à identificação das leveduras foram utilizadas as seguintes notações: (+) resposta positiva à prova; (-) resposta negativa à prova; (l) resposta lenta à prova; (f) resposta fraca à prova; (c) colônia creme; (b) colônia branca; (bc) colônia branco-creme; (v) colônia vermelha; (bm) brotamento multilateral; (bb) brotamento bipolar e (nd) resultado não determinado.

### **3.3.1 - Características da Reprodução Vegetativa**

#### **3.3.1.1 - Morfologia das células vegetativas**

Arranjo, forma das células e o tipo de divisão celular apresentados pelas culturas foram observados através de análise microscópica das linhagens crescidas em meio líquido (caldo GYP "Sabouraud") a 27°C por 24 horas. Características como formação de anel, película e sedimento também foram observadas em período de 7, 14 e 21 dias.

As características de coloração, brilho, textura, superfície, forma, margem e elevação das colônias em meio sólido foram observadas tanto em GYP "Sabouraud" ágar como em meio de isolamento (WLN ágar, WLD ágar, Lisina ágar ou Lin ágar), através de estereoscópio, após a incubação a 30°C por 48-72 horas.

### **3.3.1.2 - Microcultivo**

Algumas leveduras apresentam a característica de formar pseudomicélios, micélios verdadeiros e/ou artrósporos em determinados meios de cultura.

Culturas de leveduras foram inoculadas na forma de um risco em placas de Petri contendo meio de CMA (Corn Meal Ágar - Difco) e recobertas com lamínulas estéreis para a observação destas características. As placas foram incubadas a 27°C e observadas em microscópio óptico após 5 a 7 dias de incubação. Em algumas linhagens foi possível também verificar a formação de esporos sexuais.

### **3.3.1.3 - Formação de balistosporos**

A formação de balistosporos foi verificada utilizando-se da técnica de dois fundos de placas de Petri unidas com fita adesiva, uma contendo meio pobre (CMA) e outra contendo meio rico (GYP "Sabouraud" ágar). As culturas, inoculadas no meio CMA através da técnica de "replica plate" descrita no item 3.3, foram incubadas a 27°C por 3 a 4 semanas, com o meio CMA na parte superior, para que, na presença de balistosporos, estes descarregassem seus esporos no meio GYP "Sabouraud" ágar, e então pudessem ser observados macroscopicamente e posteriormente ao microscópio óptico.

## **3.3.2 - Características da Reprodução Sexuada**

A produção de esporos sexuais foi verificada através de análise microscópica das linhagens desenvolvidas nas placas com meio de isolamento.

As culturas de leveduras foram também inoculadas nos meios de Acetato ágar de Fowell (0,5% de acetato de sódio trihidratado, 2,0% de ágar, pH=6,5~7,0), YM ágar (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1,0% de glicose e 2,0% de ágar) e CMA utilizando-se da técnica de "replica plate" descrita no item 3.3 para a observação da produção de esporos. Após a incubação a 27°C por 5 a 7 dias, foi verificada a produção de esporos ao microscópio óptico em preparação à fresco, anotando-se o tamanho e a forma dos ascos e ascósporos, o número de ascósporos por

asco, a deiscência dos ascos, bem como a presença ou ausência de conjugação. No caso da não produção de esporos, a cultura foi novamente incubada por um período de um mês, e lâminas foram preparadas periodicamente para a verificação destas características. Outros meios de esporulação como Gorodkova ágar e MEA também foram utilizados. Em casos de suspeita, com difícil visualização dos esporos, foi adotada a técnica de coloração de esporos pelo método de Vitz para sua confirmação. Este método consiste na coloração das células de leveduras fixadas em lâmina de vidro com solução de 5,0% de verde de malaquita a 80°C (aquecimento em bico de Bunsen) por 60 segundos, seguido da lavagem em água corrente por 30 segundos e posterior coloração com solução de 0,5% de safranina por 30 segundos a temperatura ambiente e lavagem com água corrente. As células vegetativas coram-se em vermelho e os esporos sexuais em verde.

### **3.3.3 - Características Fisiológicas e Bioquímicas**

Estabelecida a pureza e determinadas as principais características morfológicas da culturas, foram realizados os testes para a verificação das principais características fisiológicas e bioquímicas.

#### **3.3.3.1 - Fermentação de carboidratos**

As linhagens foram testadas quanto a habilidade de fermentar diferentes carboidratos. As culturas que demonstraram capacidade em fermentar inicialmente a glicose foram em seguida testadas quanto à capacidade de fermentar alguns dissacarídeos (sacarose, maltose e lactose), trissacarídeo (rafinose) e hexose (galactose). Os carboidratos foram preparados em soluções estoques a 6%, com exceção da rafinose a 12% e foram esterilizados por filtração (Millipore) em membranas de celulose (0,22µm de porosidade).

O poder fermentativo das linhagens foi verificado em tubos de ensaio com tubos de Durham invertidos, contendo 2ml de Meio Basal (0,45% de extrato de levedura, 0,75% de peptona e solução de azul de bromotimol até a coloração verde-garrafa) acrescido de 1ml do carboidrato em estudo. Os tubos foram inoculados com 0,1ml de uma suspensão celular densa de culturas de 24 horas crescidas em GYP "Sabouraud" ágar e incubados a 27°C. As leituras foram realizadas diariamente observando a produção de ácido através



da mudança de coloração do meio basal para amarelo, e a formação de gás capturado no interior do tubo de Durham. As observações foram feitas por um período máximo de 21 dias.

Para efeito de identificação só foram considerados positivos os tubos que apresentaram produção de gás. A quantidade de gás produzida e a velocidade de produção indicaram o potencial fermentativo das linhagens e o registro dos resultados foi feito considerando-se:

- Positivo: quando o tubo de Durham continha de 1/3 a 3/3 de gás em 1 a 3 dias de incubação
- Lento: quando o tubo de Durham continha de 1/3 a 3/3 de gás em período superior a 3 dias
- Fraco: quando o tubo de Durham continha apenas bolhas de gás
- Negativo: quando não havia a produção de gás

### 3.3.3.2 - Assimilação de compostos de carbono

Para a caracterização das linhagens isoladas foram testados as seguintes fontes de carbono:

- Hexoses: glicose, galactose, L-sorbose, L-ramnose
- Dissacarídeos: sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose
- Trissacarídeos: rafinose, melizitose
- Polissacarídeos: amido solúvel, inulina
- Pentoses: D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose
- Álcoois: eritritol, ribitol (adonitol), D-manitol, inositol, metanol, etanol, glicerol, galactitol (dulcitol), D-glucitol (sorbitol)
- Ácidos orgânicos: ácido succínico, ácido cítrico, ácido DL-lático
- Glicosídeos:  $\alpha$ -metil D-glicosídeo, salicina

As fontes de carbono foram preparadas em soluções estoque a 5%, com exceção da rafinose a 10% e foram esterilizadas por filtração em membranas de celulose (0,22µm de porosidade) através de filtro Millipore. Todas as fontes de carbono foram utilizadas em uma concentração final de 0,5%, exceto a rafinose, que foi utilizada a 1%. As soluções de ácidos orgânicos tiveram seus pHs ajustados para 5,6.

A inoculação foi feita através da técnica de "replica plate", descrita no item 3.3, em placas de Petri contendo "Yeast Nitrogen Base" 10x (YNB) e a solução estoque do composto de carbono a ser testado, acrescidas de 2% de ágar. Foram inoculadas também, placas com YNB ágar + glicose como controle positivo e placas com YNB ágar (sem a fonte de carbono) como controle negativo. As placas, inoculadas a partir da placa matriz, foram incubadas a 27°C.

As leituras foram realizadas com 7, 14 e 21 dias, adotando-se uma escala de 0 a 3 para avaliação do crescimento, considerando não somente o diâmetro da colônia, mas também a densidade e o vigor do crescimento, baseado no seguinte critério:

3+: quando a densidade da colônia foi aproximadamente igual ao controle positivo (meio com glicose);

2+: quando a densidade da colônia foi inferior ao controle positivo, porém bastante superior ao controle negativo (meio sem glicose);

1+: quando houve pouco crescimento, porém superior ao controle negativo;

0: negativo, quando o crescimento foi semelhante ao controle negativo.

Para efeito de identificação foram considerados como positivos os resultados 3+ e 2+. O resultado 1+ foi considerado fraco e o resultado 0 como negativo.

### 3.3.3.3 - Assimilação de compostos de nitrogênio

A capacidade de utilizar alguns compostos nitrogenados como única fonte de nitrogênio foi detectada pela técnica de "replica plate" utilizando-se o meio "Yeast Carbon Base" (YCB) 10x (11,7g em 100ml de água destilada) acrescido de 2% de ágar e de soluções estoques das seguintes fontes de nitrogênio:

- Nitrato de potássio            0,78g/100ml
- Nitrito de sódio                0,26g/100ml
- L-Lisina                            0,56g/100ml
- Etilamina                         0,64g/100ml

Como controle positivo foram utilizadas placas com YCB ágar + glicose, e como controle negativo placas com YCB ágar (sem fonte de nitrogênio).

A inoculação, as leituras e os resultados foram verificados da mesma maneira que na assimilação de compostos de carbono.

### 3.3.3.4 - Resistência à cicloheximida

A habilidade das leveduras em suportar altos teores de cicloheximida (actidiona) foi verificada utilizando-se da técnica de "replica plate". A cicloheximida foi testada nas concentrações de 100 ppm e 1000 ppm. Os procedimentos para a realização do teste e análise dos resultados foram semelhantes àqueles descritos no item 3.3.3.2.

### 3.3.3.5 - Crescimento a diferentes temperaturas

A capacidade de crescimento das culturas a 37°C e 40°C foi verificada utilizando-se caldo GYP "Sabouraud". Os tubos de ensaio foram inoculados e incubados em banho-maria, com o nível da água pelo menos um centímetro acima do limite superior do meio existente nos tubos. As leituras foram realizadas através da turbidez do meio após 48 horas de incubação.

### **3.3.3.6 - Crescimento em meio sem vitaminas**

As linhagens foram testadas quanto a capacidade de crescimento na ausência de vitaminas. As culturas foram inoculadas em meio de "Vitamin Free Base" ágar (VFB) pela técnica de "replica plate" anteriormente descrita. Os procedimentos para a realização do teste e análise dos resultados foram semelhantes àqueles descritos no item 3.3.3.2.

### **3.3.3.7 - Osmotolerância a 50% de glicose e a 10% de NaCl**

A resistência das linhagens a altas pressões osmóticas foi verificada utilizando-se os meios de GYP ágar + 50% de glicose (50,0% de glicose, 1,0% de extrato de levedura e 3,0% de ágar) e de 10% de cloreto de sódio + 5% de glicose (10,0% de cloreto de sódio, 5% de glicose, 10ml de solução de YNB e 2,0% de ágar), através da técnica de "replica plate". As placas foram incubadas a 27°C e as leituras realizadas em 7, 14 e 21 dias de incubação, conforme descrito no item 3.3.3.2.

### **3.3.3.8 - Produção de ácido a partir da glicose**

A capacidade de produção de ácidos a partir da glicose foi verificada pela inoculação das culturas em meio de CaCO<sub>3</sub> ágar (0,5% de extrato de levedura, 5,0% de glicose, 0,5% de carbonato de cálcio e 2,0% de ágar), utilizando-se da técnica de "replica plate", conforme descrito no item 3.3. Após 7 dias de incubação a 27°C, o ácido formado pelas linhagens é capaz de dissolver o carbonato de cálcio disperso no meio de cultura, produzindo halos translúcidos.

### **3.3.3.9 - Síntese de compostos amilóides**

As placas utilizadas como controle positivo (YNB ágar + glicose) no teste de assimilação de compostos de carbono foram utilizadas para verificar a síntese de compostos amilóides. Após 21 dias de incubação as placas foram recobertas com solução de lugol durante alguns minutos. Em casos positivos ocorre uma alteração da cor da colônia para uma coloração azulada.

### 3.3.3.10 - Hidrólise de Uréia + DBB

O teste conjugado DBB + uréia é um método alternativo onde o teste de coloração de DBB e o teste de hidrólise da uréia são observados simultaneamente (HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1991).

Após o crescimento em GYP "Sabouraud" ágar as culturas foram inoculadas em tubos contendo YCB-Uréia ágar (1,17% de YCB, 0,02% de fucsina ácida, 2,0% de ágar e 2,0% de uréia esterilizada por filtração, pH=5,5) e incubadas a 27°C por 72 horas. A produção de urease foi verificada pela mudança de coloração do meio de rosa para incolor.

Após a leitura da urease os tubos foram incubados a 55°C por 16 horas. Em solução de tampão tris (0,25M/pH=7,0) foi adicionado o sal DBB (o-dianisidine tetrazotized, Sigma), sob rigorosas condições de refrigeração. Imediatamente após a mistura dos reagentes, pingou-se algumas gotas desta solução sobre as culturas. Após 1 a 2 minutos realizou-se a leitura do teste. A reação foi considerada positiva quando apresentou uma coloração vermelha escura ou violeta, e negativa quando não houve alteração de cor.

Além do teste conjugado DBB + uréia, o teste DBB foi confirmado separadamente em placas de GYP "Sabouraud" ágar, inoculadas pela técnica de "replica plate" e incubadas a 27°C por 21 dias.

A habilidade de hidrolisar a uréia foi também verificada pela inoculação das culturas crescidas em GYP "Sabouraud" ágar por 24 horas em meio de Uréia ágar (0,1% de glicose, 0,1% de peptona, 0,5% de NaCl, 0,2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1ml de solução 0,12% de vermelho de fenol e 2,0% de ágar, pH=6,8). Após o crescimento a 27°C por 5 a 7 dias observou-se o crescimento positivo pela mudança de coloração do meio de cultura, que passa de amarelo para rosa intenso.

### 3.3.3.11 - Atividade da arbutina

As culturas de leveduras crescidas em GYP "Sabouraud" ágar foram transferidas para Arbutina ágar (0,5% de arbutina, 0,5% de extrato de levedura, 2,0% de ágar e 1ml de solução 1,0% de citrato férrico de amônia) para a verificação da habilidade em hidrolisar a arbutina. Após a incubação a 27°C por 5 a 7 dias foi observada a mudança de coloração do meio de cultura de branco para marrom escuro, indicando resultado positivo.

### 3.3.4 - Seleção das Culturas

Diante da dificuldade em se identificar em nível de espécie um grande número de isolados de leveduras, alguns testes de identificação foram selecionados para triagem e agrupamento das linhagens. A realização de um conjunto simplificado de testes preliminares permite o agrupamento de linhagens idênticas, diminuindo o número de culturas submetidas aos testes completos de identificação.

O conjunto simplificado de testes preliminares constituiu-se de morfologia das células vegetativas, microcultivo, formação de balistosporos, crescimento em YM ágar, Acetato ágar Fowell e CMA e MEA (5,0% de extrato de malte e 3,0% de ágar) para observação da produção de esporos sexuais, assimilação de glicose, sacarose, celobiose, eritritol, inositol e nitrato de potássio, fermentação da glicose, crescimento a 37°C, produção de ácido a partir da glicose, síntese de compostos amilóides, teste conjugado "DBB + uréia", que foram realizados com todas as linhagens isoladas.

Após a realização desta triagem, conseguiu-se agrupar os isolados com características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas semelhantes entre si, identificando-os em nível de gênero.

O gênero *Candida*, por ser mais significativo e por representar numericamente a maior parte das linhagens contaminantes nas amostras analisadas, foi submetido aos testes completos de identificação, sendo classificado em nível de espécie.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Contagem Microbiana

As TABELAS 1 e 2 mostram os parâmetros físico-químicos determinados nas amostras coletadas nas duas usinas de açúcar e álcool estudadas.

Os resultados das contagens microbianas das amostras examinadas encontram-se descritos na TABELA 3. Pelos valores encontrados, nota-se que houve uma diminuição do número de microrganismos encontrados no meio WLN ágar em relação aos outros meios de cultura utilizados. Este fato é compreensível já que o meio WLN ágar é indicado para contagem total de microrganismos, enquanto que os outros meios são seletivos para determinados grupos de leveduras.

### 4.2 - Ocorrência de Gêneros de Leveduras nas Diferentes Amostras

A partir dos meios de cultivo utilizados (WLN ágar, WLD ágar, Lisina ágar e Lin ágar), foram isoladas 439 linhagens de leveduras referentes as seis coletas realizadas. Através da TABELA 4 verifica-se que foram isoladas 221 linhagens de leveduras das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e 218 linhagens da Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

A lista de gêneros e o número de linhagens de leveduras isoladas das amostras de mosto, vinho levedurado e leite levedurado coletadas nas usinas Costa Pinto e Santa Cruz encontram-se na TABELA 5.

Das 221 linhagens isoladas da Usina Costa Pinto, 213 (96,39%) apresentaram respostas negativas aos testes de DBB + uréia (HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1991) sendo consideradas ascomicéticas ou seus estados anamórficos. As 8 linhagens restantes (3,61%) responderam positivamente a estes testes e foram consideradas pertencentes aos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*. A partir do conjunto simplificado de testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos conseguiu-se classificar as 221 linhagens de leveduras em nível genérico, ficando assim distribuídas: *Saccharomyces* (44,80%), *Candida* (38,91%), *Pichia* (5,43%), *Zygosaccharomyces/*

*Torulaspota* (2,72%), *Saccharomyces/Hanseniaspora* (1,81%), *Cryptococcus* (1,36%), *Issatchenkia* (1,36%), *Schizosaccharomyces* (1,36%), *Trichosporon* (1,36%) e *Rhodotorula* (0,90%) (FIGURA 2).

Das 218 linhagens isoladas da Usina Santa Cruz, 216 (99,08%) apresentaram respostas negativas aos testes de DBB + uréia sendo consideradas ascomicéticas ou seus estados anamórficos. Somente 2 linhagens (0,92%) responderam positivamente a estes testes e foram classificadas como representantes do gênero *Rhodotorula* (deuteromicética). A partir do conjunto simplificado de testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, os 218 isolados foram classificados nos seguintes gêneros: *Candida* (43,58%), *Saccharomyces* (33,03%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (10,09%), *Kluyveromyces* (8,71%), *Issatchenkia* (1,83%), *Rhodotorula* (0,92%), *Schizosaccharomyces* (0,92%), *Pichia* (0,46%) e *Saccharomyces/Hanseniaspora* (0,46%) (FIGURA 3).

Algumas linhagens submetidas aos testes preliminares de identificação apresentaram características morfológicas e bioquímicas muito semelhantes entre si e pertencentes a dois gêneros distintos. Por este motivo, estas linhagens não puderam ser caracterizadas em um único gênero e foram então enquadradas nos grupos *Saccharomyces/Hanseniaspora* e *Zygosaccharomyces/Torulaspota*.

Alguns gêneros de leveduras foram isolados apenas em uma das usinas de açúcar e álcool (TABELA 5). *Trichosporon* e *Cryptococcus* foram detectados apenas na Usina Costa Pinto, enquanto que *Kluyveromyces* foi isolado apenas na Usina Santa Cruz. Alguns gêneros foram detectados em apenas uma ou duas amostras coletadas na Usina Costa Pinto. *Zygosaccharomyces/Torulaspota* foi isolado apenas das amostras de vinho levedurado, *Rhodotorula* foi isolado apenas de leite levedurado e *Cryptococcus* apenas de mosto. *Schizosaccharomyces* foi encontrado nas amostras de vinho e leite levedurados, enquanto que *Trichosporon* foi detectado em mosto e leite levedurado. O mesmo ocorreu com as amostras coletadas na Usina Santa Cruz. Os gêneros *Rhodotorula* e *Saccharomyces/Hanseniaspora* foram isolados apenas das amostras de mosto, enquanto que *Pichia* foi isolado apenas de leite levedurado. O gênero *Schizosaccharomyces* foi detectado nas amostras de vinho e leite levedurados.



A microbiota associada aos processos fermentativos nas duas usinas de açúcar e álcool em estudo, constituiu-se basicamente de linhagens ascomicéticas e seus estados anamorfos. Ocorreu uma predominância de gêneros fermentativos, como *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces/Torulaspota*, *Schizosaccharomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces/Hanseniaspora*, que fermentaram vigorosamente a glicose. Este resultado está em concordância com outros trabalhos de levantamento de leveduras em processos fermentativos. ANDERSON *et alii* (1988) selecionaram de usinas de cana de açúcar diversos gêneros de leveduras termotolerantes, como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Geotrichum* e *Debaryomyces*.

Poucos gêneros e em baixa frequência foram encontrados como não fermentadores, como *Trichosporon*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Apesar destes gêneros apresentarem características oxidativas e não serem frequentemente encontrados em fermentação, muitos autores têm isolado estes microrganismos de processos fermentativos e produtos com altos teores de açúcares (MORA *et alii*, 1988).

JOLY (1968) isolou de amostras de açúcar mascavo uma linhagem de *Rhodotorula glutinis*. MORA *et alii* (1988) detectou linhagens de *Cryptococcus albidus* em mosto do processo de produção de vinho. Linhagens de *Rhodotorula pallida*, *Rh. rubra*, *Cryptococcus kvetzingii* e *Trichosporon cutaneum* também foram encontrados em moendas de usinas de cana de açúcar (LIMA *et alii*, 1974). Em amostras de melão de açúcar cristal e demerara, SOUZA *et alii* (1977) isolou linhagens de *Rhodotorula pallida*, *Rh. graminis*, *Cryptococcus albidus* var. *albidus* e *Cr. infirmominiatus*, além de outros gêneros oxidativos.

A grande maioria (41,23%) das linhagens contaminantes das amostras de mosto, vinho e leite levedurados foi pertencente ao gênero *Candida*. O gênero *Saccharomyces* foi também bastante frequente (38,95%), embora muitas destas linhagens possam vir a serem caracterizadas como *S. cerevisiae*, ou seja, o próprio fermento empregado na produção de álcool pelas usinas estudadas, já que este grupo não foi caracterizado em nível específico. Os outros gêneros de leveduras isoladas representaram apenas 19,82% do total da microbiota contaminante.

