

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À
MACRÓFITAS AQUÁTICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANDREA FORMOSO DE SOUZA

Orientadora: Prof. Dra. Patricia Valente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Dezembro, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À
MACRÓFITAS AQUÁTICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Área de concentração: Microbiologia de Ambientes Naturais e Antropogênicos), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia.

ANDREA FORMOSO DE SOUZA

Bióloga / PUCRS

Orientadora: Prof. Dra. Patricia Valente

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Patricia Valente por me acolher desde o início com seu sorriso e me aceitar como sua aluna de mestrado. Agradeço pela confiança depositada em mim e por ser mais do que uma orientadora nesses dois anos, e sim uma querida amiga.

À Prof^a. Maria Lúcia Scroferneker pelo incentivo e preocupação com o meu trabalho e por alegrar ainda mais o ambiente de laboratório.

Ao Prof. Paulo Abreu por disponibilizar equipamentos e transporte para as coletas.

Aos colegas do Lab 210 que tornaram esse período de convívio mais feliz e dividiram comigo seus conhecimentos contribuindo com o meu trabalho. Em especial, agradeço ao Maurício Ramirez, Sandra Mendes, Belize Leite, Priscilla Dallè e Paula Mattanna. Amigos queridos que espero levar para a vida toda.

À minha família pelo apoio, e agradeço especialmente ao Pablo, meu amor e melhor amigo, que me apoiou e incentivou durante os bons e maus momentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Autora: Andrea Formoso de Souza

Orientadora: Prof. Dr. Patricia Valente

¹RESUMO

Marismas são ecossistemas entremarés altamente produtivos que suportam grandes variações de salinidade e são cobertos por vegetação herbácea adaptada que abriga diversos microrganismos. Os objetivos do presente trabalho foram isolar e avaliar a diversidade e o potencial biotecnológico de leveduras associadas ao filoplano de macrófitas aquáticas de uma marisma da Ilha da Pólvora – RS. Foram realizadas cinco coletas de hastes e folhas de três espécies de macrófitas *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora* entre junho de 2012 e janeiro de 2013. As amostras foram colocadas em solução de Tween 20 a 0,5% e incubadas a 200 rpm por 30 minutos. Em seguida foram realizadas diluições decimais seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e um volume de 0,1mL foi inoculado em ágar malte levedura acidificado ao pH 4.0 e suplementado com 0.04% de cloranfenicol e 0.01% de bifenila. As placas foram incubadas por 7 dias a 20 – 25 °C e as colônias isoladas e purificadas em meio *Glucose Yeast Peptone*. Isolados de leveduras e fungos leveduriformes foram agrupados de acordo com a morfologia de colônia e testados quanto a afinidade ascomicética ou basidiomicética em meio uréia/DBB. O potencial biotecnológico dos isolados foi avaliado por meio de testes enzimáticos para a produção das enzimas de interesse industrial amilase, esterase, caseinase, celulase, gelatinase e lipase. As leveduras que obtiveram maior produção também foram testadas quanto à capacidade de degradar o corante azóico *Acid Red 357*. Foram obtidos 102 isolados, 37 leveduras de afinidade basidiomicética, 27 leveduras de afinidade ascomicética e 38 fungos leveduriformes. Cinco linhagens tiveram as regiões D1/D2 e/ou região ITS do DNA sequenciadas, sendo duas delas pertencentes à espécie *Hortaea werneckii*, de importância clínica. Dos 102 isolados, todos produziram lipase, 63,7% esterase, 50% gelatinase, 47% amilase, 45% caseinase e 45% celulase. As linhagens testadas no meio com o corante azóico obtiveram crescimento muito rápido e foram capazes de clarear a cor do meio, porém devem ser futuramente testadas em outras concentrações de corante para uma melhor visualização do resultado. Os resultados do trabalho demonstram o grande potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de plantas de marismas e, portanto, sua capacidade de contribuir para o avanço da biotecnologia.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (74 p.) Dezembro, 2014.

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF YEASTS ASSOCIATED TO AQUATIC MACROPHYTES

Autor: Andrea Formoso de Souza

Supervisor: Prof. Dr. Patricia Valente

¹ABSTRACT

Salt marshes are highly productive intertidal ecosystems that support large variations in salinity and are covered by herbaceous vegetation that home many microorganisms. The objectives of this study were to isolate and evaluate the diversity and the biotechnological potential of yeasts associated with phylloplane of aquatic weeds in a salt marsh on the island of Pólvora - RS. Five surveys were carried, between June 2012 and January 2013, and stems and leaves of three species of macrophytes, *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* and *Spartina densiflora*, were collected. The samples were placed in 0.5% Tween 20 solution and incubated at 200 rpm for 30 minutes. Decimal serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) were performed, and a volume of 0.1 mL was inoculated onto YM acidified to pH 4.0 and supplemented with 0.04% chloramphenicol and 0.01% biphenyl. Plates were incubated for 7 days at 20 - 25 ° C, and colonies were isolated and purified in GYP medium. Isolates of yeasts and yeast-like fungi were grouped according to colony morphology, and tested for ascomycetous or basidiomycetous affinity in urease / DBB medium. The biotechnological potential of the isolates was assessed by enzymatic assays for the production of enzymes of industrial interest amylase, esterase, caseinase, cellulase, lipase and gelatinase. Yeasts with the greatest production were also tested for their ability to degrade azo dye Acid Red 357. 102 yeast isolates were obtained, 37 with basidiomycetous affinity, 27 with ascomycetic affinity and 38 yeast-like fungi. Five strains had the D1 / D2 regions and / or the ITS region of rDNA sequenced, two of which is *Hortaea werneckii*, a species of clinical importance. Of the 102 isolates, all produced lipase, 63.7% esterase, 50% gelatinase, 47% amylase, 45% caseinase and 45% cellulase. The strains tested in the medium with the azo dye grew very rapidly, and were able to lighten the color of the medium, but they must be further tested in other dye concentrations for a better evaluation of the result. Our results demonstrate the great biotechnological potential of yeasts and yeast-like fungi associated with the phylloplane of macrophytes, and therefore their ability to contribute to the advancement of biotechnology.

¹ Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (74 p.) Dezembro, 2014.

Índice

1.	Introdução.....	1
2	Revisão bibliográfica.....	4
2.1	Marismas	4
2.2	Leveduras e fungos leveduriformes	6
2.3	Microbiota do filoplano.....	8
2.4	Potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes.....	10
3	Material e Métodos.....	13
3.1	Área de estudo.....	13
3.2	Experimento	15
3.3	Dados ambientais.....	16
3.4	Contagem e isolamento de leveduras.....	16
3.5	Caracterização fenotípica dos isolados	18
3.6	Caracterização molecular dos isolados	19
3.6.1	Extração de DNA.....	19
3.6.2	Sequenciamento da região D1/D2 do LSU rDNA e/ou região ITS.....	20
3.7	Avaliação do potencial biotecnológico	22
3.7.1	Produção de amilase	23
3.7.2	Produção de caseinase	24
3.7.3	Produção de gelatinase.....	25
3.7.4	Produção de celulase	26
3.7.5	Produção de esterase (Tween 80)	27
3.7.6	Produção de lipase (tributirina)	28
3.8	Verificação da degradação de corante azóico.....	29
4	Resultados e discussão.....	31
4.1	Isolamento, contagem e agrupamento morfológico dos isolados.....	31
4.2	Identificação molecular dos isolados.....	36
4.3	Potencial biotecnológico.....	37
4.3.1	Produção de amilase	39
4.3.2	Produção de caseinase	41
4.3.3	Produção de gelatinase.....	41

4.3.4	Produção de celulase	42
4.3.5	Produção de esterase.....	43
4.3.6	Produção de lipase	44
4.4	Degradação de corante azóico	47
5	Conclusões.....	50
6	Perspectivas.....	52
7	Referências bibliográficas.....	53
8	Anexos	60

Relação de Figuras

- Figura 1 Local de estudo: Ilha da Pólvora, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Figura 2 Marisma da Ilha da Pólvora A: Pontos de coletas das macrófitas na marisma (1: *S. maritimus*, 2: *S. alterniflora*, 3: *S. densiflora*; B: *S. maritimus*; C: *S. alterniflora*; D: *S. densiflora*).
- Figura 3 Teste da urease / DBB. Tubo 1: isolado positivo (afinidade basidiomicética); tubo 2: isolado negativo (afinidade ascomicética).
- Figura 4 Halos de degradação formados ao redor das colônias produtoras de amilase à esquerda da placa.
- Figura 5 Halos de degradação esbranquiçados formados ao redor das colônias produtoras de caseinase.
- Figura 6 Halos de degradação transparentes formados ao redor das colônias produtoras de gelatinase inoculadas à direita da placa.
- Figura 7 Halos de degradação alaranjados formados ao redor das quatro colônias produtoras de celulase inoculadas.
- Figura 8 Halos de degradação formados ao redor das duas colônias de cor creme que produziram esterase.
- Figura 9 Halos de degradação transparentes formados ao redor das colônias produtoras de lipase.
- Figura 10 Percentual de isolados por grupo taxonômico
- Figura 11 Representação gráfica dos isolados do filoplano de cada espécie de macrófita.
- Figura 12 Percentagem de produção enzimática por grupo taxonômico.
- Figura 13 Média da atividade enzimática dos isolados de leveduras e fungos leveduriformes do filoplano de macrófitas aquáticas ($Pz < 0,64$ fortemente positivos).
- Figura 14 Relação de representantes de leveduras e fungos leveduriformes produtores de enzimas por espécie de macrófita aquática.
- Figura 15 Placas (1 e 2) com meio adicionado de *Acid Red 357* 25mg/L, 1: controle negativo, sem inoculação; 2: meio inoculado com levedura (Bel 101). Placa 3: isolado Bel 101 inoculado em meio sem corante.

Relação de Tabelas

Tabela 1	Condições ambientais registradas nos dias das coletas (valores calculados a partir da média mensal, exceto para precipitação que representa o índice total acumulado).
Tabela 2	Isolados de leveduras melhores produtores de amilase.
Tabela 3	Isolados de leveduras melhores produtores de caseinase.
Tabela 4	Isolados de leveduras melhores produtores de gelatinase.
Tabela 5	Isolados de leveduras melhores produtores de celulase.
Tabela 6	Isolados de leveduras melhores produtores de esterase.
Tabela 7	Isolados de leveduras melhores produtores de lipase.

Lista de Abreviaturas

DBB: Diazonium Blue B

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

GYP: Glicose, extrato de levedura e peptona

ITS: Espaçador interno transcrito

M: molar

Min: minuto(s)

mL: mililitro

μ L: microlitro

ng: nanograma

pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio em uma solução

RNA: Ácido ribonucléico

rpm: Rotação por minuto

YM: Extrato de malte e extrato de levedura

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

s: segundo(s)

SDS: Dodecilsulfato de sódio

TE: Tris- EDTA

TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano

Tween 20: Polioxietileno Sorbitan Monolaurato

Tween 80: Polioxietileno-20-sorbitan Monooleato

1. Introdução

Marismas são ecossistemas de transição de rica diversidade biológica e alta produção primária. São ambientes cobertos por vegetação herbácea frequentemente alagados e capazes de suportar grande variação de salinidade.

A marisma da Ilha da Pólvora (Rio Grande do Sul, RS) localiza-se no estuário da Lagoa dos Patos e sua cobertura vegetal é dominada por espécies herbáceas. *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora* são espécies de macrófitas abundantes nesse ambiente, com grande capacidade de fixar carbono. Alguns estudos acerca da decomposição dessas plantas aquáticas foram realizados, porém em relação a associações de leveduras e fungos leveduriformes às plantas *in natura* existe apenas o estudo comparativo de Pagani (2013), que este autor testou um pequeno número de isolados e concluiu que ambas folhas frescas e em decomposição comportam leveduras com alta capacidade de produzir enzimas de interesse industrial como lipase, esterase, caseinase e amilase.

Leveduras associadas ao filoplano de plantas são bastante relatadas, porém seu potencial biotecnológico ainda é pouco explorado. Para se fixarem e desenvolverem na superfície foliar, as leveduras precisam de aparatos enzimáticos para assimilar nutrientes do substrato, para isso produzem enzimas extracelulares hidrolíticas como celulases, amilases, esterases etc.

Estudos recentes comprovam que leveduras e fungos leveduriformes isolados de bromélias, figueiras e *Hibiscus* representam uma boa fonte de produção de enzimas.

O utilização de fungos e leveduras como recurso biotecnológico na produção de enzimas de aplicação industrial (ex: alimentícia, farmacêutica, têxtil) tem aumentado o interesse sobre atividade enzimática desses microrganismos. A produção de enzimas como lipases, proteinases e celulases ocorre naturalmente nos microrganismos, o que os torna fontes enzimáticas de baixo custo e mais facilmente aceitas para comercialização. Além disso, organismos versáteis podem trazer novas soluções para biodegradação de resíduos e por isso se faz necessário maiores estudos nessa área a fim de isolar e selecionar novas linhagens.

