



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Diversidade genética e funcional de leveduras
presentes em solos de mineração e áreas do entorno**

Geisianny Augusta Monteiro Moreira

Orientador: Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale

Brasília, Março/2015



Diversidade genética e funcional de leveduras presentes em solos de mineração e áreas do entorno

Geisianny Augusta Monteiro Moreira

Orientador: Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Brasília, Março/2015.



**Diversidade genética e funcional de leveduras
presentes em solos de mineração e áreas do
entorno**

Geisianny Augusta Monteiro Moreira

Dissertação aprovada em 12 de março de 2015 por:

Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale – Orientador

**Profa. Dra. Cristine Chaves Barreto – Universidade Católica de
Brasília**

**Dra. Mariana Rodrigues Fontenelle - Embrapa Hortaliças -
CNPQ**

Brasília, Março/2015.

Agradecimentos

Gratidão a Deus, pelo dom da vida e por ser o acaento e conforto nos momentos de desespero. À Maria, mãe de Deus, pela poderosa intercessão e por sempre passar na frente da minha vida e abrir os caminhos.

Gratidão à minha mãe, Fátima Maria, por sempre me apoiar e incentivar e por estar presente em todos os momentos. Aos meus irmãos, George e Geovany, pelo apoio, incentivo e churrascos no meio da semana. A minha irmã, Marília, por ser amiga, confidante e companheira em todos os momentos. A minha sobrinha, Lorena, por achar a biologia tão legal e cogitar a possibilidade de ser bióloga igual a tia. Ao meu pai, Geraldo, pelo apoio.

Gratidão aos tios, tias, primos e primas da família Moreira e família Monteiro pelo apoio constante e reuniões familiares que foram base para me fazer Ser Humano. Principalmente à linhagem de tias professoras/educadoras que sempre despertaram em mim a sede pelo conhecimento. Aos progenitores, topo da minha árvore genealógica, vó Maria e vô Chico Moreira; vó Amélia e vô Cosme Monteiro, minha eterna gratidão pelos ensinamentos, carinho e educação.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Helson Mario, pelo apoio e incentivo desde a graduação, e por acreditar no meu potencial científico.

Agradeço a todos os professores que me ajudaram no processo de construção do conhecimento durante a minha vida acadêmica.

Gratidão a minhas amigas Catharine, Érica, Flávia, e Caroline por serem mais que colegas de laboratório. Agradeço a leveza que vocês dão aos dias corridos e pesados da pós-graduação. Agradeço pelas conversas, pelos cafés, *happy hours*, cinemas, clube da luluzinha e convívio diário que agrega conhecimento e descontração.

Gratidão a amiga Thais por estar sempre presente, pelas conversas, apoio constante, conselhos e discussões filosóficas no pôr do sol.

Gratidão as minhas cunhadas, Ana e Cida, por me tirar do 'mundo mestrado' e mostrar que existe vida além da pós-graduação.

Agradeço ao Marcos pelos chocolates e por me elevar ao *status* de co-orientadora. A minha irmã científica, Elenice, que em tão pouco tempo de

convivência se tornou tão querida. E ao Victor pela ajuda laboratorial durante o mestrado.

Agradeço a equipe de Coletas de Solo: Prof. Juvenil, Prof. Jackson, Prof. Helson, Larissa, Patrícia, Amanda e Wellington por compartilharem comigo uma semana trabalhosa de coletas e a tornarem tão agradável. E ao Juliano, do CeBio – Vale, por tornar possível o reconhecimento dos pontos e locais de coleta e pela ajuda indispensável.

Agradeço a Regina Sartori e a Rafaella pela ajuda com o DGGE.

Aos técnicos de laboratório Cezinha e Arê pela ajuda no laboratório. A Maria pelas vidrarias de laboratório sempre limpas e pelo café. Ao seu Arlindo pelo excelente chá de erva cidreira.

A secretaria do programa de pós-graduação em Biologia Microbiana, Luciana Medeiros, por sempre me atender prontamente, pela simpatia, dedicação e empenho em ajudar os alunos e melhorar o programa, e pelas conversas no balcão de atendimento.

Agradeço a Prof. Fátima da UFLA pela oportunidade e por tornar possível a execução desse projeto, e a VALE S.A pela concessão do local de estudo.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

*“O papel dos infinitamente
pequenos na natureza é
infinitamente grande.”
Louis Pasteur*

*“Confia no Senhor e fazei o bem; assim
habitarás na terra, e te alimentarás em
segurança.
Deleita-te também no Senhor, e ele te
concederá o que deseja o teu coração.
Entrega o teu caminho ao Senhor;
confia nele, e ele tudo fará.”
Salmos 37:3-5*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Solo como habitat	5
2.2 Micro-organismos presentes nos solos	7
2.3 Leveduras do solo.....	8
2.4 Taxonomia clássica de leveduras	10
2.5 Métodos moleculares para identificação e avaliação da diversidade de leveduras	11
2.5.1 Métodos dependentes de cultivo.....	11
2.5.2 Técnica de fingerprint independente de cultivo – PCR DGGE.....	14
2.6 Aplicação biotecnológica	16
2.6.1 Promoção de crescimento vegetal	20
2.6.2 Tolerância a metais.....	21
2.7 Mineração e Metais pesados	24
2.8 Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais e o Centro de Biodiversidade da Vale S.A (CeBio)	28
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo geral	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1 Áreas amostradas.....	33
5.2 Amostragem.....	34
5.2.1 Análise físico-química do solo	36
5.3 Isolamento de leveduras	36
5.4 Caracterização Morfológica	37
5.4.1 Análise microscópica.....	37
5.5 Caracterização Molecular dos Isolados	38
5.5.1 Extração de DNA	38

5.5.2	MSP – PCR	38
5.5.3	Sequenciamento do gene 26S do RNA ribossomal	39
5.5.4	Análises Filogenéticas e identificação dos isolados	39
5.6	Análises de Diversidade.....	40
5.7	Análise da diversidade de leveduras das amostras de solo por meio de PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis).....	40
5.8	Promoção de crescimento vegetal.....	42
5.8	Tolerância a metal	43
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1	Isolamento de leveduras.....	44
6.1.1	Análises físico-química do solo.....	47
6.2	Caracterização morfológica.....	50
6.2.1	Análise microscópica.....	51
6.3	Caracterização molecular	56
6.3.1	MSP – PCR	56
6.3.2	Sequenciamento do 26S rDNA.....	58
6.3.3	Análises de Diversidade.....	60
6.3.4	Análises Filogenéticas	63
6.3.4.1	Filo Basidiomycota	65
6.3.4.2	Filo Ascomycota	68
6.6	Análise do Gel de Eletroforese com Gradiente Desnaturante (DGGE) das amostras de Solo	72
6.7	Promoção do crescimento vegetal	77
6.8	Tolerância a metal	80
7.	CONCLUSÕES	85
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
9.	ANEXOS	98
9.1	Análises do solo.....	98
9.2	Identificação dos Isolados de Solo e Água e listagem dos códigos de acesso das sequências, identidade, similaridade e e-value do GenBank.....	102

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquematização da estrutura e organização dos genes e espaços intergênicos do RNA ribossomal de leveduras. Adaptado de Baleiras Couto et al (1996).....12
- Figura 2.** Aplicações biotecnológicas de leveduras (adaptado de Johnson & Echavarri-Erasun 2011 apud Walker 1998).....17
- Figura 3.** Produção mineral no Brasil. **A)** Distribuição do valor da produção mineral pelas principais UF'S; **B)** Principais produtos minerais exportados (Anuário Mineral Brasileiro, DNPM, 2010).....24
- Figura 4.** Localização geográfica do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais (Azevedo et al, 2012).....28
- Figura 5.** Minério granulado proveniente da mineração de hematita na Mina do Córrego do Meio, em Sabará – MG (Foto: Juvenil Cares, 2013).....29
- Figura 6.** Áreas amostradas. **A:** Eucalipto; **B:** Cerrado; **C:** Canga; **D:** Barragem; **E:** Mata; **F:** Capim (Fotos: Juvenil Cares, 2013).....33
- Figura 7.** Esquema representativo do processo de amostragem. Os pontos pretos (●) simbolizam os pontos que são amostrados (Swift & Bignell, 2001).....34
- Figura 8.** Imagem representando os locais de coletas de solo e água no Centro de Biodiversidade da Vale S.A (Cebio). As setas vermelhas indicam os pontos amostrados. **A:** Eucalipto, Cerrado, Mata e Barragem; **B:** Capim; **C:** Canga.....35
- Figura 9.** Características físico-químicas das amostras de solo e quantidade de isolados de leveduras.....48
- Figura 10.** Dendograma de similaridade fenética, feito no programa Past 2.17, utilizando o coeficiente Jaccard de similaridade.....51
- Figura 11.** Principais variações morfológicas de colônias das leveduras recuperadas de solos e água, crescidas por 5 dias em meio MYGP pH 5,6, a 28°C. **A:** E1.7; **B:** M7.2; **C:** Ca2.1; **D:** Ca5.1; **E:** M8.2; **F:** M9.2; **G:** B2.2; **H:** B1.2; **I:** Ca2.2.....52
- Figura 12.** Aspectos morfológicos celulares. **A:** Cg4.2, em destaque o pseudomicélio; **B** e **C:** Ca2.1, em destaque o brotamento e pseudomicélio; **D:** M8.2, brotamento em destaque; **E** e **F:** B2.2, formato celular e pseudomicélio. Microscópio ótico (Leica DFC 490).....54

- Figura 13.** Aspectos morfológicos celulares. **A** e **B**: B2.1, em destaque o pseudomicélio e brotamento; **C** e **D**: M9.2, em destaque o brotamento. Microscópio ótico (Leica DFC 490).....55
- Figura 14.** Perfil eletroforético de fragmentos de DNA de 43 isolados de leveduras, recuperados das amostras de solo de Mata, Cerrado, Capim e Canga, amplificados com o primer M13 e agrupados pelo programa BioNumerics® (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica).....57
- Figura 15.** Composição das comunidades de leveduras por área amostrada.....61
- Figura 16.** Similaridade entre as comunidades de leveduras cultiváveis por área amostrada.....62
- Figura 17.** Árvore Filogenética, gerada a partir do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S das leveduras isoladas de amostras de solo e água, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. Os valores de bootstrap são mostrados através do gradiente de cor nos ramos, variando de 0 a 100%. O clado amarelo refere-se ao Filo Basidiomycota, o clado verde ao Filo Ascomycota e o clado azul ao Outgroup formado por espécies do gênero *Rhodotorula*.....64
- Figura 18.** Árvore Filogenética do Filo Basidiomycota, gerada a partir do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S das leveduras isoladas de amostras de solo e água, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. *Rhodotorula* spp. foram utilizadas como outgroup.....66
- Figura 19.** Árvore Filogenética do Filo Ascomycota, gerada a partir do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S das leveduras isoladas de amostras de solo e água, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. *Rhodotorula* spp. foram utilizadas como outgroup.....69
- Figura 20.** Perfil eletroforético de fragmentos de DNA de 15 amostras de solos das áreas de Mata (M), Eucalipto (E), Capim (CA) e Canga (CG), amplificados por nested-PCR com o primer NL1-GC e LS2 e agrupados pelo programa BioNumerics® (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica).....74
- Figura 21.** Árvore Filogenética, gerada a partir do sequenciamento de bandas excisadas do gel de DGGE e amplificadas com os *primers* NL1 e LS2, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de *bootstrap* com 1000 replicatas. Valores de *bootstrap* <50 não são mostrados. *Rhodotorula mucilaginosa* é utilizada como outgroup.....75

Figura 22. Teste de tolerância ao metal Cádmiu com seis isolados da área Mata, crescidos em Meio TM por 5 dias, a 28°C. **A:** 20mM de Cádmiu; **B:** Controle; **C:** 1mM de Cádmiu; **D:** Controle.....81

Figura 23. Morfologia celular e colonial do isolado **Ce4.4**, crescido em Meio TM por 5 dias, a 28°C. **A:** 5mM de Cádmiu; **B:** 20mM de Ferro; **C:** Controle; **D:** Crescimento em 5mM de Cádmiu.....83

Figura 24. Teste de tolerância ao metal Ferro (Fe) com seis isolados da área Mata, crescidos em Meio TM por 5 dias, a 28°C. **A:** 20mM de Fe; **B:** 5mM de Fe; **C:** 1mM de Fe; **D:** Controle.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais fontes antrópicas de metais tóxicos e elementos relacionados (Moreira & Siqueira, 2006).....22

Tabela 2. Pontos amostrais de solo: Identificação e Coordenadas Geográficas.....36

Tabela 3. Amostras e concentrações de DNA (ng/µL) utilizadas nas análises de PCR- DGGE.....40

Tabela 4. Quantidade de isolados de leveduras por amostra.....45

Tabela 5. Táxons de leveduras encontrados nas amostras de solo e água com base nas sequências do domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal.....59

Tabela 6. Índice de Shannon e Evenness das amostras analisadas.....60

Tabela 7. Crescimento de parte aérea (cm) e raiz (cm) dos 56 tratamentos e controle.....78

Tabela 8. Isolados de leveduras mais tolerantes ao Ferro e Cádmiu.....80

Moreira, Geisianny Augusta Monteiro. **Diversidade genética e funcional de leveduras presentes em solos de mineração e áreas do entorno.** Mestrado acadêmico em Biologia Microbiana do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, defendido dia 12 de março de 2015, sob orientação do Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale.

RESUMO

O solo configura-se como um habitat peculiar, complexo e altamente dinâmico. Os micro-organismos fazem parte do solo de maneira indissociável e possuem importante papel ecológico. As leveduras são fungos unicelulares e participam ativamente de processos ecológicos que ocorrem no solo, porém boa parte do conhecimento sobre a diversidade de leveduras em solos permanece desconhecida, principalmente em solos impactados por processos de mineração. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética e funcional de leveduras associadas a solos de mineração, áreas do entorno e amostras de água. Foram coletadas 20 amostras de solo de 5 diferentes áreas (Mata, Eucalipto, Cerrado, Canga e Capim) e 4 amostras de água do Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade da VALE S.A (CeBio). O isolamento de leveduras foi feito em meio MYGP. Caracterização morfológica da colônia e da célula foram feitas. A caracterização genética utilizou MSP-PCR para agrupamento de perfis genéticos similares e o sequenciamento do gene 26S do RNA ribossomal. PCR-DGGE foi utilizada como ferramenta molecular para avaliar a diversidade de leveduras cultiváveis e não cultiváveis das amostras de solo. A caracterização funcional foi feita através de testes de tolerância aos metais Ferro e Cádmio e verificação da habilidade dos isolados como promotores do crescimento de plântulas de arroz. Foram recuperados 72 isolados das amostras de solos e água do CeBio, agrupados em 23 morfotipos de acordo com as características morfológicas. O sequenciamento do Domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal revelou a presença de 6 gêneros: *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Meyerozyma*, *Debaryomyces*, *Lipomyces* e *Aureobasidium*. O gênero *Cryptococcus* foi dominante com 57 isolados, aparecendo também na análise de PCR-DGGE. A composição das comunidades de leveduras associadas a solos de cinco diferentes áreas e a água de um localdo CeBio mostrou-se homogênea entre as áreas. Os testes de tolerância a metais mostraram que apenas dois isolados cresceram nos 2 metais nas concentrações máximas de 5mM para Cd e 20mM para Fe. Os isolados não apresentaram habilidade para aumentar o crescimento de sementes de arroz pré-germinadas in vitro.

Palavras-chaves: Ecologia Microbiana, Leveduras do solo, Mineração, RNA ribossomal, DGGE.

ABSTRACT

The soil is a peculiar habitat with a complex and highly dynamic nature. The micro-organisms are an inseparable part of the soil. Yeasts are unicellular fungi and actively participate in ecological processes occurring in the soil, however most part of knowledge on the diversity of yeasts in soil remains unknown, mainly on soils compacted by mining process. The objective of this study was to characterize the genetic and functional diversity of yeasts associated with mining soils, surrounding areas and water samples. Were collected 20 samples were collected from 5 different places (Mata, Eucalipto, Cerrado, Canga and Capim) and 4 water samples from the Center of Research and biodiversity conservation of VALE S.A (CeBio). The isolation of the yeasts was made using MYGP medium. The isolates were characterized morphologically based on the appearance of the colony on petri plates and cell morphology. The genetic characterization was performed using MSP-PCR for grouping similar genetic profiles and sequencing of the D1/D2 domain of 26S of rDNA. PCR-DGGE was used as a molecular tool for evaluating the diversity of cultivable and non-cultivable yeasts. Functional characterization was done by tests of tolerance to the metals iron and cadmium and verification of the ability of the isolates as growth promoters of rice seedlings. 72 isolates were obtained from soil and water gathered from CeBio, grouped in 23 morphotypes according to its morphological features. The sequence of the domain D1/D2 from 26S rDNA revealed the presence of six genera: *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Meyerozyma*, *Debaryomyces*, *Lipomyces* and *Aureobasidium*. *Cryptococcus* genus was dominant with 57 isolates, also appearing in the analysis of PCR-DDGE. The composition of yeast communities associated with soil and water from five different areas of CeBio was homogeneous among those areas. The tests of metal tolerance showed that only two isolates grew in the 2 metals in maximum concentrations of 5 mM for Cadmium and 20 mM for Iron. The isolates did not demonstrate the ability to increase the growth of rice seeds pre-germinated in vitro.

Keywords: Microbial ecology, Soil yeast, Mining, Ribosomal RNA, DGGE.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a riqueza e distribuição de micro-organismos em ambientes naturais é essencial para o entendimento de quais são os principais grupos de micro-organismos dominantes em cada ambiente e para prever quais as principais funções ecológicas que esses micro-organismos estão mediando. Ainda assim, pouco é conhecido sobre a diversidade e papel ecológico desses micro-organismos.

Ambientes complexos, como os solos, possuem uma grande diversidade de micro-organismos ainda inexplorada. Um grama de solo pode conter mais de 10 bilhões de micro-organismos, e apenas 1% desses micro-organismos são cultivados e caracterizados (Torsvik & Ovreas, 2002).