A ocorrência dos gêneros *Saccharomyces* e *Candida* como contaminantes em usinas e destilarias é freqüente na literatura. LIMA *et alii* (1974) detectaram espécies de *Candida* (*C. diddensi*, *C. fabiani*, *C. intermedia* e *C. santamariae*) e *Saccharomyces* (*S. uvarum*) como deterioradoras do caldo bruto, caldo misto e água de embebição, em moendas de usina de cana de açúcar. Em trabalhos realizados por OLIVEIRA & PAGNOCCA (1988) encontrou-se no fermento centrifugado, fermento tratado e mosto em fermentação, várias espécies pertencentes aos gêneros *Candida* e *Saccharomyces*, como *C. famata*, *S. kluyveri*, *S. cerevisiae*, além de *Hansenula anomala*. CEREDA *et alii* (1989) também detectou a presença destes dois gêneros em caldo de sorgo em fermentação natural.

Em levantamentos da microbiota contaminante de amostras de melaço e açúcares os gêneros *Saccharomyces* e *Candida* estão sempre relacionados (JOLY, 1968; BIDAN & HEITZ, 1973). SOUZA *et alii* (1977) isolaram de amostras de melaço de açúcar cristal linhagens de *Candida melinii*. TILBURY (1980) isolou linhagens de *Candida etchellsii*, *C. versatilis* e *C. gropengiesseri* do processo de produção de açúcares de cana e beterraba, e linhagens de *Saccharomyces rouxii* de cana de açúcar em deterioração.

TOKUOKA *et alii* (1985) cita os gêneros *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces* e *Candida* como constituintes de melaço, açúcar bruto e refinado. Porém, o gênero *Saccharomyces* não foi detectado em nenhuma destas amostras analisadas por estes autores.

#### 4.3 - Ocorrência de Espécies de *Candida* nas Diferentes Amostras

Em decorrência da grande diversidade taxonômica e da importância metabólica do gênero *Candida* e em função da alta ocorrência dentre os contaminantes isolados, este gênero foi selecionado para caracterização taxonômica completa. O gênero *Candida* mostrou ser o grupo de maior freqüência entre os demais grupos contaminantes isolados (41,23%), e por isto foi selecionado para identificação em nível de espécie. Portanto, com as 181 linhagens pertencentes ao gênero *Candida* foram realizados os testes completos e necessários para a identificação em nível de espécie. A lista de espécies e o número de linhagens de *Candida* isoladas das amostras de mosto, vinho levedurado e leite levedurado coletas nas usinas Costa Pinto e Santa Cruz encontram-se na TABELA 6.

As espécies mais frequentes entre as 86 linhagens de *Candida* isoladas da usina Costa Pinto foram classificadas como *Candida tropicalis* (30,23%), *C. stellata* (25,58%), *C. rugosa* (12,79%) e *C. krusei* (10,46%). Outras espécies também foram classificadas porém com uma frequência mais baixa: *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* (5,81%), *C. colliculosa* (3,49%), *C. milleri/C. holmii* (3,49%), *C. guilliermondii* (2,33%), *C. lusitaniae* (2,33%), *C. magnoliae* (2,33%) e *C. utilis* (1,16%) (FIGURA 4). As 95 linhagens do gênero *Candida* isoladas da usina Santa Cruz foram classificadas como *Candida stellata* (46,32%), *C. tropicalis* (20,00%), *C. krusei* (10,53%), *C. rugosa* (9,47%), *C. colliculosa* (6,32%), *C. kefir* (4,21%), *C. dattila* (1,05%), *C. lipolytica* (1,05%) e *C. parapsilosis* (1,05%) (FIGURA 5).

As linhagens classificadas como *C. milleri/C. holmii* apresentaram características morfológicas e bioquímicas pertencentes à estas duas espécies. De acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990) *C. holmii* apresenta habilidade de crescimento na ausência de niacina e pantotenato de cálcio, enquanto que *C. milleri* apresenta resultados de crescimento variáveis ou duvidosos na presença destas vitaminas. Em nossos estudos não foi verificado a habilidade da assimilação de niacina e pantotenato de cálcio e portanto, estas linhagens foram enquadradas no grupo *C. milleri/C. holmii*.

A maioria das espécies de *Candida* encontradas tanto na usina Costa Pinto, como na usina Santa Cruz, foram linhagens fermentativas (88,95%). Dentre estas linhagens 75,69% foram capazes de fermentar a sacarose. Por outro lado, 24,31% das linhagens não foram capazes de fermentar a sacarose sendo leveduras selvagens indesejáveis, como é o caso de *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae*, *C. lipolytica* e *C. parapsilosis*. Caso ocorra condições que venham a favorecer o crescimento destas linhagens, todo o processo poderá ser afetado com a queda na produtividade e perda do fermento.

Através da TABELA 6 pode-se observar que algumas espécies foram isoladas em apenas uma das usinas de açúcar e álcool. *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens*, *C. milleri/C. holmii*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. magnoliae* e *C. utilis* foram isoladas apenas na Usina Costa Pinto, enquanto que *C. kefir*, *C. dattila*, *C. lipolytica* e *C. parapsilosis* foram encontradas apenas na Usina Santa Cruz. Algumas espécies foram isoladas em apenas uma ou duas das amostras analisadas na Usina Costa Pinto. *C. colliculosa* e *C. utilis* foram encontradas apenas nas amostras de leite levedurado. *C. rugosa*, *C. krusei* e *C. magnoliae* foram isoladas das amostras de vinho e leite levedurados, *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* e *C. milleri/C. holmii* foram isoladas das amostras de mosto e vinho levedurado, enquanto que *C. guilliermondii* e *C.*

*lusitaniae* foram isoladas das amostras de mosto e leite levedurado. O mesmo ocorreu com as amostras coletadas na Usina Santa Cruz. *C. dattila* foi encontrada apenas nas amostras de leite levedurado, *C. lipolytica* nas amostras de mosto e *C. parapsilosis* nas amostras de vinho levedurado. *C. rugosa* e *C. kefir* foram isoladas das amostras de vinho e leite levedurados.

*Candida stellata*, a espécie do gênero *Candida* mais freqüente entre os isolados, foi detectada nas amostras de mosto, vinho e leite levedurados coletados nas duas usinas em estudo. Esta espécie está freqüentemente associada a microbiota de uvas e sucos de uva (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984) e a processos de fermentação de vinho (GOTO & YOKOTSUKA, 1977; FLEET *et alii*, 1984; HEARD & FLEET, 1986; MORA *et alii*, 1988). GOTO & YOKOTSUKA (1977) verificaram que 13 a 19% dos contaminantes da fermentação do vinho eram compostos de *C. stellata*. MORA *et alii* (1988) relata que *C. stellata* foi a espécie contaminante mais freqüente em mosto da fermentação de vinhos branco e tinto, principalmente no início do processo fermentativo.

*Candida tropicalis*, a segunda espécie de maior ocorrência entre os isolados de *Candida*, ocorreu tanto nas amostras de mosto como de leite e vinho levedurados, coletados nas duas usinas em estudo. BARNETT *et alii* (1983 e 1990) relatam a ocorrência desta espécie em amostras de melão, frutos, solo, água, sauekraut, homem e outros mamíferos.

*Candida krusei* esteve presente tanto nas amostras da usina Costa Pinto como na usina Santa Cruz. Esta espécie e seu estado perfeito *Issatchenkia orientalis* estão associadas a deterioração de cervejas (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990), a processos de fermentação industrial (MEYER *et alii*, 1984) e a fermentação de vinhos (FLEET *et alii*, 1984; HEARD & FLEET, 1986). BARNETT *et alii* (1983) também relataram o isolamento de *I. orientalis* em amostras de solo, ar, iogurte, cacau, homem e outros mamíferos.

A espécie *Candida rugosa* foi isolada das amostras de vinho e leite levedurados tanto da usina Costa Pinto como da usina Santa Cruz. Esta espécie não foi detectada nas amostras de mosto. De acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990), *C. rugosa* está relacionada com a microbiota da produção de sake, a fábricas de margarina e a insetos.

*Torulaspota delbrueckii*, estado perfeito de *Candida colliculosa*, já foi encontrada como constituinte da microbiota de uvas, sucos de uvas, processos de produção de vinho (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984), açúcar bruto e usinas de cana de açúcar (MEYER *et alii*, 1984). Em nossos estudos, *C. colliculosa* foi isolada de amostras de mosto, vinho e leite coletadas na usina Santa Cruz e em amostras de leite levedurado coletadas na usina Costa Pinto.

*Candida kefir* foi isolada apenas em amostras de vinho e leite levedurados coletadas na usina Santa Cruz. De acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990) esta espécie foi isolada de usinas de açúcar e fábricas de vinho. Seu estado perfeito, *Kluyveromyces marxianus* também está relacionado com processos fermentativos e produtos com altos teores de açúcares. BIDAN & HEITZ (1973) isolaram esta espécie de amostras de açúcares. BARWALD & HAMAD (1984, *apud* DÉAK, 1991) analisando a microbiota contaminante do caldo de cana em usinas de cana de açúcar, isolaram linhagens termotolerantes de *Kluyveromyces marxianus*, promissoras por serem capazes de crescer em temperaturas de 55°C. ANDERSON *et alii* (1988) também detectaram em usinas de cana de açúcar linhagens termotolerantes de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, capazes de fermentar a sacarose em temperaturas superiores a 40°C. Algumas destas linhagens apresentaram habilidade de crescimento em temperaturas de até 47°C. Em nossos estudos, as linhagens de *C. kefir* foram capazes de crescer a temperaturas de 40°C.

*Candida guilliermondii*, estado imperfeito de *Pichia guilliermondii*, foi isolada em amostras de mosto e leite levedurado coletadas na usina Costa Pinto. Esta espécie não foi encontrada nas amostras coletadas na usina Santa Cruz. *P. guilliermondii* foi detectada em amostras de sake, cerveja, solo, ar, flores, suco de frutas e insetos (BARNETT *et alii*, 1983).

Espécies de *Candida dattila* já foram encontradas em uvas, geléias de ameixa, solo (MEYER *et alii*, 1984), vinhos e frutas (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990). Seu estado perfeito, *Kluyveromyces thermotolerans*, é comumente associado a mosto de fermentação de vinho (MORA *et alii*, 1988) e cervejas (BACK, 1987 *apud* DÉAK, 1991). Em nossos estudos apenas uma única linhagem foi isolada de leite levedurado coletado na usina Santa Cruz.

As linhagens de *Candida milleri*/*Candida holmii* foram encontradas somente em amostras de mosto e vinho levedurado na usina Costa Pinto. *Saccharomyces exiguus*, estado perfeito de *C. holmii*, foi isolada de mosto de uvas para a produção de vinho, pepino fermentado, solo e sauerkraut (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990).

Uma única linhagem de *Candida utilis* foi isolada da usina Costa Pinto na amostra de leite levedurado. JOLY (1968) detectou linhagens de *C. utilis* em amostras de açúcar mascavo e BARNETT *et alii* (1983) relaciona esta espécie como contaminante de destilarias, flores, homem e outros mamíferos. *Pichia jadinii* é reconhecida atualmente como fase perfeita de *C. utilis* e foi isolada como contaminante em fábricas de cervejas (BACK, 1987 *apud* DÉAK, 1991).

Somente uma linhagem de *Candida parapsilosis* foi isolada em amostras de vinho coletada na usina Santa Cruz. Nenhuma linhagem de *C. parapsilosis* foi detectada na usina Costa Pinto. De acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e MEYER *et alii* (1984) esta espécie já foi isolada de amostras de cervejas, suco de frutas, água, pickles e indústria de produção de ácido cítrico.

*Candida lusitaniae* (estado imperfeito de *Clavispora lusitaniae*), *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* (estado imperfeito de *Pichia ohmeri*) e *C. magnoliae* foram isoladas apenas nas amostras coletadas na Usina Costa Pinto. Em trabalhos anteriores não há registros destas espécies ocorrerem em processos fermentativos ou associados a cana de açúcar. BARNETT *et alii* (1983 e 1990) indica que *C. lusitaniae* está associada ao homem e outros mamíferos, a frutas cítricas, a peras e água. *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* já foi isolada de pimenta vermelha fermentada, do homem e outros mamíferos. *C. magnoliae* foi encontrada em flores de *Magnolia* sp, abelhas, sucos de laranja concentrado e no homem.

Uma única linhagem de *Candida lipolytica* foi isolada de mosto coletado na usina Santa Cruz. *Yarrowia lipolytica* (sinônimo de *Saccharomycopsis lipolytica*) é reconhecida como a fase perfeita de *C. lipolytica*. Ambas já foram isoladas de óleo de oliva, margarinas, hidrocarbonetos, solo e alguns mamíferos (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984), porém não há evidências de que tenham sido encontradas em processos fermentativos.

#### 4.4 - Ocorrência de Leveduras Durante a Safra 92/93

No processo fermentativo para a produção de açúcar e álcool, no decorrer da safra 92/93, houve um predomínio de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida* (41,23%) e *Saccharomyces* (38,95%). Este fato foi verificado tanto na Usina Costa Pinto, que apresentou 44,8% de leveduras do gênero *Saccharomyces* e 38,9% de leveduras do gênero *Candida*, quanto na Usina Santa Cruz, que apresentou 43,6% de leveduras do gênero *Candida* e 33,0% de leveduras do gênero *Saccharomyces*.

De acordo com a FIGURA 6 verifica-se que na Usina Costa Pinto, no início da safra, houve uma predominância de leveduras do gênero *Candida* (57,14%). Linhagens de *Saccharomyces* somaram apenas 12,25% do total de leveduras isoladas no processo de fermentação e 30,61% das leveduras foram constituídas por outros gêneros. Na segunda coleta, realizada em um período intermediário da safra, ocorreu um aumento significativo da frequência do gênero *Saccharomyces* (59,46%) e uma diminuição do gênero *Candida* (32,43%) e de linhagens pertencentes a outros gêneros de leveduras (8,10%). No final da safra metade das leveduras presentes no processo fermentativo eram pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. O gênero *Candida* apresentou uma frequência de 34,69% e os outros 15,30% das linhagens foram caracterizadas como pertencentes a outros gêneros de leveduras.

De acordo com a FIGURA 7 verifica-se que na Usina Santa Cruz, durante todo o período da safra houve uma predominância de leveduras do gênero *Candida* no processo de fermentação. No início da safra, 51,72% das leveduras presentes nas amostras analisadas eram pertencentes ao gênero *Candida*, 25,86% de leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* e 22,42% das linhagens foram caracterizadas como outros gêneros de leveduras. Na segunda coleta realizada em um período intermediário da safra, ocorreu uma diminuição da frequência do gênero *Candida* (41,03%) e um pequeno aumento das leveduras do gênero *Saccharomyces* (34,61%). Outros gêneros de leveduras somaram 24,36%. Na terceira coleta realizada no final da safra, as porcentagens de leveduras presentes no processo fermentativo mantiveram constantes. O gênero *Candida* apresentou uma frequência de 40,24%, *Saccharomyces* apresentou uma frequência de 36,58% e outros gêneros de leveduras somaram 23,18%.

#### 4.4.1 - Leveduras Contaminantes na Primeira Coleta

Das amostras coletadas na Usina Costa Pinto foram isoladas 49 linhagens de leveduras, distribuídas de acordo com a TABELA 7. Houve uma predominância do gênero *Candida* (57,14%), seguido dos gêneros *Saccharomyces* (12,25%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (8,17%), *Cryptococcus* (6,12%), *Schizosaccharomyces* (6,12%), *Trichosporon* (6,12%), *Issatchenkia* (2,04%) e *Pichia* (2,04%) (TABELA 8). Das 28 linhagens pertencentes ao gênero *Candida*, a espécie mais freqüente foi classificada como *C. tropicalis* (32,14%), seguida das espécies *C. stellata* (25%), *C. krusei* (21,43%), *C. colliculosa* (7,14%), *C. guilliermondii* (7,14%) e *C. lusitaniae* (7,14%) (TABELA 9).

Analisando os dados da TABELA 5 verifica-se que nas amostras de mosto, vinho levedurado e leite levedurado o gênero *Candida* foi o de maior freqüência, com 40%, 50% e 72,73% respectivamente. Outros gêneros foram encontrados na amostra de mosto, como *Saccharomyces* (20%), *Cryptococcus* (20%), *Issatchenkia* (6,7%), *Pichia* (6,7%) e *Trichosporon* (6,7%). No vinho detectou-se também os gêneros *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (33,33%), *Saccharomyces* (8,33%) e *Schizosaccharomyces* (8,33%). Os gêneros *Saccharomyces*, *Trichosporon* e *Schizosaccharomyces* também foram encontrados na amostra de leite, em freqüências iguais de 9,09%.

No mosto a espécie de *Candida* de maior ocorrência foi classificada como *C. tropicalis* (50%), seguida das espécies *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. stellata*, com freqüências iguais a 16,70%. Na amostra de vinho detectou-se as espécies *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. stellata*, com freqüências iguais a 33,33%. A amostra de leite foi a que apresentou um maior número de espécies, classificadas como *C. krusei* (25%), *C. stellata* (25%), *C. tropicalis* (25%), *C. colliculosa* (12,50%), *C. guilliermondii* (6,25%) e *C. lusitaniae* (6,25%) (TABELA 6).

Das amostras coletas na Usina Santa Cruz foram isoladas 58 linhagens de leveduras, distribuídas de acordo com a TABELA 7. Houve uma predominância do gênero *Candida* (51,72%), seguido dos gêneros *Saccharomyces* (25,86%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (10,35%), *Kluyveromyces* (6,90%), *Schizosaccharomyces* (3,45%) e *Rhodotorula* (1,72%) (TABELA 8). Das 30 linhagens classificadas como pertencentes ao gênero *Candida*, a espécie *C. stellata* foi a que apresentou uma maior ocorrência (40%), seguida de *C. tropicalis* (30%), *C. krusei* (20%) e *C. colliculosa* (10%) (TABELA 9).



Nas amostras de mosto, vinho levedurado e leite levedurado o gênero *Candida* apresentou uma maior ocorrência, com 50%, 41,18% e 61,90% respectivamente. No mosto detectou-se também a ocorrência dos gêneros *Saccharomyces* (25%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (15%), *Kluyveromyces* (5%) e *Rhodotorula* (5%). Nas amostras de vinho e leite encontrou-se os mesmos gêneros e com frequências bastante próximas. No vinho os gêneros presentes foram *Saccharomyces* (29,41%), *Kluyveromyces* (11,76%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (11,76%) e *Schizosaccharomyces* (5,88%). No leite foram detectados os gêneros *Saccharomyces* (23,81%), *Kluyveromyces* (4,76%), *Schizosaccharomyces* (4,76%) e *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (4,76%) (TABELA 5).

No mosto a espécie de *Candida* mais freqüente foi *C. stellata* (50%), seguida de *C. tropicalis* (30%), *C. colliculosa* (10%) e *C. krusei* (10%). Na amostra de vinho detectou-se a presença de três espécies de *Candida* classificadas como *C. krusei* (42,86%), *C. stellata* (42,86%), e *C. tropicalis* (14,28%). No leite a espécie de maior ocorrência foi *C. tropicalis* (38,46%), seguida de *C. stellata* (30,77%), *C. colliculosa* (15,38%) e *C. krusei* (15,38%) (TABELA 6).

#### 4.4.2 - Leveduras Contaminantes na Segunda Coleta

Das amostras coletadas na Usina Costa Pinto foram isoladas 74 linhagens de leveduras, distribuídas de acordo com a TABELA 7. Houve uma predominância do gênero *Saccharomyces* (59,46%), seguido dos gêneros *Candida* (32,43%), *Pichia* (4,05%), *Rhodotorula* (2,70%) e *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (1,35%) (TABELA 8). Das 24 linhagens pertencentes ao gênero *Candida*, linhagens classificadas como *C. stellata* foram mais freqüentes (45,83%), seguida de *C. rugosa* (20,83%), *C. tropicalis* (16,67%), *C. milleri/C. holmii* (8,33%), *C. colliculosa* (4,17%) e *C. utilis* (4,17%) (TABELA 9).

Nas amostras de mosto, vinho levedurado e leite levedurado o gênero *Saccharomyces* foi o de maior ocorrência com frequências de 62,5%, 69,56% e 51,43% respectivamente. No mosto, além do gênero *Saccharomyces*, foi detectada a presença do gênero *Candida* com 37,5% de frequência. No vinho também encontrou-se os gêneros *Candida* (26,09%) e *Pichia* (4,35%). No leite foram detectados também outros gêneros como *Candida* (34,28%), *Pichia* (5,71%), *Rhodotorula* (5,71%) e *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (2,86%) (TABELA 5).

No mosto 66,66% das espécies de *Candida* foram classificadas como *C. stellata* e 33,33% como *C. milleri/C. holmii*. No vinho levedurado a espécie de *Candida* mais freqüente foi *C. stellata* (50%), seguida de *C. tropicalis* (33,33%) e *C. rugosa* (16,67%). Na amostra de leite levedurado as espécies encontradas foram *C. rugosa* (33,33%), *C. stellata* (33,33%), *C. tropicalis* (16,67%), *C. colliculosa* (8,33%) e *C. utilis* (8,33%) (TABELA 6).

Das amostras coletadas na Usina Santa Cruz foram isoladas 78 linhagens de leveduras, distribuídas de acordo com a TABELA 7. Houve uma predominância do gênero *Candida* (41,03%), seguida dos gêneros *Saccharomyces* (34,61%), *Kluyveromyces* (10,26%), *Zygosaccharomyces/Torulaspora* (10,26%), *Issatchenkia* (2,56%) e *Pichia* (1,28%) (TABELA 8). Das 32 linhagens pertencentes ao gênero *Candida*, a maioria foi classificada como *C. stellata* (62,50%), seguida de *C. colliculosa* (9,37%), *C. kefir* (9,37%), *C. tropicalis* (9,37%), *C. krusei* (6,25%) e *C. lipolytica* (3,12%) (TABELA 9).

Nas amostras de mosto e vinho levedurado o gênero *Candida* foi o de maior ocorrência com 42,86% e 40,91% de freqüência. Outros gêneros também foram encontrados no mosto como *Saccharomyces* (32,14%), *Kluyveromyces* (10,71%), *Zygosaccharomyces/Torulaspora* (10,71%) e *Issatchenkia* (3,57%). No vinho também detectou-se a presença de *Saccharomyces* (31,82%), *Kluyveromyces* (13,64%) e *Zygosaccharomyces/Torulaspora* (13,64%). No leite levedurado os gêneros *Candida* e *Saccharomyces* foram encontrados em freqüências iguais (39,29%), seguidos de *Kluyveromyces* e *Zygosaccharomyces/Torulaspora* (7,14%), e *Issatchenkia* e *Pichia* (3,57%) (TABELA 5).