A partir do exposto acima, este trabalho tem como objetivo principal:

- avaliar o potencial biotecnológico de leveduras associadas a macrófitas aquáticas da Ilha da Pólvora, situada no município de Rio Grande, no Litoral Sul do Rio Grande do Sul.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Marismas

Marismas são ecossistemas costeiros entremarés recobertos por vegetação herbácea que sofrem alagamento periódico e variação de salinidade. A elevada produção de matéria orgânica é característica desses ecossistemas. Regiões de marisma representam importantes agentes geomorfológicos formadores de costa, fornecendo barreiras contra o avanço do mar e favorecendo a deposição e a fixação de sedimentos, com consequente redução da hidrodinâmica sobre a costa e a erosão costeira (Costa & Marangoni, 2010).

Marismas têm distribuição global, ocorrendo sobretudo nas zonas temperadas de altas latitudes, sendo substituídas por manguezais nas costas tropicais e subtropicais (Deegan *et al.*, 2012). Os ecossistemas manguezal e marisma geralmente estão associados às margens de baías, zonas estuarinas, lagunas e reentrâncias costeiras, onde ocorre o encontro das águas do rio e do

mar, ou diretamente expostos à linha da costa. Esses ecossistemas são considerados estáveis pela sua complexidade e resiliência característica (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2005; Stein, 2011).

No Brasil, as regiões de marismas vêm sendo suprimidas ao longo dos anos pela erosão natural, além de atividades antrópicas de expansão urbana, portuária e industrial que vêm modificando a cobertura vegetal local (Costa; Marangoni, 2010). A importância ecológica das marismas resultou na proteção permanente desse ecossistema pela legislação federal (Lei n.º 4.771, Código Florestal de 1965) e municipal (Lei n.º 4.116, Lei de Regulamentação de Ocupação dos Espaços Naturais de 1986).

As principais plantas colonizadoras das marismas baixas e médias são espécies da família Poaceae *Spartina alterniflora* *Spartina densiflora*, além das Cyperaceae *Scirpus maritimus* e *Scirpus olneyi* (Costa, 1997). Macrófitas aquáticas são recursos importantes para a manutenção das cadeias tróficas nesses ecossistemas por participarem de vários processos (químicos, físicos e biológicos), desempenhando papel importante na fixação do carbono atmosférico ou aquático (Esteves, 1998; Esteves & Camargo, 1986).

O estuário da Lagoa dos Patos (RS) tem cerca de 70 km² das margens e ilhas recobertas por marismas irregularmente alagadas, constituindo 93% das marismas da costa gaúcha (Coimbra & Costa 2006; Marangoni & Costa 2009).

A região estuarina da Lagoa dos Patos apresenta elevadas taxas de produtividade primária e uma considerável diversidade biológica. Suas áreas

de marismas têm importante papel ecológico, servindo como área de reprodução e abrigo para muitas espécies marinhas, que encontram neste ambiente proteção e disponibilidade de alimentos. No ambiente estuarino-lagunar a maior parte da matéria e energia fixada pelos produtores primários é direcionada pela teia trófica através da cadeia alimentar detritívora, onde os microrganismos atuam como agentes decompositores da biomassa de plantas superiores (Seeliger *et al.*, 1998).

2.2 Leveduras e fungos leveduriformes

Taylor *et al.* (2013) sugerem que o número de espécies de fungos na Terra estaria entre 6 milhões e estima-se que menos de 10% dessa diversidade esteja descrita (Hawksworth, 2001). No trabalho de Kurtzman *et al.* (2011) acerca da taxonomia de leveduras, estão descritas mais de 149 gêneros e 1500 espécies de leveduras. Embora microrganismos exerçam funções essenciais para a sobrevivência das formas de vida na Terra, pouco se conhece a respeito de vírus, bactérias (cerca de 1% das espécies) e fungos (5%) (Hammond, 1995; Canhos & Manfio, 2010).

Fungos contêm pigmentos responsáveis pelas suas variadas cores, porém não têm função fotossintetizante pois são heterotróficos e obtêm energia através da absorção de compostos orgânicos. As leveduras apresentam características próprias desse reino como células eucariontes providas de núcleo, organelas envoltas por membranas e ausência de motilidade. E diferenciam-se de outros fungos pela morfologia predominantemente unicelular.

Realizam reprodução assexuada por fissão ou brotamento, ou sexuada por meio de esporos denominados ascósporos, no filo Ascomycota ou basidiósporos, no filo Basidiomycota (Madigan *et al.*, 2010).

Os fungos leveduriformes ou *yeast-like* são fungos dimórficos, e sua variação na forma pode estar ligada à disponibilidade de nutrientes no ambiente. Estes fungos apresentam-se frequentemente na forma filamentosa e portanto são isolados e identificados como filamentosos. Porém, em meios ricos em açúcares desenvolvem-se na forma unicelular (Kurtzman & Fell, 1998).

No processo de nutrição por absorção, os fungos sintetizam enzimas (lipases, amilases, celulasas, etc.) capazes de decompor seu substrato, constituído por matéria orgânica viva ou morta, em moléculas menores e mais facilmente assimiláveis. A capacidade de sintetizar enzimas faz dos fungos organismos fundamentais na ciclagem de nutrientes e na decomposição de grande parcela da matéria orgânica produzida nos solos e demais ecossistemas (Christensen, 1995).

Os esporos fúngicos são estruturas que funcionam como veículos de disseminação destes organismos na natureza, permitindo, por exemplo que leveduras alcancem os mais diversos ambientes. Leveduras já foram isoladas de néctar de flores, resinas de árvores, superfícies de plantas, água doce e marinha, solo, frutos, corpo humano e detritos em geral (Bondy-Mills, 2006; Deak, 2006; Alexopoulos *et al.*, 1996; Phaff & Stamer, 1987; Pimenta *et al.*, 2009).

2.3 Microbiota do filoplano

Os nutrientes disponíveis na superfície foliar fazem do filoplano um habitat importante para grande número de microrganismos, tais como leveduras e fungos filamentosos. Como apresentado nos trabalhos de Andrew & Harris (2000) e Fonseca & Inácio (2006), leveduras e fungos filamentosos constituem o principal grupo colonizador da microbiota presente no filoplano. Estas associações entre leveduras e filoplano têm sido relatadas nos últimos anos, em folhas de bromélias (Valente, 2000 e Landell, 2006; 2009), *Hibiscus* (Fuentefria, 2004), figueiras (Mautone, 2008), flora do Cerrado (Sperandio, 2012) e de macrófitas aquáticas (Sousa, 2010). A rica comunidade microbiana do filoplano têm demonstrado ser uma fonte importante de novas espécies (Fonseca & Inácio, 2006; Landell *et al.*, 2010).

No filoplano, a maioria das espécies de leveduras isoladas são de afinidade basidiomicética devido à sua capacidade de assimilar nutrientes de diferentes fontes de carbono, disponíveis em substratos variados de componentes complexos, como folhas e solo. Entre os principais gêneros encontrados na superfície foliar estão: *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*. Já leveduras ascomicéticas utilizam um número restrito de fontes de carbono, frequentemente encontradas em substratos compostos de açúcares mais simples, como frutos. O gênero *Candida* é o mais comum entre leveduras do filoplano (Santos *et al.*, 1996; Kurtzman & Fell, 1998). São comuns associações entre plantas e leveduras, demonstrando grande influência destes fungos na modulação do equilíbrio destes micro-habitats

(Valente, 2000; Morais *et al.*, 2006; Nakase *et al.*, 2006; Kachalkin *et al.*, 2008; Mautone, 2008; Sousa, 2010).

Apesar da comprovada importância desses microrganismos na cadeia detritívora de ambientes com alta produtividade primária, a comunidade bacteriana é mais abundante no filoplano e também a mais estudada (Leite, 2014). Ainda são escassos os estudos realizados acerca de leveduras do filoplano no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente, assim como o conhecimento sobre a abundância, diversidade e potencial biotecnológico de espécies que o habitam.

Com relação aos fungos presentes na região de marisma do estuário da Lagoa dos Patos, temos estudos de leveduras no processo de decomposição de macrófitas. Hickenbick e colaboradores (2004) observaram grande quantidade de esporos fúngicos durante a decomposição de três espécies de macrófitas aquáticas do local, porém não houve identificação desses microrganismos. Silveira (2012) analisou amostras de água do estuário e a colonização de fungos durante a decomposição de macrófitas aquáticas, embora sem identificação molecular dos isolados. Leite (2014) isolou leveduras e fungos leveduriformes de macrófitas em decomposição em diferentes espaços de tempo e avaliou as mesmas quanto ao seu potencial biotecnológico. As espécies mais frequentes também foram de maior atividade enzimática: *Aureobasidium pullulans*, *Bullera pseudoalba*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces ruberrimus* e *Yarrowia lipolytica*.

2.4 Potencial biotecnológico de leveduras e fungos

leveduriformes

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais estudada entre as leveduras, sendo usada pelo homem em processos fermentativos por milhares de anos. No entanto, estudos que avaliam o potencial biotecnológico de outras leveduras são pouco frequentes, mas têm demonstrado que leveduras isoladas de ambientes tropicais – em especial do filoplano – representam uma fonte de várias enzimas com potencial para uso industrial (Abranches *et al.*, 1997; Braga *et al.*, 1998; Buzzini & Martini, 2002; Fuentefria & Valente, 2005). No Brasil, diversos trabalhos demonstram espécies de leveduras isoladas com boa capacidade de produção de enzimas com aplicação industrial (Fuentefria, 2004; Mautone, 2008 e Landell, 2006; 2009).

Segundo Alexopoulos *et al.* (1996), as leveduras aquáticas têm elevada produção de enzimas e são capazes de degradar variados tipos de substratos. Nos ecossistemas aquáticos os nutrientes do detrito foliar são dissolvidos e disponibilizados na coluna d'água estimulando a produtividade primária, secundária e a alça microbiana o que implica na garantia do balanço energético destes ambientes (Moriarty, 1997).

A respeito do potencial biotecnológico de espécies de leveduras do estuário da Lagoa dos Patos, temos apenas dois trabalhos recentes (Pagani, 2013; Leite, 2014) sendo que o último avaliou também a comunidade de leveduras associada à decomposição das macrófitas. Destacaram-se a produção enzimáticas de lipase, esterase, celulase, caseinase e amilase em ordem quantitativa. Pagani (2013) comparou o potencial enzimático entre

leveduras e fungos leveduriformes associados a macrófitas em decomposição e macrófitas *in natura* concluindo que ambos os substratos são boas fontes de enzimas de interesse industriais.

Microrganismos e invertebrados constituem cerca de 90% das espécies da biosfera e desempenham um papel fundamental no funcionamento de todo ecossistema (Canhos & Manfio, 2010) e o escasso conhecimento desses grupos faz necessário mais estudos acerca destes, suas associações, influência e importância nos diversos ambientes em que estão presentes, assim como seu potencial biotecnológico para fins industriais.

Os fungos leveduriformes *Aureobasidium pullulans* são microrganismos ubíquos, do filo Ascomycota, frequentemente encontrados no filoplano de plantas e frutos tropicais. Estes fungos são produtores de uma ampla variedade de enzimas de interesse industrial. Eles podem agir como bioindicadores de poluição e fonte comprovada de proteína de célula única. Sua importância industrial vem da capacidade de produzir pululana, um polissacarídeo de aplicação nas indústrias farmacêuticas, cosmética e do papel (Deshpande, 1992, Rich *et al.*, 2013). *A. pullulans* também é capaz de produzir enzimas degradativas como a xilanase e a lacase. Embora ainda sejam poucos os relatos sobre a produção de lacases por *A. pullulans*, a potencial aplicação dessa enzima em novos métodos de biodegradação tem solicitado maior investigação sobre esses fungos, considerados boas fontes microbianas dessa enzima.

Lacases são polifenol oxidases conhecidos componentes do sistema enzimático fúngico para degradação da lignina. Elas são capazes de catalisar

reações de desmetilação, que é o estágio inicial no processo de biodegradação de cadeias poliméricas, que resultam na decomposição de macromoléculas de lignina pela ruptura dos anéis aromáticos. Em processos de oxidação de muitos compostos (principalmente fenólicos), a lacase apresenta uma grande especificidade para um grande número de compostos xenobióticos e efluentes industriais. Sua potencial aplicação na indústria inclui degradação de corantes da indústria têxtil e materiais tóxicos. Rich *et al.* (2013) demonstraram que a produção de lacases por *A. pullulans* está associada à produção de pigmentos pelas linhagens.