Dentre os micro-organismos que habitam os solos temos as leveduras. Integrantes do Reino *Fungi*, as leveduras caracterizam-se por serem fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou fissão e não formam corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998). Os solos caracterizam-se como um repositório final ou ainda como um habitat para determinados gêneros de leveduras, e ainda, as comunidades de leveduras presentes nos solos podem, muitas vezes, refletir a comunidade de leveduras associadas a plantas e/ou animais (Phaff & Starmer, 1987; Sláviková & Vadkertiová, 2003).

As leveduras do solo participam de processos ecológicos importantes, tais como: mineralização de matéria orgânica via respiração ou fermentação; solubilização de fosfato; transformação de compostos de nitrogênio e enxofre inorgânicos; proteção de plantas contra patógenos; aumento do crescimento de raízes de plantas; e ainda atuam como presa para artrópodes, bactérias, nematóides e protistas (Botha, 2011).

A composição, estrutura e diversidade de leveduras no solo, assim como a de qualquer outro micro-organismo, pode variar dependendo do tipo de vegetal presente e das características físico-químicas do solo, bem como estação sazonal e grau de contaminação dos solos por atividades antrópicas, como exemplo, a mineração.

O Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, ocupa uma área aproximada de 7.000 km² na porção centro-sudeste do Estado, e é internacionalmente reconhecido pela riqueza significativa de recursos minerais, em especial ouro e ferro (Azevedo et al, 2012). Esta área possui vários locais de mineração, onde explora-se a extração desses recursos naturais desde a época colonial. Algumas minas, como a mina do Córrego do Meio em Sabará pertencente a empresa VALE S.A, foram desativadas e hoje funcionam como um Centro de Estudo da Biodiversidade local com o propósito de recuperar áreas impactadas pela mineração.

O procedimento para remediação e conseqüente recuperação das áreas impactadas pelo processo de mineração é lento e está relacionado à capacidade de restabelecimento do solo, onde se recompõem as características químicas, físicas e biológicas a um nível mínimo, que permita o desenvolvimento de espécies vegetais e da atividade microbiana, tão importante para o estabelecimento e sucessão da macrobiota (Mendes Filho et al, 2010; Soares et al, 2011).

A ação dos micro-organismos sobre os metais tem sido objeto de numerosos estudos, em virtude do seu potencial de aplicação, tanto para a destoxificação quanto para a recuperação de metais nas atividades da indústria de mineração. Processos de biolixiviação utilizam microrganismos que são capazes de concentrar e recuperar os metais perdidos durante o processo de extração de minérios (Schenberg, 2010).

Porém, poucos são os trabalhos que relatam a diversidade de leveduras, em áreas impactadas pelo processo de mineração.

Tendo em vista a importância ecológica das leveduras, a sua versatilidade bioquímica e fisiológica que lhe proporciona ampla aplicação biotecnológica inclusive em processos de biorremediação de áreas impactadas, torna-se essencial o levantamento da diversidade desse grupo em ambientes complexos como o solo, e ainda impactados por atividades antrópicas, como a mineração, para melhor compreender o papel desses micro-organismos no ambiente. Sendo este o objetivo geral dessa dissertação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Solo como habitat

Homogêneo em uma macroescala, heterogêneo à uma escala microscópica, o solo é composto por uma mistura dinâmica de matéria orgânica e partículas minerais de tamanhos variáveis, organismos vivos e restos inanimados. Metade do volume de um solo mineral 'típico' é constituído por partículas e a outra metade por espaço poroso. Seus constituintes sólidos inorgânicos são derivados dos processos de intemperismo de rochas e variam entre os diversos tipos de solos quanto a sua distribuição, tamanho de partículas e mineralogia (Metting, 1992).

Cerca de 50% da composição de um solo mineral "típico" é sólida (minerais e matéria orgânica) e os 50% restantes compreende uma mistura dinâmica de água e ar que flutuam de acordo com as condições ambientais vigentes. Essas flutuações hidrodinâmicas e atmosféricas contribuem para a formação de um ambiente complexo que impulsiona a heterogeneidade da diversidade microbiana do solo (O'Donnell et al, 2007).

O solo compreende partículas minerais de diferentes tamanhos, formas e características químicas, em conjunto com micro-organismos e compostos orgânicos. A matriz do solo é composta por partículas de argila, areia e silte que formam micro e macro agregados cujas superfícies e espaços entre eles são ideias para a colonização e crescimento de micro-organismos (Daniel, 2005). Outra característica analisada em solos diz respeito a sua textura que caracteriza-se pela distribuição e tamanho das partículas de areia (0,02 – 2 mm), silte (0,002 – 0,02 mm) e argila (< 0,002 mm) (Metting, 1992).

O solo apresenta um perfil em camadas (horizontes) quando exposto verticalmente. Os horizontes do solo podem variar em espessura e apresentarem limites irregulares, que se dá pela influência do ar, água, radiação solar e matéria orgânica resultante da interação solo-atmosfera. O solo apresenta, em geral, os seguintes horizontes: 1) Horizonte O, mais superficial e rico em matéria orgânica; 2) Horizonte A, é a camada mais próxima da superfície e é rica em matéria orgânica e partículas minerais, por

isso apresenta coloração escura; 3) Horizonte B, apresenta uma quantidade menor de matéria orgânica e caracteriza-se pela acumulação de argila, óxidos de ferro e alumínio e carbonatos de cálcio; 4) Horizonte C, é a última camada formada pelas modificações químicas causadas por micro-organismos e raízes de plantas no horizonte B, e ainda, possui o material de origem da formação dos solos (Brady & Weil, 2008).

Muitos solos não possuem um ou mais dos horizontes anteriormente citados, em resposta as condições ambientais vigentes e tipo de vegetação presente, como exemplo, observa-se que solos desenvolvidos em regiões secas possuem horizontes diferentes daqueles desenvolvidos em regiões úmidas (Brady & Weil, 2008).

Devido a essas características o solo configura-se como um habitat peculiar com natureza complexa e altamente dinâmica. Tais características permitem que organismos com metabolismos díspares possam conviver lado a lado, interagindo em estado de equilíbrio dinâmico, muitas vezes com relações de dependências essenciais para sua sobrevivência, proporcionando, assim, condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (Moreira & Siqueira, 2006).

O microhabitat é o local particular – ou volume do solo – onde células, populações ou comunidades microbianas são encontradas e cujo status físico-químico influencia seu comportamento, que, por sua vez, também influenciam o ambiente dentro desse espaço (Moreira & Siqueira, 2006). Enquanto que o micro-ambiente do solo é definido como o status físico-químico em que as células, populações ou comunidades microbianas são encontradas em determinado espaço de tempo (Metting, 1992).

Os micro-organismos se adaptam aos microhabitats e formam consórcios microbianos interagindo entre si e com outras partes da biota do solo, já que os microhabitats oferecem condições favoráveis como disponibilidade de água e substratos necessários ao seu crescimento (Torsvik & Ovreas, 2002).

A estrutura da comunidade microbiana do solo não só reflete a heterogeneidade física da matriz do solo, mas também a habilidade dos micro-organismos em modificar e estruturar seu ambiente físico por meio da

produção de polissacarídeos, polipeptídeos e outros metabólitos, alterando assim o seu microambiente. Além disso, a comunidade microbiana do solo pode modificar também seu ambiente químico por meio da produção de metabólitos tais como ácidos, bases e ligantes (O'Donnell et al, 2007).

Segundo O'Donnell et al (2007) comparações estatísticas entre comunidades microbianas de diferentes locais sugerem que comunidades sob as mesmas condições ambientais compartilham estrutura e composição semelhantes. Além disso, as atividades antrópicas como a poluição, urbanização ou práticas de agricultura intensiva podem afetar a estrutura das comunidades microbianas do solo e, conseqüentemente, a sua capacidade de manutenção do ecossistema global.

De acordo com Brady & Weil (2008) o solo possui seis funções ecológicas cruciais para o bom funcionamento do nosso ecossistema, sendo elas: 1) apoia o crescimento de plantas superiores, principalmente por fornecer um meio para as raízes e prover as plantas com os nutrientes essenciais, portanto, as propriedades físico-química do solo determina a natureza da vegetação presente; 2) participa do ciclo hidrológico, controlando o destino da água e afetando os processos de perda, utilização, contaminação e purificação da água; 3) atua como um sistema natural de reciclagem de nutrientes, por meio da decomposição de matéria orgânica morta; 4) é o habitat para inúmeras formas de vida; 5) influencia a composição e condição física da atmosfera captando e liberando uma grande quantidade de dióxido de carbono, oxigênio, metano e outros gases; 6) atua como meio de fundação/apoio para a construção civil.

2.2 Micro-organismos presentes nos solos

Os micro-organismos do solo, também chamados coletivamente de microbiota, são representados por cinco grandes grupos: bactérias, actinobacterias, fungos, algas e protozoários. Apesar de constituírem somente 1 a 4% do carbono total e ocuparem menos de 5% do espaço poroso do solo, a diversidade e a quantidade dos micro-organismos é bastante elevada, porém

nem todos estão em seu estado ativo devido a condições ambientais estressantes, tais como o déficit de nutrientes (Andreola & Fernandes, 2007).

Estima-se que a comunidade de organismos eucarióticos no solo seja maior do que 1,5 milhões de espécies e que a riqueza de espécies esteja além de 10.000 para procariotos (Swift et al, 2008).

Os micro-organismos fazem parte do solo de maneira indissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas, como: decomposição e ressíntese da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e fixação biológica do nitrogênio; atuando também na produção de substâncias promotoras ou inibidoras do crescimento de plantas e ação antagônica a patógenos. A microbiota do solo age também nos processos de intemperismo das rochas, desempenhando papel fundamental na gênese do solo (Andreola & Fernandes, 2007).

Por estarem tão intimamente associados aos processos ecológicos do ambiente, os micro-organismos apresentam grande potencial como indicadores da qualidade do solo (Hofman et al, 2003), justamente por serem os responsáveis por recuperar formas de energia e nutrientes que outros organismos não conseguem (Loreau, 2001). Para tanto, alguns índices de diversidade, como o de Shannon-Weaver; e de riqueza, como o de Margalef e Menhinik, fornecem informações importantes sobre o padrão de distribuição de espécies microbianas dentro do ecossistema em estudo (Kennedy, 1999).

Apesar da sua grande importância ecológica menos de 1% dos micro-organismos presentes no solo são cultiváveis, portanto a maior parte da diversidade microbiana dos solos ainda não está mapeada e caracterizada (Torsvik & Ovreas, 2002).

2.3 Leveduras do solo

Integrantes do Reino Fungi (Domínio Eukarya), as leveduras possuem características típicas dos fungos como parede celular rígida e núcleo organizado com membrana nuclear, não possuindo pigmentos fotossintetizantes, tendo por isso nutrição heterotrófica por meio de absorção de nutrientes; não possuem motilidade e sua reprodução sexuada ocorre por

meio de células especializadas denominadas esporos. Diferenciam-se dos demais fungos por possuírem um talo que é predominantemente unicelular, reproduzirem assexuadamente por brotação ou fissão binária e não formarem corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998).

O solo caracteriza-se como um repositório final para o armazenamento ou ainda como o local de desenvolvimento de certas espécies de leveduras. A densidade de leveduras pode variar desde nenhuma até milhares de células por grama de solo. A comunidade de leveduras encontradas nos solos pode, muitas das vezes, refletir a comunidade de leveduras associadas a plantas, animais e outros fungos que vivem acima do solo, embora algumas espécies de leveduras sejam habitantes típicas do solo (Phaff & Starmer, 1987; Sláviková & Vadkertiová, 2003).

A composição, estrutura e diversidade de leveduras do solo podem variar conforme as características físicas, químicas e biológicas do microhabitat em que se encontram. O tipo de vegetação, grau de contaminação por xenobióticos, época do ano e clima também afetam as populações de leveduras (Dias & Schwan 2010).

Solos cultivados e de florestas podem apresentar centenas de milhares de células de leveduras por grama, enquanto que solos nutricionalmente pobres podem apresentar algumas ou poucas dezenas de células por grama de solo (Sláviková & Vadkertiová, 2003; Dias & Schwan, 2010).

Segundo Botha (2011) existe uma correlação positiva entre o tamanho da população de leveduras e a concentração de nitrogênio e carbono no solo, indicando que a diversidade de espécies encontradas é proporcional à disponibilidade de nutrientes no solo, além disso, a comunidade de leveduras pode exercer um efeito positivo sobre a estrutura do solo, a reciclagem de nutrientes e ainda sobre o crescimento de plantas.

Leveduras do solo participam de processos ecológicos importantes, tais como: mineralização de matéria orgânica via respiração ou fermentação; solubilização de fosfato; transformação de compostos de nitrogênio e enxofre inorgânicos; proteção de plantas contra patógenos; aumento do crescimento de raízes de plantas; e ainda atuam como presa para artrópodes, bactérias, nematóides e protistas (Botha, 2011).

A ocorrência de leveduras em solos já foi relatada em solos cultiváveis e florestais da Eslováquia (Sláviková & Vadkertiová, 2000; Sláviková & Vadkertiová, 2003); solos da Amazônia (Vital et al, 2002); solos de uma fábrica de etanol no sul da Coréia (Choi et al., 2010); solos cultivados do Paquistão (Mushtaq & Hashmi, 2004); e em solos da Antártica (Connell et al., 2008).

2.4 Taxonomia clássica de leveduras

A identificação convencional de leveduras é baseada principalmente em métodos que utilizam caracteres morfológicos (aparência macroscópica das colônias, aparência microscópica da célula e modo de reprodução sexual, entre outros), testes bioquímicos e fisiológicos que incluem fermentação de diferentes fontes de açúcares, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas, entre outros (Kurtzman et al, 2011), e essa classificação convencional de leveduras é baseada em cepas, que são obtidas a partir do isolamento da levedura em cultura pura a partir de uma única colônia (Barnett et al, 1986).

As avaliações macro e microscópica de colônias constituem etapas necessárias à identificação de leveduras. Caracteres morfológicos das colônias como aspecto, cor, forma e tamanho são utilizados para classificar os isolados em morfotipos (Dias & Schwan, 2010).

A morfologia celular também é analisada, observando-se caracteres como a forma e tamanho da célula e formação ou não de pseudo-hifas (Dias & Schwan, 2010); se o modo de reprodução vegetativa se dá por brotamento (multilateral, bipolar ou unipolar), por fissão ou por formação de filamentos; e a forma, estrutura e modo de formação dos esporos sexuais (ascósporos ou teliósporos), quando presentes (Barnett et al, 1986).

Testes bioquímicos e fisiológicos envolvidos na identificação de leveduras avaliam características do metabolismo com relação à capacidade fermentativa de diversas fontes de carboidratos (mono, di e oligossacarídeos), assimilação de diversas fontes de carbono e nitrogênio, requerimento de vitaminas e outros fatores de crescimento, resistência à cicloheximida e outros

compostos e produção/secreção de metabólitos (ácido acético, amido, enzimas) (Dias & Schwan, 2010).

Tradicionalmente as características fisiológicas utilizadas na taxonomia de leveduras são: a capacidade fermentativa de certos açúcares; assimilação de diversas fontes de carbono e nitrogênio; crescimento sem suplementação exógena de certas vitaminas; crescer na presença de 50%-60% de Glicose; crescimento em diferentes temperaturas; resistência à cicloheximida; produção de lípidos; produção de polissacarídeos; hidrólise de uréia e formação de ácidos. O conjunto de características semelhantes é utilizado principalmente para distinção entre espécies, porém alguns gêneros também podem ser separados por alguma característica fisiológica em particular, como exemplo, espécies do gênero *Saccharomyces* são conhecidas pela suas habilidades em fermentar D-glucose (Barnett et al, 1986).

2.5 Métodos moleculares para identificação e avaliação da diversidade de leveduras

2.5.1 Métodos dependentes de cultivo

Métodos moleculares tornaram-se importantes ferramentas na identificação de leveduras, assim como em outros micro-organismos cuja visualização de estruturas morfológicas essenciais para taxonomia é difícil, sendo, portanto, uma ferramenta útil em análises filogenéticas (Boundy-Mills, 2006).

A determinação do conteúdo de GC (bases guanina-citosina) do DNA foi um dos primeiros métodos moleculares utilizados no estudo taxonômico de leveduras, não sendo necessária a amplificação do DNA da amostra via PCR, porém, requer grandes quantidades de DNA (Boundy-Mills, 2006). Essa análise demonstra que leveduras com afinidade ascomicética possuem aproximadamente 28-50 mol% de G+C, enquanto que leveduras basidiomicéticas possuem 50-70 mol% de G+C (Kurtzmann & Fell, 2006).

O sequenciamento de ácidos nucleicos tem se tornado uma ferramenta promissora por conseguir resolver relações próximas e distantes entre microorganismos, dependendo da molécula, gene ou região utilizada, e ainda por possuir um maior número de caracteres (ou informação) que estão contidos em uma sequência simples (Valente et al, 1999).

Os genes presentes no RNA ribossomal tem sido bastante utilizados em estudos taxonômicos pelo fato de ser universal, ou seja, estar presente em todos os organismos, que evoluíram de um ancestral em comum; está presente em várias cópias e também pela presença de regiões codificantes e não-codificantes. Genes nucleares ou regiões diferentes dos genes do RNA ribossomal raramente são utilizadas em taxonomia molecular de leveduras (Valente et al, 1999).

Em leveduras, os genes ribossomais estão organizados em *clusters* possuindo os seguimentos 5.8S, 18S e 26S, além das regiões ITS e IGS, que estão presentes em várias cópias no genoma (Figura 1). Os espaços internos transcritos (ITS) se intercalam entre esses genes e são denominados ITS1 e ITS2 (Barnett et al, 2000). O gene 26S tem sido utilizado para discriminar a nível de gênero e espécies, enquanto a região ITS tem sido utilizada para separar espécies próximas e/ou subespécies, bem como a região IGS que discrimina subespécies e até estirpes quando combinada com análises utilizando enzimas de restrição (Valente et al, 1999).