No mosto a espécie de *Candida* que apresentou maior freqüência foi *C. stellata* (41,67%), seguida de *C. colliculosa* (16,67%), *C. krusei* (16,67%), *C. tropicalis* (16,67%) e *C. lipolytica* (8,33%). No vinho a maioria das espécies de *Candida* foi composta de *C. stellata* (77,78%), seguida de *C. colliculosa* (11,11%) e *C. kefir* (11,11%). *C. stellata* também foi a espécie mais abundante na amostra de leite (72,73%), seguida de *C. kefir* (18,18%) e *C. tropicalis* (9,09%) (TABELA 6).

#### 4.4.3 - Leveduras Contaminantes na Terceira Coleta

Das amostras coletadas na Usina Costa Pinto foram isoladas 98 linhagens de leveduras, distribuídas de acordo com a TABELA 7. Houve uma predominância do gênero *Saccharomyces* (50%), seguido dos gêneros *Candida* (34,69%), *Pichia* (8,16%), *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (3,06%), *Issatchenkia* (2,04%) e *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (2,04%) (TABELA 8). Das 34 linhagens pertencentes ao gênero *Candida*, a espécie *C. tropicalis* foi a que apresentou uma maior ocorrência (38,23%), seguida de *C. rugosa* (17,65%), *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* (14,71%), *C. stellata* (11,76%), *C. krusei* (8,82%), *C. magnoliae* ( 5,88%) e *C. milleri/C. holmii* (2,94%) (TABELA 9).

Na amostra de mosto 50% das linhagens encontradas foram classificadas como pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, 42,86% como *Candida*, 3,57% como *Pichia* e 3,57% como *Saccharomycodes/Hanseniaspora*. Na amostra de vinho os gêneros *Saccharomyces* e *Candida* foram detectados em frequências iguais (36,36%), seguido de outros gêneros como *Pichia* (15,15%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (6,06%), *Issatchenkia* (3,03%) e *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (3,03%). A maioria das linhagens encontradas no leite levedurado foi classificada como do gênero *Saccharomyces* (62,16%), seguida dos gêneros *Candida* (27,03%), *Pichia* (5,40%), *Issatchenkia* (2,70%) e *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (2,70) (TABELA 5).

No mosto 75% das espécies de *Candida* foram classificadas como *C. tropicalis*, 16,67% como *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* e 8,33% como *C. stellata*. A amostra de vinho foi a que apresentou um maior número de espécies, classificadas como *C. tropicalis* (33,33%), *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* (25%), *C. stellata* (16,67%), *C. krusei* (8,33%), *C. magnoliae* (8,33%) e *C. milleri/C. holmii* (8,33%). Na amostra de leite a espécie de maior ocorrência foi *C. rugosa* (60%), seguida de *C. krusei* (20%), *C. magnoliae* (10%) e *C. stellata* (10%) (TABELA 6).

Das amostras coletadas na Usina Santa Cruz foram isoladas 82 linhagens de leveduras, distribuídas de acordo com a TABELA 7. Houve uma predominância do gênero *Candida* (40,24%), seguida dos gêneros *Saccharomyces* (36,58%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (9,76%), *Kluyveromyces* (8,54%), *Issatchenkia* (2,44%), *Rhodotorula* (1,22%) e *Saccharomycodes/Hanseniaspora* (1,22%) (TABELA 8). Das 33 linhagens classificadas como pertencentes ao gênero *Candida*, a espécie *C. stellata* foi a que apresentou uma maior frequência (36,36%), seguida de *C. rugosa*

(27,27%), *C. tropicalis* (21,21%), *C. krusei* (6,06%), *C. dattila* (3,03%), *C. kefir* (3,03%) e *C. parapsilosis* (3,03%) (TABELA 9).

Na amostra de mosto o gênero *Saccharomyces* foi o de maior ocorrência, com 48,48%, seguida dos gêneros *Candida* (21,21%), *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (15,15%), *Kluyveromyces* (6,06%), *Issatchenkia* (3,03%), *Rhodotorula* (3,03%) e *Saccharomyces/Hanseniaspora* (3,03%). Nas amostras de vinho levedurado e leite levedurado o gênero *Candida* apresentou uma maior frequência em relação aos demais gêneros, com 47,83% e 57,69%, respectivamente. No vinho os gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* (21,74%) e *Zygosaccharomyces/Torulaspota* e *Issatchenkia* (4,35%) também foram detectados. No leite encontrou-se também os gêneros *Saccharomyces* (34,61) e *Zygosaccharomyces/Torulaspota* (7,69%) (TABELA 5).

No mosto encontrou-se duas espécies de *Candida* classificadas como *C. tropicalis* (57,14%) e *C. stellata* (42,86%). No vinho a espécie de *Candida* mais frequente foi *C. stellata* (63,64%), seguida de *C. rugosa* (18,18%), *C. krusei* (9,09%) e *C. parapsilosis* (9,09%). Na amostra de leite as espécies de *Candida* encontradas foram *C. rugosa* (46,67%), *C. tropicalis* (20%), *C. stellata* (13,33%), *C. dattilla* (6,67%), *C. kefir* (6,67%) e *C. krusei* (6,67%) (TABELA 6).

#### 4.5 - Variação da Microbiota em Relação aos Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados para o isolamento das leveduras se mostraram eficientes, já que conseguiram o desenvolvimento de um número diversificado de linhagens.

A TABELA 10 mostra o número de linhagens de leveduras isoladas a partir dos meios WLN ágar, WLD ágar, Lisina ágar e Lin ágar, utilizando-se amostras de mosto, vinho levedurado e leite levedurado coletadas nas usinas Costa Pinto e Santa Cruz.

#### 4.5.1 - Eficiência do Meio WLN Ágar

O meio WLN ágar, indicado para uma contagem total de leveduras, evidenciou as diferenças morfológicas das colônias com uma ampla variação de coloração, brilho, superfície, forma e margem (FIGURA 8). Houve o desenvolvimento de colônias branca, branco-creme, creme, verde, verde-claro e branco-esverdeado; brilhante, perolada, transparente ou opaca; superfícies lisa, levemente rugosa ou rugosa; forma circular ou irregular; margem inteira, ondulada ou ciliada. A produção de ácido foi verificada pela grande maioria das colônias, que produziram uma coloração amarela ao meio de cultura devido a viragem do indicador verde de bromocresol.

Através desse meio detectou-se os gêneros *Saccharomyces* (73,45%), *Candida* (18,58%), *Zygosaccharomyces/Torulaspora* (4,43%), *Rhodotorula* (1,77%), *Cryptococcus* (0,88%) e *Issatchenkia* (0,88%) (TABELA 10). Outros gêneros isolados em outros meios de cultura não foram detectados no meio WLN ágar.

As linhagens identificadas como *Saccharomyces* apresentaram em sua maioria colônias de superfície lisa, forma circular e margem inteira, peroladas e com coloração branco, creme ou verde, ou ainda branco nas margens e verde ao centro. Algumas culturas apresentaram-se com superfície levemente rugosa, margem ondulada e forma irregular, com coloração variando entre o branco, verde-claro e verde-escuro. Os isolados classificados como *Zygosaccharomyces/Torulaspora* apresentaram colônias lisas, inteiras, circulares, brilhantes, de coloração creme, verde ou creme-esverdeado. As colônias pertencentes ao gênero *Rhodotorula* não produziram ácido e portanto não modificaram a coloração do meio de cultura, que permaneceu verde. As duas linhagens do gênero *Rhodotorula* isoladas possuíam coloração ocre, superfície lisa, inteira, circular e brilhante. A única linhagem de *Issatchenkia* isolada no meio WLN ágar apresentou coloração branca, brilho perolado, superfície lisa, margem ondulada, e forma circular. A linhagem classificada como *Cryptococcus* também não produziu ácido e não modificou a coloração do meio. Sua colônia apresentou-se opaca, com coloração creme, superfície complexa e rugosa, margem inteira e forma circular.

Das 21 linhagens pertencentes ao gênero *Candida*, 16 isolados foram classificados como *C. stellata* (76,19%), 3 isolados como *C. tropicalis* (14,29%) e 2 isolados como *C. milleri/C. holmii* (9,52%). As linhagens de *C. stellata* apresentaram, em sua grande maioria, colônias lisas, circulares, inteiras, com coloração branco, creme, branco-creme, verde ou branco nas margens e verde ao centro, peroladas, transparentes ou brilhantes.

Uma colônia, com coloração branco nas margens e verde ao centro, apresentou-se de forma irregular, superfície levemente rugosa, margem ondulada e brilho perolado. Outra colônia, de coloração branca, apresentou-se de forma circular, superfície levemente rugosa, margem inteira e brilho perolado. Os isolados de *C. tropicalis* possuíam margem ciliada, brilho perolado, superfície lisa ou levemente rugosa, forma circular e coloração branco ou branco-esverdeado. Os dois isolados de *C. milleri*/*C. holmii* apresentaram colônias brancas, lisas, inteiras, circulares e peroladas.

Outras espécies de *Candida* com frequências de ocorrência altas em outros meios de cultura não foram detectadas no meio WLN ágar. Isso talvez tenha ocorrido devido a utilização de diluições mais altas neste meio de cultura, por se tratar de um meio básico para contagem total de leveduras, o que pode ter impedido o crescimento de outros grupos. HARPER (1981), através do meio WLN ágar, isolou de cervejaria leveduras pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* *Torulopsis* etc.

#### 4.5.2 - Eficiência de Meio WLD Ágar

O meio WLD ágar foi formulado a partir do meio WLN ágar suplementado com actidiona a 2,5 µg/ml, concentração indicada para inibir o desenvolvimento de *Saccharomyces cerevisiae* e não interferir no crescimento de outras leveduras. Assim como o meio anterior, o WLD ágar evidencia a produção de ácido pelas linhagens através da mudança de coloração do meio de cultura, que passa de verde-azulado para amarelo.

As colônias desenvolvidas no meio WLD ágar apresentaram ampla variedade de cores como branca, branco-creme, creme e diversas tonalidades de verde, e ampla variedade de tamanho, desde colônias puntiformes até colônias grandes. As colônias foram também caracterizadas com superfície lisa, levemente rugosa ou complexa; forma irregular ou circular; margem inteira, ondulada ou ciliada, e brilho perolado, transparente ou brilhante (FIGURA 9).

37,27% das linhagens isoladas neste meio de cultura foram pertencentes ao gênero *Candida*, 32,73% pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, 14,54% pertencentes ao gênero *Zygosaccharomyces*/*Torulospora* e 10,00% pertencentes ao gênero *Kluyveromyces*. Os gêneros *Schizosaccharomyces* (2,73%), *Cryptococcus* (0,91%), *Pichia* (0,91%) e *Trichosporon* (0,91%) também foram isolados em frequências menos significativas (TABELA 10).

A maioria das linhagens identificadas como *Saccharomyces* apresentaram colônias peroladas, de superfície lisa, margem inteira e forma circular, coloração variando entre verde escuro, verde claro, verde mostarda, branca nas margens e verde ao centro, branco-creme e creme. Alguns isolados apresentaram colônias com superfície levemente rugosa, margem inteira, forma irregular e brilho perolado, de coloração branco-creme ou verde com margens branca. Outros isolados possuíam colônias lisas, inteiras, peroladas, irregulares e de cor verde-claro. As linhagens classificadas como *Zygosaccharomyces/Torulasporea* apresentaram colônias lisas, circulares, inteiras, peroladas ou brilhantes, de coloração verde-escuro, verde-claro, verde-escuro com margem branca, verde-claro com margem creme ou creme. Colônias lisas, inteiras, circulares, peroladas ou brilhantes, de coloração branca, creme ou creme-esverdeado foram classificadas como pertencentes ao gênero *Kluyveromyces*. Alguns destes isolados apresentaram colônias bem grandes. Colônias classificadas como *Schizosaccharomyces* apresentaram coloração creme, branca ou creme-esverdeado, superfície lisa, forma circular, margem inteira ou ondulada, perolada ou brilhante. Um único isolado de *Pichia* apresentou colônia branca, lisa, inteira, circular e brilhante. A única linhagem de *Trichosporon* possuía colônia creme, superfície lisa, margem ondulada, forma circular e brilho perolado. A linhagem de *Cryptococcus* possuía colônia creme, lisa, inteira, circular e brilhante. Os isolados de *Trichosporon* e *Cryptococcus* não modificaram a coloração do meio de cultura, indicando a não produção de ácido.

O meio WLD ágar mostrou-se bastante propício para o desenvolvimento de uma alta variedade de espécies de *Candida*, como *C. tropicalis* (46,34%), *C. colliculosa* (12,19%), *C. rugosa* (12,19%), *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* (9,76%), *C. kefyr* (7,32%), *C. guilliermondii* (4,88%), *C. lipolytica* (2,44%), *C. parapsilosis* (2,44%) e *C. utilis* (2,44%). Colônias com forma circular, brilho perolado, superfície lisa ou complexa, margem ciliada, de coloração branco-creme foram classificadas como *C. tropicalis*. Outras colônias de *C. tropicalis* apresentaram coloração branca ou branco-esverdeado, superfície lisa, margem inteira, forma circular, opacas ou peroladas. Todas as linhagens de *C. rugosa* eram formadas por colônias puntiformes, brancas transparentes, lisas, inteiras e circulares. Os isolados de *C. colliculosa* possuíam colônias lisas, inteiras, circulares, brilhantes, de coloração branca, verde-escuro, ou verde ao centro com margem branca. As linhagens de *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* apresentaram colônias lisas, inteiras, circulares, peroladas, brancas ou brancas com centro azulado. Uma única linhagem apresentou colônias brancas, lisas, inteiras, irregulares e brilhantes. As três linhagens de *C. kefyr* apresentaram colônias de coloração mostarda, lisas, inteiras,

circulares e peroladas. Os dois isolados de *C. guilliermondii* possuíam colônias brancas, lisas, inteiras circulares e brilhantes. As linhagens de *C. utilis*, *C. lipolytica* e *C. parapsilosis* foram caracterizadas por apresentarem colônias brancas, lisas, inteiras, circulares e peroladas.

#### 4.5.3 - Eficiência do Meio Lisina Ágar

Lisina ágar é um meio de cultura que contém essencialmente lisina como única fonte de nitrogênio, o que impede o crescimento de algumas espécies de *Saccharomyces*, como *S. cerevisiae* e *S. carlsbergensis* por inibir a síntese de aminoácidos. As linhagens desenvolvidas neste meio de cultura apresentaram-se com tamanho bastante reduzido, com colônias pequenas e puntiformes. Verificou-se uma baixa variação de coloração das colônias, normalmente formada por colônias brancas ou branco-cremes. As colônias foram caracterizadas também pela superfície lisa, rugosa, levemente rugosa ou hirsuta; margem inteira, ondulada, ciliada ou filamentosa; forma circular; com brilho perolado, transparente, brilhante ou opaco (FIGURA 10).

Apesar do meio Lisina ágar ser seletivo para leveduras não-*Saccharomyces*, o gênero *Saccharomyces* foi isolado em uma frequência de 27,50%, juntamente com o gênero *Candida* (40,00%). A alta ocorrência de *Saccharomyces* no meio Lisina ágar deve-se a utilização de reservas endógenas por estas linhagens, já que a grande maioria dos isolados apresentaram colônias puntiformes ou pequenas quando comparadas ao tamanho das colônias de outros gêneros. Outros grupos de leveduras também foram detectados neste meio como: *Pichia* (10,00%), *Kluyveromyces* (6,67%), *Zygosaccharomyces/Torulaspora* (5,83%), *Issatchenkia* (5,00%), *Saccharomyces/Hanseniaspora* (4,16%) e *Rhodotorula* (0,83%) (TABELA 10).

Os isolados do gênero *Saccharomyces* apresentaram, em sua maioria, colônias pequenas ou puntiformes, de coloração branca, superfície lisa, margem inteira, forma circular ou ondulada e brilhante. Outras linhagens apresentaram colônias puntiformes, superfície lisa, margem ondulada e ciliada, forma circular e brilho perolado. Colônias brancas, levemente rugosas, circulares e peroladas também foram classificadas como pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. As linhagens identificadas como *Pichia* apresentaram colônias brancas, circulares, lisas ou levemente rugosas, inteiras ou onduladas, peroladas, transparentes ou opacas. As linhagens dos gêneros *Kluyveromyces* e



*Zygosaccharomyces/Torulaspota* apresentaram colônias pequenas e brancas, lisas, inteiras, circulares e brilhantes. Um único isolado de *Kluyveromyces* apresentou colônia bem grande, branca, lisa, inteira, circular e brilhante; e um isolado de *Zygosaccharomyces/Torulaspota* apresentou colônias branco-creme, lisa, inteira, circular e brilhante. A maioria das linhagens de *Issatchenkia* possuíam colônias puntiformes, brancas, lisas, inteiras, circulares e peroladas. Um isolado apresentou colônias brancas, transparentes, lisas, ciliadas e circulares. Um outro isolado apresentou colônias de coloração branca, superfície lisa, margem ondulada, forma circular e opaca. Todas as linhagens identificadas como *Saccharomyces/Hanseniaspora* apresentaram colônias brancas, lisas, inteiras, circulares e peroladas. Uma única linhagem de *Rhodotorula* apresentou colônias pequenas, de coloração vermelha, superfície lisa, forma circular, margem inteira e brilho perolado.

Das linhagens pertencentes ao gênero *Candida*, a espécie de maior ocorrência foi *C. tropicalis* (47,92%), seguida de *C. krusei* (25,00%), *C. rugosa* (10,42%), *C. colliculosa* (8,33%), *C. dattila* (2,08%), *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* (2,08%), *C. kefir* (2,08%) e *C. magnoliae* (2,08%). As linhagens identificadas como *C. tropicalis* apresentaram colônias morfologicamente bastante variadas. A maioria delas possuíam coloração branca ou creme, transparentes, superfície lisa, forma circular e margem ciliada. Outras colônias apresentaram coloração branca, superfície lisa, forma circular, margem inteira ou ondulada e brilho perolado. Algumas colônias possuíam superfície rugosa, margem ondulada e ciliada, forma circular, coloração branca e brilho perolado. Os isolados identificados como *C. krusei* apresentaram colônias brancas, irregulares e expansivas, rugosas e hirsutas, opacas ou peroladas. Colônias menores e opacas desta mesma espécie apresentaram coloração branca, superfície levemente rugosa, forma circular e margem inteira. As linhagens de *C. rugosa* apresentaram colônias brancas, lisas, inteiras, circulares e peroladas. Um isolado apresentou margem filamentosa e outro superfície levemente rugosa. Todos os isolados identificados como *C. colliculosa* apresentaram colônias brancas, pequenas e transparentes, com superfície lisa, margem inteira e forma circular. As linhagens de *C. guilliermondii*, *C. dattila* e *C. magnoliae* apresentaram colônias brancas, lisas, inteiras, circulares e brilhantes. A única linhagem de *C. kefir* isolada no meio Lisina ágar apresentou as mesmas características das três últimas espécies citadas, exceto que suas colônias eram puntiformes.

TAYLOR & MARSH (1984) afirmam que o meio Lisina ágar muitas vezes permite também o desenvolvimento de espécies do gênero *Saccharomyces* que não conseguem crescer em meios contendo cristal violeta. HEARD & FLEET (1986), analisando a fermentação do vinho, detectaram através de Lisina ágar linhagens de *Candida stellata*, *Saccharomyces ludwigii* e *Kloeckera apiculata* (estado imperfeito do gênero *Hanseniaspora*).

#### 4.5.4 - Eficiência do Meio Lin Ágar

O meio Lin ágar é indicado para a detecção de leveduras do gênero *Saccharomyces*. Devido a presença de cristal violeta esse meio dificulta o desenvolvimento de leveduras de outros gêneros (LIN, 1975; LONGLEY *et alii*, 1978; TAYLOR & MARSH, 1984; OLIVEIRA & PAGNOCCA, 1988). Apesar disto, 73,96% das linhagens isoladas neste meio foram pertencentes ao gênero *Candida* e apenas 19,79% foram pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. Outros grupos também foram detectados, como *Schizosaccharomyces* (2,08%), *Trichosporon* (2,08%), *Cryptococcus* (1,04%) e *Rhodotorula* (1,04%) (TABELA 10).

As linhagens desenvolvidas no meio Lin ágar apresentaram uma alta variação de coloração, com colônias branca, lilás, rosa-claro, branca-rosada, roxa ou alaranjada. Houve o desenvolvimento de colônias com superfície lisa, levemente rugosa, rugosa, hirsuta ou complexa; margem inteira, ciliada, filamentosa ou ondulada; forma circular ou irregular; brilhantes, peroladas ou opacas (FIGURA 11).

Linhagens de gênero *Saccharomyces* apresentaram colônias brancas, complexas, inteiras, circulares ou irregulares e peroladas. Alguns isolados apresentaram colônias pequenas e brancas, levemente rugosas, inteiras, circulares e peroladas. Outros isolados ainda apresentaram colônias de coloração lilás, superfície complexa, margem inteira, forma irregular e brilho perolado. Um único isolado possuiu colônias brancas, lisas, inteiras, circulares e brilhantes. As duas linhagens pertencentes ao gênero *Trichosporon* desenvolveram colônias brancas, hirsutas e rugosas, onduladas, circulares e opacas. Um isolado de *Schizosaccharomyces* apresentou colônias rosa claro, lilás, inteiras circulares, e peroladas; outro isolado apresentou colônias brancas, hirsutas, rugosas, filamentosas, circulares e opacas. A única linhagem de *Cryptococcus* isolada no meio Lin ágar apresentou-se com coloração rosa claro, superfície lisa, margem inteira, forma circular e

brilhante. A linhagem de *Rhodotorula* apresentou essas mesmas características, exceto em relação a sua coloração, que foi alaranjada.