A biodegradação tem se mostrado um método muito promissor para tratamento de efluentes. Processos de biorremediação são uma alternativa economicamente mais interessante comparada aos principais métodos físico-químicos de tratamento de efluentes. A busca continua de organismos versáteis com capacidade de degradar diversos poluentes de maneira eficiente e com baixo custo é o que motiva pesquisas de biodegradação (Kunz, 2001). Os corantes azóicos são compostos químicos persistentes de preocupação ambiental, capazes de manter sua cor e integridade estrutural mesmo após longos períodos e ação microbiana. São a classe de corantes mais utilizada na indústria, constituindo a maior parte dos efluentes industriais têxteis (Zee, 2002). Além da indústria têxtil estão presentes na farmacêutica, de tintas, papel, couro e cosmética (Wallace, 2001; Almeida, 2008).

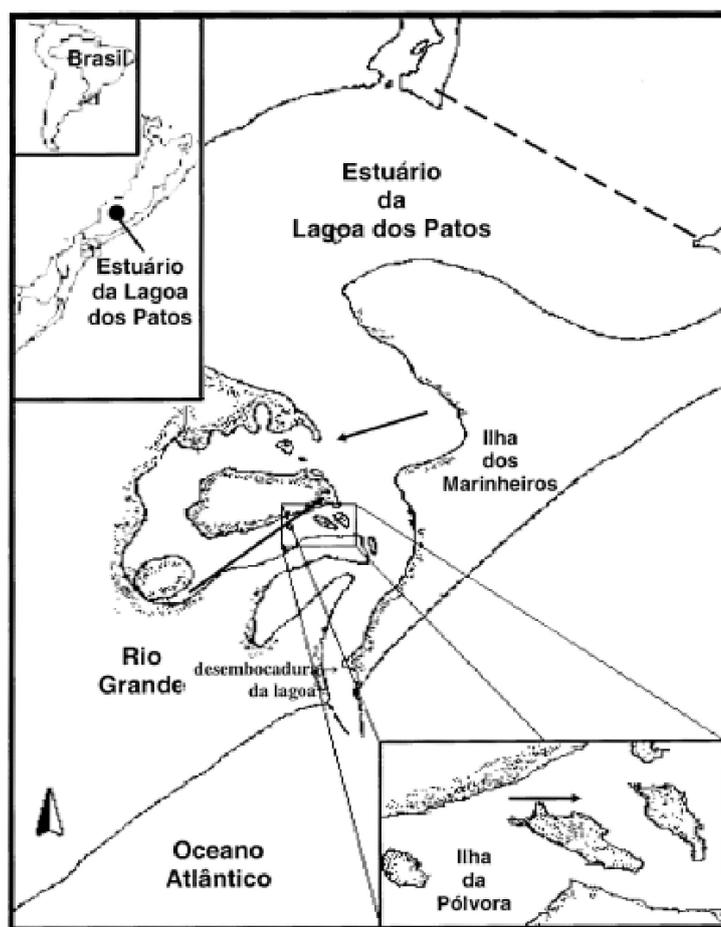
3 Material e Métodos

3.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas em uma região de marisma da Ilha da Pólvora (Fig. 1). A Ilha da Pólvora possui 45 hectares e é uma das ilhas do estuário da Lagoa dos Patos.

A Lagoa dos Patos situa-se na planície costeira do Rio Grande do Sul ($32^{\circ} 10' S$ e $52^{\circ} 15' W$) e é considerada a maior lagoa costeira estrangulada do mundo com aproximadamente 10.000 km^2 . A lagoa recebe cargas de água doce dos rios ao norte da planície costeira do Rio Grande do Sul e dos rios afluentes da Lagoa Mirim, assim formando um escoadouro natural da bacia hidrográfica (cerca de 2.000 km^2) para o oceano (Möller & Fernandes, 2010). Na sua extremidade sul, a Lagoa dos Patos forma uma região estuarina de 1.000 km^2 que conecta ao Oceano Atlântico através de um estreito canal. O estuário da Lagoa dos Patos compreende cerca de 170 km^2 de áreas rasas ($<1,5\text{m}$ de profundidade), ambiente favorável ao desenvolvimento de

fanerógamas enraizadas e macroalgas bentônicas (Copertino & Seeliger, 2010).



Hickenbick & Abreu, 2004

Figura 1. Ilha da Pólvora, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil (Fonte: Hickenbick *et al.*, 2004).

A Ilha da Pólvora ($32^{\circ}01'S$, $52^{\circ}06'W$) possui uma superfície de 45 ha, sendo quase toda área coberta por marismas. A Ilha serviu de base militar durante 134 anos e devido ao isolamento imposto pelos militares, têm suas marismas entre as mais preservadas do estuário, mesmo localizando-se a

menos de 500 m do centro do município de Rio Grande. Atualmente sob tutela da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, tornou-se local dedicado à preservação, pesquisa e educação ambiental, e abriga um Eco-museu aberto ao público nos finais de semana.

3.2 Experimento

Foram realizadas seis coletas de macrófitas aquáticas entre junho de 2012 e janeiro de 2013, representativas das diferentes épocas do ano analisadas. Em cada coleta foram amostradas macrófitas pertencentes às espécies *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus*, escolhidas em virtude da abundância no local de estudo. As amostras foram identificadas pelo coletor de acordo com a localização dos bancos de macrófitas na marisma e de acordo com a anatomia da planta.

Scirpus maritimus apresenta o colmo triangular e folhas largas, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora* possuem ambas colmo circular sendo diferenciadas pelo diâmetro, bastante reduzido em *S. densiflora* e pelas folhas em folhas estreitas e fechadas junto ao seu colmo.

Hastes e folhas das três espécies de macrófitas *in natura* foram retiradas de três pontos distintos da marisma. As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos, transportadas em caixas refrigeradas e então processadas em laboratório dentro de 24 horas.

3.3 Dados ambientais

As condições ambientais nas datas de coletas foram registradas e fornecidas pelo Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos da FURG, em Rio Grande. Dados como temperatura do ar, temperatura da água, salinidade e valores de precipitação mensais foram fornecidos e utilizados para posterior análise e comparação neste estudo entre fatores abióticos e a comunidade microbiana das macrófitas.

3.4 Contagem e isolamento de leveduras

Para este estudo foram realizadas cinco coletas de macrófitas *in natura* entre os meses de junho de 2012 até janeiro de 2013 em três pontos de região de marisma da Ilha da Pólvora, no Estuário da Lagoa dos Patos. As leveduras foram isoladas das hastes e folhas de três espécies de macrófitas aquáticas *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora* (Fig. 2), plantas predominantes na área de coleta. As plantas de cada espécie foram coletadas assepticamente e colocadas em sacos plásticos individuais etiquetados. Em seguida, as amostras foram levadas para o Laboratório de Micologia da UFRGS, onde foram processadas para obtenção dos isolados de leveduras.

Primeiramente, as plantas foram cortadas em pequenos pedaços com lâmina estéril e 3g de cada amostra foi colocada em frascos de vidro cônico contendo 30 mL de detergente Tween 20 na concentração 0,5%. Os frascos foram colocados em agitador mecânico (“*shaker*”) com agitação a 200

rpm por 30 minutos. A partir da mistura, foram realizadas diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e destas, um volume de 0,1mL foi pipetado e inoculado com técnica de *spread plate* em ágar YM (1% glicose, 0.3% extrato de malte, 0.3% extrato de levedura, 0.5% peptona, 2% ágar, acidificado ao pH 4.0 e suplementado com 0.04% de cloranfenicol e 0.01% de bifenila).

Após incubação a 20 – 25°C por 7 dias, as placas foram examinadas e fotografadas e as unidades formadoras de colônias foram contabilizadas. As colônias presentes foram agrupadas de acordo com a sua morfologia e de acordo com os seguintes aspectos: cor, tamanho, forma, elevação, margem, brilho e consistência. Os isolados representantes de cada tipo morfológico foram purificados em ágar GYP (2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura e 2% ágar) pela técnica de esgotamento em placas. Os isolados de leveduras foram conservados em tubos com ágar GYP inclinado cobertos com uma camada de óleo mineral estéril a 4°C.

As plantas foram coletadas de três pontos distintos dessa marisma (Fig. 2). As metodologias de isolamento, de identificação molecular e avaliação do potencial biotecnológico das leveduras foram realizadas de acordo com as utilizadas por Landell (2006; 2009).

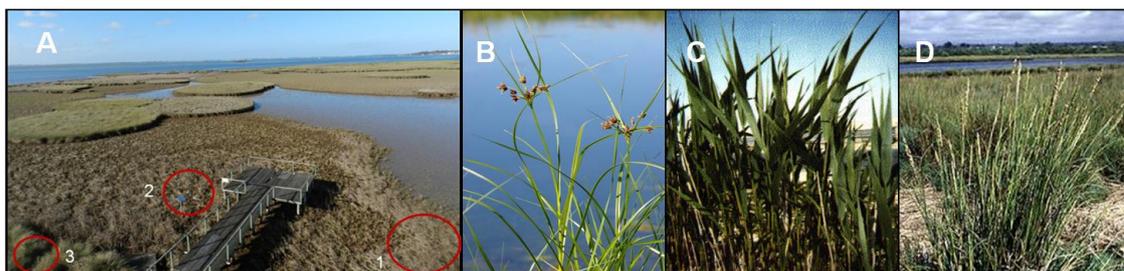


Fig. 2 Marisma da Ilha da Pólvora A: Pontos de coletas das macrófitas (1: *S. maritimus*, 2: *S. alterniflora*, 3: *S. densiflora*; B: *S. maritimus*; C: *S. alterniflora*; D: *S. densiflora*.

3.5 Caracterização fenotípica dos isolados

Os isolados foram testados quanto a capacidade de degradar uréia e reagir ao corante DBB. O teste com o *Diazonium Blue B* é um teste bioquímico que distingue as leveduras e os fungos leveduriformes em dois grupos distintos: Ascomycota ou Basidiomycota. A parede celular das colônias basidiomicéticas reagem ao DBB tingindo-se de vermelho, ao contrário das colônias ascomicéticas que não reagem ao corante (Deak, 2006).

As leveduras foram inoculadas a partir de culturas frescas em ágar *Yeast Carbon Base - Uréia* inclinado acrescido de fucsina ácida até atingir um cor-de-rosa escuro. Os tubos foram incubados a 25°C por 3 dias. A coloração resultante do ágar indicava resultado negativo (cor-de-rosa) ou positivo (branco) demonstrando a atividade da enzima urease degradando o substrato do meio de cultivo. Após a leitura dos 3 dias, as culturas foram incubadas em estufa a 60°C por 18 horas e posteriormente foi adicionada solução tamponada TRIS HCl 1M pH 7,4 com o corante DBB. Na Figura 3, observa-se o resultado de dois isolados testados, onde a colônia positiva para o teste reagiu ao

corante e foi imediatamente corada de vermelho, já com a negativa isso não ocorre.



Fig 3. Teste da urease/DBB. Tubo 1: isolado positivo (afinidade basidiomicética); tubo 2: isolado negativo (afinidade ascomicética).

3.6 Caracterização molecular dos isolados

As leveduras foram identificadas por meio de métodos moleculares, passando pelas seguintes etapas: agrupamento dos isolados por morfotipos, seleção de representantes dos diferentes morfotipos obtidos, extração do DNA genômico total dos isolados e sequenciamento das regiões D1/D2 e/ou ITS para fins de identificação em nível de espécie.

3.6.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico total das leveduras isoladas foi realizada a partir de culturas puras dos isolados previamente cultivados em ágar YEPG (2% glicose, 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 2%

ágar) e incubados por 3-5 dias a temperatura de 23-25°C. Alçadas de colônias puras foram inoculadas em 0,5 mL de tampão de lise celular (0,15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 2% SDS, pH 8) e incubadas à 65°C pelo período de uma hora. A seguir foi adicionado um volume de 0,2mL de acetato de potássio 5M pH 4,8 em cada tubo, a solução foi ressuspensa por no mínimo 30 segundos e as amostras foram acondicionadas em banho de gelo por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. A etapa de centrifugação foi repetida para eliminar impurezas, e o sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo. O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol gelado à -20°C. Os tubos foram gentilmente agitados por 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 0,5 mL de etanol a 70%, conservado a -20°C em cada tubo e as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 50 µL de TE (TRIS-EDTA, pH 7,4) tratadas com 2,5 µL de RNase (conservada à -20°C). A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram verificadas através de eletroforese de DNA em gel de agarose 0,8-1%.

3.6.2 Sequenciamento da região D1/D2 do LSU rDNA e/ou região ITS

Para amplificação da região D1/D2 do LSU rDNA, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA

AAG-3') e NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (O'Donnel, 1993). Para as reações de amplificação, foi utilizado um volume final de 25µL, com quantidade de DNA entre 20 e 30 ng, 1 U *Taq* polimerase (Invitrogen), 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2,5 mM MgCl₂. O programa de amplificação teve desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 33 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 30s e 72°C por 1 min, com uma extensão final de 72°C por 1 min.