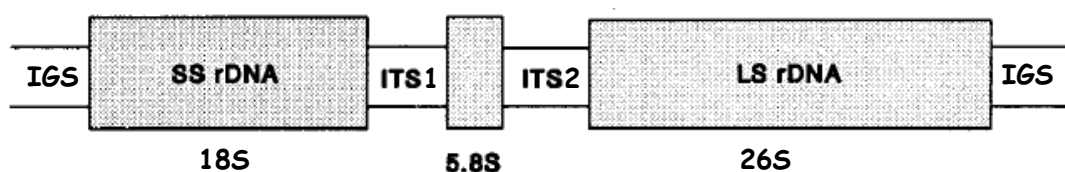


Figura 1. Esquematização da estrutura e organização dos genes e espaços intergênicos do RNA ribossomal de leveduras. Adaptado de Baleiras Couto et al (1996).

Kurtzman & Robenett (1998) demonstraram que a sequência de nucleotídeos do domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal possui variação suficiente para identificar quase todas as espécies conhecidas de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas, embora em algumas leveduras

basiomicéticas seja necessário sequenciar também as regiões ITS do RNA ribossomal (Fell, 2000). Em geral, estirpes da mesma espécie apresentam no máximo 3 nucleotídeos diferentes (0 a 0,05%) nas sequências do 26S, enquanto que espécies diferentes apresentam seis ou mais substituições em bases nucleotídicas (1%), exceto para alguns grupos de leveduras basidiomicéticas (Kurtzman & Fell, 2006), o que auxilia na identificação de espécies novas em amostras ambientais.

Diversos estudos de diversidade de leveduras têm empregado a amplificação do DNA pela técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos, como *Microssatellite-primed* PCR (MSP-PCR), que é baseado na amplificação de regiões repetitivas em *tandem* (Landell, 2009; Gadanho et al, 2006). A utilização desta técnica tem crescido significativamente e, dependendo do *primer* utilizado e das bandas analisadas, tem poder discriminatório para diferenciar linhagens ou espécies (Lasker & Ran, 2004). Resultados obtidos por meio desta técnica indicam que este método é apropriado para caracterização de grandes grupos de isolados devido a sua boa reprodutibilidade e simplicidade (Gadanho, 2001).

Sampaio et al (2001) estabelece o uso de MSP-PCR com os *primers* (GTG)₅ e M13 para leveduras com afinidade basidiomicética do gênero *Rhodosporidium*, demonstrando boa reprodutibilidade e capacidade de produzir perfis homogêneos e específicos para cada espécie. Libkind et al (2003) utilizaram os mesmos *primers* para caracterizar leveduras pigmentadas isoladas de ambientes aquáticos da Patagônia, permitindo a identificação rápida de até 90% dos isolados, com boa reprodutibilidade e baixo custo.

Assim como Yurkov et al (2011) que agruparam as estirpes isoladas de solos sobre diferentes regimes de manejo, considerando como co-espécies as estirpes que apresentaram perfil eletroforético idêntico, e posteriormente sequenciando apenas os representantes de cada grupo, reduzindo assim o tempo e custo para execução da pesquisa.

Para identificação mais segura, atualmente são utilizados em conjunto a taxonomia morfológica e molecular, conhecido por Taxonomia Polifásica onde todos os caracteres mencionados são levados em consideração para a

identificação de leveduras (Libkind et al., 2003; Sampaio et al., 2001; Sampaio, 2002; Duarte et al., 2013; Wuczowski & Prillinger, 2004).

2.5.2 Técnica de fingerprint independente de cultivo – PCR DGGE

A diversidade microbiana e o seu papel na natureza ainda é pouco explorado devido a dificuldades de cultivo da maior parte dos micro-organismos, já que apenas 1% do total de micro-organismos presentes na natureza podem ser isolados em cultura pura principalmente devido ao pouco conhecimento sobre as condições ideais de cultivo da maioria desses micro-organismos (Muyzer, 1999).

As técnicas de PCR-DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) e PCR-TGGE (*temperature gradient gel electrophoresis*) têm sido crescentemente utilizadas em estudos de diversidade microbiana em amostras ambientais. Essas técnicas detectam espécies viáveis, mas não cultiváveis que podem ocorrer em solos, sendo capazes de prover informações sobre a diversidade de leveduras que crescem nos solos, bem como a resposta dessas populações frente a mudanças ambientais (Dias & Schwan, 2010).

Nesta abordagem, o DNA total é extraído a partir da amostra ambiental e então o grupo de micro-organismos de interesse é amplificado por PCR utilizando-se grupos específicos de *primers* universais. Os *amplicons* gerados são então submetidos a um gel com gradiente desnaturante e separados com base nas diferenças em suas sequências de nucleotídeos. As bandas individuais geradas podem ser sequenciadas para se obter a identidade da espécie em questão (Prakitchaiwattana et al, 2004).

A separação de fragmentos de DNA no DGGE baseia-se na diminuição da mobilidade eletroforética das moléculas fita dupla de DNA em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturação, formado por uréia e formamida, fazendo com que moléculas com diferentes sequências apresentem diferenças na migração durante a corrida do gel (Muyzer, 1999).

Uma das principais vantagens do DGGE em ecologia microbiana é a análise simultânea de múltiplas amostras o que permite o monitoramento da dinâmica das comunidades frente a flutuações sazonais e perturbações

ambientais. A técnica porém apresenta algumas desvantagens por não conseguir detectar comunidades raras no ambiente, eventualmente pode ocorrer a co-migração de fragmentos de DNA com diferentes sequências, entre outras (Muyzer, 1999).

Trabalhos utilizando a metodologia do PCR-DGGE sobre a diversidade de leveduras em amostras ambientais tem priorizado *primers* para o gene 26S do RNA ribossomal (Hesham et al, 2006; Nielsen et al, 2005; Durand et al., 2013; Masoud et al, 2004; Cocolin et al, 2000; Cocolin et al, 2013).

Lv et al (2013) utilizaram o isolamento em cultura e a PCR-DGGE para elucidar a diversidade de leveduras presentes durante o processo de fermentação do arroz para produção de vinho na China, verificando que várias espécies de leveduras não foram detectadas por cultivo mas foram detectadas no DGGE. Da mesma forma, algumas espécies só foram detectadas em cultivo, como exemplo, *Sporobolomyces nylandii* que foi detectada apenas em meio de cultura. Portanto, recomenda-se que as abordagens dependentes e independentes de cultivo sejam utilizadas em estudos de diversidade microbiana afim de se obter uma visão mais abrangente sobre a diversidade presente na amostra em estudo.

Prakitchaiwattana et al (2004) também utilizaram cultivo e DGGE para avaliar a ecologia de leveduras em uvas para produção de vinho e concluíram que ambas abordagens devem ser utilizadas em conjunto para melhor esclarecer a dinâmica e estrutura da comunidade de leveduras, uma vez que a PCR-DGGE é menos sensível que o cultivo para detectar espécies raras, porém detecta uma maior diversidade de diferentes espécies de leveduras do que o isolamento em meio de cultura.

Nielsen et al (2005) utilizaram o DGGE para avaliar a diversidade de populações de leveduras durante o processo de fermentação de cacau encontrando que as espécies *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida krusei* e *Pichia membranifaciens* são as mais abundantes, indicando que podem possuir um importante papel no processo de fermentação do cacau. Além disso, o DGGE mostrou um agrupamento de espécies de acordo com o método de fermentação e tempo utilizado, demonstrando que a técnica pode ser útil para o

estudo da dinâmica das populações de leveduras durante o processo de fermentação do cacau.

El Sheikha et al (2009) utilizaram a técnica de DGGE para determinar a origem geográfica de frutos de espécies de *Physalis* provenientes do Egito, levando em consideração que a composição microbiana de frutos está relacionada a sua origem geográfica. Os autores verificaram que o perfil da comunidade de leveduras gerado a partir do DGGE para frutos de três espécies de *Physalis* provenientes de quatro regiões do Egito foram específicos para cada local podendo ser utilizado como um código de barras para distinguir a origem dos frutos, tornando-se uma ferramenta de rastreabilidade útil para produtos alimentares que são importados e exportados.

Embora o DGGE seja uma ferramenta útil para estudos em ecologia microbiana, ainda faz-se necessário o uso de técnicas convencionais de isolamento em cultura pura para uma melhor compreensão da fisiologia de leveduras e seu papel na ciclagem de elementos químicos (Muyzer, 1999).

Outros trabalhos utilizaram a PCR-DGGE para analisar a diversidade de leveduras em amostras de *Coffea arabica* detectando as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida xestobii* (Masoud et al, 2004); para monitorar a dinâmica e diversidade das comunidades de leveduras e fungos filamentosos produtores de ocratoxina A durante o processamento de frutos de café (Durand et al, 2013); para caracterizar a diversidade de leveduras durante o processo de fermentação da uva para a produção de vinho (Cocolin et al, 2000); e para acompanhar as mudanças populacionais de leveduras durante o processo de biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em reatores (Hesham et al, 2006); porém trabalhos envolvendo a PCR-DGGE para o estudo de diversidade de leveduras em amostras de solos são raros e/ou inexistentes.

2.6 Aplicação biotecnológica

As leveduras tem beneficiado a humanidade por milênios. Elas possuem ampla e fundamental importância na indústria, na ciência, na medicina e na agricultura. Participam de processos fermentativos para a produção de cerveja,

vinhos, destilados, queijos, entre outros. Além disso, as leveduras têm sido amplamente aplicadas na produção de etanol, produção de enzimas e outras moléculas bioativas, e ainda para expressão heteróloga de proteínas. Na agricultura, as leveduras apresentam papel importante como agentes de biocontrole, biorremediação e indicadores da qualidade ambiental (Figura 2) (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011).

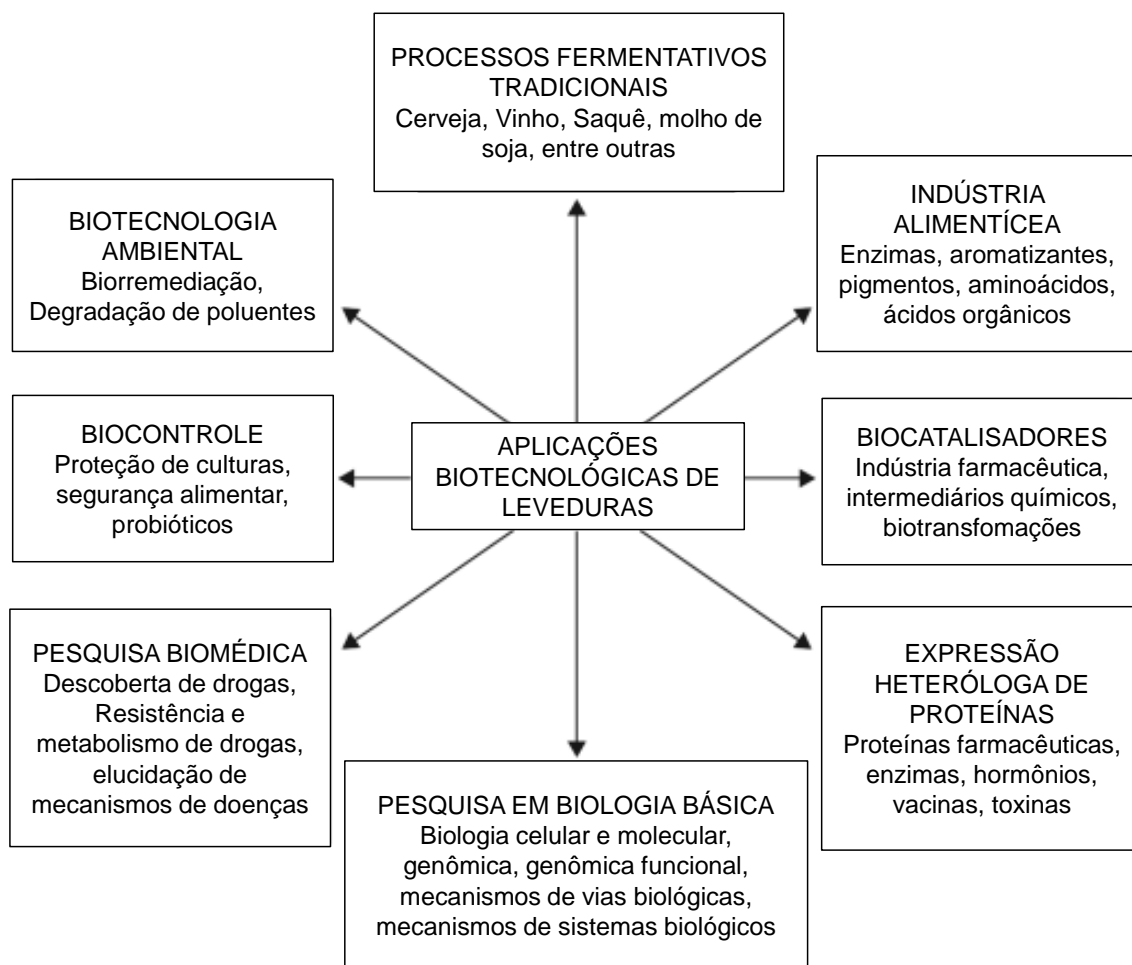


Figura 2. Aplicações biotecnológicas de leveduras (adaptado de Johnson & Echavarri-Erasun 2011 apud Walker 1998).

Muitas são as espécies de leveduras empregadas em processos biotecnológicos sendo que as principais são: *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua fisiologia fermentativa única (Johnson & Echavarri-Erasun 2011) e por ser o principal organismo modelo para estudos em sistemas biológicos eucarióticos (Mustacchi et al, 2006); *Debaryomyces hansenii*, uma levedura oleaginosa, utilizada na síntese de produtos lácteos, processos fermentativos e

formação de enzimas líticas, e eficiente em produzir xilitol a partir de D-glicose proveniente da hidrólise de madeira (Breuer & Harms, 2006); *Schizosaccharomyces pombe* e *Pichia pastoris* utilizadas para a expressão heteróloga de proteínas (Johnson & Echavarri-Erasun 2011).

A produção de uma proteína funcional por meio da expressão heteróloga está intimamente relacionada com a maquinaria celular do organismo que está produzindo a proteína (Macauley-Patrick et al, 2005), por isso leveduras são organismos promissores por serem eucariotos e não requererem meios complexos para se desenvolverem.

Pichia pastoris tem sido utilizada para a expressão heteróloga de proteínas pela sua habilidade em utilizar várias fontes de Carbono, e principalmente por utilizar o metanol como única fonte de energia e carbono. A via metabólica do metanol é então utilizada para a expressão heteróloga de proteínas uma vez que é regulada por promotores e, estes por sua vez, podem ser reprimidos na presença de glicose, ativados por glicerol e induzidos por metanol, uma vez que a expressão gênica é dependente da fonte de Carbono (Gellisen et al, 2005).

Candida rugosa têm sido amplamente aplicada em processos biotecnológicos e industriais devido a produção de lipases que atuam em processos fermentativos da indústria alimentícia, como: produção de sucos, alimentos assados, vegetais fermentados, processos de enriquecimento de laticínios bem como desenvolvimento de sabores e aromas desejáveis de queijos; produção de óleos, margarinas e sorvetes; e na indústria farmacêutica essas lipases também atuam como catalisadoras para a síntese de inúmeras drogas (Benjamin & Pandey, 1998).

Espécies de *Kluyveromyces*, presentes no leite, são eficientes em utilizar o dissacarídeo lactose como fonte de carbono, por isso tem sido aplicada em processos industriais envolvidos na eliminação desse açúcar, como por exemplo na indústria de laticínios. Além disso, essas leveduras tem sido utilizadas em processos de biorremediação da indústria de laticínios para otimizar a eliminação do soro resultante da produção de queijos. *Kluyveromyces* spp. produzem uma β -galactosidase bastante utilizada na

indústria e biotecnologia de alimentos envolvidos na eliminação da lactose (Rubio-Teixeira, 2006).

Cepas de *Yarrowia lipolytica*, uma levedura dimórfica com afinidade ascomicética, isoladas de solos, água do mar, sedimentos e águas residuais possuem habilidades fisiológicas para a degradação de hidrocarbonetos, tais como alcanos e compostos aromáticos, além da sua capacidade em tolerar alguns metais pesados, o que a qualifica como promissora em alguns processos de biorremediação ambiental (Zinjarde et al, 2014).

Singh et al (2013) recuperaram leveduras criofílicas a partir de núcleos de gelo do Ártico, encontrando espécies de *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, e verificaram que as cepas isoladas foram capazes de produzir amilases, celulases, proteases, lipases, ureases e catalases a quantidades variáveis e a diferentes temperaturas.

Landell (2006) analisou o perfil enzimático de leveduras e fungos leveduriformes isolados do filoplano de bromélias e demonstrou atividade positiva para as enzimas amilase, caseinase, gelatinase, celobiase, lactase e esterase.

Outros trabalhos também verificaram a produção de enzimas por leveduras como: proteases produzidas por leveduras isoladas de frutos de café, encontrando uma boa atividade proteolítica para a levedura *Citeromyces matritensis* (Rodarte et al, 2011); atividade celulolítica por leveduras isoladas de solo, água e sedimentos da Indonésia, identificando o isolado *Trichosporon sporotrichoides* com maior atividade (Mangunwardoyo et al, 2011); amilase produzida por uma cepa de levedura ascomicética isolada de solo rico em amido (Fossi et al, 2005); lipases, proteases e xilanases por leveduras isoladas principalmente de sedimentos marinhos, líquens e solos da Antártica (Duarte et al, 2013); e xilanases produzidas por leveduras associadas a madeira em decomposição da Mata Atlântica Brasileira (Morais et al, 2013).

Já no campo da agricultura, Sperandio (2012) demonstrou a eficiência de isolados de *Aureobasidium* sp., isolados de folhas e frutos de plantas nativas do Cerrado, no controle do bolor verde do citros causado por *Penicillium digitatum*. Zong et al (2010) demonstraram que a aplicação em conjunto das leveduras antagonistas *Candida guilliermondii* e *Pichia*

membranaefaciens é eficiente no controle do patógeno *Botrytis cinerea* em frutos de tomate, em casos de infecções pós-colheita.