Das 71 linhagens pertencentes ao gênero *Candida*, 50 isolados foram classificados como *C. stellata* (70,42%), seguida de *C. rugosa* (14,08%), *C. krusei* (9,86%), *C. lusitaniae* (2,82%), *C. magnoliae* (1,41%) e *C. milleri/C. holmii* (1,41%). As linhagens de *C. stellata* apresentaram colônias lisas, inteiras, circulares e brilhantes, de coloração branca, branca-rosada, rosa, lilás e roxo. Colônias levemente rugosas, inteiras, circulares, peroladas, brancas, lilás ou roxas também foram identificadas como *C. stellata*. Os isolados classificados como *C. rugosa* apresentaram colônias brancas, inteiras, peroladas, lisas ou complexas, circulares ou irregulares. A maioria das linhagens de *C. krusei* apresentaram colônias opacas de coloração lilás com margem branca, superfície hirsuta, margem ciliada e forma circular. Outras colônias apresentaram-se brancas, levemente rugosas e rugosas, ciliadas, opacas, circulares ou irregulares. As linhagens de *C. lusitaniae*, *C. magnoliae* e *C. milleri/C. holmii* apresentaram colônias morfologicamente muito semelhantes, de coloração branca, superfície lisa, margem inteira, forma circular e brilhantes.

## **4.6 - Diversidade Taxonômica**

### **4.6.1 - Taxonomia das Leveduras em nível de Gênero**

Os resultados dos testes sobre as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das leveduras submetidas aos testes preliminares de identificação encontram-se na TABELA 11. A partir destes testes conseguiu-se a classificação das linhagens em nível genérico. A lista das linhagens pertencentes a cada grupo de identificação está no ANEXO 1.

Do total de 439 isolados, 424 linhagens apresentaram respostas negativas aos testes de DBB e uréia, sendo classificadas como pertencentes aos gêneros *Candida*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces/Hanseniaspora* e *Zygosaccharomyces/Torulaspota*. Dez linhagens apresentaram respostas positivas a estes testes, sendo enquadradas nos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*. Apenas 5 linhagens, identificadas como *Schizosaccharomyces*, apresentaram resposta positiva ao teste de uréia e resposta negativa ao teste de DBB. Nenhuma das linhagens isoladas produziu significativamente ácido à partir da glicose e nem produziu balistosporos. As linhagens esporuladas foram também freqüentes, sendo que 56,50% dos isolados produziram esporos esféricos, reniformes ou em forma de chapéu.

Cento e setenta e uma linhagens pertencentes a 7 biotipos diferentes foram enquadradas no gênero *Saccharomyces* de acordo com as chaves de identificação de BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e YARROW (1984a). Todas as culturas apresentaram gemulação multipolar, assimilaram e fermentaram vigorosamente a glicose, cresceram a 37°C, produziram ascos persistentes com esporos esféricos, não conjugados, em número de 2 a 4 esporos por asco e apresentaram colônias com coloração variando entre branco e branco-creme. Nenhum biotipo produziu micélio verdadeiro, artrósporos, película em meio líquido, compostos semelhantes ao amido e não assimilou nitrato de potássio, celobiose, eritritol e M-inositol. Em alguns biotipos observou-se a formação de pseudomicélio e a assimilação da sacarose.

Vinte e oito linhagens pertencentes a 4 biotipos diferentes apresentaram colônias com coloração branca, gemulação multipolar, assimilaram e fermentaram vigorosamente a glicose, cresceram a 37°C e produziram ascos persistentes, conjugados, com esporos esféricos. Estes biotipos não produziram micélio verdadeiro e nem artrósporos, não produziram película em meio líquido e nem compostos semelhantes ao amido, não assimilaram nitrato de potássio, eritritol e M-inositol. Treze culturas não produziram pseudomicélio, 6 culturas assimilaram a celobiose e outras 3 não assimilaram a sacarose. De acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e YARROW (1984c,d) estes biotipos podem se enquadrar nos gêneros *Zygosaccharomyces* ou *Torulaspota*, já que esses dois gêneros apresentam características similares às observadas por estas culturas.

Colônias com coloração branca ou branco-creme, gemulação multipolar, fermentação vigorosa da glicose, produção de ascos deiscentes com esporos reniformes não conjugados, assimilação da glicose e da sacarose, inabilidade em assimilar nitrato de potássio como única fonte de nitrogênio, inabilidade em assimilar eritritol e M-inositol como únicas fontes de carbono, crescimento a 37°C, inabilidade para a produção de compostos amilóides, foram características observadas em 19 linhagens de leveduras classificadas como pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; VAN DER WALT & JOHANNSEN, 1984). Estas linhagens estão distribuídas em 4 biotipos distintos. Dois deles, com colônias de coloração branca e branco-creme, assimilaram a celobiose e os outros dois biotipos não assimilaram este composto de carbono.

Características como produção de pseudomicélio e micélio verdadeiro, gemulação multipolar, produção de ascos deiscentes, não conjugados e com esporos esféricos, formação de película em meio líquido, crescimento a 37°C, assimilação da glicose, inabilidade em assimilar a celobiose, eritritol, M-inositol e nitrato de potássio, inabilidade de fermentar a glicose, não produção de artrósporos e de compostos semelhantes ao amido foram observadas em 4 linhagens distribuídas em 3 biotipos distintos, classificados como pertencentes ao gênero *Pichia*, de acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e KURTZMAN (1984c). A coloração das colônias variaram entre branca, branco-creme e creme, e um biotipo assimilou a sacarose. Um outro grupo de linhagens, composto de 3 biotipos, também foi classificado como *Pichia*, porém este apresentou características diferentes do grupo anterior, como produção de pseudomicélio, ausência de micélio verdadeiro e artrósporos, colônias com coloração branca ou branco-creme, gemulação multipolar, ascos persistentes, conjugados e com esporos esféricos, formação de película em meio líquido, fermentação lenta da glicose, crescimento a 37°C, ausência de compostos semelhantes ao amido, assimilação da glicose, inabilidade em assimilar nitrato de potássio, celobiose, eritritol e M-inositol, estando de acordo com as chaves de identificação de BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e KURTZMAN (1984c). Um destes biotipos apresentou resultado positivo na assimilação da sacarose. Um terceiro grupo de linhagens, composto de 2 biotipos, apresentou as seguintes características: ausência de pseudomicélio, micélio verdadeiro e artrósporos, ausência de película em meio líquido, gemulação multipolar, fermentação da glicose, ascos deiscentes com esporos em forma de chapéu, assimilação de nitrato de potássio, glicose, sacarose e eritritol, não formação de compostos semelhantes ao amido e a inabilidade em assimilar M-inositol como única fonte de carbono. Um dos biotipos não cresceu a temperatura de 37°C e assimilou a celobiose.

Este terceiro grupo, de acordo com BARNETT *et alii* (1983) e KURTZMAN (1984a) enquadra-se no gênero *Hansenula*. Porém, BARNETT *et alii* (1990) agrupam ao gênero *Pichia* as linhagens com estas características, já que a maioria das espécies do gênero *Hansenula* foram reclassificadas e agrupadas ao gênero *Pichia*, embora ainda fossem mantidas 3 espécies deste gênero.

Sete culturas pertencentes a 2 biotipos diferentes foram classificadas como representantes do gênero *Issatchenkia* (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; KURTZMAN, 1984b). As culturas apresentaram as seguintes características: gemulação multipolar, formação de pseudomicélio, ausência de micélio verdadeiro e artrósporos, fermentação positiva da glicose, crescimento a temperatura de 37°C, presença de película em meio líquido, inabilidade na produção de compostos amilóides, formação de ascos persistentes, não conjugados e com esporos esféricos, assimilação positiva da glicose e sacarose, e assimilação negativa de celobiose, eritritol, M-inositol e nitrato de potássio. Os dois biotipos de *Issatchenkia* diferenciam-se apenas pela coloração de suas colônias.

Gemulação bipolar com células apiculatas, presença de fissão, produção de pseudomicélios, ausência de micélios verdadeiros e artrósporos, ausência de película em meio líquido, fermentação vigorosa da glicose, crescimento a temperatura de 37°C, inabilidade em produzir compostos semelhantes ao amido, produção de ascos persistentes com esporos esféricos, habilidade em assimilar a glicose e inabilidade em assimilar eritritol e M-inositol foram características observadas em 5 linhagens distribuídas em dois biotipos. De acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e KREGER-VAN RIJ (1984a) estes biotipos podem ser pertencentes aos gêneros *Saccharomyces* ou *Hanseniaspora*, já que estes dois gêneros apresentam características muito similares. Um dos biotipos, com 4 linhagens, apresentou colônias de coloração branco-creme e assimilou a sacarose; enquanto que o outro biotipo, com apenas uma linhagem, apresentou colônia branca e assimilou a celobiose.

Cinco linhagens distribuídas em 3 biotipos distintos apresentaram respostas positiva ao teste de uréia e negativa ao teste de DBB, reprodução exclusivamente por fissão, ascos deiscetes com esporos esféricos, assimilação e fermentação vigorosa da glicose, crescimento a 37°C, ausência de pseudomicélio, micélio verdadeiro e artrósporos, inabilidade em assimilar nitrato de potássio como única fonte de nitrogênio e em assimilar M-inositol como única fonte de carbono. Estas culturas foram classificadas como pertencentes ao gênero *Schizosaccharomyces* (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; YARROW, 1984b). Dois biotipos apresentaram colônias branca-creme, ausência de

película em meio líquido, inabilidade em assimilar sacarose, celobiose e eritritol, diferenciando-se apenas pela síntese de compostos semelhantes ao amido. Outro biotipo apresentou colônias de coloração branca, formação de película em meio líquido e habilidade em assimilar sacarose, celobiose e eritritol.

Quatro culturas distribuídas em dois biotipos foram classificadas como pertencentes ao gênero *Rhodotorula* por apresentarem colônias de coloração vermelha, gemulação multipolar, ausência de pseudomicélio, micélio verdadeiro e artrósporos, ausência de película em meio líquido, ausência de reprodução sexuada, não crescimento a 37°C, habilidade em assimilar nitrato de potássio, glicose e sacarose, inabilidade em fermentar a glicose e em assimilar eritritol e M-inositol, estando de acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e FELL *et alii* (1984). Os biotipos de *Rhodotorula* diferenciaram-se apenas pela assimilação da celobiose.

Colônias de coloração branca, gemulação multipolar, presença de pseudomicélio, micélio verdadeiro e artrósporos, presença de película em meio líquido, crescimento a 37°C, ausência de reprodução sexuada, habilidade em assimilar glicose, sacarose e celobiose, inabilidade em fermentar a glicose, inabilidade em assimilar nitrato de potássio e eritritol foram características observadas em 3 culturas, distribuídas em 2 biotipos e classificadas como pertencentes ao gênero *Trichosporon* (BARNETT *et alii*, 1983, 1990; KREGER-VAN RIJ, 1984a). Estes dois biotipos diferenciaram-se apenas pela assimilação do eritritol.

Três culturas de um único biotipo foram identificadas como *Cryptococcus* por apresentarem colônias de coloração salmão, gemulação multipolar, formação de película em meio líquido, habilidade em assimilar glicose, sacarose, celobiose, eritritol e M-inositol, inabilidade em fermentar glicose e em assimilar nitrato de potássio, não apresentar reprodução sexuada e nem formação de compostos semelhantes ao amido, estando de acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e RODRIGUES DE MIRANDA (1984).

#### 4.6.2 - Taxonomia das Leveduras do Gênero *Candida*

Os resultados sobre as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das leveduras submetidas a identificação em nível de espécie encontram-se nas TABELAS 12 e 13. A lista das espécies de *Candida* isoladas nas usinas Costa Pinto e Santa Cruz está no ANEXO 2.

Todas as 181 linhagens que foram identificadas em nível de espécie apresentaram reprodução assexuada por brotamento multipolar e resposta negativa ao teste de DBB e urease, com exceção de uma linhagem de *C. lipolytica* que respondeu positivamente ao teste de uréia. A coloração das colônias em meio YM ágar ou GYP ágar variaram entre branca, branca-creme e creme. A presença de espécies produtoras de pseudomicélio e micélio verdadeiro foi freqüente. No total, 99 linhagens apresentaram pseudomicélio e 45 linhagens apresentaram estruturas de micélio verdadeiro. Setenta e seis linhagens não produziram nem pseudomicélio e nem micélio verdadeiro e 6 linhagens produziram apenas micélio verdadeiro. Nenhuma das linhagens identificadas apresentou artrósporos.

*Candida stellata* foi a espécie mais isolada, com 66 culturas caracterizadas em 19 biotipos. Predominaram culturas que crescem a temperatura de 37°C, mais alta que a máxima descrita para a espécie (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984). Os biotipos de *C. stellata* diferiram da descrição padrão pela fermentação dos açúcares galactose, maltose e rafinose, crescimento em meio contendo 50% de glicose e, algumas culturas, pela formação de pseudomicélio. Apenas uma linhagem hidrolisou a arbutina, discordando da descrição padrão.

As 45 linhagens de *C. tropicalis* estão caracterizadas em 13 biotipos. Um dos biotipos, composto por 5 culturas, apresentou um perfil fisiológico e bioquímico similar à descrição da espécie (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984). O maior biotipo, composto de 20 culturas, diferiu da descrição padrão apenas por não hidrolisar a arbutina; e um outro biotipo, com 5 culturas, também diferiu neste mesmo teste. Esses dois biotipos diferenciam-se entre si pela assimilação da celobiose. Outros dois biotipos, compostos por 5 e 2 linhagens, diferenciaram da descrição padrão por não assimilarem fracamente DL-lactato e por não hidrolisarem a arbutina, características consideradas variáveis dentro da espécie. Os outros 8 biotipos constituem apenas de uma única linhagem.



Algumas linhagens de *C. rugosa* divergiram da descrição padrão da literatura (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984) por crescer em meios com 50% de glicose, não assimilar etilamina, glicerol, DL-lactato, succinato, por assimilar D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, ribitol e  $\alpha$ -metil D-glicosídeo ou por fermentar lentamente a glicose.

*Candida krusei*, estado imperfeito de *Issatchenkia orientalis*, apresentou 19 linhagens pertencentes a 5 biotipos distintos, que diferiram da descrição padrão (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984) apenas por não assimilar ou assimilar fracamente succinato, e algumas por crescer em meio com 50% de glicose. Os biotipos apresentaram resultados negativo para a assimilação de D-ribose e positivo para assimilação de glicerol. Apenas um biotipo, representado pela cultura 135B, não cresceu a temperatura de 40°C. Outros biotipos diferiram entre si pelo crescimento em meio com 50% de glicose e assimilação de succinato e citrato.

*Candida colliculosa*, estado imperfeito de *Torulasporea delbrueckii*, foi representada por 9 linhagens pertencentes a 7 biotipos diferentes. Todas as culturas hidrolisaram arbutina e cresceram em meios contendo cicloheximida a 100 e 1000 ppm, o que as diferem da descrição padrão (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984). Além disto, a cultura 102A difere também pela assimilação da celobiose e a cultura 38A pela assimilação da celobiose e da salicina. Os biotipos diferem entre si nos testes de fermentação da galactose e maltose, crescimento em meio livre de vitaminas, assimilação de celobiose, inulina, ribitol,  $\alpha$ -metil D-glicosídeo, salicina e produção de pseudomicélio.

As linhagens identificadas como *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, estado imperfeito de *Pichia ohmeri*, diferiram da descrição da espécie por fermentar maltose, assimilar succinato e citrato, e crescer em meios com cicloheximida a 100 e 1000 ppm (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984). A linhagem 185A diferiu também por assimilar melizitose, enquanto que as outras quatro linhagens diferiram também por não crescerem em ribitol, quando esse composto foi usado como única fonte de carbono.

Quatro linhagens distribuídas em 3 biotipos diferentes foram identificadas como *C. kefyri*, estado imperfeito de *Kluyveromyces marxianus*. As características destas culturas estão de acordo com a descrição da literatura, proposta por BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e MEYER *et alii* (1984). Os 3 biotipos diferiram entre si pela formação de

pseudomicélio, fermentação da maltose, crescimento em meio com 50% de glicose, assimilação de celobiose e DL-lactato.

Três linhagens, representadas por 3 biotipos distintos, diferiram entre si pela fermentação da rafinose, crescimento a 50% de glicose e assimilação de  $\alpha$ -metil D-glicosídeo. Essas culturas diferiram da descrição padrão por fermentar a maltose e crescer a 37°C, temperatura acima da descrita como máxima de crescimento das espécies (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984). Um biotipo, representado pela linhagem 77A, diferiu da descrição padrão também por não fermentar a rafinose. Outro biotipo, representado pela linhagem 217A, diferiu pelo crescimento a 50% de glicose e pela assimilação de  $\alpha$ -metil D-glicosídeo. De acordo com MEYER *et alii* (1984) linhagens com estas características podem ser enquadradas tanto em *C. milleri* como a *C. holmii* (estado imperfeito de *Saccharomyces exiguus*). Segundo esses autores, *C. holmii* é fisiologicamente similar a *C. milleri*, diferindo apenas na porcentagem de guanina + citosina no DNA. Além disso, de acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990), *C. holmii* apresenta habilidade em crescer na ausência de niacina e pantotenato de cálcio, enquanto que *C. milleri* apresenta resultados variáveis e duvidosos.

*C. guilliermondii*, estado imperfeito de *Pichia guilliermondii*, aqui representada por dois biotipos diferiram entre si na assimilação de L-sorbose, inulina, D-ribose, L-ramnose e succinato. Estas duas linhagens não fermentaram a rafinose, característica variável na descrição da espécie (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990). Um dos biotipos, representado pela linhagem 24A, diferiu da descrição padrão por assimilar fracamente melibiose e por não assimilar inulina e succinato (MEYER *et alii*, 1984), o que não ocorreu com o outro biotipo, representado pela cultura 4A, que assimilou estes compostos.

Dois biotipos classificados como *C. lusitaniae*, estado imperfeito de *Clavispora lusitaniae*, divergiram entre si pela coloração de sua colônias, fermentação da galactose e assimilação de  $\alpha$ -metil D-glicosídeo. Estes biotipos diferiram da espécie descrita na literatura pela fermentação da galactose e pela assimilação de D-ribose e succinato (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984). A fermentação da galactose e a assimilação de D-ribose são características consideradas variáveis pelas descrições consultadas.

Os dois biotipos identificados como *C. magnoliae* diferem entre si pela fermentação da sacarose, crescimento em meios contendo 50% de glicose e 10% de NaCl, assimilação da etilamina, galactose, celobiose e rafinose. O biotipo representado pela cultura 220A fermentou sacarose, cresceu em meio contendo 50% de glicose e em meio com 10% de NaCl, hidrolisou arbutina, assimilou etilamina e rafinose, e assimilou fracamente a galactose; enquanto que a cultura 202A não apresentou estas características, mas assimilou galactose e celobiose. A fermentação da sacarose e a assimilação dos compostos L-sorbose, trealose, D-ribose, succinato e citrato são características consideradas variáveis na espécie de acordo com BARNETT *et alii* (1983 e 1990) e MEYER *et alii* (1984).

A linhagem de *C. dattila*, estado imperfeito de *Kluyveromyces thermotolerans*, fermentou fracamente a rafinose e assimilou ribitol, características consideradas variáveis na descrição da espécie (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984).

Uma linhagem apresentou resposta positiva ao teste da uréia e negativa ao teste DBB, sendo então, identificada como *C. lipolytica*, estado imperfeito de *Yarrowia lipolytica*. Esta cultura diferiu da descrição padrão por não assimilar succinato e etilamina, esta última característica considerada variável na descrição da espécie (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984).

Uma linhagem, identificada como *C. parapsilosis*, apresentou resultados similares aos da descrição da espécie (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984).

A única linhagem de *C. utilis*, estado imperfeito de *Pichia jadinii*, diferiu da descrição padrão por fermentar a maltose, não crescer em meio sem vitaminas, assimilar a galactose, não assimilar rafinose, D-xilose, salicina, DL-lactato, succinato e citrato, e por crescer em meios contendo cicloheximida a 100 e 1000 ppm (BARNETT *et alii*, 1983 e 1990; MEYER *et alii*, 1984).

#### 4.7 - Diversidade Metabólica

As espécies fermentadoras totalizaram 88,95% do total de linhagens pertencentes ao gênero *Candida*. Vinte e dois isolados fermentaram apenas glicose representados por *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. magnoliae* e por uma linhagem de *C. rugosa*. Glicose e sacarose foram fermentadas por 137 linhagens, sendo que 130 dessas também fermentaram galactose, 111 fermentaram também maltose e 105 fermentaram simultaneamente galactose e maltose.

Uma linhagem de *C. magnoliae* fermentou apenas glicose e sacarose. Apenas duas linhagens identificadas como *C. lusitaniae* e *C. parapsilosis* fermentaram glicose e galactose. Vinte e duas linhagens fermentaram simultaneamente glicose, galactose e sacarose. Apenas seis linhagens fermentaram a glicose, sacarose e maltose, representadas pelas espécies *C. colliculosa*, *C. utilis* e *C. dattila*. Esta última também fermentou fracamente a rafinose.

Todas as linhagens de *C. tropicalis* fermentaram os açúcares glicose, galactose, sacarose e maltose. Um único isolado de *C. kefir* fermentou os açúcares glicose, galactose, sacarose, maltose e lactose. O açúcar lactose foi fermentado apenas por 4 linhagens de *C. kefir*.

A rafinose foi fermentada por poucos isolados (35,36%), em sua grande maioria apresentando uma fermentação lenta ou fraca. Apenas 15 linhagens de *C. stellata*, 2 linhagens de *C. milleri/C. holmii* e 1 linhagem de *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* fermentaram vigorosamente a rafinose. Dezenove linhagens identificadas como *C. rugosa* e a linhagem de *C. lipolytica* não fermentaram a glicose.

Os resultados dos testes de assimilação de compostos de carbono mostram que 53,04% das linhagens de *Candida* identificadas, assimilam apenas de 1 a 6 compostos além da glicose, 13,81% assimilam entre 7 a 12 compostos e 31,49% assimilam entre 13 a 18 compostos dentre os 30 testados. Apenas duas linhagens identificadas como *C. guilliermondii* e uma linhagem de *C. tropicalis* assimilaram entre 19 e 24 compostos de carbono além da glicose. Nenhuma linhagem assimilou mais que 25 compostos de carbono. Isto demonstra que predominaram espécies com características assimilativas restritas, isto é, com habilidade de utilizar poucas fontes de carbono.

Inositol e metanol não foram assimilados por nenhuma linhagem de *Candida*. Eritritol foi assimilado apenas por uma linhagem de *C. lipolytica* e etanol foi assimilado por 61,88% dos isolados de *Candida*. Apenas as linhagens de *C. stellata*, *C. utilis* e uma linhagem de *C. magnoliae* e de *C. milleri/C. holmii* não assimilaram etanol. Melibiose foi assimilada apenas por duas linhagens de *C. guilliermondii*, uma delas fracamente. Lactose foi assimilada pelas linhagens de *C. kefir* e fracamente por duas linhagens de *C. tropicalis*.