Para amplificação da região ITS, que compreende os espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2 e o gene do rRNA 5,8S, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'). A reação de amplificação desta região é semelhante à reação de amplificação da região D1/D2 do LSU rDNA, com a substituição dos oligonucleotídeos iniciadores. O programa de amplificação teve desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 45s, 56°C por 30s e 72°C por 1 min, com uma extensão final de 72°C por 7 min.

Os *amplicons* foram purificados em gel de agarose 1.8% utilizando o kit de purificação Invisorb Fragment Clean Up (250) (Invitex), conforme as instruções do manual. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria, em comprimento de onda de 260 nm, e concentradas a 60 ng/µL para a reação de sequenciamento. O sequenciamento foi feito pelo método de Sanger na empresa Ludwig Biotec.

As sequências foram obtidas por meio do software ChromasPro, alinhadas por meio do programa MEGA versão 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) e analisadas no programa BLAST Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) (Altschul *et al.*, 1997), disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

3.7 Avaliação do potencial biotecnológico

O potencial biotecnológico das leveduras foi avaliado quanto à capacidade de produzir enzimas, seguindo a metodologia adotada por Landell (2009) com modificações. Foram realizados testes enzimáticos de lipases (tributirina e Tween 80), proteases (caseína e gelatina) e polissacarases (amido e carboximetilcelulose).

Isolados foram cultivados em ágar YEPG por 72 horas a 25°C e então inoculados por picada nos meios para testes enzimáticos contendo substrato. Cada isolado foi semeado em placa e incubado por 7 dias a temperatura de 22-25°C. A visualização dos halos após o período de incubação foi realizada através de revelação com corantes e solução específica do teste ou simples observação de halos de precipitação. Todos os halos formados e suas respectivas colônias foram medidos com paquímetro digital.

A produção enzimática dos isolados foi medida através do Pz (Precipitation zone). O Pz é expresso pela razão entre o diâmetro médio da colônia e o diâmetro médio da colônia mais o halo de degradação (Hankin & Anagnostakis, 1975).

Todos os isolados foram testados em triplicata e a produção enzimática de cada um foi calculada a partir do seu potencial enzimático (Pz). Isolados com $Pz = 1$ foram considerados negativos, $Pz \geq 0,64 < 1$ foram considerados fracamente positivos e $Pz < 0,64$ fortemente positivos (COSTA, 2006; PRICE et al., 1982; RIBAS; MARCHESAN; ONOFRE, 2009).

3.7.1 Produção de amilase

A produção de amilase foi testada por meio da degradação do amido solúvel (Buzzini & Martini, 2002; Strauss *et al.*, 2001) no meio de cultivo. Os isolados foram inoculados em placas com ágar amido de composição 0,67% YNB, 0,2% amido e 2% ágar. A revelação foi realizada adicionando-se solução de lugol às placas e após 30 minutos, o surgimento de um halo de cor amarela ou vermelha ao redor das culturas indica resposta positiva (Fig. 4). A reação ocorre devido a captura do iodo pelas moléculas polissacarídeas amilase e amilopectina, que formam a estrutura básica do amido, formando um composto escuro (MacFaddin & Lippincott, 2000).

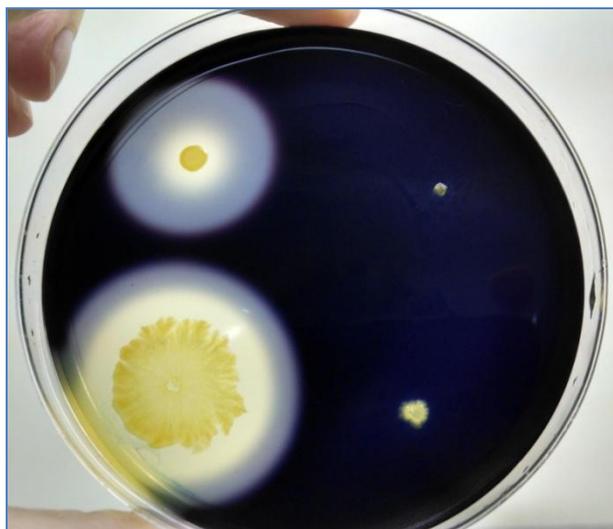


Fig. 4: Halos de degradação formados ao redor das colônias produtoras de amilase à esquerda da placa.

3.7.2 Produção de caseinase

Para testar a atividade caseinolítica os isolados foram inoculados em placas com meio composto apenas por caseína (1%) e ágar (2%). O meio foi alcalinizado com NaOH até o ponto de solubilização da caseína e depois, ajustado para pH 7,0 com ácido clorídrico (HCl) fumegante. Após um período de incubação de 7 dias a 22-25°C, o surgimento de um halo transparente ao redor da cultura indica resultado positivo (Fig. 5).



Fig. 5 Halos de degradação esbranquiçados formados ao redor das colônias produtoras de caseinase.

3.7.3 Produção de gelatinase

Para realizar o teste quanto a produção de gelatinase, os isolados foram inoculados em meio com a seguinte composição: 1,2% gelatina, 0,4% peptona, 0,1% extrato de levedura e 1,5% ágar (Smith & Goodner, 1958). As placas foram incubadas por um período de 7 dias e o resultado revelado com aplicação de solução saturada de sulfato de amônio sobre a placa com as colônias previamente removidas. Como podemos observar na Figura 6, as colônias de fungos leveduriformes (à esquerda da placa) não puderam ser completamente removidas devido as hifas que se desenvolvem para o interior do meio e não sobre ele como as outras leveduras. Após 30 minutos, o entorno das colônias produtoras revelaram halos de degradação transparentes (Fig. 6).



Fig. 6 Halos de degradação transparentes formados ao redor das colônias produtoras de gelatinase inoculadas à direita da placa.

3.7.4 Produção de celulase

Para verificar se os isolados produzem celulase, estes foram inoculados em meio com 0,5% carboximetilcelulose, 0,1% NaNO_3 , 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% KCl , 0,05% MgSO_4 , 0,05% extrato de levedura, 0,1% glicose e 1,7% ágar (Baptista *et al.*, 2010). A atividade foi revelada com aplicação de solução 0,1% de Vermelho Congo (após remoção das colônias) durante 15 min, seguida de duas lavagens com solução 1M de NaCl . A hidrólise de carboximetilcelulose é indicada por um halo com tom alaranjado ao redor da cultura (Fig. 7).



Fig. 7 Halo de degradação alaranjado formado ao redor das quatro colônias produtoras de celulase inoculadas.

3.7.5 Produção de esterase (Tween 80)

O meio teste para produção de esterase foi composto por: 2,5% Tween 80, 1% peptona, 0,5% cloreto de sódio, 0,1% glicose, 0,01% cloreto de cálcio, 2 % ágar (Slifkin, 2000). O Tween 80 é um lipídeo de cadeia longa que quando consumido libera ácidos graxos menores, provocando uma acidificação do pH do meio de cultura e portanto, formando um halo de degradação ao redor da colônia produtora de esterase (Fig. 8).



Fig. 8 Halos de degradação formados ao redor das duas colônias de cor creme que produziram esterase.

3.7.6 Produção de lipase (tributirina)

O meio teste para produção de lipase foi composto por: 1% tributirina líquida, 0,5% peptona, 0,3% extrato de levedura, 2% ágar (Atlas & Parks, 1993). O resultado positivo se dá com a formação de um halo transparente em torno das colônias de leveduras produtoras (Fig. 9).



Fig. 9 Halos de degradação transparentes formados ao redor das colônias produtoras de lipase.

3.8 Verificação da degradação de corante azóico

Os fungos leveduriformes e algumas leveduras de afinidade basidiomicéticas – consideradas boas produtoras de enzimas pelos testes anteriores – foram testados quanto a sua capacidade de degradação de corantes azóicos pelo método de adsorção. Os isolados foram inoculados por técnica de estria simples em meio de cultivo com adição do corante *Acid Red* 357 da classe azóico na concentração 25 mg/L.

Os testes foram realizados com dois grupos (A-controle: meio de cultivo sem corante; B: meio de cultivo com o corante). Os isolados foram incubados por 7 dias a 25°C e as placas contendo as colônias comparadas a uma placa com o meio com corante não inoculada, a fim de conferir se o meio com a levedura se apresentava mais claro do que o meio original e portanto, ocorreu adsorção do corante pelo microrganismo (resultado positivo)

demonstrando que este é capaz de retirar o corante do meio, ou não (resultado negativo).

4 Resultados e discussão

4.1 Isolamento, contagem e agrupamento morfológico dos isolados

Ao final das cinco coletas foram obtidos 102 isolados a partir do filoplano de macrófitas aquáticas. Os isolados foram agrupados conforme as características morfológicas da colônia (como cor, tamanho, forma, elevação, etc.) em 19 grupos distintos (Anexos: Tabela 2). Representantes de cada grupo tiveram seus DNAs extraídos para identificação por técnica molecular de sequenciamento pelo método de Sanger, técnica mais precisa do que a identificação fenotípica morfológica/bioquímica. Há trabalhos de autores que reconhecem a dificuldade na identificação precisa de leveduras usando apenas suas características fenotípicas, problema enfrentado especialmente com espécies que são bastante heterogêneas (Azeredo *et al.*, 1998; Mautone, 2008).

O teste de urease e DBB agrupou os isolados em 37 leveduras de afinidade basidiomicética (filo Basidiomycota), 27 leveduras de afinidade ascomicética (filo Ascomycota) e 38 fungos leveduriformes, como se pode observar na Figura 10.

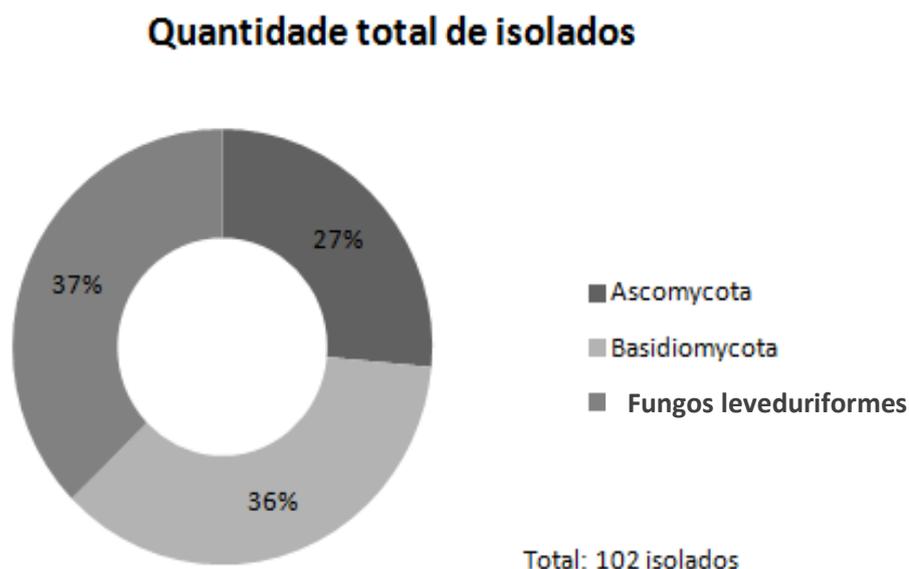


Fig. 10 Percentual de isolados por grupo taxonômico

Na figura 11, temos a representação do isolados por espécie de macrófita. As contagens de leveduras presentes nas amostras do filoplano de *S. maritimus* ficou entre $5,3 \times 10^3$ e $7,3 \times 10^6$ UFC/g. Em *S. alterniflora* variaram de 7×10^3 a $2,7 \times 10^7$ UFC/g e em amostras de *S. densiflora* ficaram entre 0 e $6,7 \times 10^5$ UFC/g. A maior parte dos isolados foi obtida a partir de *Scirpus maritimus* (57), ou seja, 56% de todos os isolados, seguida de *Spartina alterniflora* (31) e por último *S. densiflora* (14). A superfície foliar de *Scirpus maritimus* originou a maior quantidade de fungos leveduriformes (28) de todas

as três espécies de macrófitas. *Spartina alterniflora* apresentou na sua maioria espécies de Basidiomycota (12), porém foi a planta com mais leveduras ascomicéticas (11) dentre as três ao final das coletas. *Spartina densiflora* obteve um número reduzido de isolados, representando apenas 14% dos microrganismos isolados, inclusive na última coleta não houve nenhum exemplar de levedura isolado das amostras dessa planta.