Nally et al (2012) avaliaram a capacidade de leveduras isoladas de uvas em controlar o crescimento do fitopatógeno *Botrytis cinerea*, encontrando potencial antagônico nas cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* nos testes *in vivo*. Liu et al (2013) elucidaram que o mecanismo utilizado por *Kloeckera apiculata* para controlar o crescimento do fungo *Penicillium italicum*, agente causal do mofo azul em citros, foi a competição por nutrientes.

Gollner et al (2006) analisaram a aplicação combinada dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* e *Glomus mosseae* com as leveduras do solo *Candida sake*, *Cryptococcus aerius* e *Williopsis californica* em milho e verificaram que a ação combinada desses fungos com as leveduras resultou no aumento da biomassa da parte aérea em plantas de milho.

2.6.1 Promoção de crescimento vegetal

A rizosfera das plantas é habitat para uma enorme diversidade de micro-organismos, muitos dos quais interagem mutualisticamente com as raízes (Amprayn et al, 2012). Dentro desses organismos mutualísticos estão os micro-organismos capazes de promover o crescimento de plantas por mecanismos diretos, como a suplementação nutricional de plantas e produção de fitohormônios; e indiretos, como a atividade antifúngica (Nutaratat et al, 2014).

Muitos estudos tem mostrado que os micro-organismos podem estimular significativamente o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de plantas. Isto deve-se a sua capacidade de produzir substâncias estimulantes do crescimento e substâncias com ação de antibiose contra patógenos, levando a imunização das plantas e aumentando a absorção pelas raízes (Ignatova et al, 2013).

Amprayn et al (2012) demonstraram que a levedura *Candida tropicalis* HY (CtHY), isolada do solo, é capaz de agir como promotora do crescimento de plântulas de arroz em até 35% quando comparado com plântulas não

inoculadas com a levedura, devido a capacidade da levedura em produzir Ácido Indolacético (AIA).

Abd El-Hafez & Shehata (2001) relataram que uma linhagem de *Rhodotorula* sp. foi capaz de aumentar o crescimento e produção de frutos de tomate. El-Tarabily (2004) demonstrou que a inoculação de solo com as leveduras *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* e *Trichosporon asahii*, em combinação ou isoladamente, promoveram o crescimento de beterraba, comprovado pelo aumento da raiz e caule através da produção do Ácido indolacético (AIA), Giberelinas e outras substâncias promotoras do crescimento vegetal.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi testada quanto a sua capacidade em controlar o fungo *Fusarium oxysporum* e como promotora do crescimento vegetal de beterraba, verificando-se um aumento na taxa de germinação de até 85% nas sementes tratadas com a levedura e uma atividade antifúngica de até 58% contra o fitopatógeno *F. oxysporum* (Shalaby & El-Nady, 2008).

2.6.2 Tolerância a metais

Os metais no solo originam-se da intemperização dos materiais de origem e de fontes antropogênicas como pesticidas e fertilizantes, rejeitos orgânicos e industriais, mineração e queima de combustíveis, irrigação e deposição atmosférica. Assim como ocorre com outros elementos, os metais passam por uma biociclagem no solo através da absorção pelas plantas, biomassa microbiana e transformação em formas livres (iônica) ou de quelato que se equilibram com as demais formas encontradas no solo (Moreira & Siqueira, 2006).

Metais pesados são bem conhecidos por serem tóxicos para a maioria dos organismos quando presentes em concentrações excessivas (Giller et al, 1998). Eles são os principais poluentes do meio aquático (águas subterrâneas, água do mar, águas residuárias de processos industriais, etc) (Li et al, 2014), e de solos tornando-se um risco para saúde humana e ambiental (Jiang et al, 2008).

Fontes antrópicas decorrentes do desenvolvimento tecnológico mundial tem contribuído para a elevação da concentração de metais no solo (Tabela 1), e este fato interfere diretamente no ciclo desses elementos na natureza e também pode influenciar, de modo negativo, outros processos, tendo interferência negativa também no ecossistema (Moreira & Siqueira, 2006).

Tabela 1. Principais fontes antrópicas de metais tóxicos e elementos relacionados (Moreira & Siqueira, 2006).

Metal	Atividade		Metalúrgica		Agricul- tura	Manufa- turados	Rejeitos Sólidos	Lodo de esgoto
	Carvão/Petróleo/Energia		Não Ferrosa/Ferrosa					
As	X		X		X	X		X
Cd	X		X		X	X		X
Cr	X	X	X	X	X	X	X	X
Cu	X	X	X			X	X	X
Hg	X	X			X		X	
Mn	X		X	X	X	X	X	X
Ni	X	X	X		X			X
Pb		X	X			X	X	X
Se	X							
V	X	X			X			
Zn	X		X	X	X	X	X	X

A combustão do carvão mineral é a atividade de maior impacto ambiental, por possuir o maior número de metais poluentes para o solo, seguida pela deposição de lodo de esgoto e resíduos da indústria petrolífera e siderúrgica (Moreira & Siqueira, 2006).

Micro-organismos do solo estão expostos a concentrações e biodisponibilidade de metais que variam de acordo com o pH, a textura do solo, a quantidade de matéria orgânica presente, bem como exsudados de raízes de plantas, e estes fatores podem influenciar também a toxicidade desses metais para os micro-organismos ali presentes (Giller et al, 2009). Além disso, acredita-se que os micro-organismos sejam muito mais sensíveis ao estresse causado por concentrações tóxicas de metais pesados do que os animais do solo ou plantas crescendo nos mesmos solos (Giller et al, 1998).

Micro-organismos expostos a concentrações elevadas de metais pesados podem apresentar mudanças morfológicas, como o crescimento quimiotrófico negativo em hifas dos fungos *Geotrichum candidum*, *Gliocadium roseum*, *Humicola grisea* e *Trichoderma viride* em resposta a presença de Cádmio e Cobre (Fomina et al, 2000); alterações na composição do conteúdo celular (carotenóides, proteínas totais, açúcares solúveis e teor de fosfato) foram observadas em uma estirpe de *Rhodotorula* sp. em resposta à presença de Cádmio (Li et al, 2008); alterações na superfície celular da estirpe *Cryptococcus* sp. foram observadas, como o encolhimento e distorção da parede celular na presença de Cádmio e depressões da parede celular na presença de Zinco e Chumbo (Singh et al, 2013).

Alguns fungos são capazes de acumular íons metálicos em suas células em concentrações maiores do que aquela encontrada no meio em que estão, como exemplo estão as leveduras do solo *Candida tropicalis*, *Geotrichum capitatum*, *Rhodotorula minuta* e *Williopsis californica* que foram capazes de acumular concentrações consideráveis dos metais Cádmio, Cobalto, Chumbo, Níquel, Cobre e Manganês, capacitando-as para serem utilizadas em processos de biorremediação de áreas poluídas com estes metais (Falih, 1998). *Zygosaccharomyces rouxii* e *Saccharomyces cerevisiae* foram eficientes na bioacumulação de Cádmio, mostrando potencial para biorremediação em ambientes contaminados (Li et al, 2014).

Vadkertiová & Sláviková (2006) testaram leveduras isoladas de água, solo e folhas de árvores quanto a sua capacidade em tolerar diferentes concentrações dos metais pesados Zinco, Cobre, Níquel e Cádmio, encontrando resultados positivos para estirpes com afinidade ascomicéticas.

Fidalgo (2011) também analisou os mecanismos fisiológicos envolvidos na resistência a metais pesados em duas cepas de leveduras do gênero *Cryptococcus* isoladas de ambientes acidofílicos ricos em enxofre indicando que a resistência e sobrevivência em ambientes ricos em metais como Arsênio, Cádmio, Cobre e Zinco se dê principalmente pela acumulação de peptídeos tiolados como mecanismo de desintoxicação, e que os processos podem variar dependendo da espécie e estirpe analisada.

Mariano-da-Silva & Basso (2004) verificaram a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade do Cádmio sobre o crescimento de duas cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrando que a vinhaça apresenta um efeito protetor minimizando os efeitos deletérios do metal sobre as cepas testadas, já que a vinhaça é rica em compostos minerais tais como cálcio, zinco e enxofre que podem por competição ou complexação atenuar a toxidade do cádmio sobre as leveduras.

2.7 Mineração e Metais pesados

A mineração no Brasil remonta à época colonial mais precisamente no século XVII. No século XVIII, ocorreu o primeiro grande *boom* mineral, ocasionado pela descoberta do ouro, estabelecendo o setor mineral brasileiro com posterior declínio e esgotamento das jazidas de ouro. Já o segundo ciclo mineral iniciou-se no século XX, onde as descobertas mais marcantes foram o manganês, o petróleo, as jazidas ferríferas, o carvão, cobre, chumbo, fosfato e zinco, entre outros (Barreto, 2001).

Atualmente Minas Gerais é o estado que mais contribui para a produção mineral e arrecadação decorrente da extração de minério, sendo que o produto mineral mais exportado é o Ferro (Figura 3) (DNPM, 2010). Os principais depósitos de minério de Ferro do Brasil estão localizados no Quadrilátero Ferrífero/MG, na Serra de Carajás/PA e na Morraria de Urucum/MS, e representam quase 20% das reservas mundiais de minério de Ferro (Carmo et al, 2011).

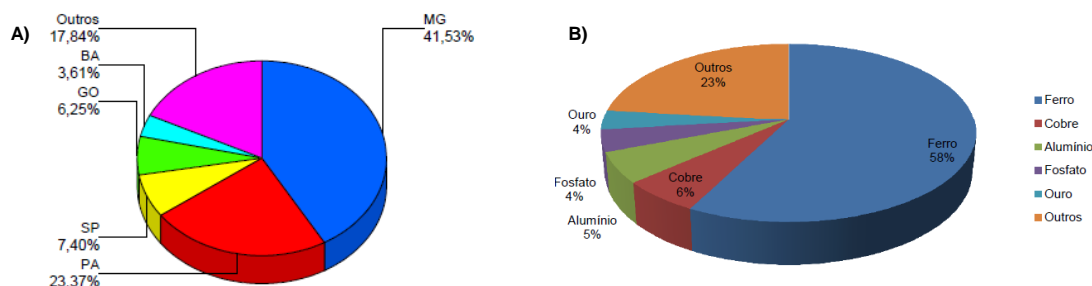


Figura 3. Produção mineral no Brasil. **A)** Distribuição do valor da produção mineral pelas principais UF'S; **B)** Principais produtos minerais exportados (Anuário Mineral Brasileiro, DNPM, 2010).

Além do Ferro, o Brasil é detentor de um conjunto diversificado e expressivo de substâncias minerais em minas de excelência global, operadas por empresas de grande porte situadas em vários estados brasileiros, como: nióbio em Araxá/MG, bauxita em Oriximiná/PA, caulim em São Domingos do Capim e Monte Dourado/PA, estanho em Presidente Figueiredo/AM, grafita em Salto da Divisa/MG, talco em Ponta Grossa/PR e em Brumado/BA e magnesita em Brumado/BA (Barreto, 2001).

Os minerais metálicos respondem pela maior fatia da produção nacional e o minério de ferro tem sido o grande destaque da economia mineral brasileira, país esse que destaca-se por possuir uma extensão territorial de dimensões continentais e expressiva geodiversidade caracterizada por uma ampla variedade de ambientes geológicos propícios a uma grande gama de mineralizações (Cabral Junior et al, 2008).

Porém, praticamente toda atividade de mineração implica supressão da vegetação local ou impedimento de sua regeneração. Em muitas situações, o solo superficial de maior fertilidade também é removido, e os solos remanescentes ficam expostos aos processos erosivos que podem acarretar em assoreamento dos corpos d'água do entorno, além da poluição causada por substâncias lixiviadas e carregadas ou contidas nos efluentes das áreas de mineração, tais como óleos, graxa e metais pesados (Mechi & Sanches, 2010), o que conseqüentemente afeta a diversidade das comunidades de micro-organismos presente na vegetação e nos solos.

O processo de mineração contribui para a geração de sub-resíduos metálicos contribuindo para o acúmulo de metais em concentrações tóxicas (Roane e Pepper, 2000). Os metais presentes no solo passam por processos de transformação que podem incluir absorção pelas plantas, utilização por micro-organismos com aumento da biomassa microbiana e transformação em formas livres ou quelatos. A biomassa microbiana pode estar envolvida no processo de mineralização deste metal ou imobilização. Os principais mecanismos de imobilização são através da excreção de produtos metabólicos, adsorção superficial, absorção e bioacumulação (Moreira & Siqueira, 2006).

Designa-se metal pesado o grupo de elementos que, ocorrem em sistemas naturais em pequenas concentrações e apresentam densidade igual

ou acima de 5 gcm⁻³. Os metais pesados no ambiente originam-se de fertilizantes, pesticidas, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mineração, fundição, refinamento e incineração de resíduos urbanos e industriais (Duarte & Pasqual, 2000).

Vários metais pesados como o Cádmio, Cromo, Cobre, Mercúrio e Níquel inibem processos bioquímicos do solo, quando presentes em concentrações críticas, como a respiração, a amonificação e a nitrificação. A concentração do metal no solo acima da qual ocorre inibição do processo depende exclusivamente do metal e do processo em consideração, sendo que o Cádmio e Mercúrio são os que exibem maior toxicidade para respiração e nitrificação (Moreira & Siqueira, 2006).

O Cádmio é um elemento traço cuja concentração na crosta terrestre varia de 0,15 a 0,20 ppm. É um elemento que encontra vários usos como: em fungicidas, baterias, tratamento de borracha, produção de pigmentos, em indústrias de galvanoplastia dando brilho e resistência à corrosão a objetos. A contaminação dos solos por Cádmio se dá principalmente por mineração, poluição atmosférica de indústrias metalúrgicas, queima de combustíveis fósseis, entre outros (Duarte & Pasqual, 2000).

A ação dos micro-organismos sobre os metais tem sido objeto de numerosos estudos, em virtude do seu potencial de aplicação, tanto para a destoxificação quanto para a recuperação de metais nas atividades da indústria de mineração (Schenberg, 2010).

Dependendo do estado de oxidação do metal pesado presente no ambiente os micro-organismos podem mobilizar ou imobilizar esse metal. A mobilização é feita através da biolixiviação, que é um mecanismo de solubilização bastante utilizado na mineração (Vullo, 2003). Processos de biolixiviação utilizam micro-organismos que são capazes de concentrar e recuperar os metais perdidos durante o processo de extração de minérios (Schenberg, 2010).

Já os mecanismos de imobilização de metais incluem: a biossorção, bioacumulação, biomineralização e biotransformação. A biossorção caracteriza-se pela retenção do metal na superfície celular, sendo muito utilizada em processos de biorremediação de metais como o Cádmio. A

bioacumulação caracteriza-se pela internalização do metal pesado na célula microbiana. A biomineralização ocorre com a precipitação do metal, enquanto que a biotransformação produz modificações químicas no metal pesado tornando-o pouco solúvel (Vullo, 2003).

O procedimento para remediação e conseqüente recuperação das áreas impactadas pelo processo de mineração é lento e está relacionado à capacidade de restabelecimento do solo, onde se recompõem as características químicas, físicas e biológicas a um nível mínimo, que permita o desenvolvimento de espécies vegetais e da atividade microbiana, tão importante para o estabelecimento e sucessão da microbiota (Mendes Filho et al, 2010; Soares et al, 2011).

Uma das estratégias para a recuperação do solo minerado é a reposição da camada superficial orgânica sobre o solo que fornece nutrientes para o crescimento de plantas e serve como banco de sementes, além de ajudar na conservação da biodiversidade de micro-organismos que participam da ciclagem de nutrientes e forma associações simbióticas com plantas, permitindo o seu estabelecimento (Matos, 2009).

Poucos são os trabalhos que relatam a diversidade de leveduras em áreas impactadas pelo processo de mineração, sendo mais focado para o estudo de bactérias e fungos filamentosos. Melloni et al (2004) avaliaram a densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos, em reabilitação, de mineração de bauxita e verificaram que o tipo de vegetação utilizado na recuperação das áreas afeta a população de bactérias; a densidade de bactérias foram baixas se comparadas às de solos agrícolas, e ainda que o grupo de bactérias predominante foram do gênero *Azospirillum*.

Matos (2009) avaliou a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em áreas de mineração de bauxita revegetadas com dendê, não encontrando uma correlação positiva entre o estabelecimento das plantas de dendê com a presença de relação simbiótica entre bactérias e fungos. Já Caproni et al (2005) encontraram uma alta densidade de esporos de fungos micorrízicos em áreas de mineração de bauxita revegetadas com *Acacia magium*.

Lins et al (2007) verificaram que a mistura de espécies diferentes de fungos micorrízicos arbusculares e sua inoculação em plantas contribuem para o desenvolvimento de mudas de *Leucaena leucocephala* em solos de Caatinga sob impacto de mineração de Cobre.

2.8 Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais e o Centro de Biodiversidade da Vale S.A (CeBio)

O Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, ocupa uma área aproximada de 7.000 km² na porção centro-sudeste do Estado (Figura 4), e é internacionalmente reconhecido como um importante terreno pré-cambriano com significativos recursos minerais, em especial ouro e ferro. O Quadrilátero Ferrífero possui clima temperado-quente com duas estações bem definidas: inverno seco e verão chuvoso (Azevedo et al, 2012).