Os resultados dos testes de assimilação de compostos de nitrogênio demonstram que 98,34% das linhagens não assimilaram nitrato de potássio e nem nitrito de sódio. Apenas duas linhagens de *C. magnoliae* e uma linhagem de *C. utilis* foram capazes de crescer em meios contendo esses compostos como única fonte de nitrogênio. Essas três linhagens também foram capazes de crescer em meio contendo L-lisina e/ou etilamina. Das 178 linhagens que assimilaram L-lisina, 75 não cresceram em meio contendo etilamina. Apenas três linhagens (*C. milleri/C. holmii*) não assimilaram nem L-lisina e nem etilamina. Não foi constatada nenhuma linhagem que tenha assimilado etilamina e não L-lisina.

Apenas 28 linhagens cresceram em meio livre de vitaminas e 34 linhagens apresentaram resposta positiva ao teste da hidrólise da arbutina. Nenhuma linhagem apresentou síntese de compostos semelhantes ao amido. Nos testes de resistência a cicloheximida, 37,57% das linhagens cresceram em meios contendo cicloheximida a 100 e 1000 ppm. A concentração de 1000 ppm inibiu o crescimento de *C. parapsilosis*, porém isto não ocorreu a 100 ppm.

A osmotolerância foi um fator importante já que 135 linhagens cresceram em meio contendo 50% de glicose, dentre os quais 76 cresceram também em meio com 10% de NaCl. Doze linhagens cresceram em meio com 10% de NaCl, mas não cresceram em 50% de glicose, e 59 linhagens cresceram apenas em 50% de glicose, mas não em 10% de NaCl.

Os testes de crescimento a diferentes temperaturas revelaram um alto número de linhagens crescendo a temperaturas mais elevadas do que aquela descrita como máxima para o crescimento das espécies. Das 181 linhagens de *Candida*, 179 linhagens apresentaram crescimento a 37°C. Dentre estas, 78 linhagens apresentaram resultado positivo ao crescimento a 40°C. Apenas duas linhagens, uma de *C. dattila* e outra de *C. stellata*, não apresentaram crescimento a 37°C.

TABELA 1 - Parâmetros físico-químicos das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool.

Amostragens	Mosto			Vinho			Leite		
	pH	T(°C)	Brix	pH	T(°C)	Brix	pH	T(°C)	Brix
1ª Coleta: 12/05/92	5,8	38	14,8	4,0	29,5	4,6	4,3	27	-
2ª Coleta: 24/06/92	5,7	30	16,1	4,0	34	2,0	-	-	-
3ª Coleta: 09/10/92	5,3	29	18,15	3,8	31	2,0	2,7	23	-

TABELA 2 - Parâmetros físico-químicos das amostras coletadas na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

Amostragens	Mosto			Vinho			Leite		
	pH	T(°C)	Brix	pH	T(°C)	Brix	pH	T(°C)	Brix
1ª Coleta: 01/06/92	5,81	-	7,7	4,30	-	1,2	4,37	-	-
2ª Coleta: 15/07/92	4,88	29	18,5	4,38	35,5	4,5	4,55	35	-
3ª Coleta: 03/11/92	5,81	30	18,7	4,15	31	0,3	3,99	33	-

TABELA 3 - Contagem microbiana em UFC/ml das amostras coletadas

Amostragens	Usina Costa Pinto			Usina Santa Cruz			Meios
	Mosto	Vinho	Leite	Mosto	Vinho	Leite	
1ª Coleta	$3,25 \times 10^4$	$4,90 \times 10^8$	$4,83 \times 10^9$	$6,45 \times 10^5$	$7,17 \times 10^8$	$2,89 \times 10^9$	WLN ágar
2ª Coleta	$1,33 \times 10^6$	$4,86 \times 10^8$	$7,56 \times 10^9$	$1,91 \times 10^6$	$1,40 \times 10^8$	$8,57 \times 10^8$	
3ª Coleta	$1,99 \times 10^6$	$3,10 \times 10^8$	$1,18 \times 10^9$	$1,48 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	$2,22 \times 10^8$	
1ª Coleta	$2,42 \times 10^3$	$7,22 \times 10^5$	$8,25 \times 10^4$	$5,39 \times 10^4$	$4,14 \times 10^4$	$2,98 \times 10^5$	WLD ágar
2ª Coleta	$3,66 \times 10^4$	$5,86 \times 10^4$	$6,68 \times 10^5$	$1,41 \times 10^6$	$3,77 \times 10^4$	$1,38 \times 10^5$	
3ª Coleta	$9,18 \times 10^5$	$2,86 \times 10^5$	$5,62 \times 10^5$	$2,72 \times 10^5$	$9,50 \times 10^2$	$1,13 \times 10^5$	
1ª Coleta	$7,18 \times 10^3$	$2,66 \times 10^4$	$9,45 \times 10^5$	$3,50 \times 10^5$	$3,70 \times 10^4$	$2,86 \times 10^5$	Lisina ágar
2ª Coleta	$3,66 \times 10^4$	$3,00 \times 10^2$	$1,55 \times 10^3$	$5,08 \times 10^5$	$3,35 \times 10^3$	$1,90 \times 10^3$	
3ª Coleta	$3,57 \times 10^5$	$3,10 \times 10^3$	$7,55 \times 10^2$	$5,54 \times 10^5$	$1,22 \times 10^6$	$1,33 \times 10^5$	
1ª Coleta	$9,75 \times 10^2$	$1,71 \times 10^7$	$9,35 \times 10^5$	$7,30 \times 10^3$	$7,95 \times 10^5$	$3,75 \times 10^6$	Lin ágar
2ª Coleta	$8,00 \times 10^2$	$1,05 \times 10^5$	$2,33 \times 10^5$	$2,12 \times 10^3$	$1,40 \times 10^4$	$5,20 \times 10^4$	
3ª Coleta	$1,11 \times 10^4$	$2,14 \times 10^4$	$2,42 \times 10^4$	$3,87 \times 10^3$	$2,00 \times 10^2$	$1,46 \times 10^5$	

TABELA 4 - Total de linhagens de leveduras isoladas em cada uma das 6 coletas realizadas em duas usinas de açúcar e álcool.

Usinas	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	Total
Costa Pinto	49	74	98	221
Santa Cruz	58	78	82	218

TABELA 5 - Lista de gêneros e número de linhagens de leveduras isoladas das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

USINAS	COSTA PINTO									SANTA CRUZ								
	MOSTO			VINHO			LEITE			MOSTO			VINHO			LEITE		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
<i>Candida</i>	6	6	12	6	6	12	16	12	10	10	12	7	7	9	11	13	11	15
<i>Cryptococcus</i>	3																	
<i>Issatchenkia</i>	1					1			1		1	1			1		1	
<i>Kluyveromyces</i>										1	3	2	2	3	5	1	2	
<i>Pichia</i>	1		1		1	5		2	2								1	
<i>Rhodotorula</i>								2		1		1						
<i>Saccharomyces</i>	3	10	14	1	16	12	2	18	23	5	9	16	5	7	5	5	11	9
<i>Saccharomyces/Hanseniaspora</i>			1			1		1	1			1						
<i>Schizosaccharomyces</i>				1			2						1			1		
<i>Trichosporon</i>	1						2											
<i>Zygosaccharomyces/Torulaspota</i>				4		2				3	3	5	2	3	1	1	2	2
Total	15	16	28	12	23	33	22	35	37	20	28	33	17	22	23	21	28	26



TABELA 6 - Lista de espécies e número de linhagens de *Candida* isoladas a partir das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Alcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

USINAS	COSTA PINTO									SANTA CRUZ								
	MOSTO			VINHO			LEITE			MOSTO			VINHO			LEITE		
ESPECIES/COLETAS	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
<i>C. colliculosa</i>							2	1		1	2			1		2		
<i>C. dattila</i>																		1
<i>C. guilliermondii</i>	1						1											
<i>C. guilliermondii</i> var. <i>membranaefaciens</i>			2			3												
<i>C. kefyri</i>														1			2	1
<i>C. krusei</i>				2		1	4		2	1	2		3		1	2		1
<i>C. lipolytica</i>											1							
<i>C. lusitanae</i>	1						1											
<i>C. magnoliae</i>						1			1									
<i>C. milleri</i> / <i>C. holmii</i>		2				1												
<i>C. parapsilosis</i>															1			
<i>C. rugosa</i>					1			4	6						2			7
<i>C. stellata</i>	1	4	1	2	3	2	4	4	1	5	5	3	3	7	7	4	8	2
<i>C. tropicalis</i>	3		9	2	2	4	4	2		3	2	4	1			5	1	3
<i>C. utilis</i>								1										
Total	6	6	12	6	6	12	16	12	10	10	12	7	7	9	11	13	11	15

TABELA 7 - Número total de linhagens isoladas a partir das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A, durante a safra 92/93.

Coletas	Amostras	Usina Costa Pinto	Usina Santa Cruz	Total
1 <sup>a</sup> Coleta	Mosto	15	20	107
	Vinho	12	17	
	Leite	22	21	
2 <sup>a</sup> Coleta	Mosto	16	28	152
	Vinho	23	22	
	Leite	35	28	
3 <sup>a</sup> Coleta	Mosto	28	33	180
	Vinho	33	23	
	Leite	37	26	

TABELA 8: Porcentagem de gêneros isolados em cada coleta realizada na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

USINAS	COSTA PINTO			SANTA CRUZ		
	1a	2a	3a	1a	2a	3a
COLETAS	%	%	%	%	%	%
<i>Candida</i>	57,14	32,43	34,69	51,72	41,03	40,24
<i>Cryptococcus</i>	6,12	-	-	-	-	-
<i>Issatchenkia</i>	2,04	-	2,04	-	2,56	2,44
<i>Kluyveromyces</i>	-	-	-	6,90	10,26	8,54
<i>Pichia</i>	2,04	4,05	8,16	-	1,28	-
<i>Rhodotorula</i>	-	2,70	-	1,72	-	1,22
<i>Saccharomyces</i>	12,25	59,46	50,00	25,86	34,61	36,58
<i>Saccharomycodes/Hanseniaspora</i>	-	1,35	3,06	-	-	1,22
<i>Schizosaccharomyces</i>	6,12	-	-	3,45	-	-
<i>Trichosporon</i>	6,12	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces/Torulaspota</i>	8,17	-	2,04	10,35	10,26	9,76

TABELA 9 - Porcentagem de espécies de *Candida* isoladas em cada coleta realizada na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

USINAS	COSTA PINTO			SANTA CRUZ		
	1a	2a	3a	1a	2a	3a
ESPECIES	%	%	%	%	%	%
<i>C. colliculosa</i>	7,14	4,17	-	10,00	9,37	-
<i>C. dattila</i>	-	-	-	-	-	3,03
<i>C. guilliermondii</i>	7,14	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i> var. <i>membranaefaciens</i>	-	-	14,71	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	-	-	-	-	9,37	3,03
<i>C. krusei</i>	21,43	-	8,82	20,00	6,25	6,06
<i>C. lipolytica</i>	-	-	-	-	3,12	-
<i>C. lusitaniae</i>	7,14	-	-	-	-	-
<i>C. magnoliae</i>	-	-	5,88	-	-	-
<i>C. milleri/C. holmii</i>	-	8,33	2,94	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	3,03
<i>C. rugosa</i>	-	20,83	17,65	-	-	27,27
<i>C. stellata</i>	25,00	45,83	11,76	40,00	62,50	36,36
<i>C. tropicalis</i>	32,14	16,67	38,23	30,00	9,37	21,21
<i>C. utilis</i>	-	4,17	-	-	-	-

TABELA 10- Número de linhagens isoladas através dos diferentes meios de cultura, em amostra coletadas nas duas usinas em estudo.

USINAS MEIOS GENÉROS	USINA COSTA PINO												USINA SANTA CRUZ																							
	WLN				WLI				LISINA				LJN				WLN				WLI				LISINA				LJN							
	M	V	L	E	M	V	L	E	M	V	L	E	M	V	L	E	M	V	L	E	M	V	L	E	M	V	L	E	M	V	L	E	M	V	L	E
<i>Candida</i>	3	1	6	8	6	5	6	7	15	7	10	12	2	5	4	7	5	4	7	5	10	6	3	11	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
<i>Cryptococcus</i>	1																																			
<i>Issatchenkia</i>							1	1	1				1																							
<i>Kluyveromyces</i>																																				
<i>Pichia</i>																																				
<i>Rhodotorula</i>																																				
<i>Saccharomyces</i>	11	14	16	2	10	20	10	2	2	4	3	5	15	11	16	2	1	1	1	1	1	8	5	6	5	6	5	2	5	2	2					
<i>Saccharomyces/</i>																																				
<i>Hanseniaspora</i>																																				
<i>Schizosaccharomyces</i>																																				
<i>Trichosporon</i>																																				
<i>Zygosaccharomyces/</i>																																				
<i>Torulasporea</i>																																				

TABELA 11 - Resultados dos testes preliminares dos gêneros de leveduras isoladas da Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool e da Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

Testes/Gêneros	<i>Saccharomyces</i>							
	124	15	23	1	2	1	5	
Pigmento	b	bc	b	bc	bc	b	b	
Pseudomicélio	-	-	+	+	+	+	-	
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	
Artrósporo	-	-	-	-	-	-	-	
Brotamento	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	
Película	-	-	-	-	-	-	-	
Fermentação da Glicose	+	+	+	+	+	+	+	
DBB	-	-	-	-	-	-	-	
Urease	-	-	-	-	-	-	-	
37°C	+	+	+	+	+	+	+	
Síntese de Amido	-	-	-	-	-	-	-	
Produção de Ácido	-	-	-	-	-	-	-	
Balistosporos	-	-	-	-	-	-	-	
Esporos	e	e	e	e	e	e	e	
Ascospores	p	p	p	p	p	p	p	
Conjugação	-	-	-	-	-	-	-	
Nitrato de Potássio	-	-	-	-	-	-	-	
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	
Sacarose	+	+	+	+	-	-	-	
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	

Testes/Gêneros	<i>Zygosaccharomyces/Torulaspóra</i>				<i>Kluyveromyces</i>			
	13	6	6	3	11	1	5	2
Pigmento	b	b	b	b	b	bc	bc	b
Pseudomicélio	-	+	+	+	+	+	+	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-
Artrósporo	-	-	-	-	-	-	-	-
Brotamento	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm
Película	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese de Amido	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-
Balistosporos	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	e	e	e	e	r	r	r	r
Ascospores	p	p	p	p	d	d	d	d
Conjugação	+	+	+	+	-	-	-	-
Nitrato de Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	-	+	+	+	+
Celobiose	-	-	+	-	-	-	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 11: (continuação)

Testes/Gêneros	<i>Pichia</i>							
	2	1	1	2	1	4	1	1
Nº de Isolados								
Pigmento	bc	b	c	b	bc	bc	bc	b
Pseudomicélio	+	+	+	-	-	+	+	+
Micélio Verdadeiro	+	+	+	-	-	-	-	-
Artrósporo	-	-	-	-	-	-	-	-
Brotamento	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm
Película	+	+	+	-	-	+	+	+
Fermentação da Glicose	-	-	-	+	+	+	+	+
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	-	+	+	+	+
Síntese de Amido	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-
Balistosporos	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	e	e	e	ch	ch	e	e	e
Ascospores	d	d	d	d	d	p	p	p
Conjugação	-	-	-	-	-	+	+	+
Nitrato de Potássio	-	-	-	+	+	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	-	-	+	+	+	-	+	-
Celobiose	-	-	-	+	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	+	+	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-

Testes/Gêneros	<i>Issatchenkia</i>		<i>Saccharomyces/Hanseniaspora</i>	
	5	2	4	1
Nº de Isolados				
Pigmento	bc	b	bc	b
Pseudomicélio	+	+	+	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-
Artrósporo	-	-	-	-
Brotamento	bm	bm	bb/f	bb/f
Película	+	+	-	-
Fermentação da Glicose	+	+	+	+
DBB	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+
Síntese de Amido	-	-	-	-
Produção de Ácido	-	-	-	-
Balistosporos	-	-	-	-
Esporos	e	e	e	e
Ascospores	p	p	p	p
Conjugação	-	-	-	-
Nitrato de Potássio	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	-
Celobiose	-	-	-	+
Eritritol	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-

TABELA 11: (continuação)

Testes/Gêneros	<i>Schizosaccharomyces</i>			<i>Rhodotorula</i>	
	2	2	1	3	1
Nº de Isolados					
Pigmento	bc	bc	b	v	v
Pseudomicélio	-	-	-	-	-
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-
Artrósporo	-	-	-	-	-
Brotamento	f	f	f	bm	bm
Película	-	-	+	-	-
Fermentação da Glicose	+	+	+	-	-
DBB	-	-	-	+	+
Urease	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	-	-
Síntese de Amido	-	+	-	-	-
Produção de Ácido	-	-	-	-	-
Balistosporos	-	-	-	-	-
Esporos	e	e	e	-	-
Ascospores	d	d	d	-	-
Conjugação	-	-	-	-	-
Nitrato de Potássio	-	-	-	+	+
Glicose	+	+	+	+	+
Sacarose	-	-	+	+	+
Celobiose	-	-	+	-	+
Eritritol	-	-	+	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-

Testes/Gêneros	<i>Trichosporon</i>		<i>Cryptococcus</i>
	1	2	3
Nº de Isolados			
Pigmento	b	b	s
Pseudomicélio	+	+	-
Micélio Verdadeiro	+	+	-
Artrósporo	+	+	-
Brotamento	bm	bm	bm
Película	+	+	+
Fermentação da Glicose	-	-	-
DBB	+	+	+
Urease	+	+	+
37°C	+	+	-
Síntese de Amido	-	-	-
Produção de Ácido	-	-	-
Balistosporos	-	-	-
Esporos	-	-	-
Ascospores	-	-	-
Conjugação	-	-	-
Nitrato de Potássio	-	-	-
Glicose	+	+	+
Sacarose	+	+	+
Celobiose	+	+	+
Eritritol	-	+	+
M-Inositol	-	-	+

Legenda: TABELA 11	
(+) resposta positiva ao teste	(e) esporos esféricos
(-) resposta negativa ao teste	(r) esporos reniformes
(b) colônia branca	(d) ascos deiscentes
(c) colônia creme	(p) ascos persistentes
(bc) colônia branco-creme	(bm) brotamento multipolar
(v) colônia vermelha	(bb) brotamento bipolar
(s) colônia salmão	(f) fissão
(ch) esporos em forma de chapéu	



TABELA 12: Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, isoladas da Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Alcool.

Testes\Culturas	<i>Candida stellata</i>								
	7A	11A	25A	27A	29A	35A	42A	53A	69A
Pigmento	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	f	f	l	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	f	f	f	l	+	+	f	f	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	f
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	-	-	+	+	-	-	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 12: (continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida stellata</i>								
	70A	71A	72A	80A	107A	109A	112A	113A	114A
Pigmento	bc	bc	b	b	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	l	-	+	-	+	+	+	l
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	f	f	f	-	f	-	+	-	f
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	f	f	f	+	+	+	+	f
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	-	-	-	-	-	-	+	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 12: (continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida stellata</i>				<i>C. guilliermondii</i>	
	129A	203A	215A	216A	4A	24A
Pigmento	b	bc	bc	bc	b	b
Pseudomicélio	-	-	-	-	+	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	+	+	l	l
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	+	+	+	-	-
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	+	f	f	+	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-
37°C	-	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	+	+
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	-	-	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	+	+
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+
Etilamina	-	-	-	-	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	f	+
Maltose	-	-	-	-	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	+	+
Trealose	-	-	-	-	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	+	f
Rafinose	+	+	+	+	+	+
Melizitol	-	-	-	-	+	+
Inulina	-	-	-	-	f	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	+	+
D-Ribose	-	-	-	-	f	+
L-Ramnose	-	-	-	-	-	f
Etanol	-	-	-	-	+	+
Glicerol	-	-	-	-	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	+	+
Galactitol	-	-	-	-	+	-
D-Manitol	-	-	-	-	+	+
D-Glucitol	-	-	-	-	+	+
$\alpha$ -Metil Glic.	-	-	-	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	+
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	+	-
Citrato	-	-	-	-	+	+
M-Inositol	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	+	+
CH 1000	-	-	-	-	+	+

TABELA 12: (continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida tropicalis</i>								
	13A	14A	15A	18A	20A	21A	43A	45A	49A
Pigmento	c	bc	c	c	c	b	b	c	b
Pseudomicélio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Micélio Verdadeiro	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	f	-	f	f	f	-	-	f	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH 1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA 12: (continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida tropicalis</i>								
	87A	92A	101A	106A	146A	147A	149A	150A	158A
Pigmento	b	b	b	b	b	b	bc	bc	bc
Pseudomicélio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Micélio Verdadeiro	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	f	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	-	-	-	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	+	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH 1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA 12: (continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida tropicalis</i>							
	159A	160A	162A	163A	166A	167A	168A	193A
Pigmento	b	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc
Pseudomicélio	-	+	+	+	+	+	+	+
Micélio Verdadeiro	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	f	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	+	+	+	+	+	+	+	+
CH 1000	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA 12: (continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida krusei</i>								
	16A	17A	19A	33A	41A	45A	199A	200A	221A
Pigmento	bc	bc	b	b	b	bc	b	b	b
Pseudomicélio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese Vitaminas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	-	+	+	+	-	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinato	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Citrato	-	-	-	+	+	-	-	-	+
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	+	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 12:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida rugosa</i>								
	100A	103A	108A	110A	111A	194A	201A	208A	209A
Pigmento	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	+	-	+	+	+	-	-	+	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	f	+	-	+	+	+	-	-	-
10% NaCl	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	f	-	-	-	-	f	f	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	f	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	f
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-