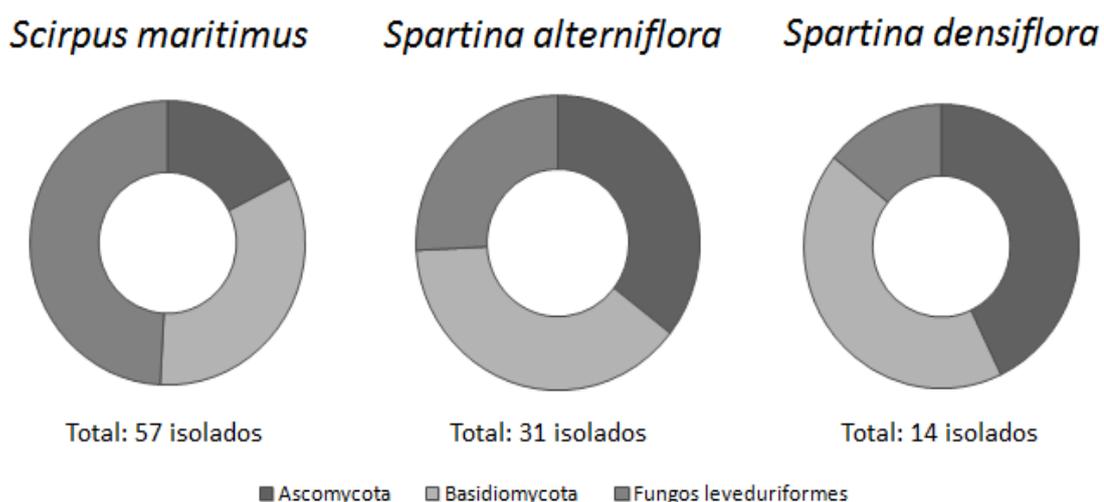


Fig. 11 Representação gráfica dos isolados do filoalano de cada espécie de macrófita.

Estes resultados diferiram bastante do resultado do estudo realizado por Leite (2014), que analisou leveduras e fungos leveduriformes associados à decomposição das mesmas espécies de macrófitas. Demonstrando que os fungos atuam de forma diferente no processo de decomposição do substrato e na colonização do filoalano, já que os projetos foram realizados em paralelo e as condições ambientais do período de coleta foram as mesmas (Tabela 1). A

grande diferença está na quantidade de isolados de *S. densiflora*, que foi mínima nas plantas *in natura* enquanto nas em decomposição foi o substrato de origem da maior parte dos isolados coletados. Fato que poderia ser explicado pela estrutura da folha fresca, mais fina e estreita (Perazzolo & Pinheiro, 1991) em relação às outras duas plantas, capaz de sofrer mais com as “lavagens” das chuvas, causando a diminuição da comunidade microbiana. A macrófita *S. densiflora* teve uma contínua diminuição no número de isolados desde o início do experimento, em junho de 2012 e foi a única que não obteve nenhuma colônia na última coleta, época em que a precipitação era intensa.

Tabela 1: Condições ambientais registradas nos dias das coletas (valores calculados a partir da média mensal, exceto para precipitação que representa o índice total acumulado).

Coletas	25/06/12	02/07/2012	07/08/2012	24/09/2012	21/01/2013
Temperatura do ar (°C)	12	14	15	20	25
Temperatura da água (°C)	14	12	14	16	25
Salinidade (%)	28	23	16	6	14
Precipitação (mm)	37	74	104,8	137,8	136,4

Na Ilha da Pólvora, as áreas de marismas frequentemente alagadas são ocupadas por *S. alterniflora*, portanto essas plantas desenvolveram alta tolerância à salinidade e mecanismos de adaptação a períodos prolongados de alagamento. A gramínea *S. densiflora*, macrófita predominante nas áreas

ocasionalmente alagadas, tem na anatomia foliar proteção para essa variação, como cutícula espessa e folhas enroladas (Cordazzo & Seeliger, 1988).

Scirpus maritimus teve o maior número de fungos leveduriformes em ambos os experimentos, porém em *S. densiflora* nas folhas em decomposição eles surgem como segundo maior grupo de isolados, enquanto nas plantas *in natura* são inexpressivos (2 isolados).

No estudo de Landell (2006), que isolou leveduras do filoplano de bromélias, houve também o predomínio de basidiomicetos sobre os ascomicetos. O seu elevado número no filoplano deve-se a ampla capacidade que leveduras deste filo têm de utilizar compostos de carbono de forma eficiente em substratos mais complexos como folhas e solos (Kutzman & Fell, 1998). O filoplano é considerado um substrato adequado para o isolamento de leveduras basidiomicéticas devido às fontes de carbono simples (Carmo-Souza, 1969). Mautone (2008) isolou de folhas de figueira mais leveduras de afinidade basidiomicética do que de afinidade ascomicética. Porém, Fuentesfria (2004) encontrou em *Hibiscus* um número superior de leveduras ascomicéticas, demonstrando variação na frequência de leveduras basidiomicéticas e ascomicéticas de acordo com o substrato foliar.

Assim como no trabalho de Leite (2014), os dados ambientais foram registrados para posterior análise em relação a influência dos fatores abióticos na variação da comunidade microbiana. A temperatura do ar variou entre 12°C (junho de 2012, período correspondente ao inverno) e 25°C (janeiro de 2013, período correspondente ao verão). A temperatura da água variou entre 12°C e

25°C. A salinidade apresentou grandes flutuações, o que é comum em ambientes dinâmicos como as marismas, variando entre 6 e 28%.

Estudos de Fonseca & Inácio (2006) avaliaram a influência das estações do ano na composição de comunidades de levedura do filoplano e relataram a predominância de leveduras pigmentadas como as do gênero *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* nas estações mais quentes. Leveduras destes gêneros se mostraram mais bem adaptadas às condições ambientais do verão, como intensidade de luz temperatura e umidade. Por outro lado, no inverno, leveduras basidiomicéticas do gênero *Cryptococcus* foram predominantes. Ao longo das coletas do presente trabalho, não foi observada predominância de leveduras pigmentadas de cor alaranjada como *Rhodotorula* durante o verão. Estas estiveram sempre presentes, ocorrendo em maior número nas coletas de julho e de setembro, meses em que foram coletadas mais leveduras basidiomicéticas do que os outros grupos. Nas coletas de junho e janeiro, os fungos leveduriformes foram os isolados mais representativos. Os ascomicetos foram o grupo com maior número de exemplares na coleta de agosto, quando houve diminuição da temperatura do ar e grande quantidade de chuvas.

4.2 Identificação molecular dos isolados

Neste trabalho apenas cinco isolados foram identificados por sequenciamento através do método de Sanger, devido a problemas enfrentados na área da biologia molecular, que resultaram em diversos atrasos na identificação.

O isolado de código Bel 17 foi identificado como *Scheffersomyces spartinae*, espécie associada a macrófita halófito *Spartina alterniflora* conforme Meyers, *et al.* 1975 e neste estudo foi obtida do filoplano de *Spartina alterniflora*, que está de acordo com a literatura.

Outra espécie identificada foi Bel 102, um fungo leveduriforme negro da espécie *Aureobasidium pullulans*. O gênero *Aureobasidium* é caracterizado por microrganismos que apresentam colônias de diversas colorações e que tornam-se completamente pretas ao longo do período de conservação em laboratório. Neste trabalho, 29 isolados apresentam tais características.

O isolado de código Bel 103 *Candida melibiosica*, uma levedura ascomicética de característica eletrogênica, alternativa de microrganismo como fonte de energia ecologicamente amigável que usa células *in vivo* para conversão da energia bioquímica em eletricidade (Hubenova & Mitov, 2010).

Os isolados Bel 109 e Bel 110 foram identificados como fungos leveduriformes negros da espécie *Hortaea werneckii*, um fungo de importância clínica causador da *tinea nigra*, uma patologia rara caracterizada pelo aparecimento de manchas escuras nas palmas das mãos.

A identificação molecular dos outros isolados é uma etapa desse trabalho que será realizada futuramente.

4.3 Potencial biotecnológico

Fungos leveduriformes formaram o grupo predominante na degradação de todos os substratos testados, resultado diferente das leveduras

associadas à macrófitas em decomposição (Leite, 2014), onde os basidiomicetos foram os maiores produtores de enzimas. Porém, na produção de amilase e carboximetilcelulase foram os fungos leveduriformes o grupo que predominou (Leite, 2014), conferindo com o resultado das macrófitas frescas.

Todos os isolados produziram lipase. Foi observado um padrão entre os grupos na produção de todas as enzimas, com os fungos leveduriformes predominantes na produção de todas as enzimas testadas, o filo Basidiomycota sendo o segundo grupo com maior número de representantes positivos e o filo Ascomycota com menor percentual de isolados produtores de enzimas, como se vê no gráfico de percentagem de produção enzimática por grupo taxonômico (Fig. 12). A exceção foi a produção de proteases, em que os ascomicetos obtiveram uma maior produção enzimática do que os isolados de afinidade basidiomicética. Das leveduras ascomicéticas, 26% produziram caseína contra 21,6% das basidiomicéticas. No teste da produção de gelatinase, 44% dos ascomicetos conseguiram degradar a gelatina, enquanto 43% dos basidiomicetos produziram essa enzima. Apenas 32 linhagens produziram ambas as proteases. Outros trabalhos (Landell, 2006; Mautone, 2008) relataram maior diferença na produção dessas duas proteases pelas leveduras, cerca de 30% mais produtores de caseinase.

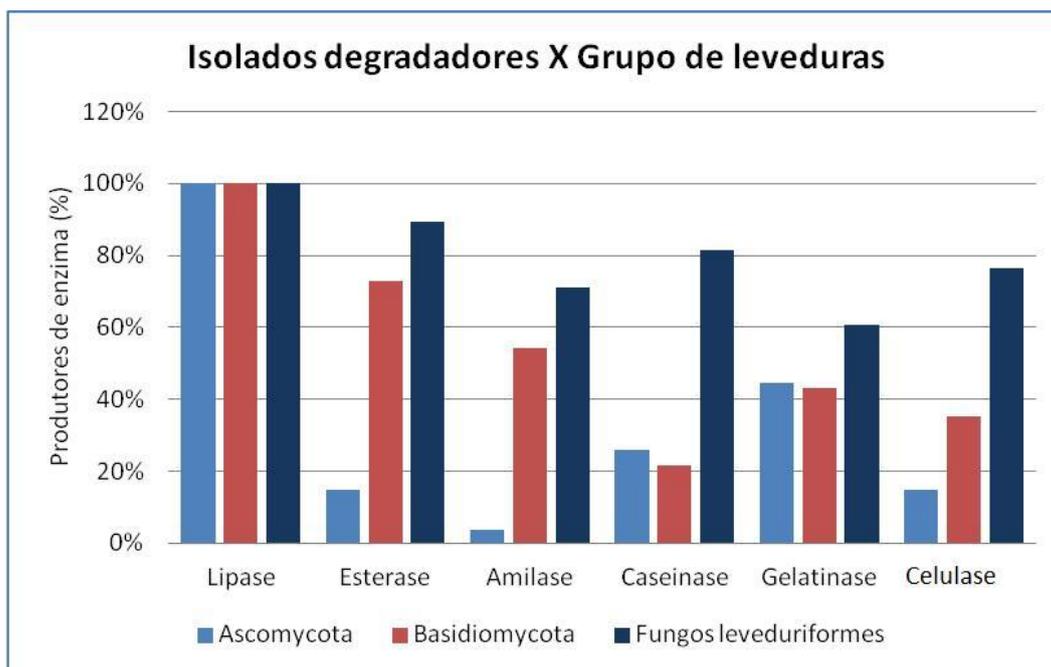


Fig. 12 Percentagem de produção enzimática por grupo taxonômico.

4.3.1 Produção de amilase

Os melhores produtores de amilase podem ser vistos na tabela 2. Os isolados positivos apresentaram duas colorações diferentes de halo de degradação no meio com amido. A maioria apresentou um halo de cor amarela, indicação de degradação total do substrato, enquanto alguns isolados formaram halos avermelhados que indicam uma hidrólise parcial do amido.

Tabela 2: Isolados de leveduras melhores produtores de amilase.

Isolado	PZ médio	Grupo morfológico	Filo
BEL 63	0,1637214	7	Basidiomycota
BEL 45	0,1780292	7	Basidiomycota
BEL 90	0,1885733	7	Basidiomycota
BEL 4	0,1893997	7	Ascomycota
BEL 88	0,1919772	7	Basidiomycota

Todos os cinco isolados que obtiveram maior produção de amilase (Tabela 2) foram leveduras pigmentadas de cor creme. Foi observado um padrão de produção neste grupo, das leveduras de cor creme pertencentes ao grupo 7, porém nem todas as leveduras do filo Basidiomycota testadas foram capazes de degradar o amido do meio. A produção pelos fungos leveduriformes não foi uniforme nesses testes. Apenas um representante do grupo Ascomycota produziu amilase, a levedura Bel 4, inserida no grupo 7 de acordo com suas características macromorfológicas e está entre as cinco linhagens que melhor produziram a enzima (Tabela 2). À exceção deste caso, pode-se dizer que o resultado da atividade amilolítica dos isolados confere com o de Mautone (2008) que não isolou nenhuma levedura ascomicética produtora de amilase de folhas de figueira, enquanto entre basidiomicetos e fungos semelhantes a leveduras, obteve 29,1% e 50% positivos para a produção da enzima, respectivamente. No presente trabalho, 54% dos basidiomicetos foram capazes de produzir amilase e 71% dos fungos leveduriformes (Fig. 11).