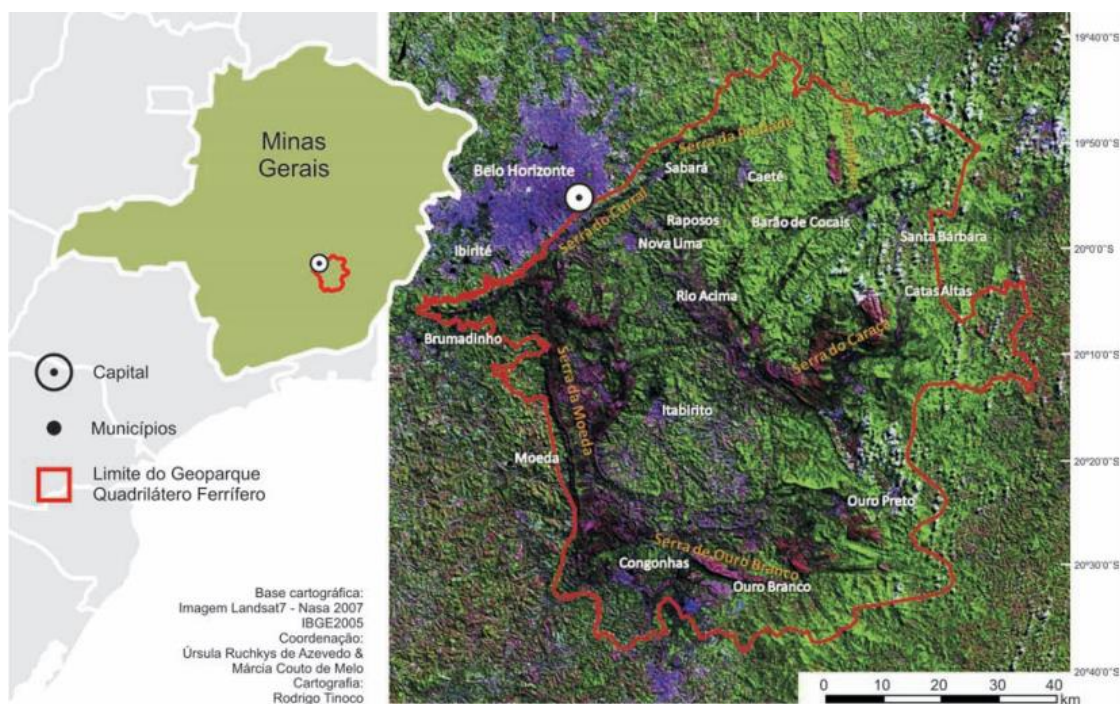


Figura 4. Localização geográfica do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais (Azevedo et al, 2012).

A região possui uma grande riqueza de flora, com sua cobertura vegetal sendo partilhada entre os Biomas Cerrado e Mata Atlântica, que atualmente

encontra-se bastante degradado, representado principalmente por fragmentos de vegetação. O Bioma Cerrado é composto por um mosaico de fitofisionomias, indo desde áreas florestais como matas ciliares e matas de galerias até campos rupestres, que ocorrem geralmente em altitudes superiores a 900 metros, sobre afloramentos rochosos, principalmente cangas, com solo arenoso, fino ou cascalhento, pobre em nutrientes e matéria orgânica e com baixa capacidade de retenção de água (Azevedo et al, 2012).

O Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio) foi criado em 27 de junho de 2008 pela empresa Vale do Rio Doce S.A na antiga mina de Córrego do Meio, em Sabará-MG (Lobo, 2008). A mina do Córrego do Meio é a mina mais antiga na região do Quadrilátero Ferrífero. Suas reservas de hematita compacta foram exploradas durante 65 anos, desde 1940 até a exaustão em 2005, produzindo minério granulado (Figura 5) para uso em processos siderúrgicos de redução direta e alto-fornos (Azevedo et al, 2012).



Figura 5. Minério granulado proveniente da mineração de hematita na Mina do Córrego do Meio, em Sabará – MG (Foto: Juvenil Cares, 2013).

O CeBio possui um banco de germoplasma para arquivamento genético da flora e possui a missão de produzir 1 milhão de mudas por ano de espécies típicas do Quadrilátero Ferrífero para reflorestamento de propriedades da Vale e de outras áreas afetadas pela ação humana ou desastres naturais (Lobo, 2008; Azevedo et al, 2012).

Nesse contexto o CeBio insere-se como alvo de estudo da rede BIOSBRASIL (www.biosbrasil.ufla.br), formada por um grupo de pesquisadores de várias instituições de pesquisa, com 8 anos de experiência nacional e internacional, atuando na avaliação da diversidade de grupos de organismos do solo denominados "funcionais chave" por atuarem em processos imprescindíveis para a manutenção da sustentabilidade dos ecossistemas. Nesse sentido, a avaliação da diversidade de leveduras em solos de áreas do CeBio é um subprojeto pertencente ao projeto intitulado "Diversidade de plantas e de organismos dos solos com potencial biotecnológico e indicadores de impacto ambiental no Estado de Minas Gerais" sob coordenação da professora Doutora Fatima Maria de Souza Moreira da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

O CeBio possui áreas remanescentes de Mata Atlântica e Cerrado, bem como áreas remanescentes do processo de mineração, Canga e Capim, e regiões reflorestadas com Eucalipto, que serão amostradas e analisadas nesse estudo.

As cangas são afloramentos ferruginosos associadas às formações ferríferas, e que ocorrem geralmente nas porções mais altas do relevo sobre os principais depósitos de minério de Ferro do Brasil (Carmo et al, 2011; Jacobi & Carmo, 2008).

Esses afloramentos ferruginosos abrigam uma vegetação rupestre característica, que é principalmente arbustiva, em conjunto com um grande número de herbáceas, gramíneas e orquídeas, porém devido a sua localização restrita e de difícil acesso, e ainda por estar associada a depósitos de minério de ferro de alta qualidade, as comunidades de plantas das cangas estão entre as mais ameaçadas e menos estudadas comunidades vegetais. A alta diversidade contrasta com condições edafo-climáticas severas como alta

intensidade de radiação UV, variações térmicas no substrato, perda rápida de água e alto teor de metais pesados (Jacobi & Carmo, 2008).

A área de Capim é uma região em recuperação dominada praticamente pelo Capim gordura (*Melinis minutiflora*). Gramíneas são frequentemente plantadas ou semeadas em áreas em processo de reabilitação, devido principalmente a sua capacidade de estabelecer relações mutualísticas com bactérias diazotróficas endofíticas que incorporam nitrogênio por meio da fixação biológica e produzem substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (Melloni et al, 2004).

3. JUSTIFICATIVA

Devido a complexidade da amostra a ser estudada (amostras de solo e água) e do local em que serão amostradas (antiga área de mineração), e ainda, o importante papel de micro-organismos do solo nos processos de recuperação de áreas impactadas, justifica-se o estudo da diversidade de leveduras nos locais mencionados para o melhor entendimento de quais são as espécies ou grupos presentes na área e, futuramente, inferir o seu papel ecológico nesse ambiente.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade genética e funcional de leveduras, bem como a estrutura e composição das comunidades presentes em solos de mineração e no seu entorno e em amostras de água.

4.2 Objetivos específicos

- Estimar a riqueza, estrutura e composição da comunidade de leveduras presentes em solos de mineração, áreas do entorno e amostras de água;
- Identificar as leveduras isoladas por meio de sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal e características morfológicas;
- Comparar a estrutura da comunidade de leveduras nas diferentes áreas por meio de PCR-DGGE;
- Avaliar o potencial das leveduras isoladas como promotoras de crescimento vegetal de plântulas de arroz;
- Avaliar a tolerância dos isolados de leveduras aos metais Ferro e Cádmio.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Áreas amostradas

Neste estudo foram avaliadas a diversidade de leveduras presentes em solos e água de áreas pertencentes ao Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio), sendo elas: amostras de solo com cobertura vegetal de Eucalipto, Cerrado, Canga, Mata, Capim e água de uma Barragem próxima a área de Eucalipto (Figura 6).



Figura 6. Áreas amostradas. **A:** Eucalipto; **B:** Cerrado; **C:** Canga; **D:** Barragem; **E:** Mata; **F:** Capim (Fotos: Juvenil Cares, 2013).

5.2 Amostragem

O processo de amostragem foi realizado conforme descrito por Swift & Bignell (2001). De acordo com este método, para cada ponto amostral foram coletados 12 pontos formando dois círculos concêntricos ao redor do ponto amostral com 3 m de distância entre eles, de forma que o círculo externo possua um raio de 6 m (Figura 7). Com o auxílio de um trado foram retirados apenas os 20 cm iniciais do solo e então foram homogeneizados afim de se obter ao final uma amostra composta pelos 12 pontos coletados.

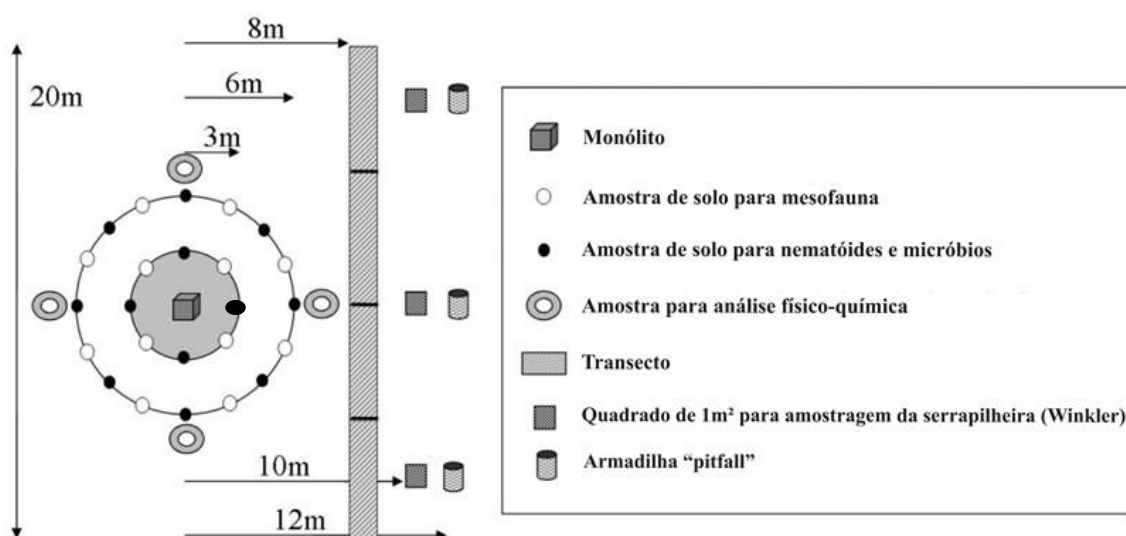


Figura 7. Esquema representativo do processo de amostragem. Os pontos pretos (●) simbolizam os pontos que são amostrados (Swift & Bignell, 2001).

As coletas foram realizadas do dia 23 ao dia 27 de setembro de 2013, período de transição entre a estação seca para a estação chuvosa. Foram amostrados 4 pontos por área, totalizando 20 amostras compostas (Figura 8), sendo elas: Eucalipto Extra 1, Eucalipto 2, Eucalipto 3 e Eucalipto 4; Cerrado 1, Cerrado 2, Cerrado 3 e Cerrado 4; Mata 6, Mata 7, Mata 8 e Mata 9; Capim 2, Capim 3, Capim 4 e Capim 5; Canga 1, Canga 2, Canga 4 e Canga 6 (Tabela 2).

As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, mantidas em caixas térmicas e transportadas ao laboratório de Micologia do Departamento

de Fitopatologia da Universidade de Brasília – UnB, para posterior processamento.

Foram coletadas também 4 amostras de água da margem de uma barragem, próxima à área de Eucalipto, que recebe efluentes da cava de mineração.

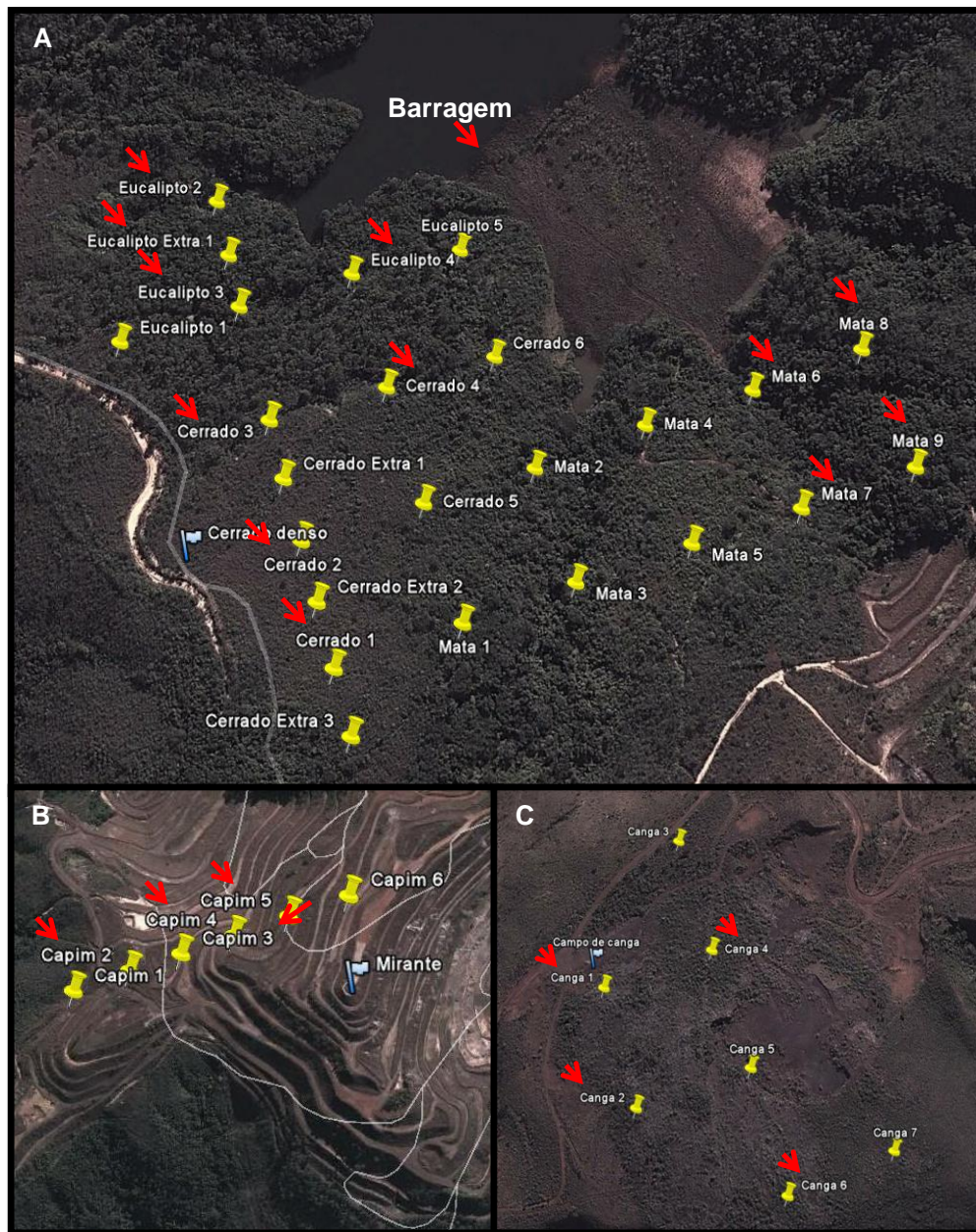


Figura 8. Imagem representando os locais de coletas de solo e água no Centro de Biodiversidade da Vale S.A (Cebio). As setas vermelhas indicam os pontos amostrados. **A:** Eucalipto, Cerrado, Mata e Barragem; **B:** Capim; **C:** Canga.

Tabela 2. Pontos amostrais de solo: Identificação e Coordenadas Geográficas.

Ponto amostral	Código de identificação	Coordenadas geográficas	
		Latitude	Longitude
Eucalipto (E)			
<i>Eucalipto 1</i>	E1	19°51'37.85"S	43°48'23.75"O
<i>Eucalipto 2</i>	E2	19°51'36.27"S	43°48'24.25"O
<i>Eucalipto 3</i>	E3	19°51'39.32"S	43°48'23.29"O
<i>Eucalipto 4</i>	E4	19°51'38.30"S	43°48'20.07"O
Cerrado (Ce)			
<i>Cerrado 1</i>	Ce1	19°51'48.47"S	43°48'20.08"O
<i>Cerrado 2</i>	Ce2	19°51'45.42"S	43°48'21.12"O
<i>Cerrado 3</i>	Ce3	19°51'42.38"S	43°48'22.18"O
<i>Cerrado 4</i>	Ce4	19°51'41.45"S	43°48'18.92"O
Mata (M)			
<i>Mata 6</i>	M6	19°51'41.41"S	43°48'7.90"O
<i>Mata 7</i>	M7	19°51'44.60"S	43°48'6.81"O
<i>Mata 8</i>	M8	19°51'40.38"S	43°48'4.76"O
<i>Mata 9</i>	M9	19°51'43.56"S	43°48'3.57"O
Capim (Ca)			
<i>Capim 2</i>	Ca2	19°51'40.56"S	43°47'53.75"O
<i>Capim 3</i>	Ca3	19°51'39.62"S	43°47'50.61"O
<i>Capim 4</i>	Ca4	19°51'38.59"S	43°47'47.36"O
<i>Capim 5</i>	Ca5	19°51'37.58"S	43°47'44.11"O
Canga (Cg)			
<i>Canga 1</i>	Cg1	19°50'2.06"S	43°44'7.40"O
<i>Canga 2</i>	Cg2	19°50'5.13"S	43°44'6.35"O
<i>Canga 4</i>	Cg4	19°50'1.11"S	43°44'4.15"O
<i>Canga 6</i>	Cg6	19°50'7.25"S	43°44'1.99"O

5.2.1 Análise físico-química do solo

As análises físico-química das amostras coletadas foram realizadas pelo Laboratório de Análises de Solo, do Departamento de Ciência do Solo, da Universidade Federal de Lavras – UFLA/MG.

5.3 Isolamento de leveduras

As amostras foram processadas no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia na Universidade de Brasília – UnB. Para cada

amostra foram tomadas 10 g de solo, que em seguida foi homogeneizado em 90 mL de Água Peptonada 0,1% (0,1% Peptona), em triplicata, e agitados em *shaker* por 1 hora, a 200 rpm. Em seguida, foram diluídos seriadamente até 10^{-3} e 100 µl da amostra foi plaqueado em meio MYGP (0,3% Extrato de malte; 0,3% Extrato de levedura; 0,5% Peptona; 1% Glucose; 2% Ágar) pH 5,6 (Masoud et al, 2004). Já para as amostras de água foi feito o plaqueamento direto de 100 µl da amostra em meio MYGP, sem diluição e em triplicata.

As placas foram incubadas por 2-3 dias a 28°C e as colônias crescidas foram isoladas e repicadas em meio MYGP até a obtenção de culturas puras que posteriormente foram armazenadas em glicerol 15% em freezer a -80°C, e estão depositadas na Coleção de Culturas de Leveduras do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília – UnB.

