



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

LABORATÓRIO DE SISTEMÁTICA E FISIOLOGIA MICROBIANA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS NATIVAS DOS BIOMAS
BRASILEIROS COM HABILIDADE EM FERMENTAR A ETANOL AÇÚCARES
NÃO CONVENCIONAIS**

Raquel Andrade de Rossi

Mestranda

Prof^a Dr^a Lúcia Regina Durrant

Orientadora

Dissertação de mestrado apresentada
à comissão de pós-graduação da
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
Título de Mestre em Ciência de
Alimentos.

Campinas - SP

Setembro de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R735i Rossi, Raquel Andrade de
Isolamento e seleção de leveduras nativas dos biomas brasileiros
com habilidade em fermentar à etanol açúcares não convencionais /
Raquel Andrade de Rossi. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Lúcia Regina Durrant
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Leveduras. 2. Etanol. 3. Bagaço. 4. Xilose. 5. Arabinose.
I. Durrant, Lúcia Regina. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Selection of native yeasts isolated from brazilian biomes capable of fermenting
non-convencional sugars to ethanol

Palavras-chave em inglês (Keywords): Yeasts, Ethanol, Xylose, Arabinose

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lúcia Regina Durrant

Ísis Serrano Silva

Maria da Graça Stupiello Andrietta

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Lúcia Regina Durrant

FEA/UNICAMP

(Orientadora)

Dr.^a Maria da Graça Stupiello Andrietta

CPQBA/UNICAMP

(Membro)

Dr.^a Ísis Serrano Silva

FEA/UNICAMP

(Membro)

Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes

ITAL - TECNOLAT

(Membro)

Dr.^a Derlene Attili de Angelis

Instituto de Biociências – UNESP/Rio Claro

(Membro)

“Todo o nosso conhecimento se inicia com sentimentos”.

- Leonardo da Vinci

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos ergem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe”.

- Leonardo da Vinci

“A vida não é um corredor reto e tranqüilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelos quais devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída.

Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós”.

- A. J. Cronin

Aos meus pais, Glais e Rose

A minha irmã, Barbara

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e a oportunidade desta realização profissional;

Aos meus queridos pais, Rose e Glais, fundamentais nesta minha conquista. Agradeço pela educação proporcionada, amor incondicional, respeito às minhas escolhas, apoio e incentivo nos momentos difíceis;

A minha querida irmã, Barbara, pelo amor fraterno que me faz tão bem;

Ao querido Klauss Franz, pelo apoio em todas as coletas, boa vontade em ajudar, paciência, carinho demonstrado e especialmente pelos momentos felizes compartilhados;

As minhas queridas tias, Marli, Marta e Daniela, pela torcida positiva;

Ao Paulo Vagner, pela amizade verdadeira que tanto prezo;

A Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas/CPQBA - UNICAMP, pela oportunidade oferecida ao desenvolvimento deste trabalho;

A agência de fomento FAPESP pelo financiamento do trabalho e pela bolsa de mestrado;

A Dr^a Maria da Graça Stupiello Andrietta, pela orientação deste trabalho;

A Prof^a Dr^a Lúcia Regina Durrant, por ter me aceitado como sua orientada;

Aos componentes da banca de avaliação deste trabalho, Dr^a Ísis Serrano Silva, Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes e Dr^a Derlene Attili de Angelis pelas sugestões e correções pertinentes ao aprimoramento deste trabalho;

Aos colegas do laboratório de Bioprocessos (CPQBA): Dr^a. Cláudia Steckelberg, Milene Cristina, Patrícia Kitaka e Guilherme Canosa, pelo companheirismo;

A Milene Cristina pelo auxílio no laboratório;

Aos amigos Karen Signori Pereira e Homero Ferracini Gumerato, pela amizade;

Ao funcionário da FEA, Sr. Geraldo, pela disposição em ajudar;

Obrigada a todos os colegas das disciplinas, pela boa convivência e experiências compartilhadas.

SUMÁRIO	Pág.
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Etanol no Brasil: Panorama Atual.....	3
2.2. Produção de etanol a partir do bagaço da cana-de-açúcar.....	4
2.3. Biomassa lignocelulósica.....	5
2.4. Composição do bagaço da cana-de-açúcar.....	8
2.5. Fermentação de hexose e pentose a etanol.....	9
2.5.1. Fermentação da glicose.....	9
2.5.2. Fermentação da xilose e arabinose.....	10
2.6. Leveduras fermentadoras de pentoses: ocorrência na natureza.....	13
2.7. Leveduras em biomas brasileiros.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Amostras coletadas.....	20
4.2. Meios de cultura.....	21
4.2.1. Meio YM (Yeast - Malt) e YMA (Yeast - Malt - Agar).....	21

4.2.2. Meio WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar).....	22
4.2.3. Meio CAC (CHROMágar Candida).....	23
4.2.4. Meio PDA (Potato - Dextrose - Agar).....	23
4.2.5. Meio YPD (Yeast - Peptone - Dextrose).....	24
4.2.6. Meio Basal para testes de assimilação e fermentação.....	24
4.3. Isolamento das leveduras.....	25
4.3.1. Purificação das colônias de leveduras.....	26
4.4. Conservação das leveduras.....	27
4.5. Habilidade em assimilar e fermentar fontes de carbono.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Isolamento das Leveduras.....	30
5.1.1. Coleta 1 - Cerrado.....	30
5.1.2. Coleta 2 – Mata Atlântica – Parque Estadual da Serra do Mar.....	39
5.1.3. Coleta 3 – Mata Atlântica – Parque Estadual Carlos Botelho.....	53
5.2. Habilidade em assimilar e fermentar fontes de carbono (coletas: 1, 2 e 3).....	64
6. CONCLUSÕES.....	75
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
8. ANEXO.....	85

ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

1.	Contagem das colônias de leveduras obtidas das amostras de material vegetal coletadas no Cerrado (coleta 1), em fevereiro/2008.....	32
2.	Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 1 (Cerrado), quando semeadas em meio de cultura YMA.....	37
3.	Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 1 (Cerrado), quando semeadas em meio de cultura WLN.....	38
4.	Contagem das colônias de leveduras obtidas das amostras de material vegetal coletadas na Mata Atlântica - Parque Estadual da Serra do Mar (coleta 2), em agosto/2008.....	41
5.	Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 2, quando semeadas em meio WLN.....	47
6.	Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 2, quando semeadas em meio CAC.....	49
7.	Espécies de leveduras isoladas das amostras da coleta 2, de acordo com a cor apresentada pelas colônias em meio CAC, segundo Gaschet et al. (2008) e Tornai-Lehoczki et al. (2003).....	52
8.	Contagem das colônias de leveduras obtidas das amostras de material vegetal coletadas na Mata Atlântica - Parque Estadual Carlos Botelho (coleta 3), em outubro/2008.....	54
9.	Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 3, quando semeadas em meio WLN.....	60

10.	Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 3, quando semeadas em meio CAC.....	61
11.	Espécies de leveduras isoladas das amostras da coleta 3, de acordo com a cor apresentada pelas colônias em meio CAC, segundo Gaschet et al. (2008) e Tornai-Lehoczhi et al. (2003).....	63
12.	Características bioquímicas dos isolados obtidos na coleta 1 (Cerrado), quanto à assimilação e fermentação de açúcares.....	66
13.	Características bioquímicas dos isolados obtidos na coleta 2 (Mata Atlântica - Parque Estadual da Serra do Mar), quanto a assimilação e fermentação de açúcares.....	68
14.	Características bioquímicas dos isolados obtidos na coleta 3 (Parque Estadual Carlos Botelho), quanto à assimilação e fermentação de açúcares.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
1. Estrutura química da celulose.....	6
2. Estrutura química da hemicelulose.....	7
3. Precursores primários da lignina.....	8
4. Esquema do metabolismo de D-xilose e L-arabinose em bactérias e fungos..	12
5. Esquema das etapas realizadas para o desenvolvimento do trabalho.....	19
6. Quantidade das cepas isoladas, da coleta 1 (Cerrado), capazes de assimilar e fermentar açúcares.....	65
7. Quantidade das cepas isoladas, da coleta 2 (Mata Atlântica - Parque Estadual da Serra do Mar), capazes de assimilar e fermentar açúcares.....	67
8. Quantidade das cepas isoladas, da coleta 3 (Mata Atlântica - Parque Estadual “Carlos Botelho”) capazes de assimilar e fermentar açúcares.....	71

RESUMO

O bagaço da cana-de-açúcar é considerado uma biomassa lignocelulósica promissora para a produção de etanol, devido a sua composição em açúcares, grande disponibilidade e baixo custo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, embora apresente atributos ideais para o uso industrial, não é capaz de fermentar alguns açúcares presentes nesta biomassa, como xilose e arabinose (açúcares não convencionais). Assim, é interessante a busca por leveduras em nichos ecológicos onde esses açúcares estão presentes. O Brasil apresenta uma rica biodiversidade, qualificada pela diversidade em: ecossistemas, espécies biológicas e endemismos. Utilizar ecossistemas característicos do território brasileiro como fonte de coleta oferece a oportunidade não só de obter novas espécies, mas também de isolar aquelas capazes de fermentar diferentes substratos. De acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi de isolar, a partir de amostras de biomas brasileiros, leveduras que apresentassem a habilidade em fermentar alguns açúcares, além da glicose e frutose, especialmente os que compõem o hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar (açúcares não convencionais). Os resultados demonstraram que as linhagens isoladas não apresentaram habilidade em fermentar as principais pentoses (xilose e arabinose) presentes no bagaço da cana-de-açúcar. Contudo, 19 foram capazes de assimilar a xilose, e 12 linhagens, a arabinose. Desta forma, como sugestão, o hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar pode ser utilizado para a produção de biomassa protéica (*single cell protein*) pelas linhagens que assimilaram xilose e arabinose.

Palavras-chave – leveduras, etanol, bagaço, xilose e arabinose.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is considered a promising lignocellulosic biomass for ethanol production, due to its sugar composition, high availability and low price. Although, *Saccharomyces cerevisiae* has the ideal attributes for industrial use, it is not able to ferment some sugars present in this biomass such as xylose and arabinose (non-conventional sugars). Thus, it is interesting to search for yeasts in ecological niches where these sugars are present. Brazil has a rich biodiversity, qualified for its diversity in: ecosystems, biological species and endemisms. To use the ecosystems characteristics of the Brazilian territory as a source for sample collection offers the opportunity not only to obtain new species, but also to isolate those capable of fermenting diverse substrates. Therefore, the aim of this study was to isolate from samples of Brazilian biomes, yeasts that have the ability to ferment some sugars, besides glucose and fructose, especially those components of the sugarcane bagasse hydrolyzate (non-conventional sugars). The results demonstrated that the isolated strains had no ability to ferment the main pentoses (xylose and arabinose) present in sugarcane bagasse. However, 19 strains were able to assimilate xylose, and 12 strains, arabinose. Thus, as suggestion, the sugarcane bagasse hydrolyzate can be used for the production of single cell protein by the strains that assimilate xylose and arabinose.

Keywords: yeasts, ethanol, bagasse, xylose and arabinose.

1. INTRODUÇÃO

O aumento crescente dos preços dos combustíveis fósseis e a preocupação mundial com o acúmulo de gases causadores do efeito estufa motiva as buscas por fontes alternativas de energia.

A conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis é atualmente avaliada como uma importante forma de utilização de energia renovável e redução da emissão de gases poluentes. Dentre os materiais lignocelulósicos encontra-se o bagaço da cana-de-açúcar, considerado como uma biomassa promissora para a produção de etanol, devido à sua constituição em açúcares (pentoses e hexoses), grande disponibilidade e baixo custo (PEREIRA JR. et al., 2008)

No Brasil este resíduo agro-industrial é queimado para a geração de energia nas usinas, o qual é capaz de atender toda a demanda energética para a produção e ainda apresentar um excedente de energia elétrica.

O bagaço da cana-de-açúcar é composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Os principais açúcares que constituem esses polímeros são a glicose, galactose, xilose e arabinose. Converter material lignocelulósico em etanol envolve quebrar as longas cadeias de celulose e hemicelulose em monossacarídeos e assim, os fermentar a etanol (SHREEVE, 2006).

Capacidade de fermentar rapidamente glicose e frutose a partir da sacarose a etanol, apresentar alta tolerância ao produto formado e às grandes variações de temperatura, são alguns dos atributos apresentados pela espécie *Saccharomyces cerevisiae*, os quais são desejáveis para uma cepa de uso industrial (ANDRIETTA et al., 2007). Embora, esta espécie tenha as características que a coloca como ideal para o uso industrial, não é capaz

de fermentar açúcares como a xilose e arabinose (açúcares não convencionais), entre outros. Como esses açúcares compõem o substrato de interesse, faz-se necessária a busca por leveduras capazes de fermentá-los.

As leveduras apresentam grande diversidade morfológica e bioquímica, com habilidade em assimilar diversos compostos orgânicos presentes em diferentes nichos ecológicos, o que possibilita a sua dispersão e ocupação em ambientes onde há esses compostos (PHAFF & STARMER, 1987 apud RUIVO, 2005).

Inserido nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo beneficiar-se da biodiversidade dos ecossistemas brasileiros para encontrar linhagens de leveduras capazes de fermentar a etanol outros açúcares além da glicose e frutose (açúcares convencionais), com ênfase xilose e arabinose, os quais são componentes do bagaço da cana-de-açúcar. A obtenção dessas linhagens é um dos maiores desafios no domínio da tecnologia da fermentação de resíduos de biomassa vegetal, uma vez que são poucos os microrganismos descritos até o momento que fermentam esses dois açúcares não convencionais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Etanol no Brasil: Panorama Atual

O Brasil encontra-se como o líder mundial em tecnologia de açúcar e álcool a partir da cana-de-açúcar, sendo que o Proálcool (Programa Nacional do Álcool/1975-1986) foi o grande responsável pela capacitação tecnológica da indústria e dos centros de pesquisas na produção de etanol, levando a inserção deste biocombustível na matriz energética brasileira (ANDRIETTA et al., 2007). A evolução da produtividade do bioetanol, devido à novas formas de plantio, variedades de cana-de-açúcar e otimização das unidades de fermentação, fica evidente considerando que em 1974 a produção era de 60,6 L (álcool/ton de cana) e atualmente está em torno de 81,6 L (GOLDEMBERG, 1996; MOREIRA & GOLDEMBERG, 1999; CONAB, 2008).

Hoje, no Brasil, a gasolina apresenta uma concentração de álcool entre 20% a 25% (v/v) (WALTER et al., 2008) e aproximadamente 89,1% dos automóveis produzidos são bicomcombustíveis (*flex-fuel*) (LORA & ANDRADE, 2007).

Brasil e Estados Unidos dominam a produção e consumo de etanol, o que representa mais de 80% do mercado mundial. Por décadas, a produção de etanol brasileiro foi a maior do mundo, entretanto em 2006 os Estados Unidos a superou devido a investimentos governamentais pela criação em 2005 da *Renewable Fuels Standard*, que tem como objetivo o uso de 28,4 bilhões de litros de combustíveis renováveis, na sua grande maioria o etanol, no setor de transportes até 2012 (WALTER et al, 2008).

A cana-de-açúcar é considerada a biomassa mais eficiente para a produção do etanol. O balanço energético (a razão entre a energia obtida a partir do biocombustível e a quantidade de energia fóssil necessária para a sua produção) a partir da cana-de-açúcar

(8.3-10) é bem mais favorável do que o do milho nos Estados Unidos (1.34) (SHAPOURI et al., 1995 apud WALTER et al, 2008; MACEDO et al., 2004 apud WALTER et al, 2008).

O interesse no aumento da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar como substituto ou aditivo da gasolina, incentiva as pesquisas e o desenvolvimento de tecnologias de produção mais eficientes, incluindo aquelas que utilizam materiais lignocelulósicos como matéria-prima.

Atualmente um dos grandes desafios da indústria da fermentação alcoólica envolve a utilização e comercialização dos subprodutos e resíduos da produção, especialmente o bagaço da cana-de-açúcar.

2.2. Produção de etanol a partir do bagaço da cana-de-açúcar

No Brasil as usinas de álcool/açúcar processaram na safra de 2008/2009 aproximadamente 572 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que gerou em média cerca de 157 milhões de bagaço (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2008; CONAB, 2008). Este resíduo agro-industrial é queimado para a geração de energia nas usinas, o qual é capaz de atender toda a demanda energética da produção e ainda apresentar um excedente de 5-10% de bagaço e 0-10 kW htc⁻¹ de eletricidade (MACEDO et al., 2008).

O bagaço da cana é considerado uma fonte promissora para a produção de etanol, devido à sua constituição em açúcares (pentoses e hexoses), disponibilidade na unidade industrial, já que é um subproduto do processo, além da possibilidade de compartilhar operações do processo de produção convencional deste biocombustível, tais como a fermentação e destilação, o que evita um aumento nos custos com equipamentos (DIAS, 2008)

A produção de etanol a partir de material lignocelulósico inclui: um pré-tratamento e deslignificação para a liberação de celulose e hemicelulose do complexo com a lignina; hidrólise dos polímeros de carboidratos para a liberação de monossacarídeos (sacarificação); e fermentação desses açúcares (LIN & TAKANA, 2006).

2.3. Biomassa lignocelulósica

Os compostos lignocelulósicos estão presentes na estrutura da parede celular das plantas, constituídos basicamente por polissacarídeos, a celulose (40-60%) e a hemicelulose (20-40%), os quais estão associados com a lignina (15-25%), uma estrutura macromolecular que apresenta substâncias aromáticas. São considerados os recursos naturais renováveis mais abundantes presentes na biosfera, representando aproximadamente 50% da biomassa terrestre (SUN & CHENG, 2002).