4.3.2 Produção de caseinase

O grupo dos fungos leveduriformes se destacou no teste da caseinase, como grupo com maior número de produtores dessa enzima (81,5%). Contudo, dois isolados fortemente positivos que pertencem o filo Basidiomycota, foram as leveduras que produziram maiores quantidades de caseinase (Tabela 3). Isolados de afinidade ascomicética também se destacaram dentre os melhores produtores dessa enzimas. O isolado que obteve o melhor resultado nesse teste foi Bel 110, um fungo leveduriforme negro da espécie *Hortaea werneckii*, causador de uma infecção de pele chamada tinea nigra.

Tabela 3: Isolados de leveduras melhores produtores de caseinase.

Isolado	PZ médio	Grupo morfológico	Filo
BEL 82	0,2164529	8	Basidiomycota
BEL 58	0,2333193	8	Basidiomycota
BEL 69	0,2499504	11	Ascomycota
BEL 110	0,3538429	3	leveduriforme
BEL 44	0,4285653	10	Ascomycota

4.3.3 Produção de gelatinase

Os resultados da produção de gelatinase podem ser vistos na Tabela 4. A levedura ascomicética de código Bel 69 resultou em valores de Pz extremamente baixos ($Pz < 0,64$: fortemente positivo) nos testes de degradação

de proteases (caseinase e gelatinase) e foi o isolado melhor produtor de gelatinase. Seguida de uma levedura pigmentada de afinidade basidiomicética, Bel 92. O grupo com maior número de representantes positivos para produção de gelatinase foi o dos fungos leveduriformes com 60,5%, dentre eles Bel 98, Bel 8 e Bel 35 ficaram entre os melhores produtores.

Tabela 4: Isolados de leveduras melhores produtores de gelatinase.

Isolado	PZ médio	Grupo morfológico	Filo
BEL 69	0,2994452	11	Ascomycota
BEL 92	0,3682533	8	Basidiomycota
BEL 98	0,3777324	4	leveduriforme
BEL 8	0,3899705	6	leveduriforme
BEL 35	0,4211618	5	leveduriforme

4.3.4 Produção de celulase

Os melhores produtores de celulase podem ser vistos na Tabela 5. Dos grupo dos fungos leveduriformes, 76% produziu celulase. Os maiores degradadores de carboximetilcelulose foram os fungos leveduriformes negros , com poucas exceções, como no caso das leveduras Bel 95, Bel 57 e Bel 91, pertencentes ao grupo morfolológico 7 (Anexos: Tabela 2). Apenas dois isolados de fungos leveduriformes obtiveram boa produção de celulase, Bel 01 e Bel 104. A levedura ascomicética Bel 66 foi a única deste grupo taxonômico a produzir a enzima em boa quantidade (Anexos: Tabela 1), foi a segunda maior produtora de celulase entre todos isolados testados, com Pz médio de 0,2058335.

Tabela 5: Isolados de leveduras melhores produtores de celulase.

Isolado	PZ médio	Grupo morfológico	Filo
BEL 9a	0,1727074	5	leveduriforme
BEL 109	0,2026643	3	leveduriforme
BEL 66	0,2058335	15	Ascomycota
BEL 51	0,2428262	19	Basidiomycota
BEL 8	0,2430989	6	leveduriforme

4.3.5 Produção de esterase

O teste de produção de esterase gerou dois tipos de halos formados pelos isolados testados: halo transparente (em leveduras) ou halo de precipitação (em fungos leveduriformes).

Os isolados com maior produção de esterases foram todos de afinidade basidiomicética (Tabela 6). A atividade enzimática dos fungos leveduriformes para esterase foi considerada fortemente positiva, com um Pz médio de 0,59044. A maioria deles (89%) degradou o substrato do meio. Apenas quatro leveduras ascomicéticas resultaram positivas para produção de esterase, o que contrasta com leveduras isoladas do filoplano de figueiras, onde 88,8% obtiveram forte produção (Mautone, 2008).

Como no teste para produção de amilase, as leveduras de cor creme do grupo 7 também produziram as maiores quantidades da enzima esterase.

Tabela 6: Isolados de leveduras melhores produtores de esterase.

Isolado	PZ médio	Grupo morfológico	Filo
BEL 108	0,1592729	7	Basidiomycota
BEL 84	0,2200156	7	Basidiomycota
BEL 87	0,2488182	7	Basidiomycota
BEL 88	0,2585406	7	Basidiomycota
BEL 90	0,2626880	7	Basidiomycota

4.3.6 Produção de lipase

Todos os isolados foram capazes de degradar a tributirina do meio. Os isolados maiores produtores de lipase foram leveduras de afinidade basidiomicética (Tabela 7).

As cinco linhagens de melhor atividade lipolítica (produção de esterase e lipase) foram coletadas de *Scirpus maritimus*. As leveduras Bel 84 e Bel 90, de afinidade basidiomicética, estão entre as melhores produtoras de ambas as enzimas, assim como as Bel 43 e Bel 45.

Tabela 7: Isolados de leveduras melhores produtores de lipase.

Isolado	PZ médio	Grupo morfológico	Filo
BEL 84	0,1429092	7	Basidiomycota
BEL 82	0,1654450	8	Basidiomycota
BEL 4	0,2198579	7	Ascomycota
BEL 90	0,2571428	7	Basidiomycota
BEL 89	0,2828102	7	Basidiomycota

É possível observar que alguns isolados do filo Ascomycota apresentaram os mais baixos valores de Pz para as enzimas aqui testadas.

Os resultados dos testes enzimáticos confirmam o filoplano de macrófitas aquáticas como uma excelente fonte de microrganismos de alto potencial biotecnológico. O gráfico abaixo (Fig.13) demonstra essa capacidade dos isolados produzirem enzimas de interesse industrial, especialmente amilase, esterase e caseinase (Pz<0,64 fortemente positivos). Os fungos leveduriformes, encontrados com frequência na superfície de folhas (Fuentefria, 2004; Landell, 2006; Mautone, 2008), são considerados microrganismos com ampla capacidade de produção de enzimas usadas nas indústrias têxteis e farmacêuticas (Deshpande *et al.*, 1992). Nesse trabalho resultaram os melhores produtores de gelatinase e celulase. Basidiomycota o grupo melhor produtor de amilase (levando-se em consideração que Ascomycota tem apenas um representante positivo para a enzima (Bel 4) e que supostamente teve erro na sua identificação como ascomiceto), esterase e lipase. A produção de caseinase foi melhor nas leveduras do filo Ascomycota.

Dezesseis isolados de fungos leveduriformes foram capazes de produzir todas as enzimas testadas. Apesar das leveduras do filo Basidiomycota terem sido as melhores produtoras enzimáticas, alguns fungos leveduriformes produziram mais de uma enzima com baixos valores de Pz (Anexos: Tabela 1). O isolado Bel 109, identificado como *Hortaea werneckii*, está entre os isolados que mais produziram amilase, celulase e caseinase, com um Pz em torno de 0,3, assim como Bel 110. O isolado Bel 35, um fungo

leveduriforme produziu grandes quantidades de celulase, gelatina e caseinase, com Pz em torno de 0,3.

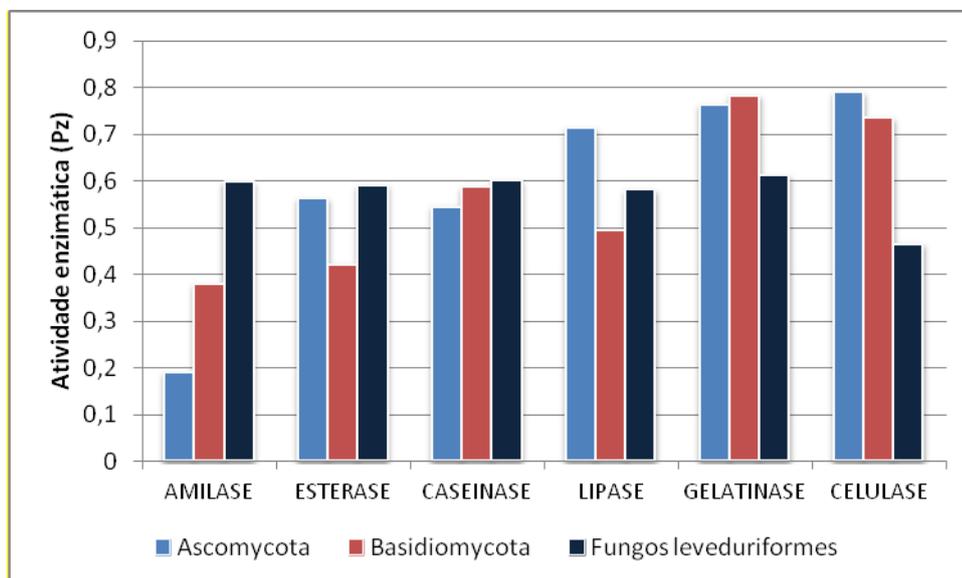


Fig. 13 Média da atividade enzimática dos isolados de leveduras e fungos leveduriformes do filoplano de macrófitas aquáticas (Pz<0,64 fortemente positivos).

O resultado interessante foi dos isolados Bel 109 e Bel 110, identificadas como *Hortaea werneckii*, que apresentaram valores baixos de Pz para celulase (alta atividade enzimática), demonstrando que estas leveduras patogênicas estão bem adaptadas ao ambiente do filoplano.

Spartina densiflora foi o substrato foliar com menor quantidade de microrganismos capazes de produzir enzimas (Fig. 14). Resultado diverso do experimento das macrófitas em decomposição (Leite, 2014), que encontrou em *S. densiflora* um substrato rico em microrganismos produtores de enzimas, principalmente lipases, proteases e polissacarases. Devido à abundância de isolados, *Scirpus maritimus* teve mais representantes positivos para obtenção de todas as enzimas testadas.

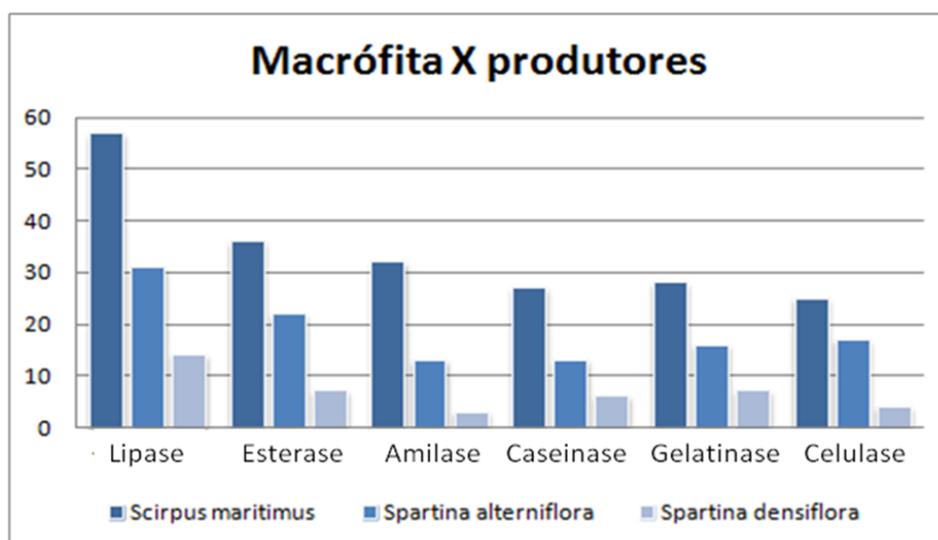


Fig. 14 Relação de representantes de leveduras e fungos leveduriformes produtores de enzimas por espécie de macrófita aquática.

4.4 Degradação de corante azóico

Todos os isolados selecionados para esse teste (na maioria fungos leveduriformes e algumas leveduras de afinidade basidiomicética) cresceram em abundância no meio com o corante *Acid Red 357*. No teste com o isolado

Bel 8 foi observada presença de biomassa em apenas 2h de incubação, o que leva a acreditar que o corante influenciou no crescimento dos fungos, pois o mesmo não ocorreu no controle (meio sem corante). Mais testes têm que ser realizados para avaliar a extensão e o mecanismo dessa influência.