5.4 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica das colônias dos isolados foi realizada em meio de cultura MYGP pH 5,6 (Masoud et al, 2004) de acordo com a metodologia descrita por Dias & Schwan (2010), onde observou-se aspectos macromorfológicos das colônias, como: tamanho, cor, tempo de crescimento, tipo de borda, forma da superfície e perfil da colônia, entre outros.

A análise fenética e agrupamento morfológico foi feito por meio da construção de uma matriz binária de presença (1) ou ausência (0) da característica morfológica observada para cada colônia, que posteriormente foi analisada no programa Past 2.17 (Hammer et al, 2001). O dendograma de similaridade fenética foi construído pelo algoritmo *Paired group* utilizando o coeficiente Jaccard para cálculo de similaridade.

5.4.1 Análise microscópica

As análises microscópicas foram feitas apenas para um representante de cada gênero de levedura encontrado nas amostras analisadas, após resultado do sequenciamento, objetivando-se a caracterização da morfologia celular a nível de gênero. Para tanto, os isolados foram cultivados em meio

Malte 3% e Ágar Acetato, por um período de 5 a 10 dias, para verificação de produção de estruturas sexuais. Após o crescimento das colônias foi feita a montagem de lâmina microscópica utilizando Lactoglicerol. As lâminas foram observadas e fotografadas em Microscópio ótico (Leica DFC 490), utilizando o programa Leica Qwin V3.

5.5 Caracterização Molecular dos Isolados

5.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir do *pellet* de células, obtido através da centrifugação da cultura de levedura crescida em MYGP líquido, utilizando o protocolo modificado de Kurtzmann & Fell (1998), onde usa-se um tampão de extração (200mM Tris-HCl, 250mM NaCl, 25mM EDTA pH 8, 0,5% SDS) combinado com *beads* de vidro. A extração foi confirmada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e revelado em fotodocumentador L-PIX Sti (Loccus Biotecnologia).

5.5.2 MSP – PCR

O polimorfismo de regiões de mini e micro-satélites (MSP-PCR) foi determinado utilizando o *primer* M13 (5'GAG GGT GGC GGT TCT 3') (Vassart et al, 1987) em uma reação com volume final de 12,5µl, sendo: 5X GoTaq Green Promega®; dNTP's 0,2 mM; MgCl₂ 1,5 mM; *primer* 20 pmol e 1 U Taq DNA Polimerase Invitrogen®.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2% por 4h30min, a 70V. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo e revelado em fotodocumentador L-PIX Sti (Loccus Biotecnologia).

O agrupamento dos isolados foi feito com base no *fingerprint* gerado em gel de agarose e analisado no programa Bionumerics®, utilizando o método UPGMA e o Coeficiente Dice para cálculo de similaridade.

5.5.3 Sequenciamento do gene 26S do RNA ribossomal

A região D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal foi amplificada por PCR utilizando os *primers* NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGAGGG 3') (Kurtzman & Robnett, 1998), gerando um fragmento de aproximadamente 600bp. A reação de PCR foi feita para um volume final de 50µL contendo 20-30 ng de DNA molde, 20 pmol de cada *primer*, MgCl₂ 1,5 mM e 0,2 mM dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). O programa de termociclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 6 minutos.

Os fragmentos foram checados e quantificados em gel de agarose 1,2% utilizando o marcador DNA Low Mass Ladder (Invitrogen®) para quantificar a concentração de DNA.

Os amplicons gerados foram tratados com a enzima Exo-Sap® e enviados para sequenciamento na Universidade Católica de Brasília (UCB), utilizando o sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems, pela metodologia de sequenciamento de Sanger.

5.5.4 Análises Filogenéticas e identificação dos isolados

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os alinhamentos entre as sequências dos isolados e aquelas com identidade acima de 95% do GenBank foram feitas no programa ClustalX 2 (Larkin et al, 2007), e editado no BioEdit (7.1.3.0). As relações filogenéticas foram calculadas no MEGA 6, pelo método de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e o teste de *bootstrap* com 1000 replicatas (Tamura et al, 2013).

5.6 Análises de Diversidade

Os índices de diversidade foram calculados no programa Past 2.17 (Hammer et al, 2001), bem como o dendograma de similaridade entre as amostras, que foi construído pelo algoritmo *Paired group* utilizando o coeficiente Jaccard para cálculo de similaridade, baseando-se apenas nos gêneros encontrados em cada amostra.

5.7 Análise da diversidade de leveduras das amostras de solo por meio de PCR-DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*)

O DNA genômico total das amostras utilizadas no DGGE foi gentilmente cedido pelo professor Doutor Jackson Antônio Marcondes de Souza do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da UNESP - Jaboticabal/SP, integrante da equipe de Solos desse projeto. O DNA total foi submetido à PCR e posterior análise de DGGE com a finalidade de avaliar a diversidade de leveduras presente nas amostras sem a necessidade de cultivo. Para essa análise foram utilizadas 16 amostras (Tabela 3).

Tabela 3. Amostras e concentrações de DNA (ng/μL) utilizadas nas análises de PCR- DGGE.

Amostra	Concentração DNA (ng/μL)	Amostra	Concentração DNA (ng/μL)
Mata (M)		Capim (CA)	
Mata 6	66	Capim 2	5
Mata 7	72	Capim 3	17
Mata 8	65	Capim 4	34
Mata 9	142	Capim 5	26
Eucalipto (E)		Canga (CG)	
Eucalipto 1	57	Canga 1	37
Eucalipto 2	68	Canga 2	52
Eucalipto 3	43	Canga 4	75
Eucalipto 4	81	Canga 6	76

A PCR foi realizada em duas etapas visando a amplificação do gene 26S do RNA ribossomal, de acordo com protocolo descrito por Prakitchaiwattana et al (2004).

A primeira reação de PCR utilizou os *primers* NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'), gerando um fragmento de aproximadamente 600 bp (O'Donnell, 1993). A reação de PCR foi feita para um volume final de 12,5µL contendo 20-30 ng de DNA molde, 20 pmol de cada *primer*, 1,5 mM MgCl₂ e 0,2 mM dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). O programa de termociclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

O *amplicon* (aproximadamente 600bp) gerado na primeira PCR foi diluído e utilizado como molde para a segunda reação da *nested-PCR*. Na segunda PCR utilizou-se os *primers* NL1-grampo GC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G 3') e LS2 (5' ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC 3') (Cocolin et al, 2000; El Sheikh et al, 2009), gerando um fragmento de 250bp. As condições desta reação de PCR foram as mesmas da primeira PCR, exceto pelo volume final que foi de 50µL. O programa de termociclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os *amplicons* com grampo GC gerados na *nested-PCR* foram separados de acordo com a composição das suas sequências de nucleotídeos utilizando o sistema Dcode™ Universal Mutation System (Bio-Rad). Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de poli-acrilamida a 8% (37,5:1/ poli-acrilamida: bis-acrilamida). O gradiente de desnaturação foi obtido utilizando uréia e formamida, variando de 30 a 60%.

A eletroforese foi feita inicialmente a uma voltagem de 70V por 1 hora, para lavagem do gel, e a corrida das amostras a 70V por 16 horas, com temperatura constante de 60°C, em tampão TAE 1X. O gel foi corado com

brometo de etídeo e revelado em fotodocumentador L-PIX Sti (Loccus Biotecnologia).

O gel foi analisado no programa Bionumerics®, utilizando o método UPGMA e o Coeficiente Dice para cálculo de similaridade.

As bandas dominantes no gel de PCR-DGGE foram recortadas e eluídas em 20µL de água milli-Q estéril. As bandas eluídas foram então amplificadas, para serem sequenciadas, utilizando os *primers* NL1 e LS2, com as mesmas condições de reação e termociclagem da *nested-PCR*. O produto de PCR foi tratado com Exo-Sap® e então enviados para sequenciamento Universidade Católica de Brasília (UCB), utilizando o sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems, pela metodologia de sequenciamento de Sanger.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os alinhamentos e as relações filogenéticas foram calculadas no MEGA 6, pelo método de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e o teste de *bootstrap* com 1000 replicatas (Tamura et al, 2013).

5.8 Promoção de crescimento vegetal

A avaliação do potencial de leveduras para promoção do crescimento vegetal foi realizado *in vitro* conforme protocolo modificado descrito por Amprayn et al (2012), que consiste basicamente no co-cultivo da levedura a ser testada com a semente de arroz.

As sementes de arroz foram esterilizadas em Hipoclorito de Sódio 50% e Etanol 70%, e em seguida lavadas com água destilada. Após serem esterilizadas, as sementes foram colocadas para germinar em papel de filtro umedecido em caixas do tipo Gerbox por 2 dias (Sottero et al, 2006). Após o período de germinação as sementes foram inoculadas com solução de leveduras (10^{-6} células/mL) e agitadas por 1h em *shaker* para permitir que a levedura se ligue ao revestimento da semente. Em seguida, a semente foi semeada em tubos de ensaio contendo Ágar-Água 8% (8% ágar) por 10 dias a 25°C, em câmara de germinação.

Cada levedura foi considerada como um tratamento, contendo cinco repetições. Água destilada foi utilizada como grupo controle. A avaliação foi feita sob as sementes crescidas no tubo de ensaio, tomando-se o comprimento da parte aérea e da raiz.

As avaliações estatísticas foram feitas no programa Assistat 7.7 (Silva & Azevedo, 2002) utilizando a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

5.8 Tolerância a metal

Os isolados foram testados quanto a sua capacidade em tolerar diferentes concentrações dos metais Ferro e Cádmio, conforme metodologia modificada descrita por Vadkertiová & Sláviková (2006).

Foi feita uma triagem em placas de petri contendo o Meio Tolerância a Metal - TM (1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% MgSO_4 ; 2% glucose; 0,3% extrato de levedura) com pH 5,6, e as soluções de metal (Cádmio e Ferro) em diferentes concentrações finais (1 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM), e em triplicata. A placa controle consistiu do Meio Tolerância a Metal - TM sem a solução de metal. As placas foram incubadas por um período de 5 dias e então avaliadas quanto ao crescimento ou não do isolado no meio de cultura. Foram considerados resistentes os isolados que apresentaram crescimento no Meio de cultura com a solução de metal semelhante ao grupo controle.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento de leveduras

Um total de 72 isolados de leveduras foram recuperados das 5 áreas amostradas (20 amostras de solo) mais as 4 amostras de água da barragem, em meio de cultura MYGP. Nas amostras Capim 4, Canga 1, Barragem 3 e Barragem 4 não foram observados crescimento de colônias de leveduras (Tabela 4).

Para todas as amostras analisadas não foi possível efetuar a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) devido ao baixo crescimento de colônias de leveduras por placa semeada (< 30).

Os isolados foram identificados de acordo com as iniciais da amostra coletada seguido do número da levedura isolada, por exemplo, **E1.6** é o sexto isolado recuperado da amostra Eucalipto 1.

A diversidade de leveduras no solo pode variar de acordo com as características físicas, químicas e biológicas, se o solo é cultivado ou não, grau de contaminação por xenobióticos, época do ano e clima, além do que a diversidade das espécies encontradas é proporcional à disponibilidade de nutrientes no solo (Dias & Schwan, 2010), o que pode explicar a maior taxa de isolamento nas áreas de Mata e Eucalipto, e menor taxa nas áreas de Capim e Barragem, que são áreas que receberam resíduos do processo de mineração, e isso pode influenciar na taxa de isolamento e diversidade de micro-organismos ali presentes.

Tabela 4. Quantidade de isolados de leveduras por amostra.

Ponto amostral	Código de identificação	Número de isolados
Eucalipto (E)		
<i>Eucalipto Extra 1</i>	E1	9
<i>Eucalipto 2</i>	E2	4
<i>Eucalipto 3</i>	E3	7
<i>Eucalipto 4</i>	E4	4
Cerrado (Ce)		
<i>Cerrado 1</i>	Ce1	2
<i>Cerrado 2</i>	Ce2	2
<i>Cerrado 3</i>	Ce3	1
<i>Cerrado 4</i>	Ce4	4
Mata (M)		
<i>Mata 6</i>	M6	4
<i>Mata 7</i>	M7	6
<i>Mata 8</i>	M8	4
<i>Mata 9</i>	M9	5
Capim (Ca)		
<i>Capim 2</i>	Ca2	5
<i>Capim 3</i>	Ca3	1
<i>Capim 4</i>	Ca4	0
<i>Capim 5</i>	Ca5	2
Canga (Cg)		
<i>Canga 1</i>	Cg1	0
<i>Canga 2</i>	Cg2	4
<i>Canga 4</i>	Cg4	2
<i>Canga 6</i>	Cg6	2
Barragem (B)		
<i>Barragem 1</i>	B1	2
<i>Barragem 2</i>	B2	2
<i>Barragem 3</i>	B3	0
<i>Barragem 4</i>	B4	0
Total		72

Wuczkowski & Prillinger (2004) recuperaram 136 isolados de leveduras de diferentes solos da Áustria, incluindo solos florestais e solos cultivados. Vital et al (2002) recuperaram 240 isolados de leveduras de solos da Floresta Amazônica, na Estação Ecológica de Maracá. Sláviková & Vadkertiová (2003) recuperaram 111 estirpes de leveduras de 60 amostras de solos cultivados

com milho, beterraba, batata e cultivo de grãos. Já em solos florestais, sob diferentes tipos de vegetação, Sláviková & Vadkertiová (2000) isolaram 181 estirpes de leveduras de 180 amostras de solo. Mestre et al (2011) isolaram 126 estirpes de leveduras de solos adjacentes e solos rizosféricos de florestas de *Nothofagus pumilio*.

Essa alta taxa de isolamentos (Tabela 4) pode ser explicada pelos dados já descritos em literatura onde confirmam que solos cultivados e florestais podem apresentar centenas de milhares de células de leveduras por grama, enquanto solos nutricionalmente pobres, aqui incluindo solos impactados por ação antrópica, podem apresentar algumas ou poucas dezenas de células por grama de solo (Sláviková & Vadkertiová, 2003; Dias & Schwan, 2010), conforme foi observado nos solos oriundos das áreas que receberam resíduos do processo de mineração.

Já quanto a água da barragem, que recebeu efluentes da cava de mineração, observa-se uma baixa taxa de isolamento com apenas 4 isolados recuperados. Poucos e/ou escassos são os dados em literatura sobre leveduras associadas à água, principalmente à água proveniente de ambientes contaminados.

Gadanho et al (2003) verificaram a ocorrência e diversidade de leveduras na água do mar em Portugal, isolando 234 leveduras em 43 amostras de água, e agrupando esses isolados em 31 classes com base em *fingerprint* gerado pela MSP-PCR. Almeida (2005) avaliou a dinâmica da comunidade de leveduras presentes em águas do estuário do Tejo em Portugal, durante um ano, verificando que a ocorrência de determinadas espécies de leveduras podem estar parcialmente relacionadas com a poluição das águas, principalmente poluição fecal. Loureiro et al (2005) isolaram 292 leveduras de areia e água do mar do estado de Pernambuco – Brasil, durante os períodos de seca e de chuva, e em duas diferentes praias do estado. Esses resultados de isolamento foram maiores do que o encontrado neste trabalho provavelmente devido ao maior número de amostras analisadas.

Gadanho et al (2006) analisou a diversidade e estrutura da comunidade de leveduras em águas extremamente ácidas e ricas em metais pesados de Portugal, encontrando 27 espécies de leveduras das quais 48% representam

táxons não descritos. Russo et al (2008) caracterizaram a comunidade de leveduras presentes em águas de rio e lago naturalmente ácidos da Patagônia, verificando que a comunidade de leveduras é similar à ambientes aquáticos ácidos decorrentes da ação antrópica, como as águas de minas de Portugal e Espanha. O que justifica a importância de se estudar a diversidade de leveduras em ambientes poucos relatados, como exemplo, a água da barragem contaminada por efluentes de mineração.

Outro fato importante que pode ter limitado o isolamento de leveduras foi a utilização de apenas um meio de cultivo. O meio MYGP é um meio amplamente utilizado por oferecer os principais nutrientes para o crescimento de leveduras. Porém pode existir leveduras que apresentem outros requerimentos nutricionais além dos oferecidos no meio utilizado, ou então, que necessite de uma pequena quantidade de nutrientes.

Difícilmente um meio de cultivo é suficiente para o crescimento de todos os micro-organismos de um grupo, o que também se aplica às leveduras. Todavia, o meio utilizado apresenta amplo espectro de aplicação, uma vez que contém diferentes fontes de Carbono, e é um meio de composição complexa que atende à maioria das leveduras quanto ao requerimento nutricional (Dias & Schwan, 2010).

6.1.1 Análises físico-química do solo

As 20 amostras de solo foram analisadas quanto às suas características físico-químicas no Laboratório de Análises de Solo da Universidade Federal de Lavras – UFLA, e as principais características são mostradas na Figura 9. O resultado completo da análise pode ser verificada no Anexo 9.1.

Analisando as características dos solos e a quantidade de isolamentos feitos por amostra, observa-se que não há uma relação direta entre essas características e os isolamentos.