A celulose, o principal composto da lignocelulose, é um polímero linear constituído por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ (Figura 1), que são formadas a partir da eliminação de uma molécula de água das hidroxilas dos carbonos 1 e 4 de duas unidades de glicose. As unidades repetitivas da celulose formam a celobiose. As cadeias de D-glicose formadas constituem complexos de fibras, que podem apresentar regiões amorfas ou cristalinas. Estas fibras estão unidas por ligações de hidrogênio intra e intermolecular, que individualmente são fracas, porém no total resultam em uma forte união, o que confere à celulose uma estrutura resistente a hidrólises (PEREIRA JR. et al., 2008).

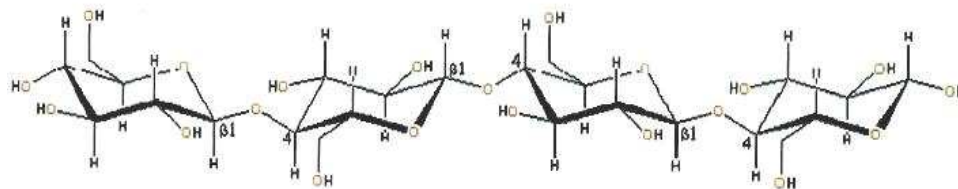


Figura 1. Estrutura química da celulose.

Fonte: COUGHLAN (1985) apud PEREIRA JR. et al. (2008)

O segundo principal constituinte da lignocelulose, a hemicelulose, é um heteropolímero altamente ramificado (Figura 2) constituído por polissacarídeos de baixo peso molecular, como: xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas. As unidades que formam estes polissacarídeos são basicamente: moléculas de hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), pentoses (D-xilose e L-arabinose), ácidos urônicos (D-glucurônico, D-galacturônico e α -D-4-O-metilglucurônico) e alguns produtos de oxidação, como acetatos. Diferentemente da celulose, a hemicelulose não apresenta regiões cristalinas, desta forma é mais susceptível a hidrólises químicas sob condições amenas (PEREIRA JR. et al., 2008).

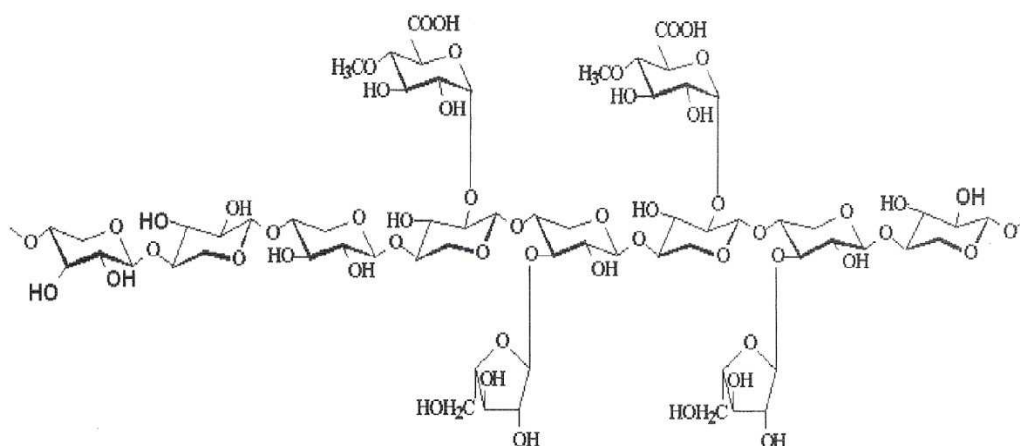


Figura 2. Estrutura química da hemicelulose

Fonte: SUNNA & ANTRANIKIAN (1997) apud PEREIRA JR. et al. (2008).

A lignina é um composto polifenólico constituído pela polimerização de três principais precursores: álcool trans-*p*-coumaril (I), álcool trans-coniferil (II) e álcool trans-sinapil (III) (Figura 3). Esta estrutura é responsável pela resistência mecânica da parede celular de plantas, já que apresenta a característica de ser um material ligante, o qual envolve as fibras celulósicas, mantendo-as unidas. A lignina não contribui como fonte de carbono para fermentação, no entanto pode ser utilizada como matéria prima para a produção de produtos químicos, tais como: dispersantes, copolímeros, emulsificantes, aditivos em misturas de concreto, antioxidantes ou substratos para a produção de insumos químicos (PEREIRA JR. et al., 2008; ZALDIVAR et al., 2001).

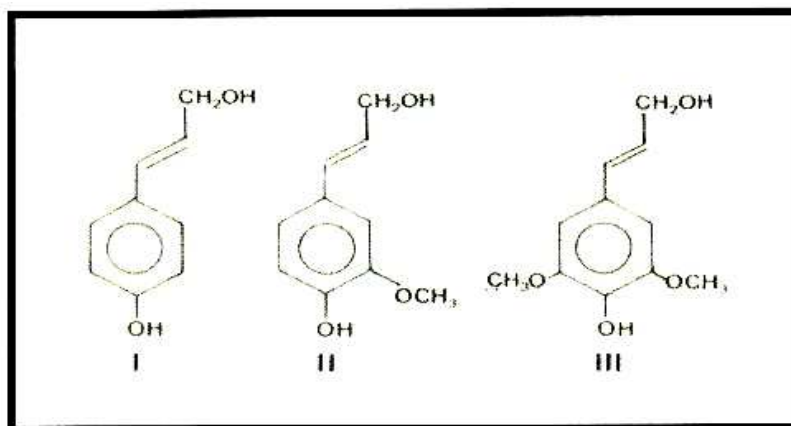


Figura 3. Precursores primários da lignina.
Fonte: PEREIRA JR. et al. (2008)

Além dos três principais componentes, a biomassa lignocelulósica apresenta em menores proporções outras substâncias como: resinas, taninos, ácidos graxos, compostos nitrogenados e minerais, especialmente, cálcio, potássio e magnésio. A composição química dos materiais lignocelulósicos varia de acordo com o tipo de tecido e espécie da planta (FENGEL & WEGENER, 1989 apud PEREIRA JR. et al., 2008; d'ALMEIDA, 1988 apud PEREIRA JR. et al., 2008; WAYMAN & PAREKH, 1990).

2.4. Composição do bagaço da cana-de-açúcar

O bagaço da cana é constituído principalmente por 40% de celulose, 24% de hemicelulose e 25% de lignina (SAHA, 2003). Quanto à sua composição em seus principais açúcares apresenta 39% de D-glicose, 0,4% de D-manose, 0,5% de D-galactose, 22,1% de D-xilose, 2,1% de L-arabinose e 2,2% de ácidos urônicos (GROHMANN & BOTHAST, 1994 apud van MARIS et al., 2006, LEE, 1997).

2.5. Fermentação de hexose e pentose a etanol

2.5.1. Fermentação da glicose

A tecnologia da fermentação alcoólica está estabelecida comercialmente pela utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual apresenta atributos desejáveis para um microrganismo de uso industrial. Esta espécie tem a capacidade de fermentar rapidamente glicose e frutose a etanol, apresentando alta tolerância aos produtos formados, às grandes variações de temperatura e atividade em meio ácido (ANDRIETTA et al., 2007). No entanto, esta levedura não é capaz de metabolizar D-xilose e L-arabinose, as pentoses constituintes do hidrolisado da fração hemicelulósica do bagaço da cana de açúcar.

A fermentação alcoólica consiste em uma série de reações químicas sob condições de anaerobiose, na qual a partir da glicose há formação de etanol e CO₂. A reação estequiométrica geral desta fermentação é a seguinte:



De acordo com Pereira Jr. et al. (2008), o termo “fermentação da glicose” refere-se à fermentação de açúcares provenientes da hidrólise da glicose, via glicólise ou Embden-Meyerhof-Parnas, a piruvato e a sua conversão a etanol. As principais reações que a compreendem podem ser divididas em três fases:

- *Fase de ativação*, refere-se a conversão de glicose a frutose 1,6-bifosfato, na qual há adição de grupos de fosfato ao açúcar pelo uso de duas moléculas de ATP, o que ativa ou desestabiliza o açúcar pela adição de energia;
- *Fase de geração*, a conversão de frutose 1,6-bifosfato a piruvato que inclui duas reações que geram ATP a partir de ADP;

- *Fase de regeneração de NAD*. Na fermentação da glicose, nas etapas iniciais, há redução de duas moléculas de NAD a NADH, as quais devem ser regeneradas para que as reações seguintes possam ocorrer. Nesta fase de regeneração há a transformação de piruvato a etanol, o que possibilita a conversão de NADH a NAD.

Na fermentação de uma molécula de glicose duas reações geram ATP a partir de ADP. Cada uma dessas reações ocorre duas vezes, devido a divisão da glicose em duas moléculas de três unidades de carbono. Desta forma, quatro ATPs são formados, no entanto, duas dessas moléculas são utilizadas para repor outras duas que possibilitaram a inicialização do processo. No final, a produção energética da fermentação alcoólica é de duas moléculas de ATP por molécula de glicose, considerada pouco eficiente, porém vantajosa por não depender de condições adequadas de suprimento de O₂ (PEREIRA JR. et al., 2008).

A produção de etanol na fermentação alcoólica é de 0,511 g de etanol/ g de glicose. Parte dos açúcares presentes no meio é consumida em reações paralelas, sendo algumas necessárias para a síntese de etanol. Nestas reações há formação de: subprodutos, principalmente glicerol, alcoóis e ácidos orgânicos, como o succínico e o acético, além de biomassa microbiana (leveduras) (DIAS, 2008).

2.5.2. Fermentação da xilose e arabinose

Microrganismos fermentadores de xilose e arabinose utilizam as seguintes vias metabólicas: pentoses-fosfato e Embden-Meyerhof-Parnas (via glicolítica).

O piruvato formado, a partir da pentose via xilulose, é convertido a diferentes produtos, tais como: etanol, ácidos orgânicos, cetonas e compostos voláteis. A formação

desses compostos pode ser controlada através do microrganismo utilizado e da regulação de carbono pelas vias metabólicas disponíveis (PEREIRA JR. et al., 2008).

Nas bactérias a conversão de D-xilose a etanol procede principalmente através da sua isomerização direta a xilulose, catalisada pela xilose isomerase. Já na maior parte das leveduras e fungos a formação de xilulose ocorre em duas reações, nas quais xilose é reduzida a xilitol, pela xilose redutase (XR), dependente do cofator NADPH e/ou NADH e a subsequente oxidação de xilitol a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), a qual requer NAD^+ (Figura 4).

A diferença de afinidade pelos cofatores entre a XR e a XDH leva à formação de xilitol sob condições de anaerobiose. Desta forma, xilitol é um subproduto da fermentação alcoólica o que reduz a produção final de etanol. A vantagem da XR de utilizar NADH está relacionada ao fato de que há um equilíbrio dos cofatores quando este é utilizado e assim, não há formação de xilitol (AGBOGBO & COWARD-KELLY, 2008).

A habilidade de *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus* de usar NADH como cofator da XR possibilita uma menor produção de xilitol na conversão da xilose, quando comparadas com outras leveduras fermentadoras de xilose sob condições de anaerobiose (VEDUYN et al., 1985 apud AGBOGBO & COWARD-KELLY, 2008).

A D-xilulose formada é incorporada a via pentoses-fosfato pela D-xilulose-5-fosfato, originando gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato. Ambos são convertidos a piruvato pela via glicolítica, o qual através de duas reações sequenciais: a descarboxilação e a redução dá origem ao etanol (PEREIRA JR. et al., 2008).

No caso da L-arabinose, em bactérias, este açúcar é isomerizado a L-ribulose e então, fosforilado a D-xilulose-5-fosfato, a partir do qual pela via pentoses-fosfato e via glicolítica produz etanol. Já em fungos, L-arabinose é reduzida a L-arabitol, o qual sofre

oxidações e reduções até a sua conversão em xilitol. O xilitol é oxidado a D-xilulose e após, fosforilado a D-xilulose-5-fosfato que conecta a vias pentoses-fosfato e via glicolítica (Figura 4).

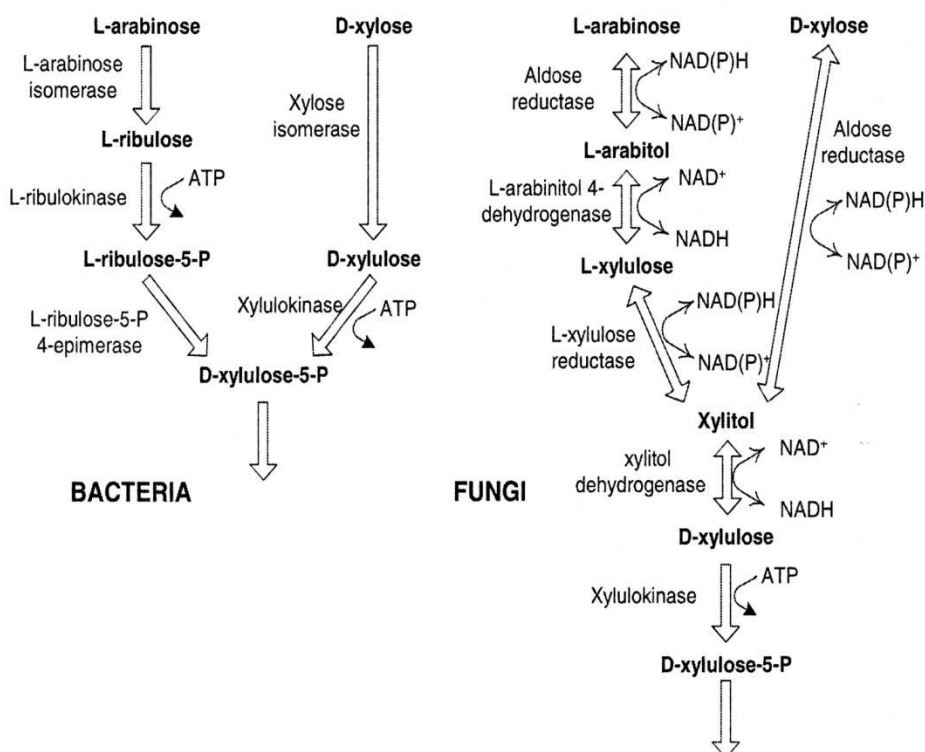


Figura 4. Esquema do metabolismo de D-xilose e L-arabinose em bactérias e fungos
Fonte: HAHN-HÄGERDAL et al. (2007)

A busca por microrganismos fermentadores de pentoses (C₅) teve início na década de 80 (SHNEIDER et al., 1981; SLININGER et al., 1982). Estes microrganismos podem ser divididos de acordo com a forma de obtê-los, formando dois subgrupos: os que ocorrem na natureza e aqueles geneticamente modificados. Dentre os microrganismos fermentadores de C₅, amplamente estudados, presentes em ecossistemas naturais estão as seguintes

leveduras: *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*. Já dentre os que foram geneticamente modificados estão: *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* e *Zymomonas mobilis* (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; AGBOGBO & COWARD-KELLY, 2008).

Atualmente vários estudos consideram viável para o desenvolvimento da fermentação de hexoses e pentoses, a modificação genética de *Saccharomyces sp.*, por estas leveduras apresentarem robustez às condições do processo de fermentação e acessibilidade genética (KUYPER et al., 2005; van MARIS et al., 2006; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

Trabalhos recentes isolaram de ecossistemas naturais novas linhagens de leveduras capazes de fermentar pentoses (NGUYEN et al., 2006; RAO et al., 2008). Neste contexto, a busca por leveduras que tenham a habilidade de fermentar os açúcares não convencionais em ambientes onde esses compõem o bioma é uma estratégia promissora.

2.6. Leveduras fermentadoras de pentoses: ocorrência na natureza

As leveduras constituem um grupo de fungos unicelulares, não móveis, cujo estado sexual não apresenta corpos de frutificação e o crescimento vegetativo ocorre por brotamento ou fissão binária. São microrganismos, em sua maioria sapróbios, sendo alguns parasitas oportunistas (LACHANCE & STARMER, 1998). Apresentam grande diversidade morfológica e bioquímica, com habilidade em assimilar diversos compostos orgânicos presentes em diferentes nichos ecológicos, o que possibilita a sua dispersão e ocupação em ambientes onde há esses compostos (PHAFF & STARMER, 1987 apud RUIVO, 2005).

As plantas são consideradas excelentes habitats para leveduras devido a elevada concentração de açúcares simples, baixo pH e intensa visitação de insetos (vetores)

(PHAFF & STARMER, 1987 apud RUIVO, 2005). Diversos trabalhos sobre comunidades de leveduras demonstraram a presença desses microrganismos em diferentes substratos vegetais como: flores, frutos, folhas e exsudados (PRADA & PAGNOCCA, 1997; ROSA et al., 1994). Os gêneros de leveduras mais comumente encontrados em frutos e flores são: *Cândida*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kloeckera* e *Metschnikowia* (PHAFF, 1990; PRADA & PAGNOCCA, 1997; ROSA et al., 1995). Os principais responsáveis pela disseminação dessas leveduras nesses microhabitats são os insetos visitantes, sendo os principais as abelhas, as vespas, as borboletas e os besouros (PHAFF, 1987 apud RUIVO, 2005).

Várias leveduras produtoras de etanol a partir de D-xilose foram isoladas de habitats naturais como exsudados de plantas (NIGAM et al., 1985), estruturas vegetais (SREENATH & JEFFRIES, 2000) e intestino de insetos (SUH et al., 2003).

Em um estudo, Rao et al. (2008) isolaram de frutos apodrecidos e cascas do tronco de árvores, 374 leveduras, das quais 27 apresentaram a capacidade de converter D-xilose em etanol.

Leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Cryptococcuse*, *Rhodotorula* e *Kloeckera* são conhecidas por fermentarem xilose a etanol (TOIVOLA et al., 1984; NIGAM et al., 1985; RAO et al., 2008).

Nguyen et al. (2006) descreveram um novo gênero *Spathaspora* e duas novas espécies de leveduras fermentadoras de xilose, *S. passalidarum* e *Candida jeffriesii*, as quais foram isoladas do intestino de besouros das famílias *Passalidae* e *Tenebrionidae*.