TABELA 12:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida rugosa</i>		<i>Candida colliculosa</i>			<i>Candida lusitania</i>	
	213A	214A	22A	38A	102A	5A	34A
Pigmento	bc	b	b	b	b	b	bc
Pseudomicélio	-	+	-	-	-	+	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	-	-	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	-	-	+	+	+	-	1
Ferm. Sacarose	-	-	+	+	+	-	-
Ferm. Maltose	-	-	+	-	-	-	-
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	+	+
Síntese Vitaminas	-	-	f	f	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	-	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	-	-	-	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	+	+	+	+	+
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	-	-	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	-	-
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	+	+	+	+	+
Sacarose	-	-	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	+	+	+	+
Trealose	-	-	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	+	+	+	-	-
Melizitose	-	-	-	-	-	+	+
Inulina	-	-	+	+	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	-	-	-	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	+	+
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucitol	+	f	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	-	-	+	-	f	+	f
Salicina	-	-	-	+	-	+	+
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	+	+	+	-	-
CH 1000	-	-	+	+	+	-	-

TABELA 12:(continuação)

Testes\Culturas	<i>C. utilis</i>		<i>C. guilliermondii</i> var. <i>membranaefaciens</i>			
	85A	151A	152A	157A	161A	185A
Pigmento	b	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	+	+	+	+	+	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	-	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	+	+	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	+	-	f
DBB	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	+	+	+	+	+	+
Nitrato Potássio	+	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	+	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	+	+	+	+	+
Melizitose	+	f	f	f	f	+
Inulina	-	f	f	f	f	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	f
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	+
Galactitol	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	+	+	+	+	+
D-Glucitol	-	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	+	+	+	+	+
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-
CH 100	+	+	+	+	+	+
CH 1000	+	+	+	+	+	+

TABELA 12: (continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida magnoliae</i>		<i>C. milleri</i> / <i>C. holmii</i>		
	202A	220A	77A	78A	217A
Pigmento	c	c	b	b	b
Pseudomicélio	-	-	-	-	-
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	-	-	+	+	+
Ferm. Sacarose	-	+	+	+	+
Ferm. Maltose	-	-	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	+	+
DBB	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	+	-	-	+
10% NaCl	-	+	-	-	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	+	-	-	-
Nitrato Potássio	+	+	-	-	-
Nitrito Sódio	+	+	-	-	-
L-Lisina	+	+	-	-	-
Etilamina	-	+	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+
Galactose	+	f	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+
Celobiose	+	-	-	-	-
Trealose	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Rafinose	-	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-
D-Ribose	f	f	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-
Etanol	+	-	f	f	-
Glicerol	+	+	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	-	-	-
D-Glucitol	+	+	-	-	-
α-Metil Glic.	-	-	-	-	+
Salicina	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-

TABELA 13: Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, isoladas da Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

Testes\Culturas	<i>Candida stellata</i>								
	2B	21B	25B	26B	27B	37B	49B	52B	53B
Pigmento	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	+	f	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	f	f	f	f	-	f	-	f	f
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida stellata</i>							
	55B	56B	57B	63B	79B	91B	92B	93B
Pigmento	b	b	b	b	b	b	bc	b
Pseudomicélio	-	-	-	-	-	-	-	-
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	-	+	+	l	+	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	f	f	-	f	+	+	f	f
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida stellata</i>								
	108B	109B	110B	112B	113B	116B	117B	118B	119B
Pigmento	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	-	+	l	l	+	-	+	+	-
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	+	f	f	f	f	+	f	+	+
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	-	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida stellata</i>								
	120B	121B	122B	123B	126B	134B	137B	140B	145B
Pigmento	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	l	+	+	f	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	+	l	-	+	-	-	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	f	+	f	+	f	+	+	f	f
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	-	+	+	-	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida stielatca</i>								
	199B	201B	202B	205B	206B	215B	216B	217B	218B
Pigmento	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	+	+	+	-	+	+	-	-	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	l	+	+	l	+	+	l
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	f	f	f	f	f	f	f	f	f
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	-	+	-	-	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-



TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida tropicalis</i>									
	28B	29B	31B	32B	34B	35B	41B	44B	51B	67B
Pigmento	b	b	b	bc	b	bc	b	b	bc	bc
Pseudomicélio	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Mic. Verdadeiro	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	l	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidról. Arbutina	-	-	f	-	f	-	f	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	f	f	-	-	-	-	f	f	-	f
Succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH 1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida tropicalis</i>								
	83B	89B	147B	173B	174B	175B	177B	184B	194B
Pigmento	b	b	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc
Pseudomicélio	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Micélio Verdadeiro	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	l	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Maltose	+	f	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	f	f	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	f	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	f	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	f	f	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CH 1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	Candida krusei									
	22B	24B	36B	45B	50B	58B	94B	135B	192B	213B
Pigmento	b	b	b	b	b	b	b	bc	b	b
Pseudomicélio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Micél. Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Síntese Vitaminas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinato	-	-	f	f	-	f	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida rugosa</i>								
	166B	167B	168B	171B	172B	196B	204B	207B	208B
Pigmento	b	b	b	b	b	bc	b	b	b
Pseudomicélio	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	-	-	-	-	-	l	-	-	-
Ferm. Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódico	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	f	+	f	f
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	+	+	+	f	f	+	-	-	-
Succinato	+	+	+	f	f	+	+	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	<i>Candida colliculosa</i>						<i>C. lipolytica</i>
	30B	33B	40B	60B	66B	73B	129B
Pigmento	b	b	b	b	b	b	bc
Pseudomicélio	-	+	-	+	-	+	-
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	+
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+	-
Ferm. Galactose	-	+	+	-	-	-	-
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	+	+	-
Ferm. Maltose	+	+	+	+	+	+	-
Ferm. Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	-	-	-	-	-
Síntese Vitaminas	f	f	f	+	f	f	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	+	+	+	+	+	+	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	+	+	+	+	+	+	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	-
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	-
Melizitolose	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	+	+	+	+	+	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	f
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	f
Glicerol	-	-	-	-	-	-	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	+
Ribitol	f	-	-	f	f	f	f
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	f	f	+	f	f	f	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	-	+
Succinato	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	f
M-Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
CH 100	+	+	+	+	+	+	+
CH 1000	+	+	+	+	+	+	+

TABELA 13:(continuação)

Testes\Culturas	Candida kefir				C. parapsilosis	C. dactyla
	76B	86B	102B	169B	165B	190B
Pigmento	b	b	b	b	b	bc
Pseudomicélio	+	+	+	-	+	+
Micélio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-
Ferm. Glicose	+	+	+	+	+	+
Ferm. Galactose	+	+	+	+	l	nd
Ferm. Sacarose	+	+	+	+	-	+
Ferm. Maltose	-	-	-	l	-	+
Ferm. Lactose	+	+	+	+	-	-
Ferm. Rafinose	-	-	-	-	-	f
DEB	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	-
40°C	+	+	+	+	+	-
Síntese Vitaminas	-	-	-	-	-	-
Síntese Amido	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	+	+
Produção Ácido	-	-	-	-	-	-
Hidrólise Arbutina	+	+	+	+	-	-
Nitrato Potássio	-	-	-	-	-	-
Nitrito Sódio	-	-	-	-	-	-
L-Lisina	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	+	+
Maltose	-	-	-	-	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+
Melizitose	-	-	-	-	+	+
Inulina	+	+	+	+	-	-
Amido Solúvel	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	+	+	+	+	+	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	f
Glicerol	f	f	f	f	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	+	+
Galactitol	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+
D-Glucitol	+	+	+	+	+	+
α-Metil Glic.	-	-	-	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	+	+	+	-	-
Succinato	+	+	+	+	+	-
Citrato	-	-	-	-	+	-
M-Inositol	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-
CH 100	+	+	+	+	+	-
CH 1000	+	+	+	+	-	-

**Legenda: TABELAS 12 E 13**

- (+) resposta positiva ao teste
- (-) resposta negativa ao teste
- (f) resposta fraca ao teste
- (l) resposta lenta ao teste
- (b) colônia branca
- (c) colônia creme
- (bc) colônia branco-creme
- (DBB) teste do azul de diazônio B
- (CH) Cicloheximida
- (nd) resultado não determinado



FIGURA 1a- Vista geral do multinoculador utilizado na técnica de “replica plate”.



FIGURA 1b - Placa de YM ágar inoculada através do multinoculador (21 dias/27°C).



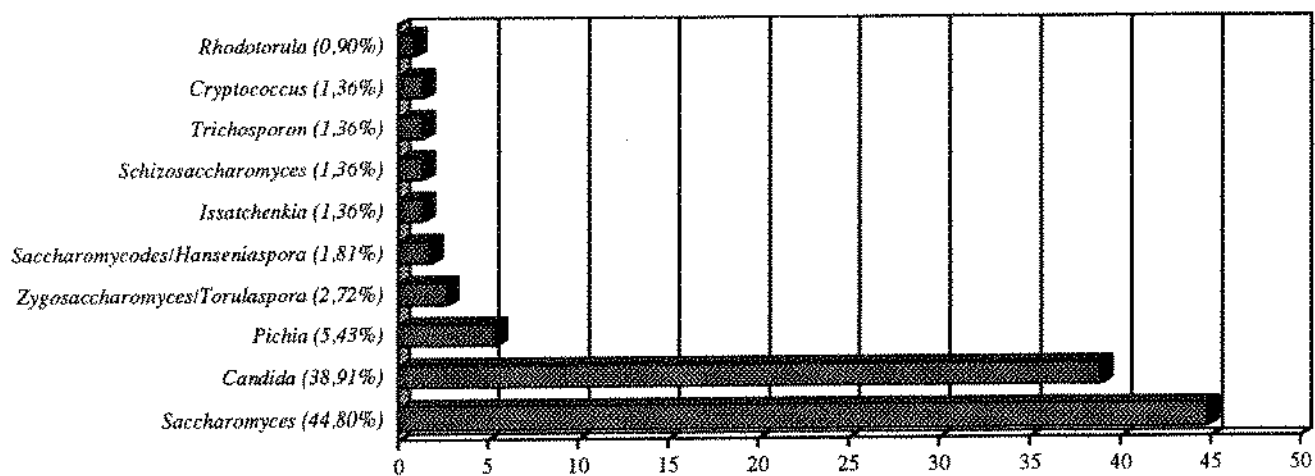


FIGURA 2 - Frequência dos gêneros isolados das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool.

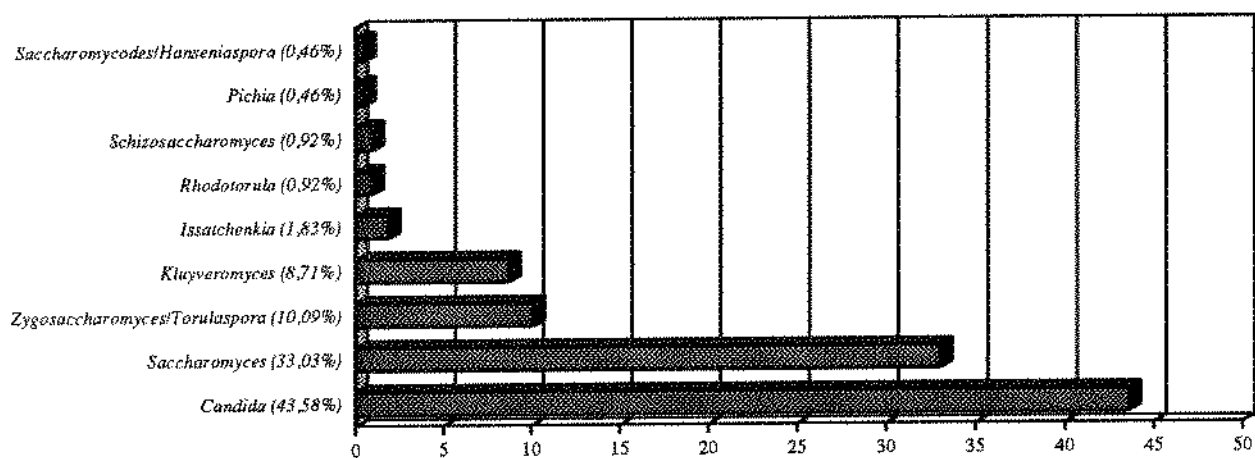


FIGURA 3 - Frequência dos gêneros isolados das amostras coletadas na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

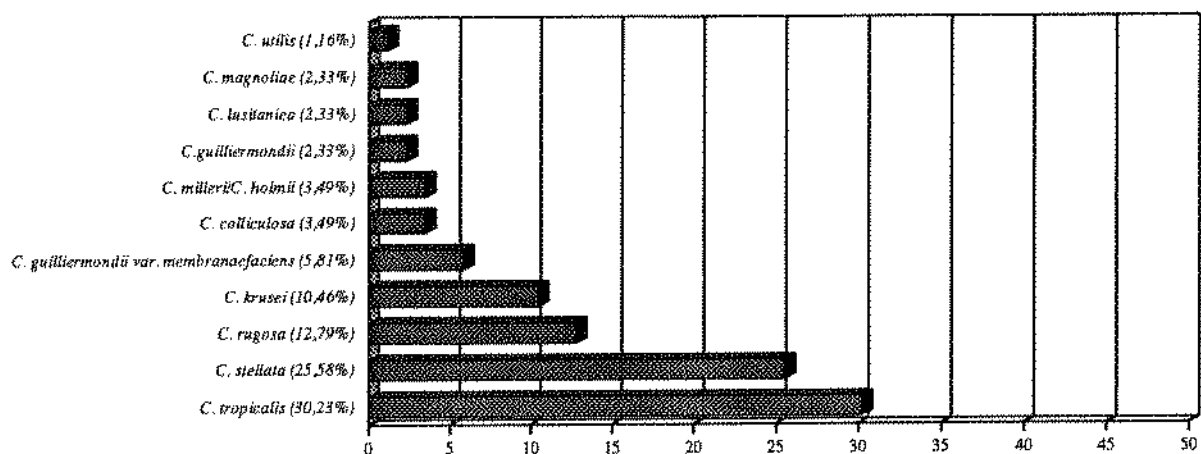


FIGURA 4 - Frequência das espécies de *Candida* isoladas das amostras coletadas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool.

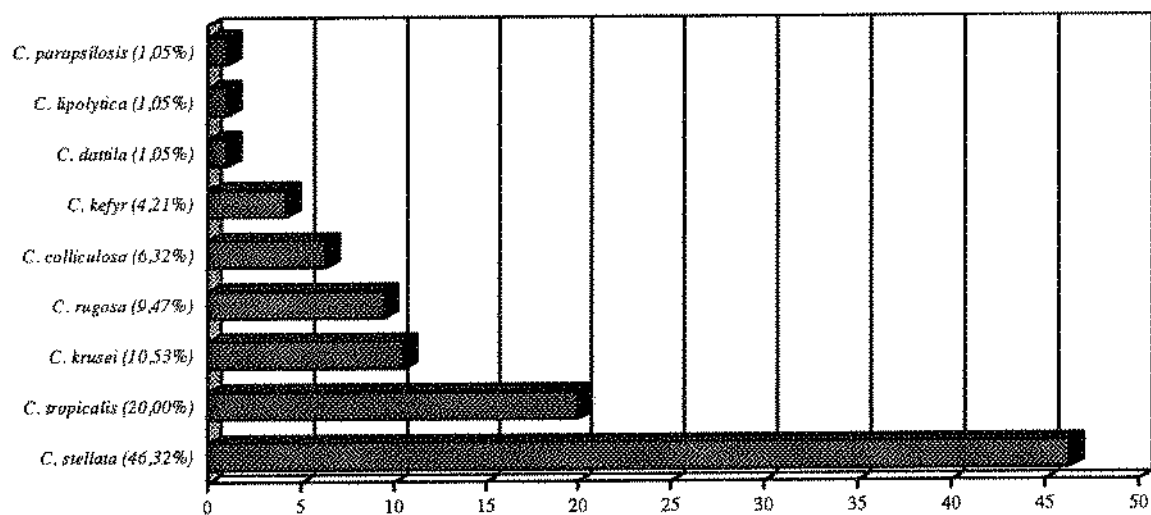


FIGURA 5 - Frequência das espécies de *Candida* isoladas das amostras coletadas na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

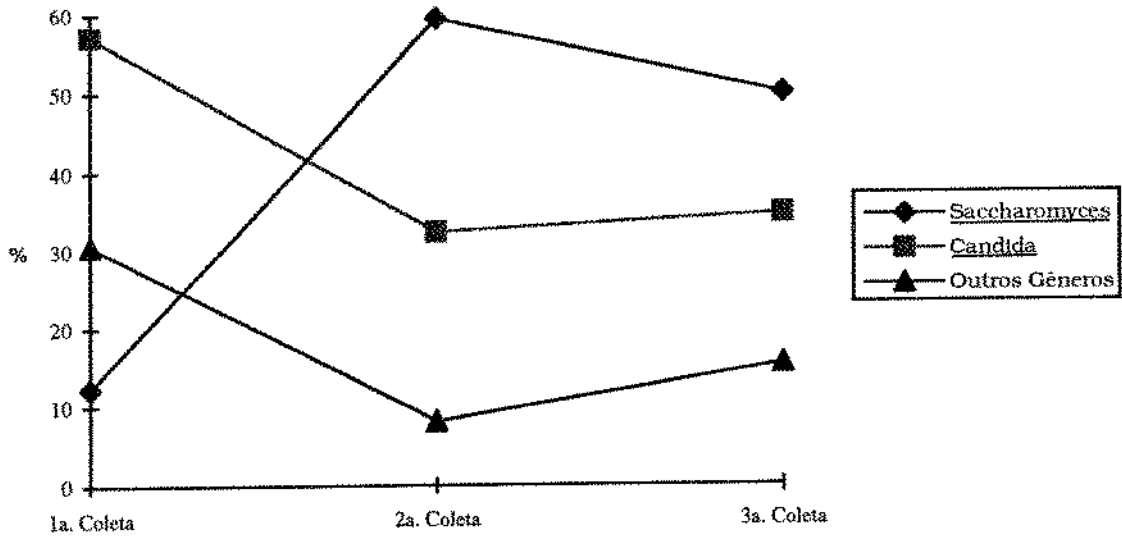


FIGURA 6 - Frequência dos gêneros isolados em cada uma das coletas na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool.

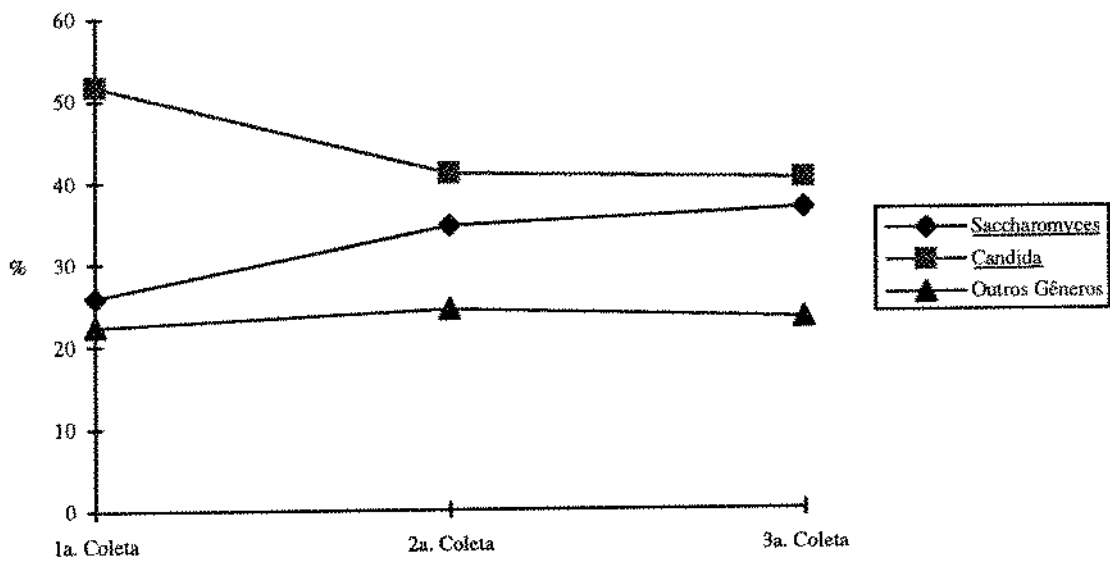


FIGURA 7 - Frequência dos gêneros isolados em cada uma das coletas na Usina Açucareira Santa Cruz S/A.

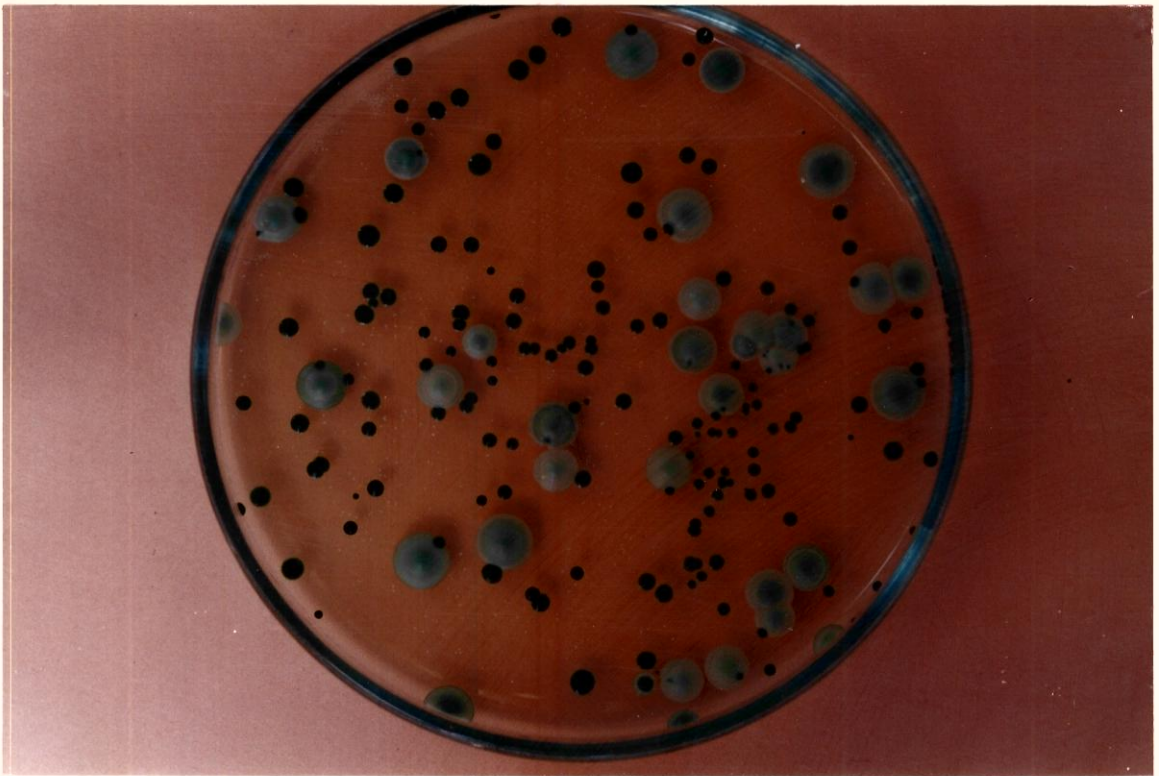


FIGURA 8 - Placa de contagem e isolamento em meio WLN ágar (amostra de mosto coletada na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool).