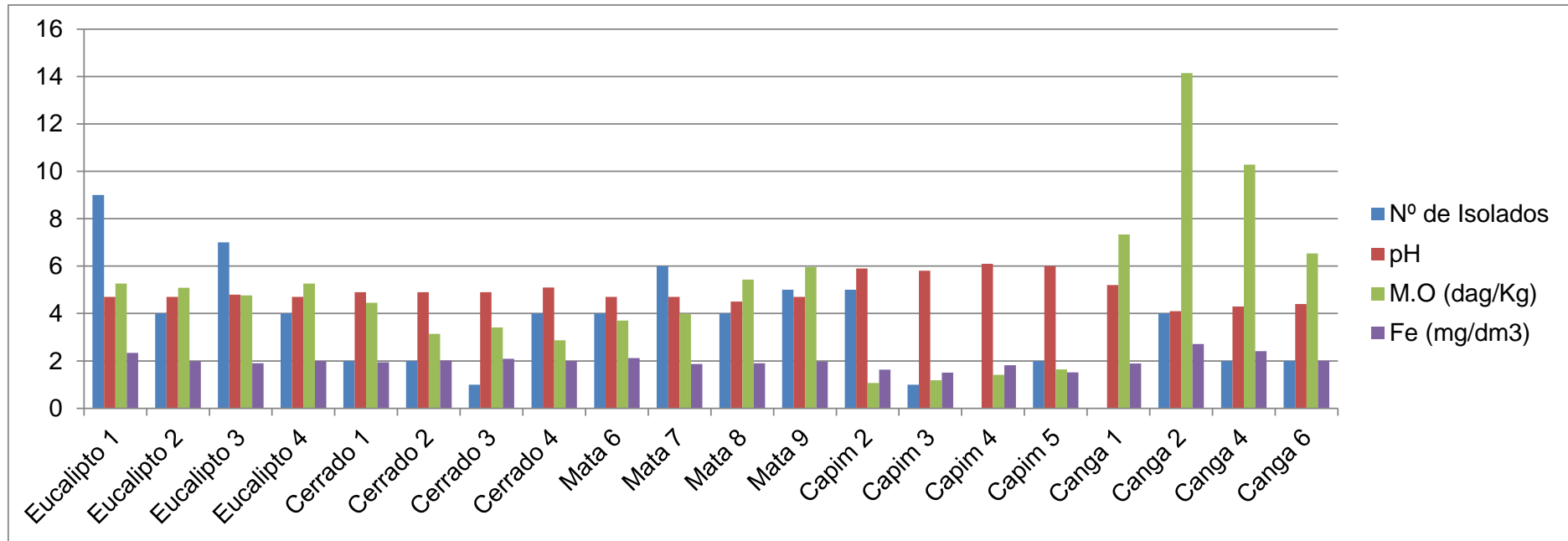


Figura 9. Características físico-químicas das amostras de solo e quantidade de isolados de leveduras.

A amostra Eucalipto foi a que obteve o maior número de isolados, totalizando 24, porém foi na amostra Canga que verifica-se uma maior quantidade de matéria orgânica (Figura 9).

A amostra Capim foi a mais pobre em matéria orgânica, o que pode ser justificado pela dominância de apenas um tipo de planta, o Capim gordura (*Melinis minutiflora*), diferentemente das outras áreas amostradas. E ainda porque grande parte da matéria orgânica em solos é oriunda da queda de folhas, e o acúmulo de folhas na superfície do solo previne processos erosivos (Troeh & Thompson, 2007).

A amostra Canga caracteriza-se por apresentar concentrações elevadas de ferro, fato relacionado à sua própria formação, pois são afloramentos ferruginosos associados geneticamente às formações ferríferas (Carmo et al, 2011; Jacobi & Carmo, 2008). Esse tipo de afloramento está associado à topos de montanhas e possui altas concentrações de metais, particularmente Ferro e Manganês (Skiryicz et al, 2014). No Quadrilátero Ferrífero, a Canga está localizada na zona de transição entre o Cerrado e a Mata Atlântica (Skiryicz et al, 2014), o que pode justificar as concentrações elevadas de Ferro encontradas também nas áreas de Cerrado e Mata.

Outra característica dos solos que pode ter influenciado o isolamento de micro-organismos é a textura. A textura do solo é um meio de descrever o tamanho da partícula (areia, silte e argila) presente no solo e está relacionada com a passagem do ar, água e raízes. Em solos arenosos normalmente há pouca restrição de movimento, enquanto que em solos argilosos, o movimento de ar, água e raízes é lento. Porém solos argilosos retêm muito mais água que solos arenosos (Troeh & Thompson, 2007). Os solos de Eucalipto 1, Eucalipto 4 e Mata 7 são solos argilosos (Anexo 9.1) e obtiveram números de isolamento de leveduras elevados (9, 4 e 6, respectivamente), o que talvez seja consequência da textura desse solo e da sua capacidade de reter água, diferentemente dos outros tipos de solo, o que lhe confere vantagem frente ao tempo seco em que foram realizadas as coletas, e proporciona um maior número de células de leveduras viáveis.

Quanto ao pH todas as amostras apresentaram um valor de pH ácido (Figura 9), o que contribui para a permanência de fungos no solo, já que os fungos toleram melhor as condições ácidas, em relação a outros micro-organismos (Troeh &

Thompson, 2007). Um pH entre 4 e 5 favorece o crescimento fúngico em detrimento do crescimento de bactérias e actinomicetos no solo, porém minimiza a disponibilidade de nutrientes nos solos, como o Nitrogênio, Potássio, Enxofre, Cálcio, Magnésio, Molibdênio e Cobre, e aumenta a quantidade dos metais Ferro, Manganês e Zinco (Brady & Weil, 2013), o que também explica a alta concentração de Ferro nas amostras avaliadas.

6.2 Caracterização morfológica

Os 72 isolados recuperados de solo e água do CeBio - Vale foram agrupados de acordo com as características morfológicas, observadas em meio de cultivo MYGP pH 5.6, com 5 dias de incubação, sendo que a grande maioria das colônias apresentaram coloração de branca a bege, e os morfotipos diferenciaram-se basicamente pelo tipo de borda e perfil da colônia, totalizando 23 morfotipos (Figura 10).

A tendência de agrupamento se deu por área amostrada, apresentando características comuns dentro da área mais do que entre as áreas, o que pode ser explicado pelas características de cada área como: cobertura vegetal e características físico-química dos solos de cada área.

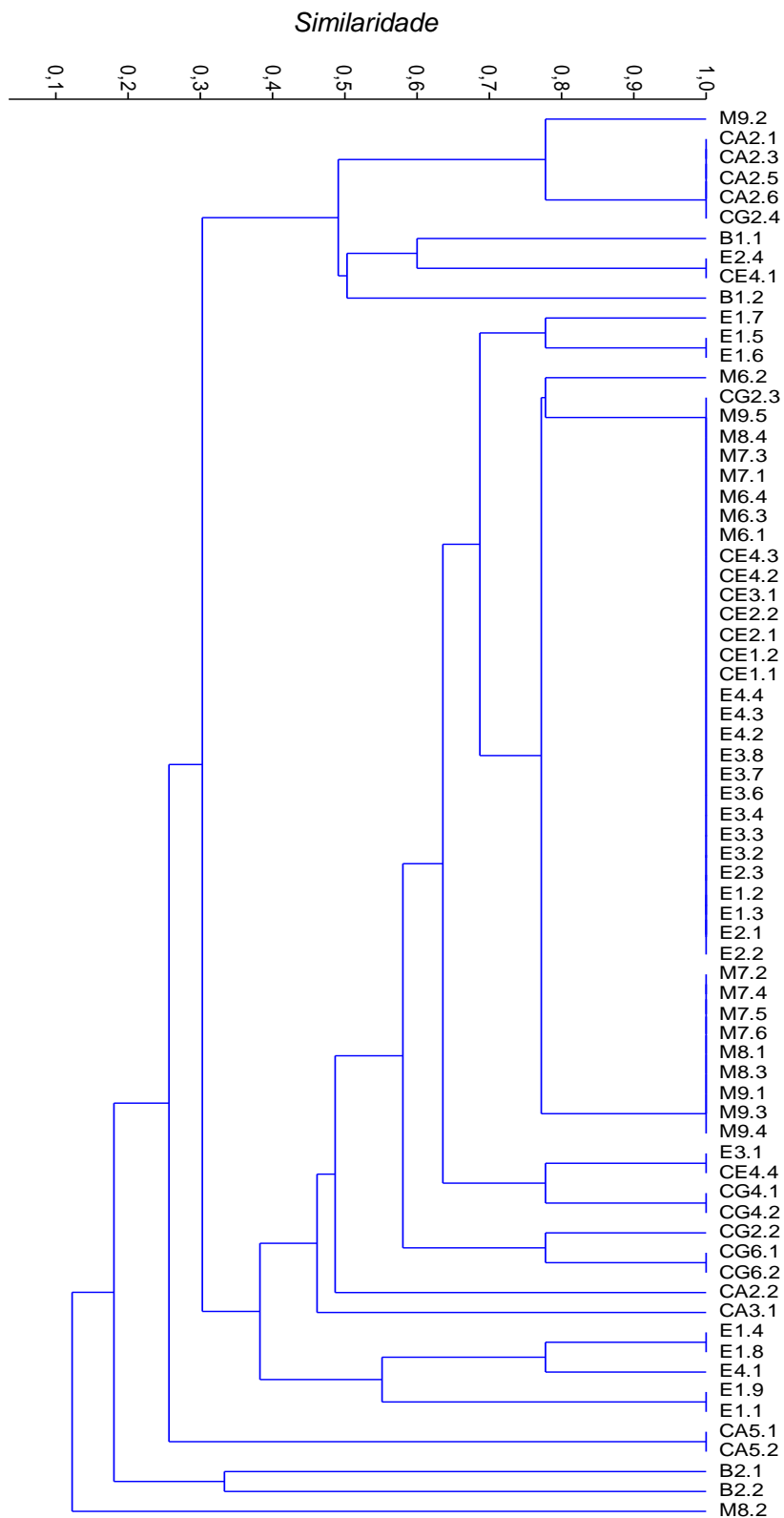


Figura 10. Dendrograma de similaridade fenética, feito no programa Past 2.17, utilizando o coeficiente Jaccard de similaridade.

A maioria das leveduras produzem colônias com coloração de branca a bege, conforme observado nas colônias de **A – I** (Figura 11), a presença de cores distintas como amarelo, vermelho e laranja deve-se a produção de pigmentos carotenóides e são características de determinados gêneros de leveduras, como *Rhodosporidium* e *Sporidiobolus* (Yarrow, 1998), o que não foi observado nas leveduras recuperadas neste trabalho.

As colônias **F** e **H** (Figura 11) apresentam textura mucosa, o que é frequentemente associado a encapsulação de células como resultado da produção de polissacarídeos extracelulares; já o crescimento membranoso visto em **D**, **G** e **I** (Figura 11) resulta da formação de filamentos (Yarrow, 1998).

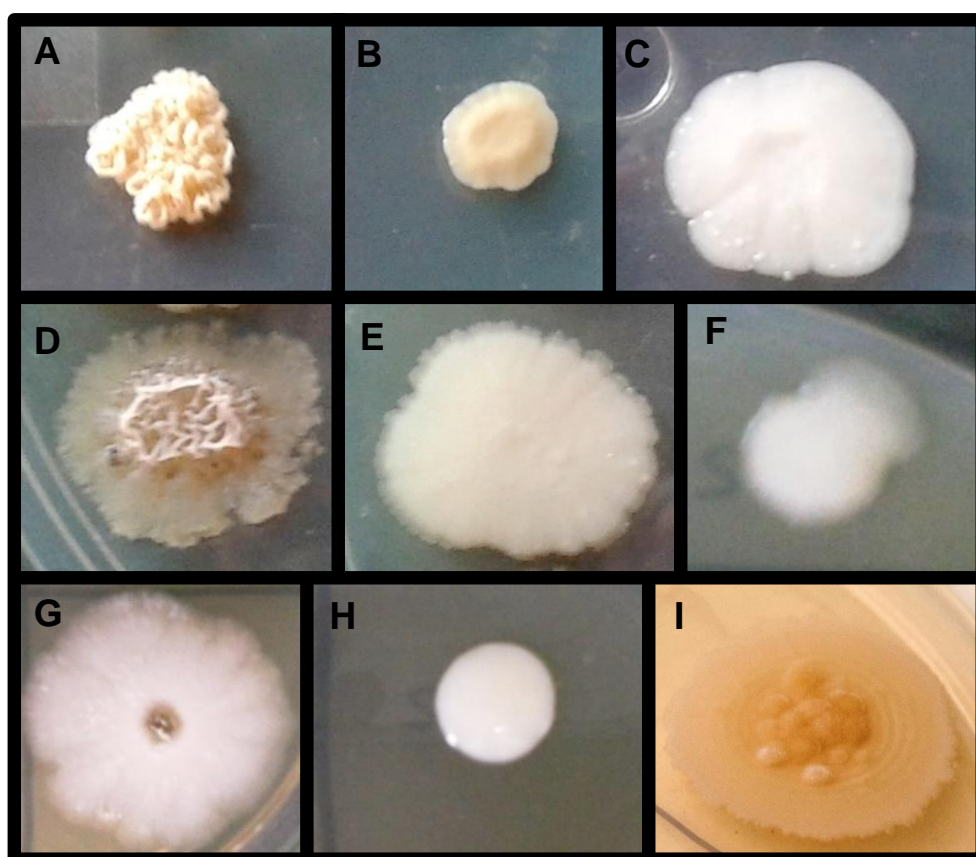


Figura 11. Principais variações morfológicas de colônias das leveduras recuperadas de solos e água, crescidas por 5 dias em meio MYGP pH 5,6, a 28°C. **A:** E1.7; **B:** M7.2; **C:** Ca2.1; **D:** Ca5.1; **E:** M8.2; **F:** M9.2; **G:** B2.2; **H:** B1.2; **I:** Ca2.2.

A composição dos meios de cultivo pode alterar a morfologia das colônias de uma mesma espécie, razão pela qual prefere-se a utilização do meio MYGP (Dias &

Schwan, 2010), e a análise morfológica das colônias são mais descritivas e servem para auxiliar na diferenciação inicial durante o isolamento e plaqueamento de leveduras, não chegando a uma conclusão taxonômica exata a nível de espécie.

6.2.1 Análise microscópica

A análise microscópica foi feita com um representante de cada gênero, utilizando os isolados: **Cg4.2**, **Ca2.1**, **M8.2**, **B2.2**, **B2.1** e **M9.2**. Os isolados foram crescidos em meio Malte 3% e Ágar-Acetato por um período de 5 a 10 dias e então foram montadas lâminas microscópicas com Lactoglicerol.

A morfologia celular predominante foram células ovóides, elipsoidais a alongadas (Figura 12 e 13), apresentando pseudomicélios em alguns casos.

Na Figura 12 percebe-se que isolados mostrados em **A**, **C** e **F** formaram pseudomicélios. Também é possível ver os brotamentos, em **B** e **D**, porém não foram detectados estruturas sexuais. Além disso, percebe-se que em **E** o formato celular foi mais diferenciado dos demais.

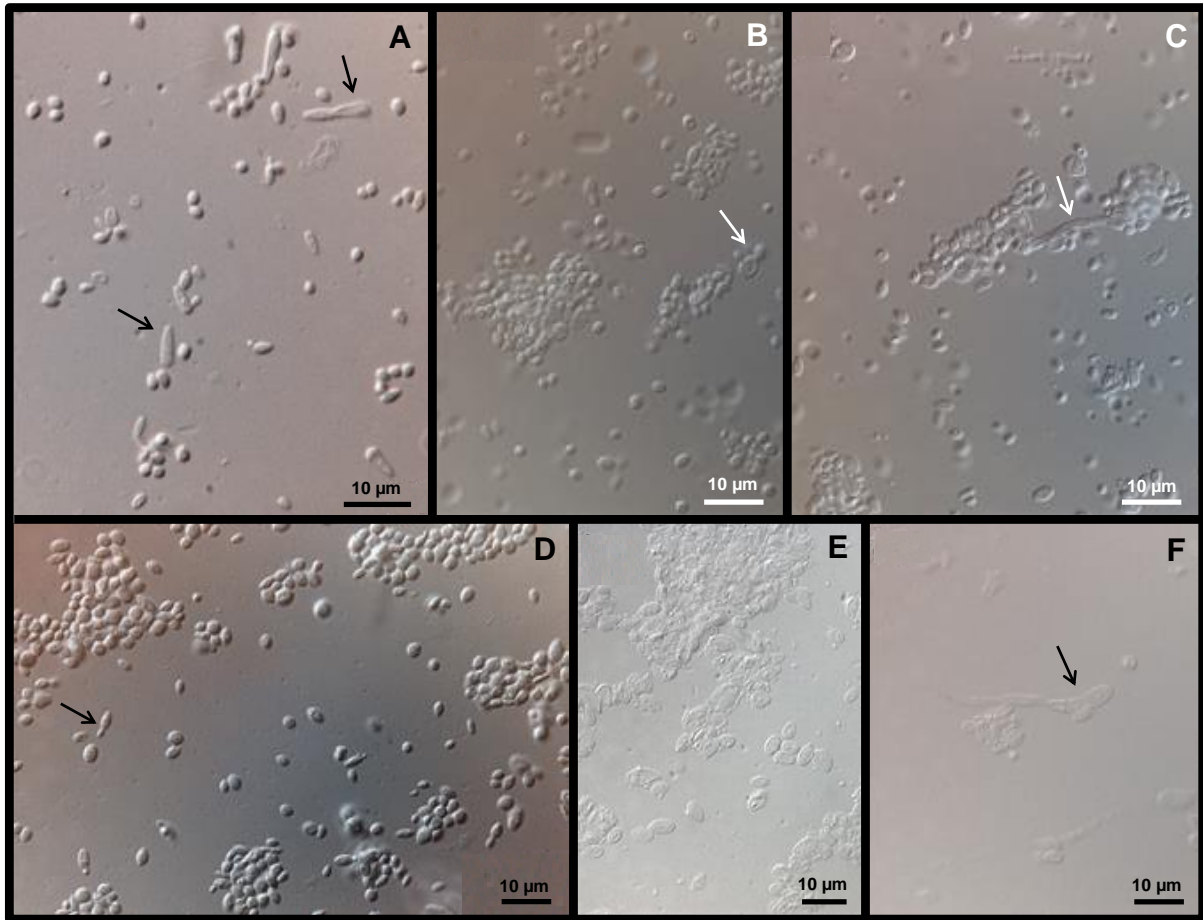


Figura 12. Aspectos morfológicos celulares. **A:** Cg4.2, em destaque o pseudomicélio; **B e C:** Ca2.1, em destaque o brotamento e pseudomicélio; **D:** M8.2, brotamento em destaque; **E e F:** B2.2, formato celular e pseudomicélio. Microscópio ótico (Leica DFC 490).

Já na Figura 13 observamos os isolados **B2.1** e **M9.2**. O isolado **B2.1**, em **A** e **B** possui células com formatos variados, podendo ser ovóide, elipsóide ou cilíndrico. Também é observado a formação de hifa verdadeira por esse isolado em **A**.