Dentre as espécies de leveduras conhecidas por serem fermentadoras de xilose, as mais estudadas são: *Pichia stipitis*, *Candida shehatei* e *Pachysolen tannophilus* (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

Du Preez e Prior (1985) analisaram a produção de etanol a partir de D-xilose por leveduras isoladas de vários tipos de solos. Dentre as 56 leveduras obtidas, uma linhagem de *Pichia stipitis* destacou-se como melhor produtora de etanol.

P. stipitis é considerado o microrganismo natural mais adequado para a produção de etanol a partir dos açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico. Esta espécie pertence a um grupo de leveduras isoladas a partir de madeira apodrecida e de larvas de insetos habitantes de madeira (TOIVOLA et al., 1984). Estes nichos ecológicos propiciaram a esta levedura a capacidade de utilizar a maioria dos açúcares presentes na madeira. *P. stipitis* desenvolveu a síntese de várias celulasas e hemicelulasas que hidrolisam este substrato em monossacarídeos (JEFFRIES et al., 2007). Esta levedura é capaz de fermentar a etanol: D-glicose, D-xilose, D-manose, D-galactose e celobiose, além de produzir massa celular a partir de L-arabinose (PAREKH et al., 1986; NIGAM, 2002).

Baseado na descrição de novas taxa de leveduras em trabalhos recentes e na habilidade de espécies já conhecidas em fermentar açúcares não convencionais a etanol, pressupõe-se que há uma grande diversidade de leveduras não descritas e que essas possam apresentar metabolismo que as qualifiquem como aptas a fermentarem diferentes açúcares (LACHANCE et al., 2001; SUH et al., 2000; NGUYEN et al., 2006).

2.7. Leveduras em biomas brasileiros

O habitat natural das leveduras é extenso e diversificado, abrangendo desde estruturas vegetais (flores, folhas, pólen, frutos, caules e raízes) até a água do mar (BOEKHOUT & PHAFF, 2003).

Há vários estudos, disponíveis na literatura, sobre diversidade de leveduras em regiões temperadas, já em biomas tropicais apenas recentemente pesquisas foram realizadas. No Brasil, alguns desses estudos demonstraram uma grande diversidade de leveduras encontradas em diferentes habitats como insetos, flores e frutos (HAGLER et al., 1993; MORAIS et al., 1995; SANTOS et al., 1996).

O Brasil apresenta uma rica biodiversidade devido a sua dimensão continental e a grande variação geomorfológica e climática. Assim, abriga 7 biomas, 49 ecorregiões e incalculáveis ecossistemas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – IBAMA, 2007).

Esta biodiversidade não é totalmente conhecida, entretanto estima-se que o número de espécies ainda não identificadas pode alcançar a ordem de dezena de milhões. Apesar dos microrganismos exercerem funções vitais nos ecossistemas, estes foram pouco estudados, tanto devido à falta de interesse quanto a dificuldade nas pesquisas destes organismos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – IBAMA, 2002 apud COLLA, 2008).

Utilizar ecossistemas característicos do território brasileiro como fonte de coleta, oferece a oportunidade, não só de obter novas espécies, mas também de isolar aquelas capazes de fermentar diferentes substratos.

A Mata Atlântica, considerada um mosaico diversificado de ecossistemas, apresenta estruturas e composições florísticas diferenciadas, em função da composição do solo, diferenças de relevo e características climáticas. Já, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica no mundo em biodiversidade com a presença de diversos

ecossistemas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – IBAMA, 2007). Desta forma, o isolamento de leveduras a partir desses dois ambientes brasileiros é de grande interesse da tecnologia da fermentação de resíduos pelo potencial em abrigar leveduras capazes de fermentar os açúcares não convencionais (D-xilose e L-arabinose), presentes nos resíduos da biomassa vegetal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi de isolar, a partir de materiais de origem vegetal dos biomas Cerrado e Mata Atlântica, leveduras capazes de fermentar a etanol alguns açúcares, com ênfase aos não convencionais, D-xilose e L-arabinose, constituintes do hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar a seleção de linhagens que fermentam a glicose dentre as isoladas;
- Testar a capacidade das leveduras selecionadas em assimilar e fermentar diferentes açúcares;
- Criar um banco de cepas dos microrganismos isolados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A figura 5 apresenta um esquema das etapas realizadas para o desenvolvimento do trabalho.

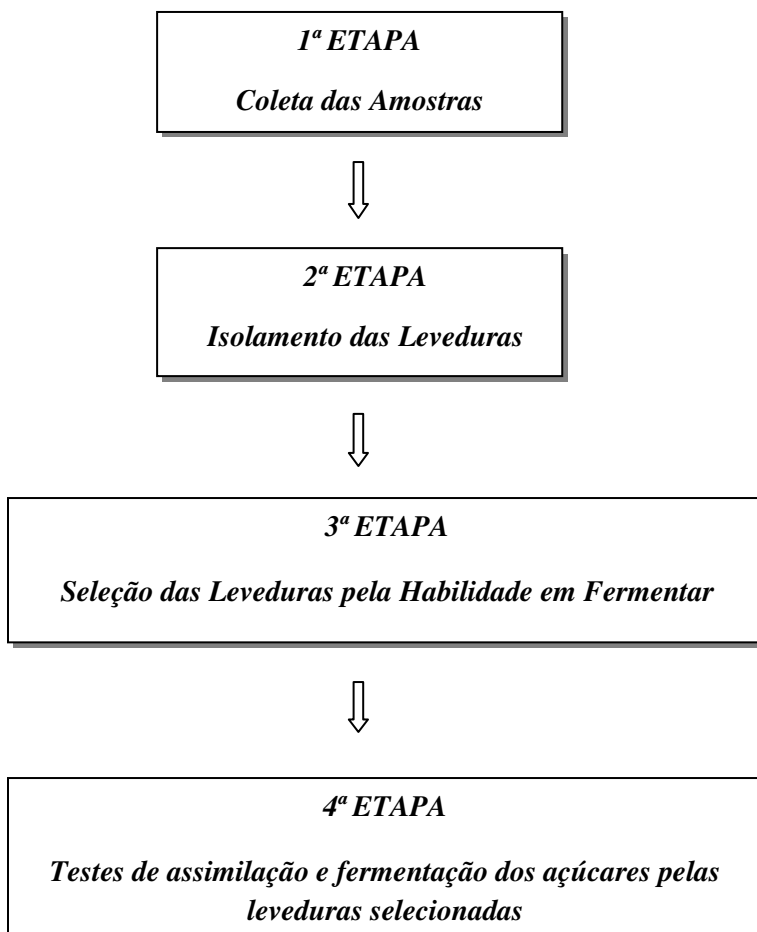


Figura 5. - Esquema das etapas realizadas para o desenvolvimento do trabalho.

4.1. Amostras coletadas

Foram realizadas três coletas, das quais uma ocorreu em uma região de cerrado e duas em locais de Mata Atlântica. Foram obtidas 85 amostras que compreenderam estruturas e matéria vegetal em decomposição, as quais foram obtidas de forma direta e depositadas em sacos plásticos estéreis, sendo processadas logo após cada coleta.

Coleta 1 - Cerrado

A primeira coleta foi realizada em uma região de cerrado, em fevereiro/2008, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu, Fazenda Campininha – SP, na trilha do setor SPNP – 2.

Foram coletadas 34 amostras vegetais que envolveram: 10 frutos, 6 flores, 6 cascas de tronco, 5 folhas, 5 misturas de material vegetal em decomposição e 2 tipos de sementes.

- *Coletas 2 e 3 - Mata Atlântica*

A segunda coleta ocorreu em agosto/2008, no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, Ubatuba – SP, na trilha “Estrada da Casa da Farinha”.

Nesta coleta foram obtidas 29 amostras, das quais eram: 17 frutos, 6 flores, 4 folhas e 2 tipos de sementes.

A terceira coleta foi realizada em outubro/2008, no Parque Estadual Carlos Botelho, São Miguel Arcanjo – SP, na “Trilha dos Fornos”.

Foram coletadas 22 amostras, composta por: 10 frutos, 8 flores, 2 folhas e 2 exemplares de diferentes sementes.

As coletas 2 e 3 (Mata Atlântica) foram realizadas em locais de preservação do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), desta forma a autorização para as coletas foi obtida em maio de 2008 e, encontra-se como anexo deste trabalho.

4.2. Meios de cultura

4.2.1. Meio YM (Yeast - Malt) e YMA (Yeast - Malt - Agar)

O meio YM apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura.....	3 g
Extrato de malte.....	3 g
Peptona.....	5 g
Glicose.....	10 g
Água destilada.....	1000 mL

O meio YMA apresenta a mesma composição do meio YM, acrescido de 2% de ágar. O meio YMA foi utilizado para o isolamento e purificação das leveduras e o YM para o enriquecimento do material para possibilitar o cultivo das células presentes nas amostras.

4.2.2. Meio WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar – DIFCO/0424-17-9)

Composição do meio WLN, a seguir:

Extrato de levedura.....	4 g
Caseína.....	5 g
Glicose.....	50 g
Fosfato hidratado de potássio.....	0,55 g
Cloreto de potássio.....	0,425 g
Cloreto de cálcio.....	0,125 g
Sulfato de magnésio.....	0,125 g
Cloreto férrico.....	0,0025 g
Sulfato de manganês.....	0,0025 g
Ágar.....	20 g
Verde de bromocresol.....	0,022 g
Água destilada.....	1000 mL

O meio WLN foi preparado conforme especificações do fabricante. Este meio foi utilizado no isolamento das leveduras.

4.2.3. Meio CAC (CHROMagar Candida – DIFCO/212961)

O meio CAC apresenta a seguinte composição:

Cromopectona.....	10,2 g
Glicose.....	20 g
“Chromogen mix”.....	2 g
Cloranfenicol.....	0,5 g
Ágar.....	15 g
Água destilada.....	1000 mL

Preparado conforme as especificações do fabricante. Utilizado no isolamento das leveduras.

4.2.4. Meio PDA (Potato - Dextrose - Agar)

Extrato de batata.....	4 g
Glicose.....	20 g
Ágar.....	15 g
Água destilada.....	1000 mL

O meio PDA foi utilizado para a manutenção das culturas.

4.2.5. Meio YPD (Yeast - Peptone - Dextrose)

Este meio apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura.....	10 g
Peptona.....	20 g
Dextrose.....	20 g
Água destilada.....	1000 mL

Este meio foi utilizado para a multiplicação das células e preparo do inóculo nos ensaios de fermentação e assimilação de carboidratos.

4.2.6. Meio Basal para testes de fermentação e assimilação

Composto por:

Sulfato de amônio.....	5 g
Fosfato de potássio monobásico.....	1 g
Sulfato de magnésio.....	0,5 g
Fonte de carbono.....	20 /40 g
Água destilada.....	1000 mL

Foram utilizados, como fonte de carbono, 2 g dos seguintes carboidratos: glicose, L-arabinose, D-galactose, inulina, lactose, maltose, melibiose, sacarose, xilose e trealose; e 4 g

de rafinose. O Meio Basal foi usado para determinar a habilidade das leveduras isoladas em assimilar e fermentar carboidratos.

Foram esterilizados em autoclave a 121°C/1 atm/ 15 minutos, os seguintes meios de cultura: YM, YMA, WLN, PDA e YPD. Já o meio Basal foi submetido a tratamento térmico em autoclave a 121°C, a 1atm por 3 minutos, sendo estas condições adequadas ao processo, evitando a degradação dos açúcares utilizados.

4.3. Isolamento das leveduras

As estruturas e os materiais vegetais coletados foram macerados manualmente com o auxílio de um almofariz e um pistilo. Foram diluídos, de cada amostra macerada, 10 g em 90 mL de solução salina (0,9% de NaCl) estéril em Erlenmeyer de 250 mL. Os Erlenmeyers, contendo as amostras diluídas (10^{-1}), foram submetidos à agitação em mesa rotatória nas seguintes condições: 150 rpm/32°C/5 min., para a obtenção de uma mistura homogênea. Em seguida, foram realizadas diluições em série destas amostras (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}).

A partir de cada diluição foi transferido 0,1mL (inóculo) para placas de Petri (9 cm x 1,5 cm) contendo 25 mL dos seguintes meios: YMA e WLN, no caso da 1ª coleta. Na 2ª e 3ª coletas, foram utilizados os meios WLN e CAC. O inóculo foi distribuído sobre os meios com o auxílio de alça de Drigalsky (plaqueamento em superfície).

Nos meios de cultura foram adicionados, assepticamente, 100 mg/L de cada um dos antibióticos: monensina, ampicilina e tetraciclina, para inibir o desenvolvimento das bactérias presentes nas amostras.

As placas de cada amostra contendo os devidos meios, com as alíquotas semeadas em duplicata, foram incubadas a 30°C por 5 dias. Após este período, foi realizada a leitura das mesmas para a contagem das colônias de leveduras obtidas.

As colônias foram diferenciadas pelas seguintes características morfológicas: cor, brilho (opaca ou brilhosa), margem (regular, irregular, lobada ou com raízes), superfície (lisa ou rugosa), elevação (plana, convexa, umbonada ou vulcão) e consistência (cremosa, mucóide, amanteigada, membranosa, esfarelada, dura ou seca), segundo Yarrow (1998).

4.3.1. Purificação das colônias de leveduras

As células das colônias com características macroscópicas de levedura foram semeadas, com o auxílio de uma alça estéril, por esgotamento em placas de Petri, contendo o meio YMA. A seguir, as placas foram acondicionadas em estufa a 30°C por 5 dias. Este procedimento foi realizado repetidamente até a obtenção de colônias puras, as quais foram observadas em microscópio ótico (aumento 400x), utilizando técnica a fresco.

As colônias puras obtidas foram identificadas utilizando números cardinais agrupados em três grupos e a primeira letra do meio de cultura (YMA, WLN ou CAC) do qual foram provenientes. De acordo com a seguinte exemplificação:

- Primeiro grupo: coleta realizada (ex: 1._._ / 1ª coleta - Cerrado);
- Segundo grupo: amostra coletada (ex: 1.2._/2ª amostra da 1ª coleta);
- Terceiro grupo: ordem da colônia em relação a sua quantidade do total obtido no meio de cultura utilizado (1.2.1^(w) / colônia dominante no meio WLN, da 2ª amostra, obtida na 1ª coleta).

4.4. Conservação das leveduras

As leveduras purificadas foram semeadas em um tubo de ensaio contendo meio PDA inclinado. Estes tubos foram mantidos em estufa 30° C por 3 dias. Após o crescimento das colônias, estas foram cobertas com óleo mineral estéril e mantidas como cultura estoque, em geladeira, a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Uma cepa de *Picchia stipitis* (ATCC 58376), utilizadas nos experimentos como padrão, foi conservada de acordo com o procedimento utilizado para as colônias isoladas.

4.5. Habilidade em assimilar e fermentar fontes de carbono

Os testes de habilidade em fermentar e assimilar fontes de carbono foram realizados em um mesmo ensaio, divididos em duas etapas.

As leveduras isoladas foram submetidas, em uma primeira etapa, ao teste de fermentação da glicose. Esse teste teve a função de uma pré-seleção, uma vez que se a fermentação ocorrer, a glicose será sempre fermentada. Se um carboidrato for fermentado, ele será assimilado, no entanto o contrário não é necessariamente uma verdade (BARNETT et al., 2000). Desta forma, as leveduras que apresentaram a habilidade em fermentar a glicose foram selecionadas, para a segunda etapa; os testes de fermentação e assimilação dos açúcares: L-arabinose, D-galactose, inulina, lactose, maltose, melibiose, sacarose, xilose, rafinose e trealose.

Para a realização dos testes da fermentação da glicose e, da assimilação e fermentação das demais fontes de carbono, foram realizados os seguintes procedimentos:

– *Preparo do pré-inóculo*

Uma alçada de células de cada levedura isolada e purificada foi inoculada em tubo de ensaio, com 5 mL do meio YPD e então, incubado por 24 horas a 32°C.

– *Verificação da habilidade em fermentar e assimilar*

A partir de cada solução de levedura crescida em YPD foi retirado 0,1 mL e inoculado em um tubo de ensaio com 5 mL do Meio Basal com 2% da fonte de carbono, com exceção da rafinose com 4%. Em cada tubo de ensaio, com o meio basal e o inóculo, foi inserido um tubo de Durham para a verificação da produção de gás. Os tubos de ensaio foram acondicionados em estufa a $\pm 30^\circ\text{C}$, durante 10 dias.

O teste de fermentação foi analisado através da visualização da formação de gás dentro do tubo de Durham. A leitura foi considerada negativa quando não houve acúmulo de gás ou quando foram observadas algumas bolhas de gás no tubo de Durham, +1 quando apenas 1/3 do tubo de Durham estava ocupado por gás, +2 quando o gás estava presente em 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de Durham estava cheio de gás. As cepas cujas leituras apresentaram +2 e +3 foram consideradas fermentadoras. As que tiveram leitura +1 foram consideradas fermentadoras fracas (YARROW, 1998).

A assimilação das fontes de carbono foi considerada positiva quando foi observado a presença de massa celular.

Os testes foram realizados em duplicatas. Como controle positivo foi usado um tubo com Meio Basal com glicose 2% e, como controle negativo, um tubo com Meio Basal sem a fonte de carbono. As leituras da fermentação da glicose foram feitas em 24, 48 e 72 horas e uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como padrão positivo. Na

fermentação das demais fontes de carbono, as leituras foram realizadas regularmente no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 10º dias após a inoculação. No caso da xilose, uma cepa de *Picchia stipitis* foi utilizada como padrão positivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento das leveduras

5.1.1. Coleta 1 – Cerrado

Foram isoladas 48 cepas de leveduras a partir de 34 amostras vegetais semeadas nos meios de cultura YMA e WLN. Destas cepas, 19 foram obtidas do meio YMA e 29 a partir do meio WLN (Tabela 1).