Os isolados testados ficaram da mesma cor do corante e tornaram o meio de cultivo mais claro, demonstrando que ocorreu biossorção do corante do meio pelas leveduras (Fig. 15), pois o fungo foi capaz de adsorver o corante presente no meio. A degradação completa do corante, porém, não pode ser observada. O esperado seria que a levedura inoculada retirasse completamente o corante do meio, removendo este componente tóxico através de biossorção e tornando o meio transparente. Mas o rápido e abundante crescimento das colônias fúngicas sobre as placas do teste, dificultou a visualização do meio com Acid Red 357 e portanto a análise dos resultados. Como perspectiva deste estudo, novos testes devem ser realizados com concentrações diferentes do corante no meio de cultivo e maior tempo de incubação, também para verificar a relação crescimento e concentração e para melhor comparação dos resultados.

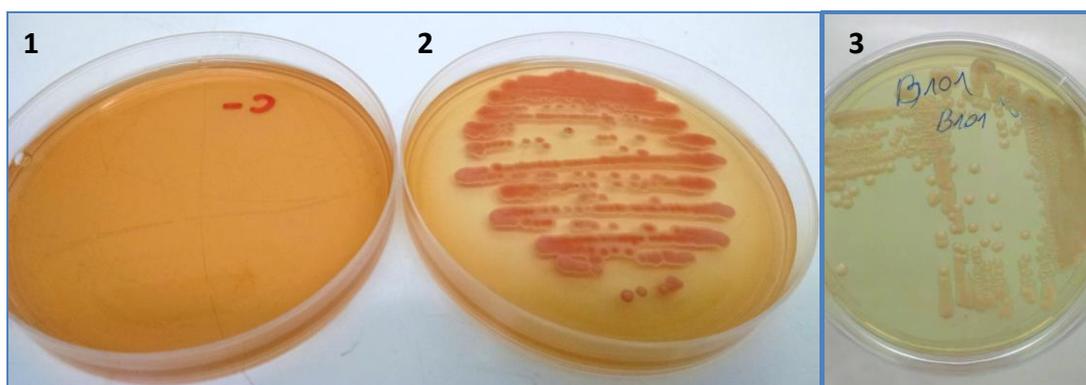


Fig. 15 Placas (1 e 2) com meio adicionado de *Acid Red 357* 25mg/L, 1: controle negativo, sem inoculação; 2: meio inoculado com levedura (Bel 101). Placa 3: isolado Bel 101 inoculado em meio sem corante.

5 Conclusões

As leveduras e fungos leveduriformes isolados de macrófitas aquáticas de uma marisma da Ilha da Pólvora em Rio Grande – RS demonstraram através de testes enzimáticos que possuem amplo potencial biotecnológico. Além de produzirem enzimas de interesse industrial como amilase, proteases, lipases e celulase, que no futuro podem ser utilizadas para produção em larga escala, também demonstraram potencial para biodegradação de corantes químicos e portanto podem contribuir para trazer soluções economicamente viáveis na degradação de poluentes.

Os fungos leveduriformes foram os isolados mais frequentes, seguidos de leveduras de afinidade basidiomicética e as menos frequentes foram as leveduras de afinidade ascomicética. A macrófita aquática *S. maritimus* foi a espécie de macrófita aquática com maior número de isolados de leveduras, seguida por *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora* que apresentou apenas 14 isolados.

Fungos leveduriformes também foi o grupo com maior quantidade de isolados positivos para os testes enzimáticos, embora as leveduras do filo Basidiomycota tenham produzido as mesmas enzimas em quantidades superiores. Isolados do filo Ascomycota foram minoria entre os microrganismos isolados e entre os produtores enzimáticos, exceto na produção de caseinase onde obtiveram os melhores valores de Pz.

Nenhum padrão foi observado no isolamento dos microrganismos nas diferentes épocas do ano. Houve oscilações em todos os grupos e não foi possível relacionar os fatores abióticos com a variação na comunidade de leveduras. É provável que bactérias e fungos filamentosos existentes no filoplano também exerçam influência sobre os microrganismos estudados.

O estudo confirmou o filoplano de plantas como uma fonte de microrganismos produtores de enzimas e provavelmente de novas espécies ainda desconhecidas baseado em estudos como os de Landell (2006, 2009) e Leite (2014). A diversidade de leveduras e fungos leveduriformes isolados desse filoplano chama a atenção para a necessidade de mais estudos em marismas, que visem aumentar o conhecimento sobre esses microrganismos e suas interações com o ambiente.

6 Perspectivas

- Realizar a identificação molecular por meio de sequenciamento as leveduras representantes de cada grupo;
- Testar a degradação do corante em outras concentrações de corante;
- Investigar a influência do corante *Acid Red 357* no rápido crescimento das colônias de leveduras testadas;
- Dar continuidade ao estudo dos isolados que obtiveram os melhores resultados enzimáticos a fim de otimizar a produção de enzimas e possivelmente utilizá-los na indústria.

7 Referências bibliográficas

ABRANCHES, J. *et al.* The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 1, p. 328-336, Abr. 1997.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York, John Wiley & Sons, 1996, 869 p.

ALMEIDA, A.C.M, **Estudo da biodegradação de corantes azóicos por inoculo proveniente de biodigestor anaeróbio de alimentos**. Dissertação. Unesp Rio Claro. 2008. 102p

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 3389-3402, Set. 1997.

ANDREW J. H.; HARRIS R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 38, p.145-180, 2000.

ATLAS R. M.; PARKS L. C. **Handbook of Microbiological Media**. London: CRC Press, 1993.

AZEREDO, L.A.I. *et al.* Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, Barcelona, v. 1, p. 205-208, 1998.

BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A.; HOMEM, R. A.; TORRES O. S.; VOJNOV A. A.; AMARAL, A. M. **Mutation in the xpsD gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence**. Genetics and Molecular Biology, Brasil, v. 33, n. 1, p. 146-153, Abr. 2010.

BOUNDY-MILLS, K. Methods for investigating yeast biodiversity. *In*: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook**. Springer-Verlag, Heidelberg, Alemanha, 2006, p. 67-100.

BRAGA, A. A. *et al.* Screening of Yeasts from Brazilian Amazon Rain Forest for Extracellular Proteinases Production. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart v. 21, p. 353-359, 1998.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeas-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 1020-1025, Nov. 2002.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. **Recursos microbiológicos para biotecnologia**. 2010. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0000/>

CHRISTENSEN, M. **A view of fungal ecology**. Mycologia, 81 (1): 1-19.
DAMARE, S, RAGHUKUMAR, C, MURALEEDHRAN, UD, DIX, NJ, WEBSTER, J. 1995. Fungal Ecology. Cambridge: Chapman & Hall, 1989, 549 p.

COIMBRA, F. L.; COSTA, C. S. B. Mapeamento digital dos macrohabitats de dunas e marismas da costa do rio grande do sul através de imagens de satélite e fotografias aéreas. In: **Encontro Nacional de Gerenciamento Costeiro**. São Vicente. Anais, 2006

COPERTINO, M.; SEELIGER, U. Habitats de *Ruppia maritima* e de macroalgas. In: SEELIGER, U; ODEBRECHT, C. (Eds.). **O Estuário da Lagoa dos Patos: Um Século de Transformações**. Rio Grande: FURG, 2010, p. 91-100. 17

CORDAZZO, C.V. & SEELIGER, U. 1988. **Guia Ilustrado da Vegetação Costeira no Extremo Sul do Brasil**. Rio Grande: Editora da FURG.

COSTA, C. S. B. Irregularly flooded marginal marshes. *Subtropical Convergence Environments: the Coast and Sea in the Warm-Temperate Southwestern Atlantic* (eds U.Seeliger, C.Odebrecht & J.P.Castello), 1997. pp. 73–77. Springer-Verlag, Berlin.

COSTA, C. S. B.; MARANGONI, J.C. As comunidades das marismas. In: SEELIGER, U; ODEBRECHT, C. (Eds.). **O Estuário da Lagoa dos Patos: Um Século de Transformações**. Rio Grande: FURG, 2010, p. 125-136.

DEAK, T. Environmental factors influencing yeasts. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook**. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2006, p. 155-174.

DEEGAN, L. A. *et al.* Coastal eutrophication as a driver of salt marsh loss. **Nature** 490, 388–392, 2012.

DESHPANDE, M. S. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. **Enzyme and Microbial Technology** 1992; 14: 514-27.

DO CARMO-SOUZA, L. Distribution of yeasts in nature. In: A. H. Rose; J. S. Harrison (Eds.) **The yeasts**. London: London Academic Press, 1969, p. 79 – 105.

ESTEVEES, F. **Fundamentos de Limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 602 p.1998.

ESTEVEES, F. A.; CAMARGO, A. F. M. Sobre o papel das macrófitas aquáticas na estocagem e ciclagem de nutrientes. **Acta Limnologica Brasiliensia**. 1: 273-298, 1986

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematic of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 50, p. 1351-1371, 2000.

FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane Yeasts. In: Rosa, C. A.; Peter, G. eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, 2006, p. 263-301.

FUENTEFRIA, A. M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS, 2004, 122f.

FUENTEFRIA, A. M.; VALENTE, P. Screening of enzyme-producing yeast and yeast-like fungi from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. **Revista Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 9, n. 1, p. 9-24, 2005.

HAMMOND, P. M. 1995 The current magnitude of biodiversity. In: **Global Biodiversity Assessment** (V. H. Heywood, ed.) : p113-138. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. 1975, The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, **67**, 597-607.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological research**, 2001 - Cambridge Univ Press, 2001.

HICKENBICK, G.; FERRO, A. L.; ABREU, P. C. Produção de detrito de macrófitas emergentes em uma marisma do estuário da Lagoa dos Patos: taxas de decomposição e dinâmica microbiana. **Atlântica**, Rio Grande, v. 26, n. 1, p. 61-75, Jan. 2004.

HUBENOVA, Y.; MITOV, M. Potencial application of *Candida melibiosica* in biofuel cells. **Bioelectrochemistry** 78 (2010) 57 – 61.

KACHALKIN, A. V. et al. Characterization of Yeast Groupings in the Phyllosphere of *Sphagnum Mosses*. **Microbiology**, E.U.A., v. 77, n. 1, p. 474-48, 2008.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, Vol. 25, No. 1, 78-82, 2001

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts: a taxonomic study**. 4th revised end enlarged edition. Elsevier, Amsterdam, 1998.

LANDELL, M. F. **Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do Parque de Itapuã-Viamão/RS**. 136 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, UFRGS, Porto Alegre, 2006.

LANDELL, M. F. **Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no Parque de Itapuã-Viamão/RS**. 187 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, UFRGS, Porto Alegre, 2009.

LANDELL, M. F.; BILLODRE, R.; J.P.; LEONCINI, O.; VAINSTEIN M.H.; VALENTE P. *Candida aechmeae* sp. Nov. and *Candida vrieseae* sp. Nov., novel yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil. **Int J Syst Evol Microbiolog**. 2010 Jan; 60 (Pt1): 244-8.

LEITE, B. R. **Avaliação da comunidade de leveduras associada à decomposição de macrófitas aquáticas em uma marisma da lagoa dos Patos (RS)**. 159 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, UFRGS, Porto Alegre, 2014.

MACFADDIN, J.P.; LIPPINCOTT, P. **Biochemical tests for identification of medicinal bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000. 912p.

MADIGAN, M. T. et al. Capítulo 18: Biologia Celular Eucariótica e Microrganismos Eucarióticos. *In*: _____. **Microbiologia de Brock**. Tradução Andrea Queiroz Maranhão e colaboradores. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARANGONI, J C.; COSTA. **Diagnóstico ambiental das marismas da Lagoa dos Patos – RS**. Atlântida, Rio Grande, v 31, n 1, p 85 – 98, jan/jun. 2009.

MAUTONE, J. N. **Identificação e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associados a figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil**. 124 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 2008.

MEYERS, S.P.; Ahearn, D.G.; Alexander, S.K.; Cook, W.L. (1975). *Pichia spartinae*, a Dominant Yeast of the *Spartina* salt marsh. **Dev. In Indust. Microbiol.**, 6: 261-267.

MÖLLER, O.; FERNANDES, E. Hidrologia e Hidrodinâmica. *In*: SEELIGER, U; ODEBRECHT, C. (Eds.). **O Estuário da Lagoa dos Patos: Um Século de Transformações**. Rio Grande: FURG, 2010, p. 17-30.

MORAIS, P. B. *et al*. Yeast Communities in Tropical Rain Forests in Brazil and other South American Ecosystem. *In*: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds.).

Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2006, p. 461-484.

MORIARTY, D. J. W. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 151, n. 1, p. 333-349, 1997.

NAKASE, T. *et al.* Yeast Biodiversity in Tropical Forests of Asia. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, 2006, p. 441-460.