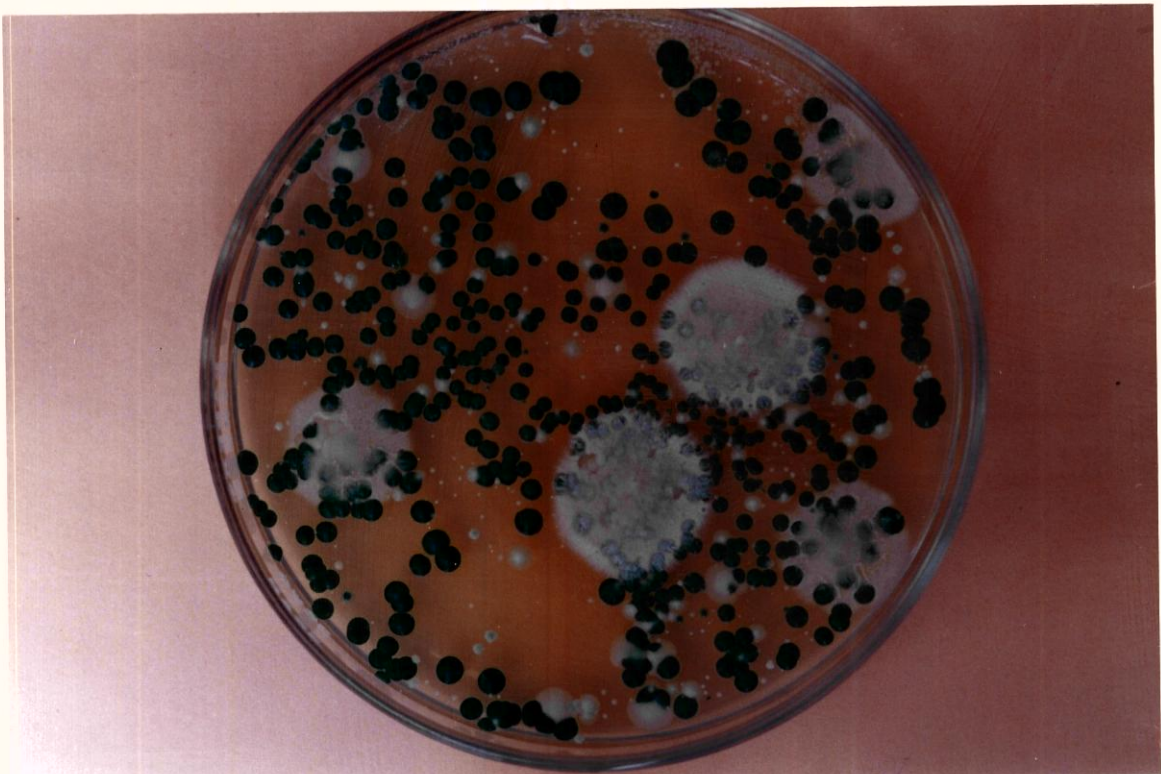


FIGURA 9 - Placa de contagem e isolamento em meio WLD ágar (amostra de leite levedurado coletada na Usina Açucareira Santa Cruz S/A).





FIGURA 10 - Placa de contagem e isolamento em meio Lisina ágar (amostra de leite levedurado coletada na Usina Açucareira Santa Cruz S/A).

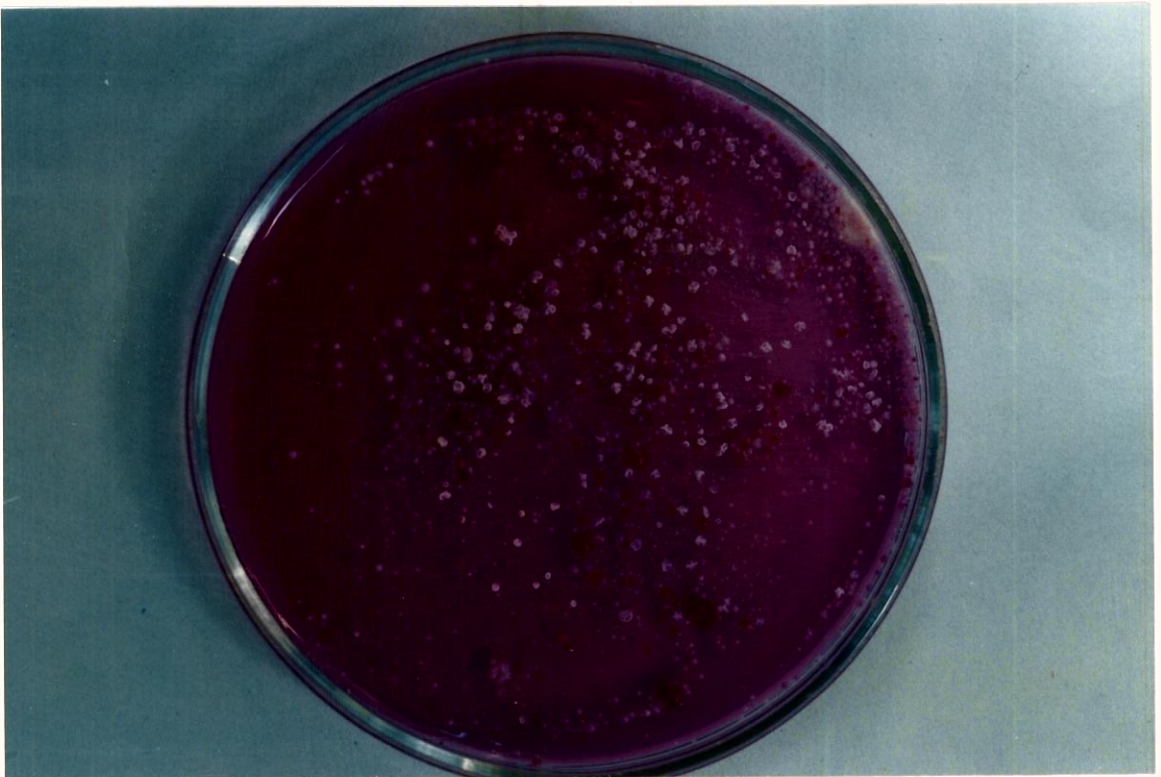


FIGURA 11 - Placa de contagem e isolamento em meio de Lin ágar (amostra de mosto coletada na Usina Costa Pinto S/A Açúcar e Álcool).

## 5 - CONCLUSÕES

1. A maioria das leveduras contaminantes presentes nas amostras coletadas nas duas usinas em estudo foram caracterizadas como leveduras ascomicéticas (97,72%).
2. Ocorreu uma significativa predominância de linhagens fermentativas (92,26%) em relação a linhagens oxidativas (7,74%), tanto nas amostras coletadas na usina Costa Pinto, como nas amostras da usina Santa Cruz.
3. *Saccharomyces* e *Candida* foram os gêneros predominantes nas amostras coletadas. A usina Costa Pinto apresentou 44,8% de *Saccharomyces*, 38,9% de *Candida* e 16,3% de leveduras pertencentes a outros gêneros. A usina Santa Cruz apresentou 33,0% de *Saccharomyces*, 43,6% de *Candida* e 23,4% de outros gêneros de leveduras.
4. Os gêneros *Pichia*, *Zygosaccharomyces/Torulaspóra*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces/Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Schizosaccharomyces*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* também foram isolados.
5. Os gêneros *Trichosporon* e *Cryptococcus* foram detectados apenas na usina Costa Pinto, enquanto que *Kluyveromyces* foi isolado apenas na usina Santa Cruz.
6. A grande maioria das espécies de *Candida* foram caracterizadas como sendo linhagens fermentativas (88,95%).
7. As espécies *Candida stellata* (36,46%) e *C. tropicalis* (24,86%) foram predominantes em relação as demais espécies de *Candida* isoladas. Essas duas espécies representaram mais da metade do número de linhagens contaminantes do gênero *Candida*.

8. Outras espécies de *Candida* foram isoladas: *C. rugosa*, *C. krusei*, *C. colliculosa*, *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, *C. kefir*, *C. milleri*/*C. holmii*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. magnoliae*, *C. utilis*, *C. dattila*, *C. lipolytica* e *C. parapsilosis*.
9. As espécies *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, *C. milleri*/*C. holmii*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. magnoliae* e *C. utilis* foram isoladas apenas na usina Costa Pinto, enquanto que *C. kefir*, *C. dattila*, *C. lipolytica* e *C. parapsilosis* foram encontradas apenas na usina Santa Cruz.
10. Aproximadamente 56,50% dos isolados produziram esporos sexuais. Nenhum dos isolados produziu balistosporos e nem produziu significativamente ácido à partir da glicose.
11. Os meios de cultura utilizados para o isolamento de leveduras se mostraram eficientes, já que conseguiram o desenvolvimento de um número diversificado de linhagens. O meio Lisina ágar (descrito na literatura como seletivo para leveduras não-*Saccharomyces*) e o meio Lin ágar (descrito na literatura como seletivo para leveduras do gênero *Saccharomyces*) foram eficientes tanto para o isolamento de linhagens não-*Saccharomyces* como linhagens *Saccharomyces*.
12. Muitas linhagens (30,91%) podem possuir alto potencial biotecnológico ou aplicabilidade industrial pela capacidade em fermentar vigorosamente a sacarose, por assimilar etanol, pela habilidade de crescimento a temperaturas de 40°C e por serem tolerantes a altas concentrações de glicose. Essas linhagens foram caracterizadas como *Candida tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* e *C. kefir*.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Álcool e Açúcar* 5:12-18, 1982.
2. ANDERSON, P.J.; McNEIL, K.; WATSON, K. Isolation and identification of thermotolerant yeasts from Australian sugar cane mills. *Journal of General Microbiology* 134:1691-1698, 1988.
3. AQUARONE, E.; BARUFFALDI, R.; NACCO, R. Emprego das associações de antibióticos na fabricação de álcool por fermentação. *Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP* 6(2):256-308, 1968.
4. BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge, Cambridge University Press, 1983. 811p.
5. BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge, Cambridge University Press, 1990. 1002p.
6. BENÍTEZ, T.; CASTILLO, L.D.; AGUILERA, A.; CONDE, J.; CERDÁ-OLMEDO, E. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Applied and Environmental Microbiology* 45(5):1429-1436, 1983.
7. BERTOLINI, M.C.; ERNANDES, J.R.; LALUCE, C. New yeast strains for alcoholic fermentation at higher sugar concentration. *Biotechnology Letters* 13(3):197-202, 1991.
8. BEVAN, D.; BOND, J. Microorganisms in field and mill: a preliminary survey. *Proc. Od. Soc. Sugar Cane Technol.* 38:137-143, 1971.
9. BIDAN, P.; HEITZ, F. Microbiologie des sucres cristallisés. *Industries Alimentaires et Agricoles* 90(7-8):867-877, 1973.
10. CARMO DE SOUZA, L. Distribution of yeasts in natura. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. ed. *The yeasts: biology of the yeasts*. London, Academic Press, 1969. v.1, p.79-106.
11. CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 13(3):219-280, 1986.



12. CEREDA, M.P.; ANTONANGELO, A.T.B.F.; GOMES, M.I.F.V.; GOLDONI, J.S. Seleção de leveduras a partir de caldo de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*, L) em fermentação natural. **Revista de Microbiologia** 20(1):78-84, 1989.
13. CLARK, M.A.; ROBERTS, E.J.; GODSHALL, M.A.; BRANNAN, M.A.; CARPENTER, F.G.; COLL, E.E. Sucrose loss in the manufacture of cane sugar. **Sugar y Azucar** 75(9):64-68. 1980.
14. COPERSUCAR Controle microbiológico na fabricação de açúcar e álcool. **Boletim Técnico Copersucar** (22):2-17, 1983.
15. D'AMORE, T.; STEWART, G.G. Ethanol tolerance of yeasts. **Enzyme and Microbial Technology** 9(6):322-330, 1987.
16. DEÁK, T. Foodborne yeasts. **Advances in Applied Microbiology** 36:179-278, 1991.
17. DUNCAN, C.L.; COLMER, A.R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Applied Microbiology** 12:173-177, 1964.
18. ERNANDES, J.R.; MATULIONIS, M.; CRUZ, S.H.; BERTOLINI, M.C.; LALUCE, C. Isolation of new ethanol-tolerant yeasts for fuel ethanol production from sucrose. **Biotechnology Letters** 12(6):463-468, 1990.
19. FELL, J.W.; STATZELL TALLMAN, A.; AHEARN, D.G. Discussion of the genera belonging to the imperfect yeasts: genus 10, *Rhodotorula*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam, Elsevier Science, 1984. p.893-905.
20. FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A.; ROSSELL, C.E.V. Fermentação alcoólica em usinas cooperadas: evolução e perspectivas. **Boletim Técnico Copersucar** (23):8-11, 1983.
21. FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A.; LEIMER, K.H.; ROSSELL, C.E.V. Controle microscópico do processo de fermentação alcoólica. **Boletim Técnico Copersucar** (34):22-26, 1986.
22. FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBEREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. **Applied and Environmental Microbiology** 48:1034-1038, 1984.

23. FONSECA, A. Utilization of tartaric acid and related compounds by yeasts: taxonomic implications. **Canadian Journal of Microbiology** **38**:1242-1251, 1992.
24. FURLETTI, M.E.M.; OLIVEIRA, M.C.F.L.; ANGELIS, D.F. Perspectivas de uso de biocidas não convencionais na desinfecção da fermentação etanólica. **Brasil Açucareiro** **98**(3):65-69. 1981.
25. GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** Campinas, 1990. 388p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
26. GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica: revisão. **STAB** **9**(4/5):35-40, 1991.
27. GARCIA, E.C.; ALCINA, M.Y. Flora microbiológica predominante en el bagazo de cana de azucar. **Acta Científica Venezolana** **32**:177-183, 1981.
28. GOTO, S.; YOKOTSUKA, I. Wild yeast populations in fresh grape musts of different harvest times. **Journal of Fermentation Technology** **55**(5):417-422, 1977.
29. HAGLER, A.N. **Ecologia e taxonomia de leveduras em um estuário poluído e ambientes marinhos do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 1978. 440p. Tese (Doutorado em microbiologia) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
30. HAGLER, A.N.; AHEARN, D.G. Rapid Diazonium Blue B test to detect basidiomycetous yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology** **31**(2):204-208, 1981.
31. HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. A Diazonium Blue B test for yeasts grown three days on Yeast Carbon Base-Urea Agar. **Revista de Microbiologia** **22**(1):71-74, 1991.
32. HARPER, D.R. Microbial contamination of draught beer in public houses. **Process Biochemistry** **16**(1):2-7, 1981.
33. HEARD, G.M.; FLEET, G.H. Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. **Journal of Applied Bacteriology** **60**(6):477-481, 1986.
34. HOPE, C.F.A. Cinnamic acid as the basis of a medium for the detection of wild yeasts. **Journal of the Institute of Brewing** **93**(3):213-215, 1987.

35. JOLY, S. Microbiologia dos açúcares (II). **Brasil Açucareiro** 72(3):20-23, 1968.
36. KIRSOP, B.E.; SNELL, J.J.S. **Maintenance of microorganisms: a manual of laboratory methods.** London, Academic Press, 1984. 207p.
37. KISH, S.; SHARF, R.; MARGALITH, P. A note on a selective medium for wine yeasts. **Journal of Applied Bacteriology** 55(1):177-179, 1983.
38. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.; SLÁVIKOVÁ, E.; SIN, J.D. Yeasts and yeast-like organisms from North Korea. **Journal of General and Applied Microbiology** 35:135-149, 1989.
39. KREGER-VAN RIJ, N.J.W. Genetic differentiation in yeasts. In: SKINNER, F.A.; PASSMORE, S.M.; DAVENPORT, R.R. ed. **Biology and activities of yeasts.** London, Academic Press, 1980. p.29-52.
40. KREGER-VAN RIJ, N.J.W. General classification of the yeasts. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study.** Amsterdam, Elsevier Science, 1984a. p.1-44.
41. KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomy study.** Amsterdam, Elsevier Science, 1984b. 1082p.
42. KURTZMAN, C.P. Discussion of the genera belonging to the ascosporeogenous yeasts: genus 11, *Hansenula*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study.** Amsterdam, Elsevier Science, 1984a. p. 165-213.
43. KURTZMAN, C.P. Discussion of the genera belonging to the ascosporeogenous yeasts: genus 12, *Issatchenkia*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study.** Amsterdam, Elsevier Science, 1984b. p. 214-223.
44. KURTZMAN, C.P. Discussion of the genera belonging to the ascosporeogenous yeasts: genus 21, *Pichia*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study.** Amsterdam, Elsevier Science, 1984c. p. 295-378.
45. KURTZMAN, C.P. PHAFF, H.J. Molecular taxonomy. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. ed. **The yeasts: biology of yeasts.** London, Academic Press, 1987. v.1, p.63-94.
46. KURTZMAN, C.P. Identification and taxonomy. In: KIRSOP, B.E.; KURTZMAN, C.P. ed. **Living resources for biotechnology: yeasts.** New York, Cambridge, 1988. p.99-140.

47. LALUCE, C.; ABUD, C.L.; GREENHALF, W.; SANCHES PERES, M.F. Thermotolerance behavior in sugar cane syrup fermentations of wild type yeast strains selected under pressures of temperature, high sugar and added ethanol. **Biotechnology Letters** 15(6):609-614, 1993.
48. LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium 11**: 641-649, 1981.
49. LIMA, U.A.; GOLDONI, J.S.; CEREDA, M.P.; SOUZA, L.G. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. **Brasil Açucareiro** 83(4):337-343, 1974.
50. LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. (Biotecnologia, v.1). São Paulo, Edgard Blucher, 1982.
51. LIN, Y. Detection of wild yeasts in the brewery efficiency of differential media. **Journal of the Institute of Brewing** 81:410-417, 1975.
52. LODDER, J. **The yeasts: a taxonomic study**. London, North-Holland, 1970. 1385p.
53. LONGLEY, R.P.; DENNIS, R.R.; HEYER, M.S.; WREN, J.J. Selective *Saccharomyces* media containing ergosterol and tween 80. **Journal of the Institute of Brewing** 84:341-345, 1978.
54. MEYER, S.A.; AHEARN, D.G.; Yarrow, D. Discussion of the genera belonging to the imperfect yeasts: genus 4, *Candida*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam, Elsevier Science, 1984. p.585-845.
55. MEYER, S.A. DNA Reassociation and protein electrophoresis useful tools to evaluate yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; MEYER, S.A.; SCHENBERG, A.C.G.; HAGLER, A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; EGUCHI, S.Y.; CANHOS, V.P. **Leveduras para biotecnologia: curso**. 1991. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1991. (apostila).
56. MORA, J.; BARBAS, J.I.; RAMIS, B.; MULET, A. Yeast microflora associated with some Majorcan musts and wines. **American Journal of Enology and Viticulture** 39(4):344-346, 1988.

57. MORAES, S.A.; FERREIRA, M.G.S.; FINGUERUT, J.; ROSSELL, C.E.V. Avaliação do estado fisiológico de leveduras através de coloração diferencial. **Boletim Técnico Copersucar (46):24-27, 1989.**
58. MORAIS, P.B. **Taxonomia e ecologia de leveduras associadas a grupos de espécies de *Drosophila* em ambientes florestais no município do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 1991. 138p. Tese (Mestrado em microbiologia) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
59. NAKASE, T.; OKADA, G.; SUGIYAMA, J.; ITOH, M.; SUZUKI, M. *Ballistosporomyces*, a new ballistospore-forming anamorphic yeast genus. **Journal of General and Applied Microbioloy 35:289-309, 1989.**
60. OLIVEIRA, M.C.F.L.; PAGNOCCA, F.C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira a detecção de leveduras selvagens em unidades sucro alcooleiras. In: SINAFERM, 8. 1988. **Anais, São Lourenço, 1988. p.78-81.**
61. PARISH, M.E.; CARROLL, D.E. Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. **American Journal of Enology and Viticulture 36(2):165-169, 1985.**
62. PATERSON, M.; BORBA, J.M.M.; MELO, F.A.D.; MORAES, J.I. Avaliação do desempenho da fermentação etanólica em diferentes situações do processo industrial. **Brasil Açucareiro 106(5/6):27-32, 1988.**
63. PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; MRAK, E.M. **The life of the yeasts.** Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, 1978. 341p.
64. PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soils. In: ROSE, A.H; HARRISON, J.S. **The yeasts: biology of the yeasts.** New York, Academic Press, 1987. v.1, p.123-180.
65. PHAFF, H.J. Isolation of yeasts from natural sources. In: LABEDA, D.P. ed. **Isolation of biotechnological organisms from nature.** New York, McGraw-Hill, 1990. p.53-79.
66. RODRIGUES DE MIRANDA, L. Discussion of the genera belonging to the imperfect yeasts: genus 5, *Cryptococcus*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study.** Amsterdam, Elsevier Science, 1984. p.845-872.