Do total de amostras coletadas, 12 delas (1.4, 1.6, 1.7, 1.12, 1.17, 1.22, 1.23., 1.27, 1.29, 1.31, 1.32 e 1.34) apresentaram desenvolvimento de colônias de leveduras nos dois meios utilizados (YMA e WLN) e 5 (1.5, 1.8, 1.14, 1.16 e 1.19) desenvolveram colônias apenas quando cultivadas em WLN (Tabela 1).

O fato de 5 amostras apresentarem somente crescimento de leveduras quando semeadas em WLN pode estar relacionado à composição deste meio de cultura, por este apresentar mais e maior quantidade de glicose quando comparado ao YMA, o que favoreceu o crescimento das células de leveduras.

Nas amostras semeadas, que apresentaram desenvolvimento de colônias, a população de leveduras variou entre 10^2 a 10^7 UFC/mL tanto para o WLN como para o YMA (Tabela 1). A variação encontrada (cinco ciclos logarítmicos) está de acordo com o fato de que cada amostra vegetal constitui diversos microhabitats durante o seu desenvolvimento e deterioração, mesmo quando encontradas em um mesmo bioma (ROSA, C. A. et al., 1995; PRADA, G. M. M. & PAGNOCCA, F. C., 1997).

Em relação à diversidade de fenótipos, em 9 das 34 amostras semeadas para ambos os meios utilizados, houve o desenvolvimento de apenas um tipo morfológico. Em

relação às demais amostras, embora tenha ocorrido mais de um fenótipo de levedura, não foi possível observar uma quantidade maior do que 3 diferentes cepas (Tabela 1). Por se tratar de amostras procedentes do meio ambiente, nenhum resultado é inesperado quanto ao tamanho populacional e diversidade dos microrganismos. Esses resultados podem estar relacionados ao tipo(s) de microrganismo(s) presentes nesses ambientes, os quais podem produzir substâncias que impedem o crescimento de outros.

Algumas cepas de leveduras produzem e excretam toxinas extracelulares, micocinas ou toxinas “killer”, que podem interferir no desenvolvimento de c sensíveis a estas substâncias, levando a exclusão desses microrganismos das fontes de nutrientes (VITAL et al., 2002). Leveduras micocinogênicas podem apresentar uma importante influência na estrutura das comunidades de leveduras por atuar como um mecanismo de competição de interferência ou amensalismo (GANTER & STARMER, 1992; ABRANCHES et al., 1997).

Tabela 1. Contagem das colônias de leveduras obtidas das amostras de material vegetal coletadas no Cerrado (coleta 1), em fevereiro/2008.

Amostra	Material Coletado	YMA					WLN				
		Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
1.1	casca do tronco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.2	flor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.3	mistura vegetal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.4	mistura vegetal	2	1.4.1 ^(y)	3,5x10 ⁶	2,7x10 ⁶	77,0	2	1.4.1 ^(w)	2,6x10 ⁶	1,7x10 ⁶	65,4
			1.4.2 ^(y)		8,0x10 ⁵	23,0		1.4.2 ^(w)		9,0x10 ⁵	34,6
1.5	casca do tronco	-	-	-	-	-	1	1.5.1 ^(w)	2,0x10 ³	2,0x10 ³	100
1.6	fruto	2	1.6.1 ^(y)	2,0x10 ⁵	1,4x10 ⁵	70,0	2	1.6.1 ^(w)	5,1x10 ⁶	3,7x10 ⁶	72,5
			1.6.2 ^(y)		6,0x10 ⁴	30,0		1.6.2 ^(w)		1,4x10 ⁶	27,5
1.7	fruto	1	1.7.1 ^(y)	7,0x10 ²	7,0x10 ²	100	1	1.7.1 ^(w)	8,0x10 ²	8,0x10 ²	100
1.8	fruto	-	-	-	-	-	1	1.8.1 ^(w)	3,0x10 ³	3,0x10 ³	100
1.9	flor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.10	casca do tronco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.11	casca do tronco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.12	semente	1	1.12.1 ^(y)	2,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴	100	1	1.12.1 ^(w)	2,2x10 ⁴	2,2x10 ⁴	100

Amostra	Material Coletado	YMA					WLN				
		Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
1.13	semente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.14	casca do tronco	-	-	-	-	-	1	1.14.1 ^(w)	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴	100
1.15	folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.16	folha	-	-	-	-	-	1	1.16.1 ^(w)	1,0x10 ²	1,0x10 ²	100
1.17	folha	1	1.17.1 ^(y)	1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁵	100	1	1.17.1 ^(w)	1,3x10 ²	1,3x10 ²	100
1.18	fruto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.19	fruto	-	-	-	-	-	3	1.19.1 ^(w)	6,6x10 ⁵	5,5x10 ^{5(w)}	83,4
								1.19.2 ^(w)		6,0x10 ^{4(w)}	9,0
								1.19.3 ^(w)		5,0x10 ^{4(w)}	7,6
1.20	folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.21	casca do tronco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.22	casca do tronco	1	1.22.1 ^(y)	5,0x10 ²	5,0x10 ²	100	1	1.22.1 ^(w)	1,6x10 ³	1,6x10 ³	100
1.23	fruto	2	1.23.1 ^(y)	5,3x10 ⁵	3,3x10 ⁵	62,3	3	1.23.1 ^(w)	1,8x10 ⁶	1,3x10 ⁶	72,2
			1.23.2 ^(y)		2,0x10 ⁵	37,7		1.23.2 ^(w)		4,0x10 ⁵	22,3
								1.23.3 ^(w)		1,0x10 ⁵	5,5
1.24	mistura vegetal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.25	fruto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostra	Material Coletado	YMA					WLN				
		Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
1.26	flor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.27	mistura vegetal	2	1.27.1 ^(y) 1.27.2 ^(y)	4,0x10 ⁷	3,0x10 ⁷ 1,0x10 ⁷	75,0 25,0	2	1.27.1 ^(w) 1.27.2 ^(w)	6,2x10 ⁷	4,2x10 ⁷ 2,0x10 ⁷	67,7 32,3
1.28	folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.29	flor	2	1.29.1 ^(y) 1.29.2 ^(y)	5,7x10 ⁵	4,6x10 ⁵ 1,1x10 ⁵	80,7 19,3	3	1.29.1 ^(w) 1.29.2 ^(w) 1.29.3 ^(w)	5,3x10 ⁵	4,8x10 ⁵ 3,0x10 ⁴ 2,0x10 ⁴	90,5 5,7 3,8
1.30	fruto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.31	fruto	2	1.31.1 ^(y) 1.31.2 ^(y)	3,1x10 ⁴	3,0x10 ⁴ 1,0x10 ³	96,7 3,3	2	1.31.1 ^(w) 1.31.2 ^(w)	5,0x10 ⁴	3,4x10 ⁴ 1,6x10 ⁴	68,0 32,0
1.32	flor	2	1.32.1 ^(y) 1.32.2 ^(y)	9,6x10 ⁷	5,0x10 ⁷ 4,6x10 ⁷	52,0 48,0	2	1.32.1 ^(w) 1.32.2 ^(w)	7,5x10 ⁷	4,5x10 ⁷ 3,0x10 ⁷	60,0 40,0
1.33	flor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.34	fruto	1	1.34.1 ^(y)	3,7x10 ⁷	3,7x10 ⁷	100	2	1.34.1 ^(w) 1.34.2 ^(w)	4,7x10 ⁷	4,5x10 ⁷ 2,0x10 ⁶	95,7 4,3
Total de linhagens isoladas:		19					29				

- ausência de resultados

As características morfológicas das colônias isoladas das amostras do Cerrado estão apresentadas nas tabelas 2 e 3. Foram obtidos 9 biótipos das 19 cepas isoladas das amostras semeadas em YMA e a partir dos 29 isolados do meio WLN foi possível verificar 14 biótipos.

No meio YMA os biótipos mais freqüentes, dentre os recuperados, foram: o 7^(y) e o 1^(y), com 5 (26,3% do total observado) e 3 ocorrências (15, 8%), respectivamente. Os isolados do biótipo 7^(y) foram resgatados das seguintes amostras (tabelas: 1 e 2): mistura vegetal (1.4.2^(y) e 1.27.2^(y)), fruto (1.6.1^(y)), semente (1.12.1^(y)) e flor (1.32.1^(y)). No caso do biótipo 1^(y), os isolados resultaram de mistura vegetal (1.4.1^(y)), fruto (1.31.1^(y)) e flor (1.32.2^(y)) (Tabelas 1 e 2).

No meio WLN os biótipos mais representativos, dentre os observados, foram o 4^(w) e o 8^(w), os quais apresentaram 4 (13,8%) e 3 (10,3%) ocorrências, respectivamente. Os isolados do biótipo 4^(w) foram obtidos das seguintes estruturas vegetais (Tabelas 1 e 3): casca de tronco (1.5.1^(w)), folha (1.16.1^(w)), fruto (1.23.2^(w)) e flor (1.29.3^(w)). Já os representantes do biótipo 8^(w), foram resgatados de mistura vegetal (1.4.1^(w)) e fruto (1.7.1^(w) e 1.23.3^(w)).

Os resultados demonstram que não há uma relação direta entre a presença de um biótipo em um determinado substrato, já que isolados que apresentaram as mesmas características foram obtidos de diferentes amostras.

Algumas leveduras são amplamente distribuídas no ambiente, mas outras ocorrem em um ou poucos substratos. Por exemplo, *Pichia kluyveri* e *P. membranifaciens* são frequentemente isoladas de uma ampla variedade de frutos e outras fontes, e podem ser consideradas leveduras cosmopolitas (MORAIS et al., 1996; STARMER et al., 1992). Ao contrário, *Candida amapae* foi encontrada apenas em um

tipo de fruto do Amapá (*Parahancornia amapa*) e associada à *Drosophila* (MORAIS et al., 1995).

Embora os meios utilizados tenham sido capazes de diferenciar as colônias quanto à sua morfologia, não é possível afirmar que as leveduras que têm o mesmo fenótipo, são representantes de um mesmo microrganismo. Essa mesma conclusão foi apresentada por Campbell (1999), o qual indica a análise da variação de morfologia e cor de colônias de leveduras crescidas em meio WLN como um dos testes para distinção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo o autor, este é um teste simples e suficiente para reconhecer similaridades ou diferenças entre isolados de levedura, apesar de não fornecer informações sobre sua identidade.

Tabela 2. Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 1 (Cerrado), quando semeadas em meio de cultura YMA.

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
1 ^(y)	1.4.1 ^(y) / 1.31.1 ^(y) / 1.32.2 ^(y)	3	bege	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
2 ^(y)	1.27.1 ^(y) / 1.29.2 ^(y)	2	bege	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
3 ^(y)	1.31.2 ^(y)	1	bege	opaca	regular	lisa	vulcão	cremosa
4 ^(y)	1.6.2 ^(y)	1	creme com centro bege	brilhosa	regular	lisa	vulcão	amanteigada
5 ^(y)	1.34.1 ^(y)	1	creme	opaca	com raízes	rugosa	convexa	seca
6 ^(y)	1.17.1 ^(y) / 1.22.1 ^(y)	2	creme	opaca	regular	lisa	plana	cremosa
7 ^(y)	1.4.2 ^(y) / 1.6.1 ^(y) / 1.12.1 ^(y) / 1.27.2 ^(y) / 1.32.1 ^(y)	5	branco	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
8 ^(y)	1.23.1 ^(y)	1	branco	opaca	regular	lisa	plana	cremosa
9 ^(y)	1.7.1 ^(y) / 1.23.2 ^(y)	2	branco	opaca	com raízes	rugosa	plana	seca

Tabela 3. Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 1 (Cerrado), quando semeadas em meio de cultura WLN.

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
1 ^(w)	1.19.1 ^(w)	1	bege com centro verde escuro	opaca	lobada	rugosa	convexa	dura
2 ^(w)	1.31.1 ^(w)	1	creme	brilhosa	regular	lisa	plana	cremosa
3 ^(w)	1.29.1 ^(w)	1	creme com centro verde	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
4 ^(w)	1.5.1 ^(w) / 1.16.1 ^(w) / 1.23.2 ^(w) / 1.29.3 ^(w)	4	branco	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa
5 ^(w)	1.8.1 ^(w) / 1.32.1 ^(w)	2	branco	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
6 ^(w)	1.4.2 ^(w) / 1.34.2 ^(w)	2	branco com centro verde	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
7 ^(w)	1.23.1 ^(w) / 1.34.1 ^(w)	2	branco com centro verde	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
8 ^(w)	1.4.1 ^(w) / 1.7.1 ^(w) / 1.23.3 ^(w)	3	verde escuro com borda branca	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
9 ^(w)	1.14.1 ^(w)	1	verde escuro	opaca	com raízes	rugosa	convexa	seca
10 ^(w)	1.17.1 ^(w) / 1.19.2 ^(w)	2	verde escuro	opaca	regular	lisa	convexa	amanteigada
11 ^(w)	1.22.1 ^(w)	1	verde escuro	brilhosa	regular	lisa	vulcão	amanteigada
12 ^(w)	1.32.2 ^(w)	1	verde	opaca	lobada	lisa	convexa	amanteigada
13 ^(w)	1.29.2 ^(w) / 1.31.2 ^(w)	2	verde com borda creme	opaca	regular	lisa	convexa	amanteigada
14 ^(w)	1.12.1 ^(w) / 1.19.3 ^(w)	2	cinza	brilhosa	regular	lisa	vulcão	amanteigada

5.1.2. Coleta 2 – Mata Atlântica – Parque Estadual da Serra do Mar

Os resultados da primeira coleta (Cerrado) indicaram que as diferenças encontradas, em relação a população de leveduras para os dois meios utilizados (WLN e YMA) não foram suficientemente relevantes. Assim, para as duas seguintes coletas (2 e 3) optou-se pela introdução de outro meio, em substituição ao YMA, o qual foi retirado por ter recuperado uma menor quantidade de leveduras quando comparado ao WLN.

O meio introduzido a partir dessa etapa do trabalho foi o CHROMagar Candida (CAC). De acordo com Odds e Bernaerts (1994) o meio CHROMagar Candida (CAC) pode ser utilizado para o isolamento e identificação presuntiva de *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* em amostras de origem clínica. Estas espécies são diferenciadas de outras leveduras através das colorações apresentadas pelas colônias, as quais são produzidas por uma reação enzimática espécie-específica do substrato cromógeno no meio de cultura. Embora esse meio seja indicado para a distinção entre espécies de *Candida* em análises clínicas, tem sido utilizado com resultados satisfatórios para a obtenção de outros gêneros de leveduras a partir de diferentes substratos. Desta forma, pode auxiliar no isolamento de espécies de origem ambiental e assim contribuir para a obtenção de uma maior diversidade de leveduras.

Tornai-Lehoczki e Péter (apud TORNAI-LEHOCZKI et al., 2003) analisaram 190 cepas de leveduras no meio CHROMagar Candida para a diferenciação visual e a identificação presuntiva em amostras de alimentos. Em todos os casos, as cepas que representaram a mesma espécie demonstraram a mesma cor, indicando que o meio é indicado para a discriminação de diversas espécies de leveduras.

A Tabela 4 apresenta a origem das 29 amostras coletadas, assim como os resultados em relação as contagens das populações de leveduras.

Foram obtidas, para as 29 amostras coletadas na Mata Atlântica, 101 cepas, sendo 54 resultantes do meio WLN e 47 do meio CAC.

Entre as 29 amostras estudadas, 23 delas apresentaram crescimento de leveduras em ambos os meios (WLN e CAC). Das 13 amostras restantes, 11 delas desenvolveram leveduras quando cultivadas em WLN, e 2 delas em CAC.

No meio WLN houve maior recuperação de leveduras de amostras de ambiente, contudo no meio CAC foi possível isolar leveduras de 2 amostras de fruto, as quais não apresentaram desenvolvimento em WLN. Esses resultados confirmam a importância de utilizar diferentes meios para uma mesma amostra, já que essa estratégia aumenta a possibilidade de se obter diferentes leveduras de uma mesma origem ambiental.

As populações de leveduras obtidas a partir dos materiais vegetais variaram entre 10^3 a 10^6 UFC/mL para o meio WLN e, para o meio CAC, o mesmo foi observado. Esta variação (três ciclos logarítmicos) pode estar relacionada com a existência de diferentes interações ecológicas presentes nos substratos vegetais, que envolvem a sua própria constituição química, comunidade de leveduras e outros organismos, sendo estas interações responsáveis pela diversidade de microrganismos encontrados em diferentes amostras provenientes de um mesmo ambiente (LACHANCE & STARMER, 1998).

Tabela 4. Contagem das colônias de leveduras obtidas das amostras de material vegetal coletadas na Mata Atlântica - Parque Estadual da Serra do Mar (coleta 2), em agosto/2008.