O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: **The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics** (Reynolds, D. R. and J. W. Taylor, Eds), C. A. B. International, Surrey, UK, 1993, p. 225-233.

PAGANI, D.M. **Verificação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes isolados de macrófitas da Ilha da Pólvora, Rio Grande, RS, Brasil.** Trabalho de conclusão do curso de Ciências Biológicas, UFRGS, Imbé, RS. 2013

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: Rose, A. H.; Harrison, J.S. (Eds.). **The Yeasts**, v. 1, 2nd Ed. Academic Press, London, 1987, p. 123-179.

PIMENTA, R. S. *et al.* Yeast communities, in two atlantic rain forest fragments in southeast, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 40, n. 1, p. 90-95, 2009.

RICH, O.J. *et al.* Laccase from *Aureobasidium pullulans*. **Enzyme and Microbial Technology**. p. 33-37, 2013.

SANTOS, F. A. *et al.* Yeast associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p. 33-40, 1996.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN, G.; CUNHA-LIGNON, M. & COELHO-JR., C. 2005. A conceptual hierarchical framework for marine coastal management and conservation: a Janus-like approach. **Journal of Coastal Research**. Special Issue,(42): 1-7.

SEELIGER, U. **Coastal plant communities of Latin America.** San Diego: Academic Press, Inc., 1998.

SEELIGER, U.; CORDAZZO, C. V. & BARBOSA, F. **Os Sites e o programa Brasileiro de pesquisas ecológicas de longa duração.** Belo Horizonte v.1 184 p, 2002.

SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C. **O Estuário da Lagoa dos Patos: Um Século de Transformações.** Rio Grande: FURG, 2010, 180 p.

SLIFKIN, M. **Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species.** Journal of Clinical Microbiology, v. 38, p. 4626–4628, 2000.

SILVEIRA, S. E. **Diversidade de fungos e leveduras na região estuarina da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino, RS.** 133 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

SMITH, H.L; GOODNER, K. Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. **Journal of Bacteriology**, v. 76, p. 662-665, 1958.

SOUSA, F. M. P. de. **Diversidade fúngica e bacteriana em diferentes substratos em três trechos do rio Água Suja, Porto Nacional/TO.** 84 f. Dissertação de Mestrado - Curso de Mestrado em Ciências do Ambiente, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2010.

SPERANDIO, Eugenio Miranda. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado.** 2012. x, 90 f., il. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

STADEN, R. et al. The Staden package. **Methods in Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 132, p. 11-130, 2000.

STEIN, C. E. **Estudo do papel de *Spartina alterniflora* como espécie bioindicadora de contaminação por elementos traço no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape (SP).** Dissertação de Mestrado em Ciência, área de Oceanografia Química e geológica – Universidade de São Paulo, 2011. 151 f.

STRAUSS, M.L.A. *et. al.* **Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts.** *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v.91, p. 182-190, 2001.

TAMURA, K. *et al.* MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. ***Molecular Biology and Evolution***, Oxford, v. 28, n. 1, p. 2731-2739, 2011.

TAYLOR, D. L.; HOLLINGSWORTH, T. N.; MCFARLAND, J.; LENNON, N. J.; NUSBAUM, C.; RUESS, R. W. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. ***Ecology***, 2013.

VALENTE, P. **Identificação convencional e molecular de leveduras isoladas do filoplanos de bromélias.** 2000. 92 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

WALLACE, T.H. **Biological Treatment of a Synthetic Dye Water and an Industrial Textile Wastewater Containing Azo Dye Compounds.** 2001. 79 f. Msc Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blackburg, Virginia, USA, 2001.

ZEE, F.P.Van der. **Anaerobic dye reduction**. 2002. 142 f. Doctoral thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2002.

8 Anexos

Tabela 1. Média dos valores médios de produção enzimática obtidos pelos isolados produtores nos testes em triplicata

Valor do Pz médio das triplicatas						
Isolados	AMILASE	CASEINASE	CMC	ESTERASE	GELATINA	TRIBUTIRINA
BEL 001		0,552116072	0,497715347	0,546774444	0,561250832	0,844894973
BEL 003	0,609504492	0,635867423	0,326688221	0,674852109	0,894161011	0,756957788
BEL 004	0,189399713			0,378993335	0,85457722	0,219857963
BEL 005	0,34283147		0,906486767	0,443477687	0,944473508	0,694681352
BEL 006			0,700102634	0,512218328		0,444364238
BEL 008	0,572713726	0,72768913	0,243098922	0,601154728	0,389970579	0,875527426
BEL 009	0,648449383	0,499798104	0,172707429	0,775330521		0,527081748
BEL 09b	0,572130836	0,43762308	0,247848735	0,669122939		0,561631944
BEL 010			0,952777778			0,860039918
BEL 011	0,741651739	0,656915501	0,414029926	0,418327966	0,464204741	0,754056656
BEL 012		0,477472674		0,77187115	0,68416577	0,481884481
BEL 013	0,701492808	0,751332647	0,370075132	0,522902438	0,609081617	0,828402367
BEL 014				0,613617214	0,980075795	0,341093394
BEL 016	0,705000983	0,687581207	0,479261338	0,461928984	0,696977584	0,428836996
BEL 017			1			0,833158447
BEL 018						0,721483306
BEL 019	0,60897611	0,636103267	0,366717076	0,531279746		0,510907492
BEL 020			1		0,9	0,433860277
BEL 022				0,402775007		0,629904801
BEL 023				0,278195531	0,936920982	0,584317743
BEL 024			1			0,928057554
BEL 025				0,478307757		0,487571083
BEL 026			1	0,621012195	0,913699923	0,460808876
BEL 028						0,534063719
BEL 032		0,81300641	0,697131756	0,752385186	0,501696251	0,627769301
BEL 033	0,722043268	0,621822122	0,315775721	0,805117565		0,702968658
BEL 034	0,521178489	0,525683538	0,257501924	0,834550211		0,483153255
BEL 035	0,592440916	0,444924997	0,286215119	0,522631021	0,421161824	0,652050265
BEL 036	0,533221214	0,650028061	0,394961598	0,546728784	0,725401384	0,488093783
BEL 037	0,626305177	0,767537178	0,394529702	0,805631589	0,520255845	0,597226484
BEL 038					1	0,592486222
BEL 039						0,9388
BEL 040					0,971276596	0,599862782
BEL 041						0,702205882
BEL 042						0,508287293
BEL 043	0,257329494			0,313794664		0,325225593
BEL 044		0,428565369				0,522837977
BEL 045	0,178029257			0,28050908	0,70939275	0,320965307
BEL 046	0,291936335			0,626516742	0,862902454	0,350480347
BEL 047	0,565421554			0,479593998		0,688082169
BEL 048						0,513159528
BEL 049		0,558644089				
BEL 050	0,430784456		0,934753082	0,657894737		0,489361702

BEL 051	0,574104234	0,662535531	0,242826297	0,767593051	0,651413075	0,702509931
BEL 052	0,355485283	0,855642518		0,481671333		0,571021571
BEL 053		0,459697144	0,954735113	0,589521828	0,647452192	0,590914461
BEL 054					0,920840065	0,679407176
BEL 055			0,993993994			0,631038027
BEL 056		0,457622445	0,655379627	0,512758318	0,924735742	0,698730795
BEL 057	0,302632647		0,344353138	0,42129991		0,260232132
BEL 058		0,23365866			0,886172651	0,442434211
BEL 059						0,588461532
BEL 060	0,466800162	0,499213969	0,388324661	0,502723154	0,444610248	0,498306363
BEL 061	0,577368526	0,554392975	0,375592318	0,954180117	0,745171761	0,486562764
BEL 062						0,485796464
BEL 063	0,163372149			0,352997199	0,935215373	0,92003
BEL 064					0,978969238	0,97164751
BEL 065		0,730083898			0,600253672	0,479189117
BEL 066		0,865759637	0,205833555	0,619347134	0,912167338	0,970042796
BEL 067				0,317030829		0,580888889
BEL 068				0,689188739		0,944636678
BEL 069		0,249950464			0,299445206	0,97265625
BEL 070						0,962421712
BEL 071		0,546824666			0,530570387	0,503613644
BEL 072						0,928571429
BEL 073		0,626428494		0,748374998	0,53131324	0,476433952
BEL 074	0,670757267	0,715316376	0,523924695	0,526479504	0,635267541	0,433881928
BEL 075						0,9505
BEL 078		0,447693390			0,625907798	0,469742515
BEL 079					0,699373708	0,826809578
BEL 080	0,316177083	0,882352941		0,555183266		0,627558045
BEL 081		0,634812936	0,876529114		0,567006278	0,568224299
BEL 082	0,260097777	0,216452991			0,550283192	0,165445064
BEL 083	0,519592877		0,952888889	0,341567568		0,599722905
BEL 084	0,305243879	0,93625498		0,220015608		0,142909298
BEL 085		0,685037439	0,777725518	0,490550627	0,552361472	0,6424
BEL 086	0,708786686	0,831295844		0,542825441		0,879514195
BEL 087	0,313035766	0,705714286		0,248818273		0,374215567
BEL 088	0,191977279			0,258540684	0,804095998	0,717322835
BEL 089	0,288276113			0,588744671	0,496492602	0,28281028
BEL 090	0,188573327		0,824093567	0,262688041	0,898778999	0,257142857
BEL 091	0,712253202		0,409580435	0,374522439		0,327493549
BEL 092			0,929090909		0,368253367	0,448863636
BEL 093	0,753703672		0,709428476	0,332254139		0,383659636
BEL 094	0,728392368		0,910023061	0,44777403		0,32812509
BEL 095	0,42167549		0,340436809	0,332471571		0,469319563
BEL 096						0,391516924
BEL 097						0,656300904
BEL 098		0,536165046		0,794672755	0,377732483	0,427703241
BEL 099						0,441685912
BEL 100	0,563353912	0,66464577	0,482327725	0,548222185	0,728036787	0,629228723

BEL101	0,403902018			0,338556981		0,451842105
BEL102	0,900957637	0,522222222	0,320669037	0,358072804	0,853197674	0,554297257
BEL103						0,827645012
BEL104	0,891975922	0,550276201	0,490719249	0,631189964	0,495649372	0,877014614
BEL105	0,420643883			0,422119973		0,326393238
BEL106	0,639071955					0,503014643
BEL107						0,337891738
BEL108		0,495754276		0,159272958		0,76948736
BEL109	0,344196119	0,429429664	0,202664316	0,691301513		0,477536232
BEL110	0,529780457	0,353842913	0,327210702	0,595920951	0,635579939	0,515185185
BEL111				0,514904258	0,696196034	0,570725275

Valores de Pz:

Negativo	Fracamente positivo	Fortemente positivo
Pz = 1	Pz $\geq 0,64 < 1$	Pz $< 0,64$

(COSTA, 2006; PRICE et al., 1982; RIBAS; MARCHESAN; ONOFRE, 2009).

Tabela 2. Morfologia colonial

Grupo	Cor	Tamanho	Forma	Margem	Elevação	Brilho	Superfície	Consistência
1	laranja	pequena	circular	filamentosa	bosselada	ausente	rugosa	cremosa
2	rosa	variada	circular	ondulada	convexa	ausente	lisa	cremosa
3	preta	pequena	circular	filamentosa	bosselada	ausente	lisa	cremosa
4	rosa	pequena	circular	filamentosa	bosselada	ausente	rugosa	quebradiça
5	rosa	variada	circular	filamentosa	espraiada	presente	lisa	mucóide
6	creme	grande	circular	filamentosa	espraiada	presente	lisa	cremosa
17	rosa	grande	circular	filamentosa	bosselada	ausente	rugosa	quebradiça
19	rosa	variada	circular	ondulada	convexa	presente	rugosa	mucóide

Grupo	Cor	Tamanho	Forma	Margem	Elevação	Brilho	Superfície	Consistência
7	creme	variada	irregular	inteira	convexa	presente	lisa	cremosa
8	laranja	variada	circular	inteira	convexa	presente	lisa	cremosa
9	salmão	pequena	circular	inteira	convexa	presente	lisa	cremosa
10	branca	pequena	circular	inteira	convexa	presente	lisa	cremosa
11	branca	variada	circular	inteira	convexa	ausente	lisa	cremosa
12	rosa	variada	circular	inteira	convexa	presente	lisa	cremosa
13	creme	pequena	circular	inteira	bosselada	ausente	lisa	cremosa
14	branca	variada	circular	ondulada	bosselada	presente	lisa	cremosa
15	branca	pequena	circular	inteira	espraiada	presente	lisa	cremosa
16	pêssego	variada	circular	inteira	pulvinada	presente	lisa	cremosa
18	rosa	variada	circular	ondulada	convexa	presente	lisa	cremosa