67. RODRIGUEZ, S.B. A system for identifying spoilage yeast in packaged wine. **American Journal of Enology and Viticulture** 38(4):273-276, 1987.
68. ROSA, C.A. **Comunidades de leveduras associadas a plantas e insetos em ecossistemas de restinga**. Rio de Janeiro, 1993. 108p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
69. ROSE, A.H. Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In: SKINNER, F.A.; PASSMORE, S.M.; DAVENPORT, R.R. ed. **Biology and activities of yeasts**. London, Academic Press, 1980. p.103-121.
70. SATO, S.; BRAZZACH, M.L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes para controle de contaminações nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP** 16(1/2):122-132, 1980a.
71. SATO, S.; BRAZZACH, M.L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melaço de cana. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP** 16(1/2):133-144, 1980b.
72. SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOZO, M.T.; VICENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica: "floculação do fermento". **Brasil Açucareiro** 93(6):336-341, 1979.
73. SILVA, N. **Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo no processo de produção de álcool**. Campinas, 1988. 118p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
74. SOUZA, L.G.; GOLDONI, J.S.; EIRA, A.F. Microrganismos em melaço armazenado. **Brasil Açucareiro** 89(4):204-206, 1977.
75. SOUZA, L.G.; GOLDONI, J.S.; COSTA, S.M.; SILVA, A.A. Bolores e leveduras em açúcar cristal superior. **Brasil Açucareiro** 101(1/3):28-30, 1983.
76. SPAAIJ, F.; WEBER, G.; SMITH, M.Th. *Myxozyma vanderwaltii* sp. nov. (Candidaceae), a new yeast species isolated from a flower of *Protea repens* (L.) L. **Antonie van Leeuwenhoek** 63:17-21, 1993.

77. SUZUKI, M.; NAKASE, T.; FUKAZAWA, Y. *Candida fragi*, a new species of anamorphic yeast isolated from fermenting strawberry. **Journal of General and Applied Microbiology** 37:423-429, 1991.
78. TAYLOR, G.T.; MARSH, A.S. MYGP + copper, a medium that detects both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeast in the presence of culture yeast. **Journal of the Institute of Brewing** 90(3):134-145, 1984.
79. THOMAS, D.S.; ACKERMAN, J.C. A selective medium for detecting yeasts capable of spoiling wine. **Journal of Applied Bacteriology** 65(4):299-308, 1988.
80. TILBURY, R.H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: CARR, J.G. ed. **Lactic acid bacteria in beverages and food**. New York, Academic Press, 1975. p.177-191.
81. TILBURY, R.H.; HOLLINGSWORTH, B.S.; GRAHAM, S.D.; POTTAGE, P. Mill sanitation: a fresh approach to biocide evaluation. **Congress Int. Soc. Sugar Cane Technol.: Proceedings** 16(3):2749-2768, 1977.
82. TILBURY, R.H. Xerotolerant (Osmophilic) yeasts. In: SKINNER, F.A.; PASSMORE, S.M.; DAVENPORT, R.R. ed. **Biology and activities of yeasts**. London, Academic Press, 1980. p.153-292.
83. TOKUOKA, K.; ISHITANI, T.; GOTO, S.; KOMAGATA, K. Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. **Journal of General and Applied Microbiology** 31(5):411-427, 1985.
84. VAN DER WALT, J.P.; JOHANNSEN, E. Discussion of the genera belonging to the ascosporegenous yeasts: genus 13, *Kluyveromyces*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam, Elsevier Science, 1984. p. 224-251.
85. VAN DER WALT, J.P.; YARROW, D. Methods for isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam, Elsevier Science, 1984. p. 45-104.
86. VAN UDEN, N. Temperature profiles of yeasts. **Advances in Microbial Physiology** 25:195-251, 1984.

87. YAMADA, Y.; BANNO, I. *Fellomyces*, a new anamorphic yeast genus for the Q<sub>10</sub>-equipped organisms whose conidium is freed by an end-break in the sterigma. **Journal of General and Applied Microbiology** 30:523-525, 1984.
88. YAMADA, Y.; ITOH, M.; KAWASAKI, H.; BANNO, I.; NAKASE, T. *Kurtzmanomyces* gen. nov., an anamorphic yeast genus for the Q<sub>10</sub>-equipped organism whose conidium is freed by an end-break in the sterigma which branches or elongates to produce additional conidia and whose cells contain xylose. **Journal of General and Applied Microbiology** 34:503-506, 1988a.
89. YAMADA, Y.; KAWASAKI, H.; ITOH, M.; BANNO, I.; NAKASE, T. *Tsuchiyaea* gen. nov., an anamorphic yeast genus for the Q<sub>9</sub>-equipped organism whose reproduction is either by enteroblastic budding or by the formation of conidia which are disjointed at a septum in the mid-region of the sterigma and whose cells contain xylose. **Journal of General and Applied Microbiology** 34:507-510, 1988b.
90. YANAGIDA, F.; ICHINOSE, F.; SHINOHARA, T.; GOTO, S. Distribution of wild yeasts in the white grape varieties at Central Japan. **Journal of General and Applied Microbiology** 38(5):501-504, 1992.
91. YARROW, D. Discussion of the genera belonging to the ascosporogenous yeasts: genus 22, *Saccharomyces*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam, Elsevier Science, 1984a. p. 379-395.
92. YARROW, D. Discussion of the genera belonging to the ascosporogenous yeasts: genus 25, *Schizosaccharomyces*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam, Elsevier Science, 1984b. p. 414-422.
93. YARROW, D. Discussion of the genera belonging to the ascosporogenous yeasts: genus 29, *Torulasporea*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam, Elsevier Science, 1984c. p. 434-439.
94. YARROW, D. Discussion of the genera belonging to the ascosporogenous yeasts: genus 33, *Zygosaccharomyces*. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. ed. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam, Elsevier Science, 1984d. p. 449-465.
95. YOKOYA, F. Microbiologia de processo: fermentação. In: EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.P.; GALLO, C.R. **Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool**. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1989. p. 154.



ANEXO 1 - Lista dos gêneros isolados das amostras coletadas nas usinas Costa Pinto e Santa Cruz e seus respectivos códigos de identificação.

Gêneros	Usina Costa Pinto		Usina Santa Cruz	
	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial
<i>Saccharomyces</i>	Mosto/WLN	1A	Leite/WLN	1B
	Mosto/WLN	2A	Leite/WLN	3B
	Vinho/WLN	10A	Leite/WLN	4B
	Leite/WLN	26A	Leite/WLD	6B
	Leite/WLN	28A	Vinho/WLN	7B
	Mosto/Lisina	37A	Vinho/WLN	8B
	Leite/WLN	51A	Mosto/WLN	10B
	Leite/WLN	52A	Mosto/WLN	12B
	Leite/WLN	54A	Mosto/WLN	14B
	Mosto/WLN	55A	Vinho/WLD	16B
	Mosto/WLN	56A	Leite/WLN	38B
	Mosto/WLN	57A	Mosto/WLD	39B
	Vinho/WLN	58A	Mosto/WLD	43B
	Vinho/WLN	59A	Vinho/Lisina	47B
	Vinho/WLN	60A	Vinho/Lisina	48B
	Vinho/WLN	61A	Mosto/WLN	59B
	Vinho/WLN	62A	Mosto/WLN	61B
	Vinho/WLD	63A	Vinho/WLN	62B
	Leite/Lisina	64A	Leite/WLN	64B
	Vinho/Lisina	65A	Leite/WLN	65B
	Mosto/Lisina	66A	Vinho/Lisina	68B
	Mosto/Lisina	67A	Leite/Lisina	69B
	Mosto/Lisina	68A	Mosto/Lisina	70B
	Mosto/Lisina	73A	Mosto/Lisina	71B
	Mosto/Lisina	74A	Mosto/Lisina	72B
	Mosto/Lisina	75A	Vinho/WLN	78B
	Mosto/Lisina	76A	Vinho/WLN	80B
	Leite/WLN	79A	Mosto/WLN	84B
	Leite/WLN	81A	Leite/WLN	90B
	Leite/WLN	82A	Leite/Lisina	98B
	Leite/WLN	83A	Leite/Lisina	100B
	Leite/WLD	84A	Mosto/Lisina	104B
	Leite/WLD	86A	Mosto/Lisina	105B
	Vinho/WLD	88A	Leite/Lin	111B
	Vinho/WLD	89A	Leite/Lin	114B
	Vinho/WLD	90A	Mosto/Lin	115B
	Vinho/WLD	91A	Leite/WLN	124B
	Leite/WLD	93A	Leite/WLN	125B
	Leite/WLD	94A	Vinho/WLN	127B
	Leite/WLD	95A	Leite/Lisina	131B
	Leite/WLD	96A	Vinho/Lisina	132B
	Leite/WLD	97A	Vinho/Lisina	133B
Vinho/WLD	115A	Vinho/WLN	138B	
Vinho/WLD	116A	Vinho/WLN	139B	
Vinho/WLD	117A	Vinho/WLN	141B	
Vinho/WLD	118A	Vinho/WLN	143B	
Leite/WLD	119A	Vinho/WLN	144B	
Leite/Lin	120A	Mosto/WLN	148B	
Leite/Lin	121A	Mosto/WLN	149B	

## ANEXO I - (Continuação)

Gêneros	Usina Costa Pinto		Usina Santa Cruz	
	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial
	Vinho/Lin	122A	Mosto/WLN	150B
	Leite/WLN	124A	Mosto/WLN	151B
	Leite/WLN	125A	Mosto/WLN	153B
	Leite/WLN	126A	Mosto/WLN	154B
	Leite/WLN	127A	Mosto/WLN	155B
	Leite/WLN	128A	Mosto/WLN	156B
	Leite/WLN	130A	Mosto/WLN	157B
	Leite/WLN	131A	Leite/WLN	158B
	Vinho/WLN	132A	Leite/WLN	159B
	Vinho/WLN	133A	Leite/WLN	160B
	Vinho/WLN	134A	Leite/WLN	161B
	Vinho/WLN	135A	Leite/WLN	162B
	Vinho/WLN	136A	Leite/WLN	163B
	Vinho/WLN	137A	Leite/WLN	164B
	Vinho/WLN	138A	Mosto/Lisina	186B
	Vinho/WLN	139A	Mosto/Lisina	187B
	Mosto/WLN	140A	Mosto/Lisina	188B
	Mosto/WLN	141A	Leite/Lisina	191B
	Mosto/WLN	142A	Leite/Lisina	193B
	Mosto/WLN	143A	Mosto/Lin	197B
	Mosto/WLN	144A	Mosto/Lin	198B
	Mosto/WLN	145A	Mosto/Lin	200B
	Vinho/WLD	148A	Mosto/Lin	203B
	Mosto/WLD	155A		
	Mosto/WLD	156A		
	Leite/WLD	164A		
	Leite/WLD	165A		
	Leite/WLD	166A		
	Leite/WLD	167A		
	Leite/WLD	168A		
	Leite/WLD	169A		
	Leite/WLD	170A		
	Leite/WLD	171A		
	Leite/WLD	172A		
	Leite/WLD	173A		
	Leite/WLD	175A		
	Leite/WLD	176A		
	Vinho/Lisina	177A		
	Mosto/Lisina	190A		
	Mosto/Lisina	191A		
	Leite/Lisina	195A		
	Mosto/Lin	204A		
	Mosto/Lin	205A		
	Mosto/Lin	206A		
	Mosto/Lin	207A		
	Leite/Lin	210A		
	Leite/Lin	211A		
	Leite/Lin	212A		
	Vinho/Lin	218A		
	Vinho/Lin	219A		

ANEXO 1 - (Continuação)

Gêneros	Usina Costa Pinto		Usina Santa Cruz	
	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial
<i>Zygosaccharomyces/ Torulaspora</i>	Vinho/WLD	9A	Mosto/WLN	9B
	Vinho/WLD	39A	Mosto/WLN	11B
	Vinho/WLD	40A	Mosto/WLN	13B
	Vinho/Lisina	44A	Vinho/WLD	15B
	Vinho/WLD	153A	Vinho/WLD	19B
	Vinho/WLD	154A	Leite/WLD	42B
			Vinho/WLD	74B
			Vinho/WLD	77B
			Mosto/WLD	82B
			Leite/WLD	85B
			Vinho/Lisina	96B
			Leite/Lisina	99B
			Mosto/WLD	128B
			Mosto/Lisina	136B
			Vinho/WLN	142B
			Mosto/WLN	146B
			Leite/WLD	170B
			Mosto/WLD	178B
			Mosto/WLD	179B
	<i>Kluyveromyces</i>			Mosto/Lisina
			Mosto/Lisina	185B
			Leite/Lisina	195B
			Leite/WLD	5B
			Mosto/WLD	17B
			Vinho/WLD	18B
			Vinho/Lisina	46B
			Vinho/WLD	75B
			Mosto/WLD	81B
			Leite/WLD	87B
			Leite/WLD	88B
			Vinho/Lisina	95B
			Vinho/Lisina	97B
			Mosto/Lisina	107B
			Mosto/WLD	130B
			Mosto/WLD	176B
			Mosto/Lisina	182B
		Vinho/Lisina	189B	
		Vinho/WLD	209B	
		Vinho/WLD	210B	
		Vinho/Lisina	211B	
		Vinho/Lisina	212B	

ANEXO 1 - (Continuação)

Gêneros	Usina Costa Pinto		Usina Santa Cruz	
	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial
<i>Pichia</i>	Mosto/Lisina	12A	Leite/Lisina	101B
	Leite/Lisina	98A		
	Vinho/Lisina	104A		
	Leite/Lisina	105A		
	Leite/WLD	174A		
	Vinho/Lisina	178A		
	Vinho/Lisina	179A		
	Vinho/Lisina	181A		
	Vinho/Lisina	183A		
	Vinho/Lisina	184A		
	Mosto/Lisina	189A		
Leite/Lisina	198A			
<i>Issatchemkia</i>	Mosto/Lisina	47A	Leite/Lisina	103B
	Vinho/Lisina	182A	Mosto/Lisina	106B
	Leite/Lisina	197A	Mosto/WLN	152B
			Vinho/Lisina	214B
<i>Schizosaccharomyces</i>	Vinho/WLD	8A	Vinho/WLD	20B
	Leite/WLD	23A	Leite/Lin	23B
	Leite/Lin	36A		
<i>Saccharomyces/ Hanseniaspora</i>	Leite/Lisina	99A	Mosto/Lisina	183B
	Vinho/Lisina	180A		
	Mosto/Lisina	192A		
	Leite/Lisina	196A		
<i>Rhodotorula</i>	Leite/WLN	50A	Mosto/Lin	54B
	Leite/WLN	123A	Mosto/Lisina	180B
<i>Trichosporon</i>	Mosto/WLD	5A		
	Leite/Lin	31A		
	Leite/Lin	32A		
<i>Cryptococcus</i>	Mosto/WLD	3A		
	Mosto/Lin	30A		
	Mosto/WLN	48A		

ANEXO 2 - Lista das espécies de *Candida* isoladas nas usinas Costa Pinto e Santa Cruz e seus respectivos códigos de identificação (código inicial e código da CCT).

Especie	Usina Costa Pinto			Usina Santa Cruz		
	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial	Código CCT	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial	Código CCT
<i>C. stellata</i>	Mosto/Lin	7A	3008	Leite/WLN	2B	3552
	Vinho/WLN	11A	3011	Leite/Lin	21B	3553
	Leite/WLN	25A	3064	Vinho/Lin	25B	3556
	Leite/WLN	27A	3075	Mosto/Lin	26B	3557
	Leite/WLN	29A	3077	Mosto/Lin	27B	3558
	Leite/Lin	35A	3458	Leite/Lin	37B	3568
	Vinho/Lin	42A	3096	Mosto/Lin	49B	3573
	Leite/WLN	53A	3461	Mosto/Lin	52B	3576
	Mosto/Lin	69A	3462	Mosto/Lin	53B	3789
	Mosto/Lin	70A	3463	Vinho/Lin	55B	3577
	Mosto/Lin	71A	3464	Vinho/Lin	56B	3578
	Mosto/Lin	72A	3465	Leite/Lin	57B	3579
	Leite/WLN	80A	3468	Vinho/WLN	63B	3582
	Vinho/Lin	107A	3531	Vinho/WLN	79B	3586
	Leite/Lin	109A	3533	Leite/WLN	91B	3588
	Leite/Lin	112A	3536	Leite/WLN	92B	3793
	Vinho/Lin	113A	3537	Mosto/Lin	93B	3589
	Vinho/Lin	114A	3538	Leite/Lin	108B	3592
	Leite/WLN	129A	3539	Leite/Lin	109B	3593
	Mosto/Lin	203A	3717	Leite/Lin	110B	3594
	Vinho/Lin	215A	3784	Leite/Lin	112B	3595
	Vinho/Lin	216A	3785	Leite/Lin	113B	3596
				Mosto/Lin	116B	3597
				Mosto/Lin	117B	3598
				Vinho/Lin	118B	3615
				Mosto/Lin	119B	3616
				Vinho/Lin	120B	3617
				Vinho/Lin	121B	3618
				Vinho/Lin	122B	3619
			Vinho/Lin	123B	3620	
			Leite/WLN	126B	3621	
			Mosto/Lin	134B	3794	
			Vinho/WLN	137B	3623	
			Vinho/WLN	140B	3624	
			Vinho/WLN	145B	3625	
			Mosto/Lin	199B	3643	
			Mosto/Lin	201B	3644	
			Mosto/Lin	202B	3645	
			Leite/Lin	205B	3647	
			Leite/Lin	206B	3648	
			Vinho/Lin	215B	3651	
			Vinho/Lin	216B	3797	
			Vinho/Lin	217B	3652	
			Vinho/Lin	218B	3653	

ANEXO 2 - (Continuação)

Espécies	Usina Costa Pinto			Usina Santa Cruz		
	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial	Código CCT	Amostra/ Meio de cultura	Código Inicial	Código CCT
<i>C. tropicalis</i>	Mosto/Lisina	13A	3013	Mosto/Lisina	28B	3559
	Mosto/Lisina	14A	3014	Mosto/Lisina	29B	3560
	Mosto/Lisina	15A	3015	Leite/Lisina	31B	3562
	Leite/Lisina	18A	3053	Leite/Lisina	32B	3563
	Leite/Lisina	20A	3055	Leite/Lisina	34B	3565
	Leite/WLD	21A	3057	Vinho/Lisina	35B	3566
	Vinho/Lisina	43A	3097	Leite/WLD	41B	3570
	Vinho/Lisina	45A	3099	Mosto/WLD	44B	3571
	Leite/Lisina	49A	3460	Leite/Lisina	51B	3575
	Vinho/WLD	87A	3470	Mosto/WLD	67B	3584
	Leite/WLD	92A	3471	Mosto/WLN	83B	3791
	Leite/Lisina	101A	3527	Leite/WLD	89B	3587
	Vinho/Lisina	106A	3530	Mosto/WLN	147B	3626
	Mosto/WLN	146A	3540	Leite/WLD	173B	3634
	Vinho/WLD	147A	3541	Leite/WLD	174B	3635
	Vinho/WLD	149A	3542	Mosto/WLD	175B	3636
	Vinho/WLD	150A	3543	Mosto/WLD	177B	3637
	Mosto/WLD	158A	3547	Mosto/Lisina	184B	3638
	Mosto/WLD	159A	3548	Leite/Lisina	194B	3641
	Mosto/WLD	160A	3549			
	Mosto/WLD	162A	3551			
	Mosto/WLD	163A	3727			
	Vinho/Lisina	186A	3725			
Mosto/Lisina	187A	3724				
Mosto/Lisina	188A	3723				
Mosto/Lisina	193A	3781				
<i>C. rugosa</i>	Vinho/Lisina	100A	3526	Vinho/WLD	166B	3628
	Leite/Lisina	103A	3529	Vinho/WLD	167B	3629
	Leite/Lin	108A	3532	Leite/WLD	168B	3630
	Leite/Lin	110A	3534	Leite/WLD	171B	3632
	Leite/Lin	111A	3535	Leite/WLD	172B	3633
	Leite/Lisina	194A	3722	Leite/Lisina	196B	3642
	Leite/Lisina	201A	3719	Leite/Lin	204B	3646
	Leite/Lin	208A	3716	Leite/Lin	207B	3649
	Leite/Lin	209A	3782	Leite/Lin	208B	3796
	Leite/Lin	213A	3783			
	Leite/Lin	214A	3715			
<i>C. krusei</i>	Leite/Lisina	16A	3016	Leite/Lin	22B	3554
	Leite/Lisina	17A	3052	Vinho/Lin	24B	3555
	Leite/Lisina	19A	3054	Vinho/Lisina	36B	3567
	Leite/Lin	33A	3082	Mosto/Lin	45B	3572
	Vinho/Lin	41A	3095	Leite/Lisina	50B	3574
	Vinho/Lisina	46A	3100	Vinho/Lin	58B	3580
	Leite/Lisina	199A	3721	Mosto/Lisina	94B	3590
	Leite/Lisina	200A	3720	Mosto/Lisina	135B	3795
	Vinho/Lin	221A	3788	Leite/Lisina	192B	3640
			Vinho/Lisina	213B	3650	

ANEXO 2 - (Continuação)

Espécies	Usina Costa Pinto			Usina Santa Cruz		
	Amostra/ Meio de cultura	Código Incial	Código CCT	Amostra/ Meio de cultura	Código Incial	Código CCT
<i>C. colliculosa</i>	Leite/WLD	22A	3059	Mosto/Lisina	30B	3561
	Leite/Lisina	38A	3459	Leite/Lisina	33B	3564
	Leite/Lisina	102A	3528	Leite/WLD	40B	3569
				Mosto/WLD	60B	3581
				Mosto/WLD	66B	3583
				Vinho/WLD	73B	3585
<i>C. guilliermondii</i> var. <i>membranefaciens</i>	Vinho/WLD	151A	3544			
	Vinho/WLD	152A	3545			
	Mosto/WLD	157A	3546			
	Mosto/WLD	161A	3550			
	Vinho/Lisina	185A	3726			
<i>C. kefyri</i>				Vinho/WLD	76B	3790
				Leite/WLD	86B	3792
				Leite/Lisina	102B	3591
				Leite/WLD	169B	3631
<i>C. milleri</i> / <i>C. holmii</i>	Mosto/WLN	77A	3466			
	Mosto/WLN	78A	3467			
	Vinho/Lin	217A	3786			
<i>C. guilliermondii</i>	Mosto/WLD	4A	3005			
	Leite/WLD	24A	3063			
<i>C. lusitaniae</i>	Mosto/Lin	6A	3048			
	Leite/Lin	34A	3457			
<i>C. magnoliae</i>	Leite/Lisina	202A	3718			
	Vinho/Lin	220A	3787			
<i>C. utilis</i>	Leite/WLD	85A	3469			
<i>C. dattila</i>				Leite/Lisina	190B	3639
<i>C. lipolytica</i>				Mosto/WLD	129B	3622
<i>C. parapsilosis</i>				Vinho/WLD	165B	3627

Legenda - ANEXO 1 e 2

A: Código para leveduras isoladas da Usina Costa Pinto

B: Código para leveduras isoladas da Usina Santa Cruz