Amostra	Origem do Material Coletado	WLN					CAC				
		Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
2.1	fruto	3	2.1.1 ^(w)	1,3x10 ⁶	6,4x10 ⁵	49,2	-	-	-	-	-
			2.1.2 ^(w)		5,6x10 ⁵	43,1					
			2.1.3 ^(w)		1,0x10 ⁵	7,7					
2.2	fruto	2	2.2.1 ^(w)	7,8x10 ⁵	4,2x10 ⁵	53,9	2	2.2.1. ^(c)	4,0x10 ⁵	3,2x10 ⁵	80,0
			2.2.2 ^(w)		3,6x10 ⁵	46,1		2.2.2. ^(c)		8,0x10 ⁴	20,0
2.3	folha	1	2.3.1 ^(w)	5,0x10 ³	5,0x10 ³	100	-	-	-	-	-
2.4	fruto	1	2.4.1 ^(w)	3,5x10 ⁵	3,5x10 ⁵	100	-	-	-	-	-
2.5	semente	1	2.5.1 ^(w)	2,0x10 ³	2,0x10 ³	100	-	-	-	-	-
2.6	fruto	1	2.6.1 ^(w)	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴	100	-	-	-	-	-
2.7	fruto	1	2.7.1 ^(w)	5,4x10 ⁵	5,4x10 ⁵	100	4	2.7.1. ^(c)	1,6x10 ⁶	6,0x10 ⁵	37,5
								2.7.2. ^(c)		5,7x10 ⁵	35,6
								2.7.3. ^(c)		3,0x10 ⁵	18,8
								2.7.4. ^(c)		1,3x10 ⁵	8,1

Amostra	Origem do Material Coletado	WLN					CAC				
		Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
2.8	fruto	-	-	-	-	-	2	2.8.1. ^(c)	1,1x10 ⁶	7,0x10 ⁵	63,4
								2.8.2. ^(c)		4,0x10 ⁵	36,6
								2.9.1. ^(c)		5,0x10 ⁵	50,0
2.9	fruto	3	2.9.1 ^(w)	4,8x10 ⁵	3,0x10 ⁵	62,5	5	2.9.2. ^(c)	1,0x10 ⁶	2,0x10 ⁵	20,0
			2.9.2 ^(w)		1,3x10 ⁵	27,1		2.9.3 ^(c)		1,5x10 ⁵	15,0
			2.9.3 ^(w)		5,0x10 ⁴	10,4		2.9.4. ^(c)		1,0x10 ⁵	10,0
								2.9.5. ^(c)		5,0x10 ⁴	5,0
2.10	fruto	3	2.10.1 ^(w)	2,5x10 ⁶	1,5x10 ⁶	60,0	3	2.10.1. ^(c)	5,3x10 ⁶	5,0x10 ⁶	94,3
			2.10.2 ^(w)		7,0x10 ⁵	28,0		2.10.2. ^(c)		2,0x10 ⁵	3,7
			2.10.3 ^(w)		3,0x10 ⁵	12,0		2.10.3. ^(c)		1,0x10 ⁵	2,0
2.11	flor	3	2.11.1 ^(w)	1,6x10 ⁵	7,5x10 ⁴	46,9	3	2.11.1. ^(c)	1,7x10 ⁵	8,0x10 ⁴	47,0
			2.11.2 ^(w)		5,1x10 ⁴	31,9		2.11.2. ^(c)		5,4x10 ⁴	31,8
			2.11.3 ^(w)		3,4x10 ⁴	21,2		2.11.3. ^(c)		3,6x10 ⁴	21,2
2.12	fruto	1	2.12.1 ^(w)	4,2x10 ⁵	2,4x10 ⁵	57,1	2	2.12.1. ^(c)	1,0x10 ⁶	6,0x10 ⁵	60,0
					1,8x10 ⁵	42,9		2.12.2. ^(c)		4,0x10 ⁵	40,0
2.13	fruto	1	2.13.1 ^(w)	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴	100	-	-	-	-	-
2.14	fruto	1	2.14.1 ^(w)	3,4x10 ⁴	3,4x10 ⁴	100	1	2.14.1. ^(c)	2,6x10 ⁴	2,6x10 ⁴	100
2.15	flor	3	2.15.1 ^(w)	1,9x10 ⁵	8,2x10 ⁴	43,2	2	2.15.1. ^(c)	7,5x10 ⁴	4,0x10 ⁴	53,3
			2.15.2 ^(w)		7,5x10 ⁴	39,5		2.15.2. ^(c)		3,5x10 ⁴	46,7
			2.15.3 ^(w)		3,3x10 ⁴	17,3					
2.16	flor	1	2.16.1 ^(w)	2,3x10 ⁵	2,3x10 ⁵	100	-	-	-	-	-

Amostra	Origem do Material Coletado	WLN					CAC				
		Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
2.17	fruto	2	2.17.1 ^(w) 2.17.2 ^(w)	1,1x10 ⁵	9,0x10 ⁴ 2,0x10 ⁴	81,8 18,2	1	2.17.1 ^(c)	9,0x10 ⁴	9,0x10 ⁴	100
2.18	flor	1	2.18.1 ^(w)	1,0x10 ⁵	1,0x10 ⁵	100	4	2.18.1 ^(c) 2.18.2 ^(c) 2.18.3 ^(c) 2.18.4 ^(c)	5,0x10 ⁴	2,5x10 ⁴ 1,7x10 ⁴ 6,0x10 ³ 2,0x10 ³	50,0 34,0 12,0 4,0
2.19	fruto	1	2.19.1 ^(w)	3,2x10 ⁵	3,2x10 ⁵	100	-	-	-	-	-
2.20	fruto	-	-	-	-	-	3	2.20.1 ^(c) 2.20.2 ^(c) 2.20.3 ^(c)	1,1x10 ⁶	7,0x10 ⁵ 3,0x10 ⁵ 1,0x10 ⁵	63,6 27,3 9,1
2.21	folha	3	2.21.1 ^(w) 2.21.2 ^(w) 2.21.3 ^(w)	5,5x10 ⁴	3,0x10 ⁴ 1,5x10 ⁴ 1,0x10 ⁴	54,5 27,3 18,2	2	2.21.1 ^(c) 2.21.2 ^(c)	3,6x10 ⁴	2,0x10 ⁴ 1,6x10 ⁴	55,5 44,5
2.22	fruto	3	2.22.1 ^(w) 2.22.2 ^(w) 2.22.3 ^(w)	7,9x10 ⁵	3,8x10 ⁵ 2,6x10 ⁵ 1,5x10 ⁵	48,1 33,0 18,9	3	2.22.1 ^(c) 2.22.2 ^(c) 2.22.3 ^(c)	8,0x10 ⁵	5,0x10 ⁵ 2,0x10 ⁵ 1,0x10 ⁵	62,5 25,0 12,5
2.23	folha	2	2.23.1 ^(w) 2.23.2 ^(w)	2,0x10 ⁴	1,6x10 ⁴ 4,0x10 ³	80,0 20,0	-	-	-	-	-

Amostra	Origem do Material Coletado	WLN					CAC				
		Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Código da Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
2.24	folha	4	2.24.1 ^(w)	2,9x10 ⁵	1,4x10 ⁵	48,3	3	2.24.1 ^(c)	2,6x10 ⁵	1,8x10 ⁵	69,2
			2.24.2 ^(w)		6,0x10 ⁴	20,7		2.24.2 ^(c)		7,0x10 ⁴	27,0
			2.24.3 ^(w)		5,0x10 ⁴	17,2		2.24.3 ^(c)		1,0x10 ⁴	3,8
			2.24.4 ^(w)		4,0x10 ⁴	13,8					
2.25	flor	3	2.25.1 ^(w)	4,9x10 ⁵	4,0x10 ⁵	81,6	3	2.25.1 ^(c)	6,2x10 ⁵	4,0x10 ⁵	64,5
			2.25.2 ^(w)		5,0x10 ⁴	10,2		2.25.2 ^(c)		1,3x10 ⁵	21,0
			2.25.3 ^(w)		4,0x10 ⁴	8,2		2.25.3 ^(c)		9,0x10 ⁴	14,5
2.26	fruto	3	2.26.1 ^(w)	4,8x10 ⁵	2,6x10 ⁵	54,2	3	2.26.1 ^(c)	5,0x10 ⁵	2,0x10 ⁵	40,0
			2.26.2 ^(w)		1,2x10 ⁵	25,0		2.26.2 ^(c)		2,0x10 ⁵	40,0
			2.26.3 ^(w)		1,0x10 ⁵	20,8		2.26.3 ^(c)		1,0x10 ⁵	20,0
2.27	semente	2	2.27.1 ^(w)	1,8x10 ⁶	1,7x10 ⁶	94,4	1	2.27.1 ^(c)	5,0x10 ⁶	5,0x10 ⁶	100
			2.27.2 ^(w)		1,0x10 ⁵	5,6					
2.28	flor	1	2.28.1 ^(w)	5,3x10 ⁵	5,3x10 ⁵	100	-	-	-	-	-
2.29	fruto	3	2.29.1 ^(w)	1,1x10 ⁶	6,3x10 ⁵	57,3	-	-	-	-	-
			2.29.2 ^(w)		3,2x10 ⁵	29,1					
			2.29.3 ^(w)		1,5x10 ⁵	13,6					
Total de linhagens		54					47				

- ausência de resultados

As características morfológicas das colônias isoladas estão apresentadas nas Tabelas 5 e 6. No total, foram obtidos 20 biótipos a partir das 54 linhagens desenvolvidas em meio WLN e 23 biótipos resultantes dos 47 isolados das amostras semeadas em meio CAC.

O biótipo mais frequente observado no meio WLN foi o 3^(w), com 8 ocorrências, o que representa 40% do total obtido. Os isolados que apresentaram tal biótipo (3^(w)) foram resgatados de frutos (2.10.2^(w), 2.22.3^(w), 2.26.3^(w) e 2.29.2^(w)), flores (2.11.2^(w), 2.15.1^(w) e 2.18.1^(w)) e semente (2.27.2^(w)) (Tabelas 4 e 5).

Outros dois biótipos, 2^(w) e 6^(w) também foram representativos, cada um com 7 ocorrências (35% do total cada). Os isolados do biótipo 2^(w) resultaram de amostras de frutos (2.2.2^(w), 2.7.1^(w), 2.12.1^(w), 2.22.1^(w) e 2.26.2^(w)) e folhas (2.21.3^(w) e 2.26.2^(w)). Já aqueles pertencentes ao biótipo 6^(w), foram isolados de frutos (2.1.3^(w) e 2.9.2^(w)), flor (2.15.2^(w), 2.16.1^(w)) e folhas (2.21.2^(w) e 2.23.1^(w)) (Tabelas 4 e 5).

No meio CAC, os biótipos mais frequentes foram o 8^(c) e o 15^(c) com 6 (26% do total observado) e 4 ocorrências (17,4%), respectivamente. Os isolados do biótipo 8^(c) foram obtidos das seguintes amostras: fruto (2.9.1^(c) e 2.20.2^(c)), folhas (2.21.1^(c)), flor (2.25.3^(c)) e semente (2.27.1^(c)); e os do biótipo 15^(c) foram obtidos de flor (2.15.2^(c) e 2.18.3^(c)), folha (2.21.2^(c)) e fruto (2.22.3^(c)) (Tabelas 4 e 6).

De acordo com os resultados apresentados no meio WLN e no CAC, não houve uma correspondência entre os biótipos observados e as amostras das quais resultaram. Leveduras com o mesmo biótipo foram obtidas de diferentes tipos de amostras.

Os meios utilizados foram capazes de diferenciar as colônias quanto à sua morfologia, no entanto, não é possível afirmar que as leveduras que apresentaram o mesmo fenótipo, são representantes de um mesmo microrganismo. Tal afirmação só pode ser feita através de testes de identificação, os quais não foram contemplados nesse estudo.

Tabela 5. Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 2, quando semeadas em meio WLN.

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
1 ^(w)	2.1.1 ^(w) / 2.19.1 ^(w) / 2.17.1 ^(w) 2.25.1 ^(w) / 2.23.2 ^(w)	5	branco	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
2 ^(w)	2.2.2 ^(w) / 2.7.1 ^(w) / 2.12.1 ^(w) / 2.21.3 ^(w) / 2.22.1 ^(w) / 2.24.2 ^(w) / 2.26.2 ^(w)	7	branco	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
3 ^(w)	2.10.2 ^(w) / 2.11.2 ^(w) / 2.15.1 ^(w) / 2.18.1 ^(w) / 2.22.3 ^(w) / 2.26.3 ^(w) / 2.27.2 ^(w) / 2.29.2 ^(w)	8	branco	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa
4 ^(w)	2.1.2 ^(w)	1	branco com centro verde	opaca	regular	lisa	vulcão	cremosa
5 ^(w)	2.2.1 ^(w) / 2.5.1 ^(w) / 2.14.1 ^(w) / 2.29.1 ^(w)	4	branco com centro verde	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
6 ^(w)	2.1.3 ^(w) / 2.9.2 ^(w) / 2.11.3 ^(w) / 2.15.2 ^(w) / 2.16.1 ^(w) / 2.21.2 ^(w) / 2.23.1 ^(w)	7	creme	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
7 ^(w)	2.17.2 ^(w)	1	creme	opaca	com raízes	rugosa	convexa	seca
8 ^(w)	2.24.3 ^(w)	1	creme	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa
9 ^(w)	2.13.1 ^(w)	1	bege	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
10 ^(w)	2.28.1 ^(w)	1	laranja	brilhosa	regular	lisa	convexa	mucóide
11 ^(w)	2.4.1 ^(w) / 2.24.4 ^(w)	2	verde claro	opaca	com raízes	rugosa	convexa	seca
12 ^(w)	2.22.2 ^(w)	1	verde claro	brilhosa	regular	lisa	plana	amanteigada
13 ^(w)	2.9.1 ^(w)	1	verde	brilhosa	regular	lisa	vulcão	amanteigada

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
14 ^(w)	2.29.3 ^(w) / 2.9.3 ^(w)	2	verde	opaca	regular	lisa	convexa	esfarelada
15 ^(w)	2.25.3 ^(w)	1	verde	opaca	com raízes	rugosa	convexa	esfarelada
16 ^(w)	2.6.1 ^(w) / 2.15.3 ^(w) / 2.26.1 ^(w) / 2.27.1 ^(w)	4	verde escuro	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
17 ^(w)	2.11.1 ^(w) / 2.21.1 ^(w) / 2.25.2 ^(w)	3	verde com borda branca	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
18 ^(w)	2.10.1 ^(w)	1	azul	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa
19 ^(w)	2.10.3 ^(w)	1	azul	opaca	inteira	lisa	plana	dura
20 ^(w)	2.24.1 ^(w)	1	cinza	brilhosa	inteira	lisa	convexa	amanteigada

Tabela 6. Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 2, quando semeadas em meio CAC.

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
1 ^(c)	2.10.2 ^(c) / 2.24.1 ^(c) / 2.15.1 ^(c)	3	branco	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
2 ^(c)	2.12.1 ^(c)	1	branco	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
3 ^(c)	2.3.1 ^(c) / 2.7.3 ^(c) / 2.8.1 ^(c)	3	branco	brilhosa	regular	lisa	plana	cremosa
4 ^(c)	2.18.2 ^(c)	1	branco	opaca	regular	lisa	vulcão	cremosa
5 ^(c)	2.9.2 ^(c)	1	branco com centro roxo- avermelhado	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
6 ^(c)	2.9.4 ^(c) / 2.14.1 ^(c) / 2.20.1 ^(c)	3	branco com centro roxo	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
7 ^(c)	2.17.1 ^(c) / 2.24.2 ^(c)	2	branco com centro roxo	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
8 ^(c)	2.9.1 ^(c) / 2.20.2 ^(c) / 2.21.1 ^(c) / 2.25.3 ^(c) / 2.26.2 ^(c) / 2.27.1 ^(c)	6	creme	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
9 ^(c)	2.11.3 ^(c) / 2.12.2 ^(c) / 2.25.2 ^(c)	3	creme	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
10 ^(c)	2.2.1 ^(c)	1	creme com halo roxo	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
11 ^(c)	2.7.4 ^(c)	1	verde	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
12 ^(c)	2.7.1 ^(c) / 2.11.2 ^(c)	2	roxo	opaca	lobada	lisa	convexa	amanteigada
13 ^(c)	2.7.2 ^(c) / 2.11.1 ^(c)	2	roxo	opaca	com raízes	rugosa	convexa	seca
14 ^(c)	2.10.3 ^(c)	1	roxo	opaca	regular	lisa	plana	cremosa

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
15 ^(c)	2.15.2 ^(c) / 2.18.3 ^(c) / 2.21.2 ^(c) / 2.22.3 ^(c)	4	roxo	opaca	regular	lisa	plana	dura
16 ^(c)	2.18.1 ^(c) / 2.25.1 ^(c)	2	roxo	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa
17 ^(c)	2.8.2 ^(c) / 2.26.3 ^(c)	2	roxo com borda branca	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
18 ^(c)	2.9.3 ^(c) / 2.26.1 ^(c) / 2.24.3 ^(c)	3	roxo-avermelhado	opaca	regular	lisa	plana	amanteigada
19 ^(c)	2.2.2 ^(c)	1	azul	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
20 ^(c)	2.9.5 ^(c) / 2.18.4 ^(c)	2	azul	opaca	regular	lisa	convexa	amanteigada
21 ^(c)	2.10.1 ^(c)	1	laranja	brilhosa	regular	lisa	plana	mucóide
22 ^(c)	2.20.3 ^(c) / 2.22.1 ^(c)	2	bege	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
23 ^(c)	2.22.2 ^(c)	1	bege com centro rosa	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa

As amostras da coleta 2, quando cultivadas em meio CAC, apresentaram cores variadas das colônias de leveduras. A saber : azul, roxa, roxa com borda branca, verde, creme, roxo-avermelhada, branco com centro roxo-avermelhado, branca com centro roxo, laranja, bege, bege com centro rosa e branca (Tabela 6).

Gaschet et al. (2008) avaliou o desenvolvimento de 4 espécies de *Candida* de coleção (ATCC) quando cultivadas em meio CHROMagar Candida. Os resultados apresentados descreveram: *Candida albicans* como colônias de cor verde, *C. glabrata* como colônias variando de branca à rosa ou roxo, *C. cruzei* como colônias rosa com superfície rugosa, apresentando uma cor branca quando envelhecida e *C. tropicalis* com cor azul-escuro metálico podendo apresentar um halo ao redor da colônia.

O meio de cultura CHROMagar foi desenvolvido para diferenciação do gênero *Candida*, no entanto Tornai-Lehoczki et al. (2003) foram capazes de isolar outros gêneros de leveduras. Esses autores atribuem colônias beges ou cremes à presença de *Saccharomyces exiguus* e *S. dairensis*; cor roxo à *S. cerevisiae*; roxo-avermelhado à *Pichia membranifaciens*, *Yarrowia lipolytica* e *Issatchenkia orientalis*; cor verde à *Rhodotorula mucilaginosa* e *Crypococcust albidus*; vermelho-amarelado à *R. glutinis* e branco ou rosa claro à *Zygosaccharomyces rouxii*. Entre as leveduras do gênero *Candida* estudadas por esses autores, a cor branca é atribuída às colônias de *C. inconspícua*; cor bege ou creme às *C. parapsilosis*; verde à *C. sake* e azul à *C. tropicalis*.

Levando-se em consideração as informações descritas por Gaschet et al. (2008) e Tornai-Lehoczki et al. (2003) supõe-se que exemplares de determinadas espécies de leveduras foram isoladas nas amostras da coleta 2, como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7. Espécies de leveduras isoladas das amostras da coleta 2, de acordo com a cor apresentada pelas colônias em meio CAC, segundo Gaschet et al. (2008) e Tornai-Lehoczki et al. (2003).

Cor da Colônia	Levedura(s)	Isolado(s)
verde	<i>C. albicans</i> , <i>C. sake</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> e <i>Cryptococcus albidus</i>	2.7.4 ^(c)
azul	<i>C. tropicalis</i>	2.2.2 ^(c) / 2.18.4 ^(c)
roxo	<i>S. cerevisiae</i>	2.7.1 ^(c) / 2.7.2 ^(c) / 2.10.3 ^(c) / 2.11.1 ^(c) / 2.11.2 ^(c)
roxo-avermelhado	<i>P. membranifaciens</i> , <i>Y. lipolytica</i> e <i>I. orientalis</i>	2.9.3 ^(c) / 2.24.3 ^(c) / 2.26.1 ^(c)
creme ou bege	<i>C. parapsilosis</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> e <i>S. dairensis</i>	2.9.1 ^(c) / 2.11.3 ^(c) / 2.12.2 ^(c) / 2.20.2 ^(c) / 2.20.3 ^(c) / 2.21.1 ^(c) / 2.22.1 ^(c)
vermelho-amarelado (laranja)	<i>R. glutinis</i>	2.10.1 ^(c)
branco	<i>C. glabrata</i> , <i>C. inconspícua</i> e <i>Z. rouxii</i>	2.3.1 ^(c) / 2.8.1 ^(c) / 2.10.2 ^(c) / 2.12.1 ^(c) / 2.15.1 ^(c) / 2.18.2 ^(c) / 2.24.1 ^(c)

De acordo com os resultados apresentados, determinada coloração pode indicar mais de um tipo de levedura, o que inviabiliza a informação de correspondência de determinada cor a uma espécie. Este método de identificação presuntiva pode auxiliar na confirmação de espécies de leveduras quando aliado a outras formas de análises.

5.1.3. Coleta 3 - Mata Atlântica - Parque Estadual Carlos Botelho

Na coleta 3 foram isoladas 76 cepas de leveduras a partir de 22 amostras coletadas. Resultaram das amostras semeadas em WLN e CAC, 42 e 34 isolados, respectivamente (Tabela 8).

Das 22 amostras vegetais, 14 apresentaram desenvolvimento de leveduras nos dois meios (WLN e CAC) utilizados, 5 apenas no meio WLN e 3 somente no meio CAC.

O fato de leveduras de determinada amostra terem sido obtidas apenas em um dos meios de cultura, confirma a idéia de que ao se trabalhar com meios diferentes, há possibilidade de resgatar uma maior diversidade de leveduras. Como mencionado anteriormente (coleta 2), os dois meios utilizados (WLN e CAC) possivelmente foram capazes de recuperar diferentes leveduras.

A Tabela 8 apresenta a origem das 29 amostras coletadas, assim como os resultados em relação às contagens obtidas.

A respeito das contagens, foi observado variação de 10^3 a 10^8 UFC/mL no meio WLN e o mesmo para o meio CAC. Em todas as amostras houve o predomínio acima de 39% de um tipo morfológico. Provavelmente estes resultados estão relacionados com associações presentes entre leveduras, outros organismos e a constituição química do substrato em que estavam estabelecidas (LACHANCE & STARMER, 1998).

Tabela 8. Contagem das colônias de leveduras obtidas das amostras de material vegetal coletadas na Mata Atlântica - Parque Estadual Carlos Botelho (coleta 3), em outubro/2008.

Amostra	Material Vegetal Coletado	WLN					CAC				
		Quantidade de tipos morfológicos	Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
3.1	flor	-	-	-	-	-	1	3.1.1 ^(c)	2,0x10 ³	2,0x10 ³	100
			3.2.1 ^(w)		6,0x10 ⁶	77,9					
3.2	flor	3	3.2.2 ^(w)	7,7x10 ⁶	9,0x10 ⁵	11,7	-	-	-	-	-
			3.2.3 ^(w)		8,0x10 ⁵	10,4					
3.3	fruto	1	3.3.1 ^(w)	2,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴	100	1	3.3.1 ^(c)	1,0x10 ³	1,0x10 ³	100
3.4	fruto	1	3.4.1 ^(w)	2,0x10 ³	2,0x10 ³	100	2	3.4.1 ^(c)	3,0x10 ³	2,0x10 ³	66,7
								3.4.2 ^(c)		1,0x10 ³	33,3
3.5	semente	-	-	-	-	-	1	3.5.1 ^(c)	3,0x10 ³	3,0x10 ³	100
			3.6.1 ^(w)		1,0x10 ⁴	58,8					
3.6	semente	4	3.6.2 ^(w)	1,7x10 ⁴	3,0x10 ³	17,6	1	3.6.1 ^(c)	2,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴	100
			3.6.3 ^(w)		2,0x10 ³	11,8					
			3.6.4 ^(w)		2,0x10 ³	11,8					
			3.7.1 ^(w)		1,6x10 ⁷	89		3.7.1 ^(c)		3,0x10 ⁶	53,6
3.7	fruto	3	3.7.2 ^(w)	1,8x10 ⁷	1,4x10 ⁶	8	3	3.7.2 ^(c)	5,6x10 ⁶	1,7x10 ⁶	30,4
			3.7.3 ^(w)		5,0x10 ⁵	3		3.7.3 ^(c)		9,0x10 ⁵	16

Amostra	Material Vegetal Coletado	WLN					CAC				
		Quantidade de tipos morfológicos	Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
3.8	flor	2	3.8.1 ^(w)	2,1x10 ³	2,0x10 ³	95,2	2	3.8.1 ^(c)	1,2x10 ⁴	8,0x10 ³	66,7
			3.8.2 ^(w)		1,0x10 ²	4,8		3.8.2 ^(c)		4,0x10 ³	33,3
3.9	fruto	1	3.9.1 ^(w)	9,0x10 ³	9,0x10 ³	100	1	3.9.1 ^(c)	4,0x10 ⁴	4,0x10 ⁴	100
3.10	fruto	3	3.10.1 ^(w)	3,4x10 ⁵	3,0x10 ⁵	88,2	-	-	-	-	-
			3.10.2 ^(w)		4,0x10 ⁴	11,6					
			3.10.3 ^(w)		4,0x10 ³	1,1					
3.11	flor	3	3.11.1 ^(w) 3.11.2 ^(w) 3.11.3 ^(w)	6,9x10 ⁵	3,0x10 ⁵	43,5	5	3.11.1 ^(c)	3,6x10 ⁶	2,4x10 ⁶	66,7
					1,7x10 ⁵	24,6		3.11.2 ^(c)		7,0x10 ⁵	19,4
					1,2x10 ⁵	17,4		3.11.3 ^(c)		3,0x10 ⁵	8,3
								3.11.4 ^(c)		1,0x10 ⁵	2,8
								3.11.5 ^(c)		1,0x10 ⁵	2,8
3.12	flor	3	3.12.1 ^(w)	9,0x10 ⁵	6,0x10 ⁵	66,7	3	3.12.1 ^(c)	5,3x10 ⁵	4,0x10 ⁵	75,6
			3.12.2 ^(w)		2,0x10 ⁵	22,2		3.12.2 ^(c)		1,0x10 ⁵	18,8
			3.12.3 ^(w)		1,0x10 ⁵	11,1		3.12.3 ^(c)		3,0x10 ⁴	5,6
3.13	fruto	2	3.13.1 ^(w)	2,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴	50	1	3.13.1 ^(c)	3,0x10 ⁵	3,0x10 ⁵	100
			3.13.2 ^(w)		1,0x10 ⁴	50					

Amostra	Material Vegetal Coletado	WLN					CAC				
		Quantidade de tipos morfológicos	Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
3.14	folha	1	3.14.1 ^(w)	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴	100	-	-	-	-	-
3.15	flor	1	3.15.1 ^(w)	2,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴	100	-	-	-	-	-
3.16	folha	3	3.16.1 ^(w)	4,9x10 ⁶	2,3x10 ⁶	47	3	3.16.1 ^(c)	3,2x10 ⁶	1,3x10 ⁶	40,6
			3.16.2 ^(w)		2,0x10 ⁶	40,8		3.16.2 ^(c)		1,1x10 ⁶	34,4
			3.16.3 ^(w)		6,0x10 ⁵	12,2		3.16.3 ^(c)		8,0x10 ⁵	25
			3.17.1 ^(w)		1,0x10 ⁸	83,3		3.17.1 ^(c)		1,5x10 ⁸	93,7
3.17	fruto	3	3.17.2 ^(w)	1,2x10 ⁸	1,4x10 ⁷	11,7	2	3.17.2 ^(c)	1,6x10 ⁸	1,0x10 ⁷	6,3
			3.17.3 ^(w)		6,0x10 ⁶	5,0					
3.18	fruto	-	-	-	-	-	2	3.18.1 ^c	4,3x10 ⁵	4,0x10 ⁵	93
								3.18.2 ^c		3,0x10 ⁴	7
3.19	fruto	1	3.19.1 ^(w)	2,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴	100	1	3.19.1 ^(c)	2,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴	100
3.20	flor	2	3.20.1 ^(w)	3,3x10 ⁵	3,0x10 ⁵	90,9	3	3.20.1 ^(c)	2,3x10 ⁵	9,0x10 ⁴	39,1
			3.20.2 ^(w)		3,0x10 ⁴	9,1		3.20.2 ^(c)		9,0x10 ⁴	39,1
								3.20.3 ^(c)		5,0x10 ⁴	21,8

Amostra	Material Vegetal Coletado	WLN					CAC				
		Quantidade de tipos morfológicos	Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total	Quantidade de tipos morfológicos	Colônia Isolada	Contagem Total (UFC/mL)	Contagem por Diferenciação Morfológica (UFC/mL)	% da Contagem Total
3.21	flor	3	3.21.1 ^(w)	1,3x10 ⁶	1,0x10 ⁶	76,9	-	-	-	-	-
			3.21.2 ^(w)		2,0x10 ⁵	15,4					
			3.21.3 ^(w)		1,0x10 ⁵	7,7					
3.22	fruto	2	3.22.1 ^(w)	5,0x10 ⁷	3,2x10 ⁷	64	2	3.22.1 ^(c)	1,6x10 ⁷	8,0x10 ⁶	51,3
			3.22.2 ^(w)		1,8x10 ⁷	36		3.22.2 ^(c)		7,6x10 ⁶	48,7
Total de linhagens isoladas:		42					34				

- ausência de resultados

As características morfológicas de todas as colônias isoladas foram verificadas e descritas nas Tabelas 9 e 10.

Os 42 isolados obtidos a partir do meio WLN resultaram em 21 biótipos e, no caso do meio CAC, foram observados 22 biótipos a partir das 34 cepas desenvolvidas neste meio.

Os fenótipos dos isolados mais frequentes dos obtidos no meio WLN, foram o 9^(w), com 8 ocorrências (38% do total observado); e o 5^(w), com 6 representantes (28,6%) (Tabela 9). As amostras, das quais os isolados do biótipo 9^(w) resultaram, foram as seguintes: flor (3.2.3^(w), 3.8.1^(w), 3.11.2^(w) e 3.21.1^(w)), fruto (3.7.1^(w), 3.9.1^(w) e 3.10.1^(w)) e folha (3.16.2^(w)). Os isolados do biótipo 5^(w) foram obtidos das seguintes estruturas vegetais: fruto (3.3.1^(w) e 3.19.1^(w), 2.22.2^(w)), semente (3.6.3^(w)), folha (3.16.3^(w)) e flor (3.21.3^(w)) (Tabelas 8 e 9).

No meio CAC os biótipos mais representativos dentre os observados foram o 1^(c) e o 19^(c), com 5 (22,7% do total observado) e 4 (18,2%) ocorrências, respectivamente. Os isolados do biótipo 1^(c) foram recuperados das seguintes amostras: flor (3.1.1^(c) e 2.12.2^(c)) e fruto (3.7.2^(c), 3.17.1^(c) e 3.22.2^(c)). Já os isolados do biótipo 19^(c) resultaram de tais amostras: semente (3.5.1^(c)), flor (3.11.1^(c)), folha (3.16.1^(c)) e fruto (3.19.1^(c)) (Tabelas 8 e 10).

Nesta coleta 3, os resultados relativos aos biótipos observados e a origem dos isolados que os representam estão de acordo com as duas coletas anteriores. Isolados de um mesmo biótipo foram recuperados a partir de diferentes estruturas vegetais.

Apesar de os isolados terem apresentado as mesmas características morfológicas, não é possível afirmar que estes são representantes de um mesmo microrganismo. Como já mencionado, para a identificação das espécies de leveduras é necessário a realização de testes bioquímicos e moleculares, os quais não foram contemplados no presente estudo.

Tabela 9. Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 3, quando semeadas em meio WLN.

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
1 ^(w)	3.17.1 ^(w)	1	creme	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
2 ^(w)	3.15.1 ^(w)	1	creme	opaca	regular	lisa	vulcão	cremosa
3 ^(w)	3.12.3 ^(w) / 3.17.3 ^(w)	2	creme	brilhosa	lobada	lisa	convexa	cremosa
4 ^(w)	3.12.1 ^(w)	1	creme com centro verde	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
5 ^(w)	3.3.1 ^(w) / 3.6.3 ^(w) / 3.16.3 ^(w) / 3.19.1 ^(w) / 3.21.3 ^(w) / 3.22.2 ^(w)	6	branco	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa
6 ^(w)	3.6.4 ^(w) / 3.8.2 ^(w)	2	branco	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
7 ^(w)	3.10.2 ^(w)	1	branco	opaca	regular	lisa	vulcão	cremosa
8 ^(w)	3.20.2 ^(w)	1	branco	opaca	lobada	lisa	convexa	amanteigada
9 ^(w)	3.2.3 ^(w) / 3.7.1 ^(w) / 3.8.1 ^(w) / 3.9.1 ^(w) / 3.10.1 ^(w) / 3.11.2 ^(w) / 3.16.2 ^(w) / 3.21.1 ^(w)	8	branco com centro verde	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
10 ^(w)	3.14.1 ^(w)	1	branco com centro bege	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
11 ^(w)	3.2.1 ^(w) / 3.6.1 ^(w) / 3.7.2 ^(w)	3	verde	brilhosa	regular	lisa	vulcão	amanteigada
12 ^(w)	3.2.2 ^(w)	1	verde	opaca	com raízes	rugosa	convexa	esfarelada
13 ^(w)	3.10.3 ^(w) / 3.11.3 ^(w)	2	verde	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
14 ^(w)	3.17.2 ^(w)	1	verde	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa
15 ^(w)	3.4.1 ^(w) / 3.7.3 ^(w)	2	verde claro	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
16 ^(w)	3.6.2 ^(w) / 3.13.2 ^(w)	2	verde com borda branca	brilhosa	regular	lisa	vulcão	cremosa
17 ^(w)	3.11.1 ^(w) / 3.20.1 ^(w)	2	verde com borda branca	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
18 ^(w)	3.21.2 ^(w)	1	verde com borda branca	opaca	com raízes	rugosa	convexa	seca
19 ^(w)	3.22.1 ^(w)	1	verde escuro	opaca	regular	lisa	vulcão	amanteigada
20 ^(w)	3.16.1 ^(w)	1	azul com borda branca	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
21 ^(w)	3.12.2 ^(w) / 3.13.1 ^(w)	2	cinza	opaca	regular	lisa	convexa	amanteigada

Tabela 10. Características morfológicas das colônias de leveduras obtidas das amostras da coleta 3, quando semeadas em meio CAC.

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
1 ^(c)	3.1.1 ^(c) / 3.7.2 ^(c) / 3.12.2 ^(c) / 3.17.1 ^(c) / 3.22.2 ^(c)	5	creme	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
2 ^(c)	3.6.1 ^(c)	1	creme	brilhosa	regular	lisa	convexa	mucóide
3 ^(c)	3.7.3 ^(c)	1	creme	opaca	regular	lisa	vulcão	cremosa
4 ^(c)	3.17.2 ^(c)	1	creme	opaca	com raízes	lisa	convexa	cremosa
5 ^(c)	3.22.1 ^(c)	1	creme	opaca	com raízes	rugosa	convexa	seca
6 ^(c)	3.12.3 ^(c)	1	creme com centro bege	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
7 ^(c)	3.8.1 ^(c)	1	creme com centro roxo	opaca	lobada	lisa	convexa	cremosa
8 ^(c)	3.11.5 ^(c)	1	creme com centro roxo	brilhosa	lobada	lisa	convexa	cremosa
9 ^(c)	3.8.2 ^(c)	1	creme-alaranjado	brilhosa	regular	lisa	convexa	mucóide
10 ^(c)	3.11.2 ^(c)	1	branco	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa
11 ^(c)	3.20.2 ^(c)	1	branco	brilhosa	lobada	lisa	convexa	cremosa

Biotipo	Colônia Isolada	Nº de Ocorrência	Características Morfológicas					
			<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>	<i>Margem</i>	<i>Superfície</i>	<i>Elevação</i>	<i>Consistência</i>
12 ^(c)	3.3.1 ^(c)	1	branco com centro roxo	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
13 ^(c)	3.16.3 ^(c) / 3.20.1 ^(c)	2	branco com centro roxo	opaca	regular	lisa	vulcão	cremosa
14 ^(c)	3.16.2 ^(c)	1	branco com halo rosa	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
15 ^(c)	3.7.1 ^(c) / 3.20.3 ^(c)	2	verde	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
16 ^(c)	3.9.1 ^(c) / 3.11.3 ^(c)	2	verde-azulado	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
17 ^(c)	3.11.4 ^(c) / 3.13.1 ^(c)	2	azul escuro	brilhosa	regular	lisa	plana	amanteigada
18 ^(c)	3.4.2 ^(c) / 3.12.1 ^(c)	2	roxo	opaca	regular	lisa	convexa	cremosa
19 ^(c)	3.5.1 ^(c) / 3.11.1 ^(c) / 3.16.1 ^(c) / 3.19.1 ^(c)	4	roxo	brilhosa	regular	lisa	convexa	amanteigada
20 ^(c)	3.18.2 ^(c)	1	roxo com borda branca	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
21 ^(c)	3.4.1 ^(c)	1	rosa	brilhosa	regular	lisa	convexa	cremosa
22 ^(c)	3.18.1 ^(c)	1	vinho com borda branca	brilhosa	lobada	lisa	convexa	amanteigada

Tornai-Lehoczhi et al.(2003) e Gaschet et al. (2008), ao avaliarem o meio CHROMagar Candida quanto à sua adequação ao isolamento e identificação presuntiva de leveduras observaram uma ampla variedade de cores das colônias, as quais estavam relacionadas a certas espécies. De acordo com estes autores, supõe-se que conforme as cores das colônias obtidas a partir das amostras da coleta 3, certas espécies de leveduras foram isoladas, como apresentado na Tabela 11, a seguir.

Tabela 11. Espécies de leveduras isoladas das amostras da coleta 3, de acordo com a cor apresentada pelas colônias em meio CAC, segundo Gaschet et al. (2008) e Tornai-Lehoczhi et al. (2003).

Cor da Colônia	Possível Levedura	Isolado
creme ou bege	<i>Candida parapsilosis</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> e <i>S. dairensis</i>	3.1.1 ^(c) / 3.6.1 ^(c) / 3.7.2 ^(c) / 3.7.3 ^(c) / 3.12.2 ^(c) / 3.17.1 ^(c) / 3.17.2 ^(c) / 3.22.1 ^(c) / 3.22.2 ^(c)
roxo	<i>S. cerevisiae</i>	3.4.2 ^(c) / 3.5.1 ^(c) / 3.11.1 ^(c) / 3.12.1 ^(c) / 3.16.1 ^(c) / 3.19.1 ^(c)
verde ou verde-azulado	<i>C. sake</i> e <i>C. zeylanoides</i>	3.7.1 ^(c) / 3.9.1 ^(c) / 3.11.3 ^(c) / 3.20.3 ^(c)
rosa	<i>C. sake</i> e <i>C. zeylanoides</i>	3.4.1 ^(c)
azul escuro	<i>C. tropicalis</i>	3.11.4 ^(c) / 3.13.1 ^(c)
vinho com borda branca	<i>S. cerevisiae</i> e <i>C. stellata</i>	3.18.1 ^(c)
branco com centro roxo	<i>Issatchenkia orientalis</i>	3.3.1 ^(c) / 3.16.3 ^(c) / 3.20.1 ^(c)
branco	<i>C. glabrata</i> , <i>C. inconspicua</i> e <i>Z. rouxii</i>	3.11.2 ^(c) / 3.20.2 ^(c)

Tornai-Lehoczki et al. (2003), ao utilizar o meio CHROMagar Candida considerou outras características morfológicas além da coloração da colônia para a identificação presuntiva das cepas que apresentaram diferentes tonalidades de uma determinada cor. Estes autores propuseram a realização de testes suplementares, como assimilação de fontes de carbono, em casos que diferentes espécies apresentaram semelhante morfologia.

De acordo com os resultados apresentados, determinada coloração pode indicar mais de um tipo de levedura, o que inviabiliza a informação de correspondência de determinada cor a uma espécie. Este método de identificação presuntiva pode auxiliar na confirmação de espécies de leveduras quando aliado a outras formas de análises.

5.2. Habilidade em assimilar e fermentar fontes de carbono

Uma cepa *Pichia stipitis* (ATCC 58376) foi utilizada como referência quanto à assimilação e fermentação dos açúcares, de acordo com Barnett et al. (2000). A importância da seleção de diferentes cepas dessa levedura reside no fato que *P. stipitis* apresenta a habilidade de fermentar glicose e xilose a etanol. Esses dois açúcares são os principais componentes do bagaço hidrolisado, matéria prima promissora para a produção de bioetanol.

Dos 48 isolados obtidos a partir da coleta 1 (Cerrado), 23 (47,9%) foram capazes de fermentar a glicose, os quais foram selecionados para o teste de assimilação e fermentação dos demais açúcares.

A Figura 6 apresenta a quantidade de cepas isoladas da coleta 1, capazes de assimilar e fermentar os seguintes açúcares: D-glicose, D-galactose, lactose, maltose, inulina, melibiose, rafinose, sacarose, trealose, D-xilose e L-arabinose.

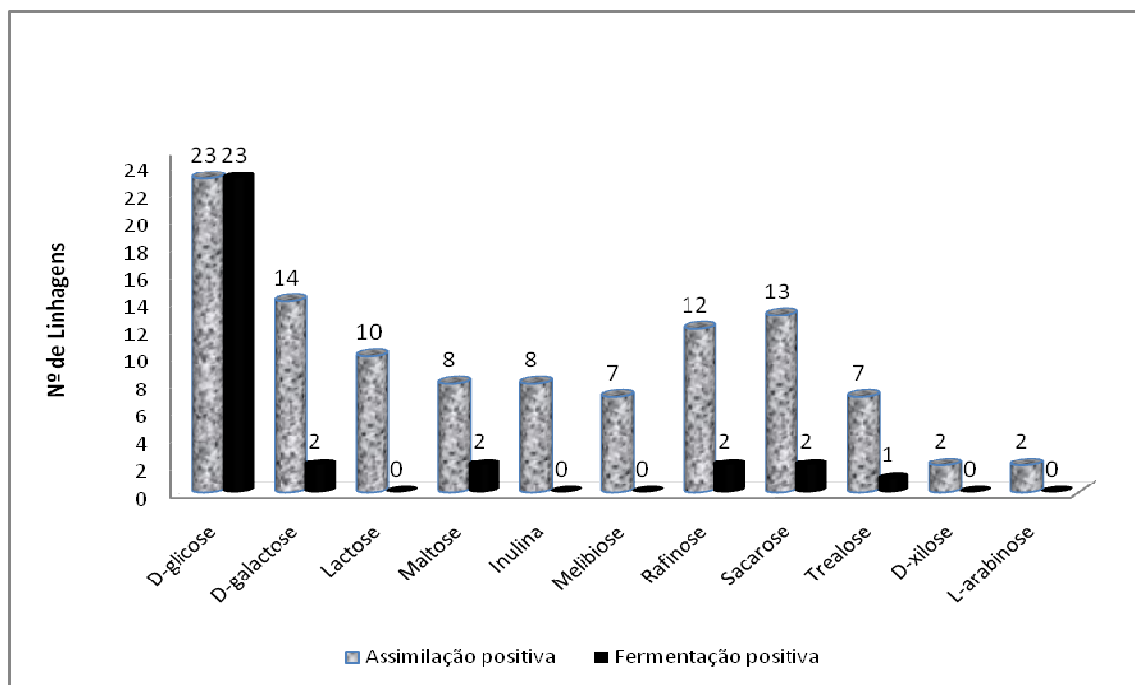


Figura 6. Quantidade das cepas isoladas, da coleta 1 (Cerrado), capazes de assimilar e fermentar açúcares.

A Tabela 12 apresenta os resultados dos testes de assimilação e fermentação dos açúcares pelos 23 isolados.

Nenhum dos isolados foi capaz de fermentar os seguintes açúcares: lactose, inulina, melibiose, D-xilose e L-arabinose

De acordo com os resultados demonstrados, na Tabela 12, não houve dentre os isolados da coleta 1, leveduras que poderiam ser representantes de *P. stipitis*.

Tabela 12. Características bioquímicas dos isolados obtidos na coleta 1 (Cerrado), quanto à assimilação e fermentação de açúcares.

Colônia Isolada	D-galactose	lactose	maltose	inulina	melibiose	rafinose	sacarose	trealose	D-xilose	L-arabinose
1.4.1 ^(w)	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
1.6.1 ^(y)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
1.6.2 ^(w)	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-
1.8.1 ^(w)	a/-	a/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
1.14.1 ^(y)	a/-	a/-	a/f	a/-	n/-	a/f	a/+	n/-	n/-	n/-
1.16.1 ^(w)	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
1.17.1 ^(y)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
1.17.2 ^(y)	a/+	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/f	n/-	n/-
1.19.1 ^(w)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
1.19.2 ^(w)	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-
1.22.1 ^(y)	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
1.22.1 ^(w)	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
1.23.1 ^(w)	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
1.23.2 ^(w)	a/f	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
1.23.3 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-
1.27.1 ^(w)	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-
1.27.2 ^(w)	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-
1.29.1 ^(w)	a/-	a/-	a/f	n/-	a/-	a/f	a/+	n/-	n/-	n/-
1.32.1 ^(w)	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-
1.32.1 ^(y)	a/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
1.32.2 ^(y)	a/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
1.34.1 ^(w)	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-
1.34.1 ^(y)	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-
<i>P. stipitis</i>	n/a/+/-	n/-	a/+	n/-	n/-	n/-	a/-	a/+	a/+	a/-

n assimilação negativa
a assimilação positiva
- fermentação negativa
+ fermentação positiva
f fermentação fraca

Na coleta 2 (Mata Atlântica – Parque Estadual da Serra do Mar), dos 101 isolados obtidos, 61 fermentaram a glicose, os quais foram selecionados para os testes de assimilação e fermentação dos açúcares.

A Figura 7 apresenta a quantidade de cepas isoladas capazes de assimilar e fermentar os seguintes açúcares: D-glicose, D-galactose, lactose, maltose, inulina, melibiose, rafinose, sacarose, trealose, D-xilose e L-arabinose.

Os açúcares inulina, L-arabinose e D-xilose não foram fermentados por nenhum dos isolados.

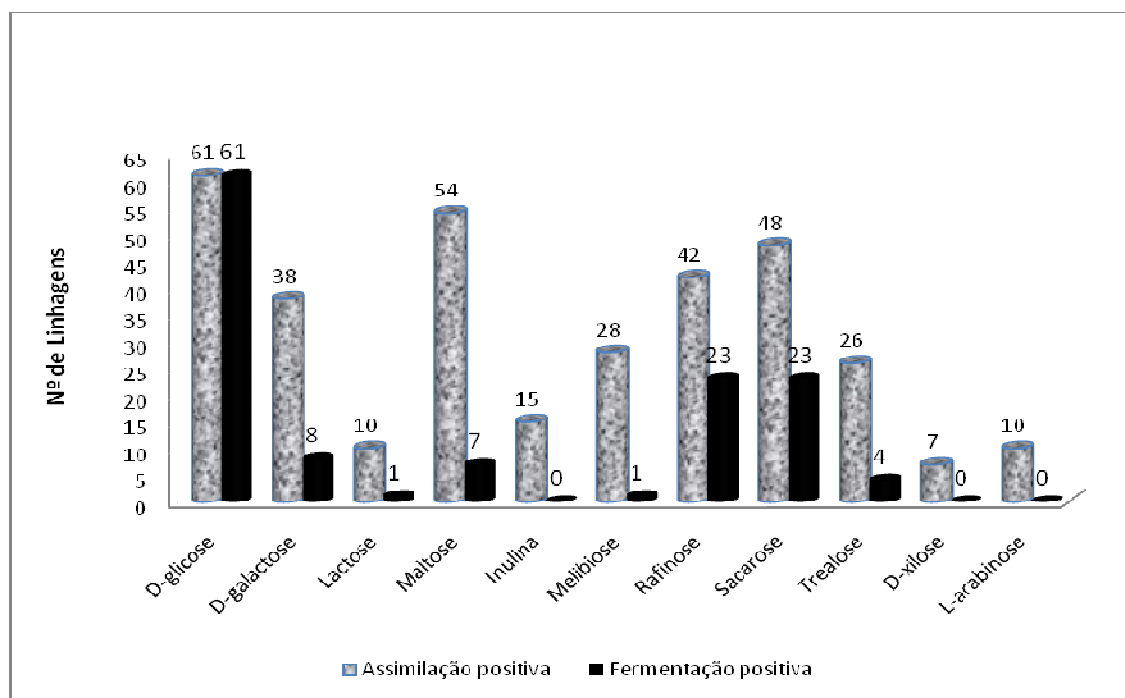


Figura 7. Quantidade das cepas isoladas, da coleta 2 (Mata Atlântica - Parque Estadual da Serra do Mar), capazes de assimilar e fermentar açúcares.

A Tabela 13 apresenta os resultados dos testes de assimilação e fermentação dos açúcares pelos 61 isolados selecionados.

A partir dos resultados observados, na Tabela 13, pode-se verificar que os 61 isolados avaliados não apresentaram perfil bioquímico semelhante ao de *P. stipitis*.

Tabela 13. Características bioquímicas dos isolados obtidos na coleta 2 (Mata Atlântica - Parque Estadual da Serra do Mar), quanto a assimilação e fermentação de açúcares.

Colônia Isolada	D-galactose	lactose	maltose	inulina	melibiose	rafinose	sacarose	trealose	D-xilose	L-arabinose
2.1.1 ^(w)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.1.2 ^(w)	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.1.3 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-
2.2.1 ^(w)	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
2.2.2 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	a/-
2.2.1 ^(c)	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-
2.2.2 ^(c)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
2.7.1 ^(c)	a/-	a/-	a/f	n/-	n/-	a/f	a/+	a/-	n/-	n/-
2.7.2 ^(c)	a/f	n/-	a/-	n/-	a/-	a/f	a/f	n/-	a/-	n/-
2.7.4 ^(c)	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
2.9.1 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	a/-
2.9.3 ^(w)	a/+	a/+	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	a/-	a/-
2.9.1 ^(c)	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-
2.9.2 ^(c)	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-
2.9.3 ^(c)	a/-	n/-	a/f	n/-	a/f	a/f	a/-	n/-	n/-	n/-
2.9.4 ^(c)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-
2.10.1 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.10.2 ^(c)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.10.3 ^(c)	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.11.3 ^(w)	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-
2.11.1 ^(c)	a/f	a/-	a/f	n/-	n/-	a/+	a/+	n/-	n/-	n/-
2.11.2 ^(c)	a/f	a/-	a/-	a/-	n/-	a/f	a/+	n/-	n/-	n/-
2.12.1 ^(w)	a/f	n/-	a/-	n/-	n/-	a/f	a/f	n/-	n/-	n/-

Colônia Isolada	D-galactose	lactose	maltose	inulina	melibiose	rafinose	sacarose	trealose	D-xilose	L-arabinose
2.12.1 ^(c)	a/+	a/-	a/f	n/-	n/-	a/f	a/+	n/-	n/-	n/-
2.14.1 ^(w)	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/f	a/f	n/-	n/-	n/-
2.15.1 ^(w)	a/-	a/-	a/-	a/-	n/-	a/f	a/+	a/-	a/-	n/-
2.15.2 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-
2.15.3 ^(w)	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.15.1 ^(c)	a/f	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.15.2 ^(c)	a/f	a/-	a/f	n/-	n/-	a/f	a/+	a/-	n/-	n/-
2.16.1 ^(w)	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-
2.17.1 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-
2.17.2 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/f	a/f	n/-	n/-	n/-
2.17.1 ^(c)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.18.1 ^(w)	a/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/f	a/f	n/-	a/-	n/-
2.18.1 ^(c)	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/f	a/+	a/-	n/-	n/-
2.18.2 ^(c)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/f	a/+	a/-	n/-	n/-
2.19.1 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/f	a/f	n/-	n/-	n/-
2.20.2 ^(c)	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
2.20.3 ^(c)	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.21.2 ^(w)	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.21.3 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.22.1 ^(w)	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/f	a/+	a/+	n/-	n/-
2.22.3 ^(w)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-
2.22.1 ^(c)	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/+	n/-	n/-
2.24.2 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/f	a/+	n/-	n/-	n/-
2.24.3 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/f	a/f	n/-	n/-	a/-
2.24.4 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/f	n/-	n/-	n/-
2.24.2 ^(c)	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/f	a/+	a/+	n/-	n/-
2.24.3 ^(c)	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/f	a/+	n/-	n/-	n/-
2.25.1 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-
2.25.1 ^(c)	a/-	a/-	a/f	n/-	a/-	a/+	a/f	a/-	n/-	n/-
2.25.2 ^(c)	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-
2.25.3 ^(c)	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-
2.26.1 ^(w)	n/-	n/-	a/f	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.26.2 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
2.26.1 ^(c)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/f	a/+	n/-	n/-	n/-

Colônia Isolada	D-galactose	lactose	maltose	inulina	melibiose	rafinose	sacarose	trealose	D-xilose	L-arabinose
2.26.2 ^(c)	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/f	a/+	n/-	n/-	n/-
2.27.2 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/+	n/-	n/-
2.29.2 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	a/-
2.29.3 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
<i>P. stipitis</i>	n/a/+/-	n/-	a/+	n/-	n/-	n/-	a/-	a/+	a/+	a/-

n assimilação negativa

a assimilação positiva

- fermentação negativa

+ fermentação positiva

f fermentação fraca

Das 76 cepas isoladas a partir da coleta 3 (Mata Atlântica - Parque Estadual Carlos Botelho), 50 fermentaram a glicose, as quais foram selecionadas para os testes de assimilação e fermentação das demais fontes de carbono.

A Figura 8 apresenta a quantidade de cepas isoladas capazes de assimilar e fermentar os seguintes açúcares: D-glicose, D-galactose, lactose, maltose, inulina, melibiose, rafinose, sacarose, trealose, D-xilose e L-arabinose.

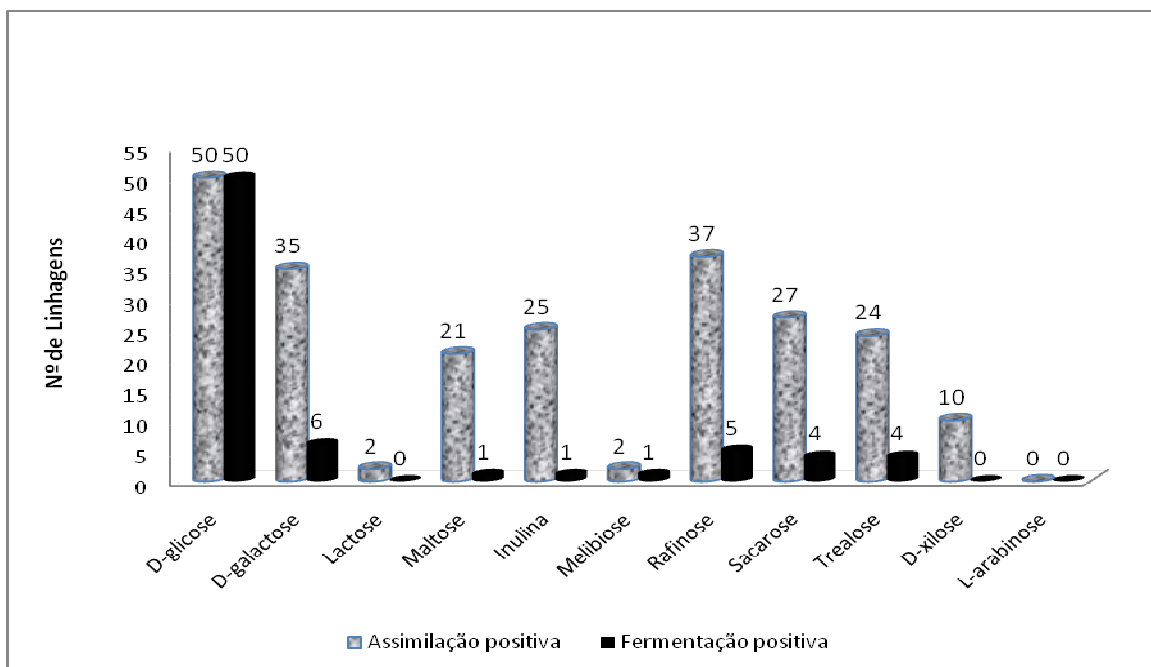


Figura 8. Quantidade das cepas isoladas, da coleta 3 (Mata Atlântica - Parque Estadual “Carlos Botelho”) capazes de assimilar e fermentar açúcares.

A Tabela 14 apresenta os resultados dos testes de assimilação e fermentação dos açúcares pelos 61 isolados selecionados.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 14, não foram observados isolados com perfil bioquímico semelhante ao de *P. stipitis*.

Tabela14. Características bioquímicas dos isolados obtidos na coleta 3 (Parque Estadual Carlos Botelho), quanto à assimilação e fermentação de seguintes açúcares.

Colônia Isolada	D-galactose	lactose	maltose	inulina	melibiose	rafinose	sacarose	trealose	D-xilose	L-arabinose
3.2.3 ^(w)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-
3.3.1 ^(w)	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.3.1 ^(c)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-
3.5.1 ^(c)	n/-	n/-	a/+	a/-	n/-	a/f	a/+	a/-	a/-	n/-
3.6.2 ^(w)	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	a/-	n/-
3.6.3 ^(w)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-
3.6.4 ^(w)	a/f	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-
3.7.1 ^(w)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
3.7.2 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-
3.7.3 ^(w)	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
3.7.1 ^(c)	a/f	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-
3.7.2 ^(c)	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
3.7.3 ^(c)	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
3.8.1 ^(w)	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
3.8.2 ^(w)	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
3.8.1 ^(c)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
3.9.1 ^(w)	a/f	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-
3.9.1 ^(c)	a/f	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-
3.10.1 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	a/-	a/f	n/-	n/-
3.10.2 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/f	a/+	a/+	a/-	n/-
3.10.3 ^(w)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.11.1 ^(w)	a/f	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.11.2 ^(w)	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.11.3 ^(w)	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.11.1 ^(c)	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.11.2 ^(c)	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-
3.11.3 ^(c)	a/f	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	a/-	n/-
3.11.4 ^(c)	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/-	a/+	n/-	n/-
3.11.5 ^(c)	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
3.12.1 ^(w)	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.12.3 ^(w)	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-

Colônia Isolada	D-galactose	lactose	maltose	inulina	melibiose	rafinose	sacarose	trealose	D-xilose	L-arabinose
3.12.1 ^(c)	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.12.2 ^(c)	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	a/-	a/-	n/-	n/-
3.13.1 ^(w)	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.13.1 ^(c)	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.14.1 ^(w)	a/-	n/a	a/-	a/-	a/f	a/f	a/-	a/-	n/-	n/-
3.15.1 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/+	a/f	a/f	n/-	n/-
3.16.3 ^(w)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/f	a/+	n/-	n/-	n/-
3.18.2 ^(c)	a/-	a/-	a/-	a/f	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.20.1 ^(w)	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.20.2 ^(w)	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.20.1 ^(c)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.20.2 ^(c)	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.20.3 ^(c)	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.21.1 ^(w)	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-
3.21.2 ^(w)	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.22.1 ^(w)	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.22.2 ^(w)	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.22.1 ^(c)	n/-	n/-	n/-	a/-	n/-	a/-	n/-	n/-	n/-	n/-
3.22.2 ^(c)	n/-	n/-	a/-	a/-	n/-	a/-	a/-	n/-	n/-	n/-
<i>P. stipitis</i>	n/a/+/-	n/-	a/+	n/-	n/-	n/-	a/-	a/+	a/+	a/-

n assimilação negativa
a assimilação positiva
- fermentação negativa
+ fermentação positiva
f fermentação fraca

A partir das três coletas foram isoladas 225 cepas, das quais 134 apresentaram a capacidade de fermentar a glicose. Dentre os 10 açúcares utilizados nos testes, poucas cepas fermentaram inulina (3.18.2^(c)), melibiose (2.9.3^(c) e 3.14.1^(w)) e lactose (2.9.3^(w)). Já

as principais pentoses presentes no bagaço da cana-de-açúcar, D-xilose e L-arabinose não foram fermentados por nenhuma das cepas isoladas.

De acordo com Hahn-Hägerdal et al. (2007), considerando que muitas espécies de leveduras metabolizam as pentoses, xilose e arabinose, poucas (aproximadamente 1%) são capazes de fermentar xilose a etanol. A levedura *Pichia stipitis*, considerada um microrganismo promissor para a produção em larga escala de etanol a partir de xilose não é capaz de fermentar L-arabinose a etanol, apenas produz massa celular (AGBOGBO & COWARD-KELLY, 2008).

Embora as cepas isoladas não tenham apresentado fermentação positiva para as pentoses presentes no bagaço da cana-de-açúcar, 19 foram capazes de assimilar a D-xilose e 12 cepas a L-arabinose.

Esses resultados, embora não tenham sido o esperado, pois pretendia-se isolar leveduras com a habilidade de fermentar as pentoses presentes no bagaço hidrolisado da cana-de-açúcar, levam a considerar a utilização das pentoses presentes no hidrolisado para a produção de massa celular, a qual pode ser utilizada como SCP (*single cell protein*). As leveduras são microrganismos interessantes para a produção de SCP. A quantidade de proteína obtida por fungos pode variar de 30 a 70%.

Anupama & Ravindra (2000) compararam as diferentes fontes de obtenção de SCP e atribuíram às leveduras algumas vantagens: rápido crescimento, assimilação de uma grande diversidade de substratos, baixo risco de contaminação e ausência de produção de toxinas. As desvantagens citadas por esse autor incluem a deficiência de aminoácidos que possuam enxofre na sua composição protéica e a necessidade de remoção do RNA.

6. CONCLUSÕES

- Dentre as cepas de leveduras isoladas a partir dos materiais coletados no Cerrado, o meio de cultura WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar) recuperou maior quantidade, em relação ao meio YMA (Yeast - Malt - Agar), devido à sua composição nutricional que possivelmente favoreceu o desenvolvimento destes microrganismos.
- Das cepas de leveduras obtidas das amostras coletadas nas duas regiões de Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar e Parque Estadual “Carlos Botelho”, o meio de cultura WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar) foi capaz de recuperar maior quantidade em relação ao meio CAC (CHROMagar Candida).
- As 134 cepas selecionadas, pela fermentação da glicose, não foram capazes de fermentar a D-xilose e L-arabinose, as principais pentoses presentes no bagaço da cana-de-açúcar, no entanto, 19 delas foram capazes de assimilar a D-xilose e 12 a L-arabinose.
- Embora a expectativa da proposta original fosse a obtenção de leveduras que fermentassem a D-xilose e a L-arabinose, o que de fato não ocorreu, os resultados apresentados, sugerem estudos posteriores com as linhagens que assimilam esses açúcares, no sentido da obtenção de SCP (*single cell protein*) a partir do bagaço hidrolisado da cana-de-açúcar.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a identificação das linhagens isoladas neste trabalho.
- Avaliar o potencial biotecnológico das linhagens isoladas, quanto à capacidade de produzir: enzimas, gomas, pigmentos, aromas, lipídeos, entre outros compostos.
- Realizar coletas em outras regiões dos biomas brasileiros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, J.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal Microbiology**, v. 43, p. 328-336, 1997.
- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1515-1524, 2008.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – 30 years of proálcool. **International Sugar Journal**, CIX, 1299, p. 195-200, 2007.
- ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459-479, 2000.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and identification**. 4rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811 p.
- BOEKHOUT, T.; PHAFF, H. J. Yeast Biodiversity. In: Boekhout, T.; Robert, V. (Ed.). **Yeast in food**. CRC Press, 2003, p. 1-38.
- CAMPBELL, I. Wild Yeasts in Brewing and Distilling. In: Priest, F. G.; Campbell, I. (Ed.). **Brewing Microbiology**, Aspen Publishers, USA, 1999.
- COLLA, E. **Seleção de leveduras produtoras de trealose e otimização da produção utilizando estratégias seqüenciais de planejamento experimental**. (2008). 115p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas

- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira (2008). Terceiro Levantamento, dezembro de 2008. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em janeiro de 2009.
- DIAS, M. O. S. **Simulação do processo de produção de etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço.** (2008). 253 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- du PREEZ, J. C.; PRIOR, B. A. A quantitative screening of some xylose-fermenting yeast isolates. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 241-246, 1985.
- GANTER, P. F.; STARMER, W. T. Killer factor as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. *Ecology*, v. 73, p. 54-67, 1992.
- GASCHET, A.; OLLIVIER, C. L.; LAPLANCHE, A.; VAGNER, O.; DALLE, F.; CUISENIER, B.; VALOT, S.; BONNIN, A. Evaluation of CadiSelect4, a new chromogenic medium for isolation and presumptive identification of *Candida* species from clinical specimens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 18, p. 89-95, 2008.
- GOLDEMBERG, J. Communication: The evolution of ethanol costs in Brazil. **Energy Policy**, v. 24, n. 12, p.1127-1128, 1996.
- HAGLER, A. N.; ROSA, C. A.; MORAIS, P. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, p.973-977, 1993.
- HAHN-HAGGERDAL, B.; JEPSSON, H.; OLSSON, L.; MOHAGHEGHI, A. An interlaboratory comparison of the performance of ethanol-producing

- microorganisms in a xylose-rich acid hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 62-72, 1994.
- HAHN-HAGËRDAL, B.; KARHUMA, C. F.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 937-953, 2007.
- JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN., Y. S.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocelluloses-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 319-326, 2007.
- KUYPER, M.; HARTOG, M. M.; TOIRKENS, M. J.; ALMERING, M. J.; WINKLER, A. A.; van DIJKEN, J. P. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast Research**, v.5, p. 399-409, 2005.
- LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; KWON, S.; GAËLLE, M.; STARMER, W. T.; JANZEN, D. H. *Metschnikowia lochheadii* and *Metschnikowia drosophilae*, two new yeast species isolated from insects associated with flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.103-109, 2001.
- LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T. Ecology and yeasts. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J. W. (Ed.) **The Yeasts, A Taxonomy Study**. 4th ed. Elsevier, Amsterdam, 1998, p. 21-30.
- LEE, R. L. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy. **Annual Review Energy Environmental**, v. 21, p. 403-465, 1997.

- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 627-642, 2006.
- LORA, E. S.; ANDRADE, R. V. Biomass as energy source in Brazil. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 777-788, 2007.
- MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 582-595, 2008.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. (2009) Relação das unidades produtoras cadastradas no departamento da cana-de-açúcar e agroenergia. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: abril/2009.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Ecossistemas. Disponível em: <http://www.ibama/ecossistemas.com.br>. Acesso em: março/2007.
- MORAIS, P. B.; MARTINS, M. B.; KLACZKO, L. B.; MENDONÇA-HAGLER, A. N. Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource portioning among *Drosophila* spp. **Appl. Environ. Microbiol**, v.61, p.4251-4257, 1995.
- MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; ABRANCHES, J.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts vectored by *Drosophila quadrum* (calloptera group) in tropical rain forests. **Review Microbiology**, v. 27, p. 87-91, 1996.
- MOREIRA, J.R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, p. 229-245, 1999.
- NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xilose-fermenting

- yeast, *Spathaspora passalidarum* gen.sp.nov. and *Candida jeffriesii* sp.nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232-1241, 2006.
- NIGAM, J. N. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysis to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. **Journal Biotechnology**, v. 97, 107-116, 2002.
- NIGAM, J. N.; IRELAND, R. S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M. A. Isolation and screening of yeasts that ferment D-xylose directly to ethanol. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1486-1489, 1985.
- ODDS, F.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, 1923-1929, 1994.
- PAREKH, S. R.; YU, S.; WAYMANN, M. Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolyzates for increased ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.25, p. 300-304, 1986.
- PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. Series on biotechnology, Pereira Jr., N. (Ed.), 2008, v. 2, 47 p.
- 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.
- PRADA, G. M. M.; PAGNOCCA, F. C. Ascomycetous yeasts associated with naturally occurring fruits in a tropical rain Forest. **Folia Microbiol**, v.42, n.1, 39-46, 1997.

- RAO, R. S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 19-24, 2008.
- ROSA, C. A.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; MONTEIRO, R. F. Yeast communities of cactus *Pilosocereus arrabidaei* and insects in the sand costal plains of southeastern Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.65, p.55-62, 1994
- RUIVO, C. C. C. **Ocorrência de leveduras em espécies vegetais nativas da Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, São Paulo.** (2005). 80 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, 279-291, 2003.
- SANTOS, E. A.; DE OLIVEIRA, R. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.27, n.1, p.33-40, 1996.
- SHNEIDER, H.; WANG, P. Y.; CHAN Y. K.; MALESZKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilis*. **Biotechnology Letters** 3:89-92, 1981.
- SHREEVE, J. Redesigning life to make ethanol. **Technology Review**, v. 109, p. 66-69, 2006.

SLININGER, P. J.; BOTHST, R. J.; VAN CAUWENBERGE, J. E.; KURTZMAN, C. P.

Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilis*.

Biotechnology and Bioengineering, 24:371-384, 1982.

SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T. W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, v.72, p.253-260, 2000.

STARMER, W. T.; GANTER, P. F.; ABERDEEN, V. The geographic distribution and genetics of killer phenotypes for the yeast *Pichia Kluyveri* across the United States. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 990-997, 1992.

SUH, S. O.; BLACKWELL, M. Three new beetle-associated yeasts in the *Pichia guilliermondii* clade. **FEMS Yeast Research**, v.5, P.87-95, 2004.

SUH, S. S.; MARSHALL, C. J.; McHUGH, J. V.; BLACKWELL, M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3137-3145, 2003.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

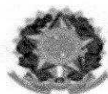
TOIVOLA, A.; YARROW, D.; BOSCH, E.; DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, p. 1221-1223, 1984.

TORNAL-LEHOCZKI, J.; PÉTER, G.; DLAUCHY, D. CHROMagar Candida medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. **Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 189-200, 2003.

- van MARIS, A. J. A.; ABBOT, D. A.; BELISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIDIKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391-418, 2006.
- VITAL, J. S. V.; ABRANCHES, J.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. M. Micocinogenic yeasts isolated from amazon soils of the Maracá ecological station, Roraima-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 230-235, 2002.
- WALTER, A.; ROSILLO-CALLE, F.; DOLZAN, P.; PIACENTE, E.; CUNHA, K. B. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. **Biomass and Bioenergy**, v.32, p. 730-748, 2008.
- WAYMAN, M.; PAREKH, S. Biotechnology of biomass conversion: fuels and chemicals from renewable sources. In: **Biotechnology Series**. Open University Press, UK, 1990, v. 30, p. 40-71.
- YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. (Ed.). **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1998, p. 77-100.
- ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocelluloses: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 17-34, 2001.

9. ANEXO

Autorização concedida pelo IBAMA para a realização das coletas.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 11953-1	Data da Emissão: 19/05/2008 14:11	Data de Validade: 19/05/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1886798	Nome: Raquel Andrade de Rossi	CPF: 299.177.478-93
Título do Projeto: ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS NATIVAS DOS BIOMAS BRASILEIROS COM HABILIDADE EM FERMENTAR À ETANOL AÇÚCARES NÃO CONVENCIONAIS		
Nome da Instituição: Universidade Estadual de Campinas		CNPJ: 46.068.425/0001-33

Observações, ressalvas e condicionantes

As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território

nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar

dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura

popular.

- Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
- Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
- A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/sisbio. Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
- O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
- Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
- Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
- As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Maria da Graça Stupiele Andrietta	Orientadora	095.761.328-86	12652428-2 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	UBATUBA	SP	Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba	UC Estadual
2	SAO MIGUEL ARCANJO	SP	Parque Estadual Carlos Botelho	UC Estadual
3	ITIRAPINA	SP	Estação Ecológica de Itirapina	UC Estadual

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 68682257