Já o isolado **M9.2** caracteriza-se por apresentar células elipsoidais ou globosas, podendo apresentar também células ovais/ cilíndricas gigantes e pseudomicélio é ausente.

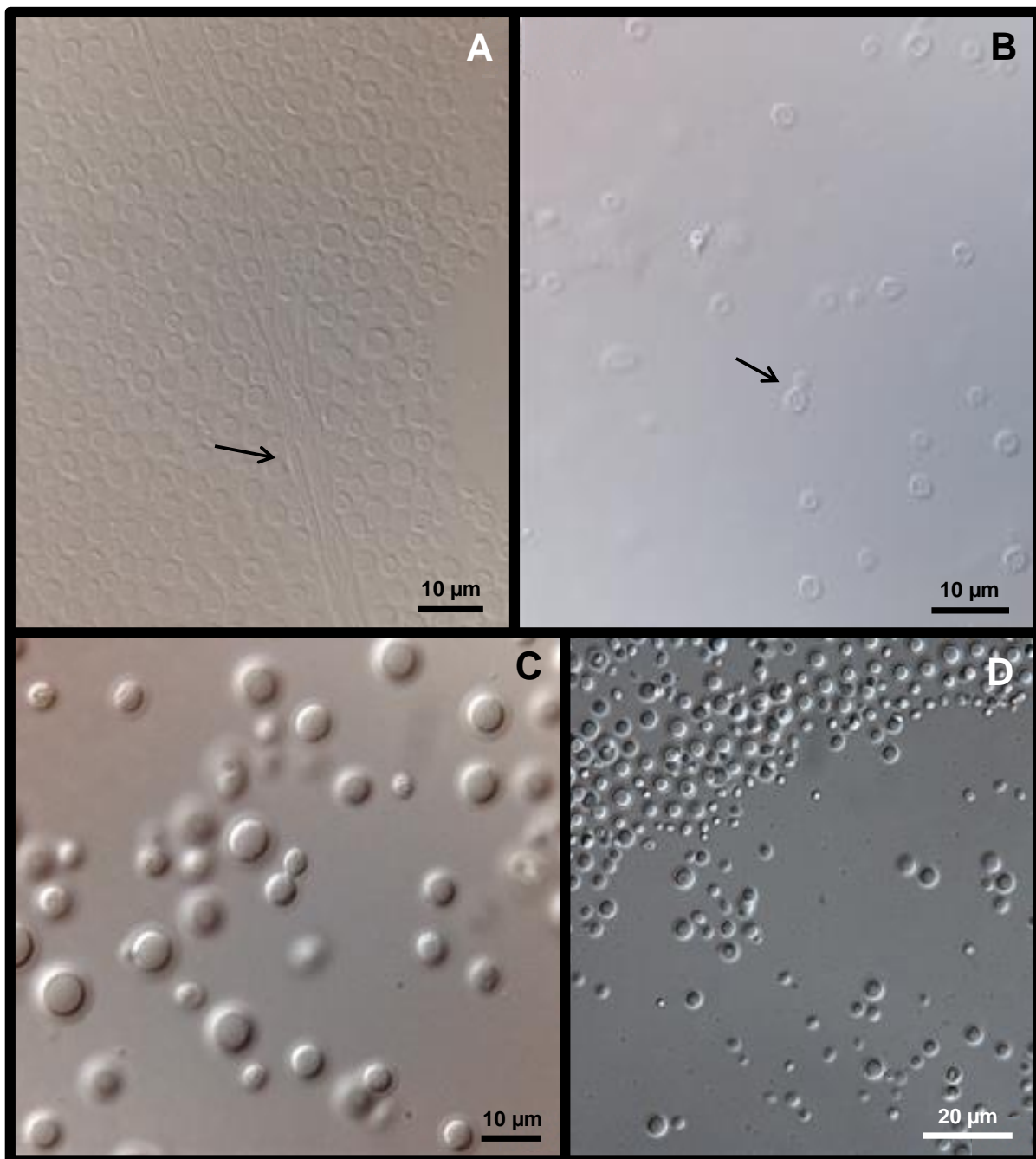


Figura 13. Aspectos morfológicos celulares. **A** e **B**: B2.1, em destaque o pseudomicélio e brotamento; **C** e **D**: M9.2, em destaque o brotamento. Microscópio ótico (Leica DFC 490).

6.3 Caracterização molecular

6.3.1 MSP – PCR

A análise molecular dos géis de PCR das amostras, com o primer M13, geraram apenas 2 grupos genotípicos com 100% de similaridade entre os perfis de bandeamento (Figura 14). Os isolados de leveduras das amostras Eucalipto e Barragem não amplificaram para o primer M13 e foram excluídos da análise.

O agrupamento não foi conclusivo uma vez que padrões de bandeamento similares não apresentaram 100% de similaridade, por isso não foi levado em consideração para escolha de representantes de cada grupo para posterior sequenciamento. Portanto, todos os isolados foram sequenciados.

O dendograma mostra uma relativa diversidade genética entre os isolados e apresenta uma maior similaridade entre os isolados da mesma área do que entre as áreas, ou seja, a tendência de agrupamento genético ocorre dentro das áreas amostradas.

Muitos trabalhos vem utilizando a técnica de MSP-PCR para agrupamento de isolados recuperados de amostras ambientais, como uma ferramenta para diminuir a quantidade de isolados que serão sequenciados, uma vez que tem poder discriminatório para diferenciar linhagens ou espécies (Lasker & Ran, 2004). Porém, conforme verificado com o resultado do sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S, podemos concluir que a técnica de MSP-PCR, para esse trabalho, foi suficiente para discriminar entre gêneros, uma vez que, os clados formados no dendograma (Figura 14) apresentaram o perfil de bandeamento bastante similar e reuniram os isolados no mesmo gênero, quando verificado o resultado do sequenciamento. Embora a análise feita pelo programa Bionumerics não tenha sido conclusiva.

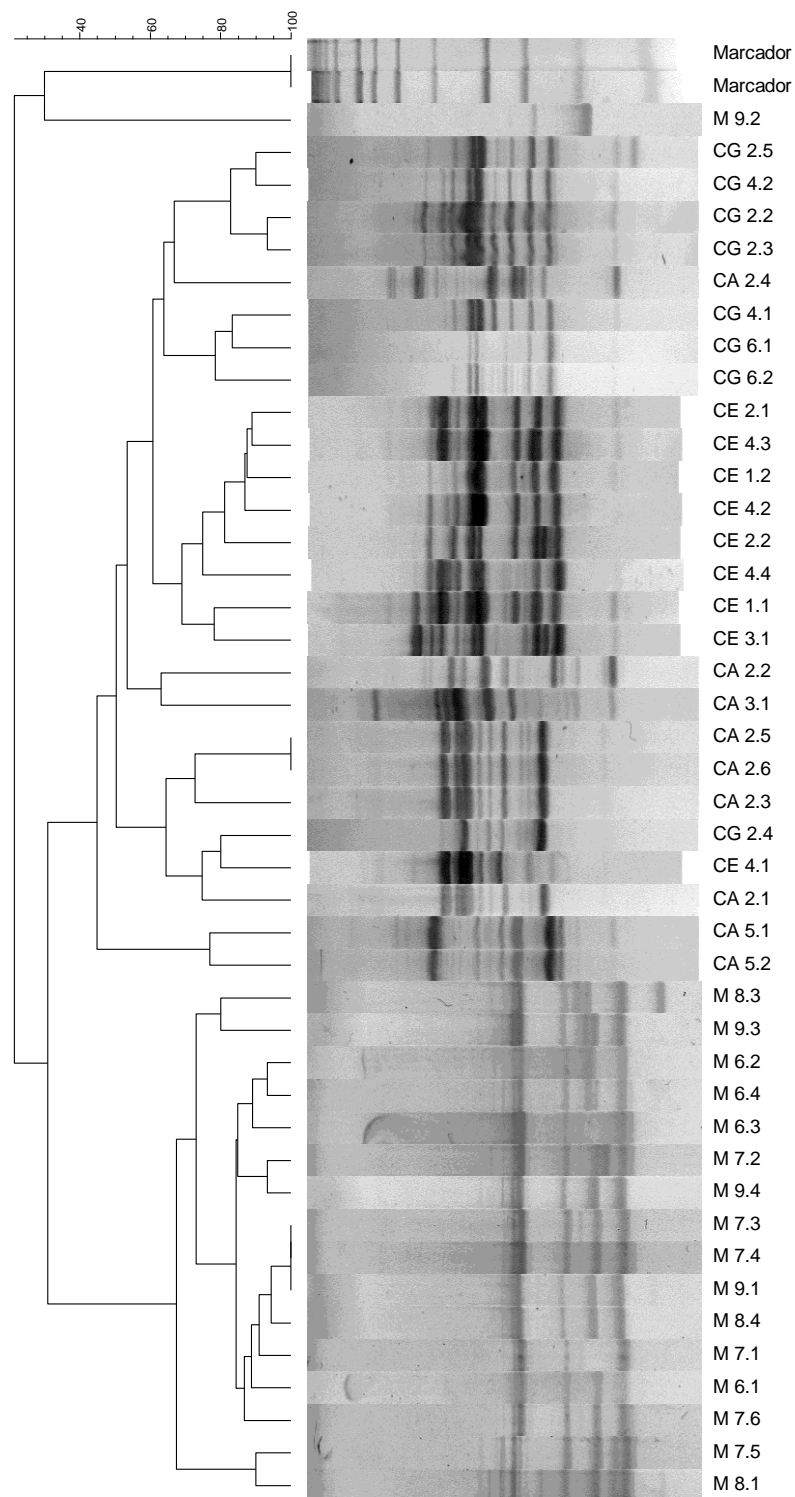


Figura 14. Perfil eletroforético de fragmentos de DNA de 43 isolados de leveduras, recuperados das amostras de solo de Mata, Cerrado, Capim e Canga, amplificados com o primer M13 e agrupados pelo programa BioNumerics® (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica).

Gadano et al (2003) utiliza a MSP-PCR para caracterizar 234 isolados de leveduras recuperados de água do mar do sul de Portugal, conseguindo agrupar as leveduras em 31 classes distinguindo bem leveduras pigmentadas de não pigmentadas, demonstrando que MSP-PCR é um método apropriado para caracterização de grupos grandes de isolados devido a sua simplicidade e boa reprodutibilidade.

A técnica de MSP-PCR pode, em alguns casos, gerar perfis diferentes para membros da mesma espécie, que pode ser indicativo de populações diferentes dentro das espécies (Gadano et al, 2003), porém continua sendo uma abordagem interessante em estudos de ecologia de leveduras, pois na maioria dos casos gera dados rápidos e acurados.

Porém no presente trabalho essa ferramenta não foi tão útil pelo fato que a quantidade de leveduras isoladas não foi tão alto, permitindo o sequenciamento de todas as leveduras, e também porque a análise no programa BioNumerics não foi tão concisa e confiável para o agrupamento de padrões similares de bandamento.

6.3.2 Sequenciamento do 26S rDNA

Das 72 leveduras recuperadas de solo e água do CeBio – Vale foram identificados 6 gêneros, baseado nas análises de sequências do gene 26S do RNA ribossomal comparadas com sequências depositadas no GenBank, sendo eles: *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Meyerozyma*, *Debaryomyces*, *Lipomyces* e *Aureobasidium* (Tabela 5).

Tabela 5. Táxons de leveduras encontrados nas amostras de solo e água com base nas sequências do domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal.

Táxon	Total 72	Área					
		Mata	Eucalipto	Cerrado	Canga	Capim	Barragem
Basidiomycetes	59						
<i>Tremellales</i>							
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	56	17	23	8	7	0	1
<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Ustilaginales</i>							
<i>Pseudozyma sp.</i>	2	0	0	0	0	1	1
Ascomycetes	13						
<i>Saccharomycetales</i>							
<i>Meyerozyma sp.</i>	6	0	0	1	1	4	0
<i>Debaryomyces sp.</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	1	1	0	0	0	0	0
<i>Lipomyces sp.</i>	1	1	0	0	0	0	0
<i>Dothideales</i>							
<i>Aureobasidium sp.</i>	3	0	0	0	0	2	1
<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	0	0	0	0	1	0

O Filo Basidiomycota foi dominante entre as leveduras isoladas, sendo que a espécie *Cryptococcus podzolicus* foi a mais abundante estando presente em todas as áreas, exceto Capim. Os outros gêneros/espécies foram menos abundantes, chegando em alguns casos, como o gênero *Lipomyces*, o qual foi encontrado apenas na área de Mata.

A predominância de *Cryptococcus* nas amostras de solo analisadas pode ser atribuído a sua capacidade de produção de cápsulas de polissacarídeos, que são importantes na competição com outros micro-organismos do solo (Vishniac, 2006), e ainda por ser capaz de utilizar bem os nutrientes disponíveis em sistemas oligotróficos, diferentemente de leveduras pertencentes ao Filo Ascomycota (Connell et al, 2007).

Cápsulas polissacarídicas podem servir para proteger as células contra danos físicos e biológicos em seu habitat natural e pode influenciar a capacidade de sobrevivência das células em condições de baixa umidade, evitando a dessecação (Sláviková & Vadkertiová, 2003), o que explica a abundância do gênero *Cryptococcus* nas amostras analisadas, uma vez que foram coletadas no final do período de seca.

O gênero *Lipomyces* têm sido isolado exclusivamente de solos (Lachance & Starmer, 1998; Dias & Schwan, 2010; Schwan et al, 2008). Esse gênero caracteriza-se por apresentar células elipsoidais ou globosas, podendo apresentar também células ovais/ cilíndricas gigantes e pseudomicélio é ausente (Kurtzman & Fell, 1998), conforme foi observado na análise microscópica (ver Figura 13).

Debaryomyces spp. tem sido frequentemente isolada de ambientes extremófilos devido a sua capacidade osmotolerante (Breuer & Harms, 2006). Para o gênero *Debaryomyces* a reprodução se dá de forma vegetativa geralmente por brotamento multilateral e a formação de pseudohifas é rara ou ausente (Kurtzman & Fell, 1998), conforme foi observado pela análise microscópica apresentado na Figura 12, onde não foi detectado formação de pseudohifas para o isolado desse gênero.

6.3.3 Análises de Diversidade

Os índices de diversidade de Shannon (H) e Evenness foram calculados para todas as áreas estudadas, com base nos gêneros isolados de cada área, e são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Índice de Shannon e Evenness das amostras analisadas.

Índice de diversidade	Mata	Eucalipto	Cerrado	Canga	Capim	Barragem
<i>Shannon (H)</i>	0,41	0,17	0,35	0,38	0,97	1,04
<i>Evenness</i>	0,5	0,59	0,71	0,73	0,88	0,94

Nota-se que o índices de diversidade foram maiores nas amostras Capim e Barragem, e menores na amostra Eucalipto. O índice de diversidade foi inversamente proporcional a quantidade de isolados por amostra, visto que na amostra Eucalipto o número de isolamentos foi maior porém a diversidade foi mais baixa que as amostras Capim e Barragem, cujos isolamentos foram baixos.

Na Figura 15 vê-se a composição da comunidade de leveduras de cada área, evidenciando a dominância do gênero *Cryptococcus* sob os demais, e a similaridade da comunidade de leveduras entre as amostras de Mata e Eucalipto, e entre

Cerrado e Canga. As amostras de Capim e Água foram as que mais divergiram das demais com relação a composição de leveduras.

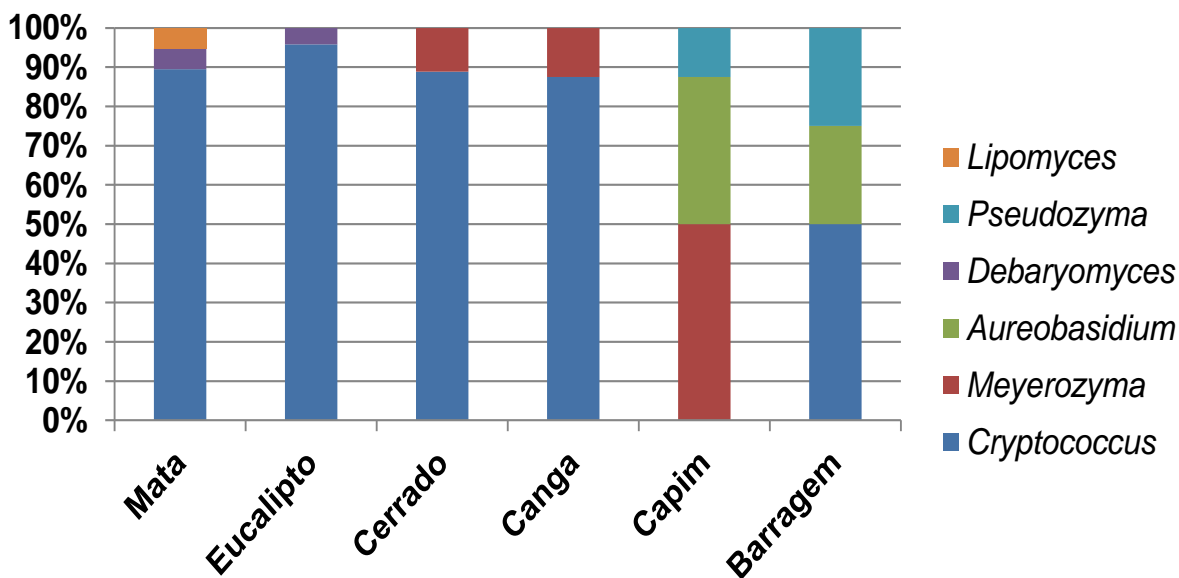


Figura 15. Composição das comunidades de leveduras por área amostrada.

Já a estrutura das comunidades de leveduras por área amostrada, utilizando o coeficiente Jaccard de Similaridade, foi feito com base na presença ou ausência de determinado gênero na área amostrada.

A similaridade é apresentada na Figura 16, onde observa-se que a estrutura e/ou composição das comunidades de leveduras é 100% similar para as amostras Cerrado e Canga. E ainda, as amostras Capim e Barragem são mais similares entre si formando um *cluster* separado das outras amostras. As amostras Eucalipto e Mata também estão mais próximas mostrando mais de 50% de similaridades entre si.

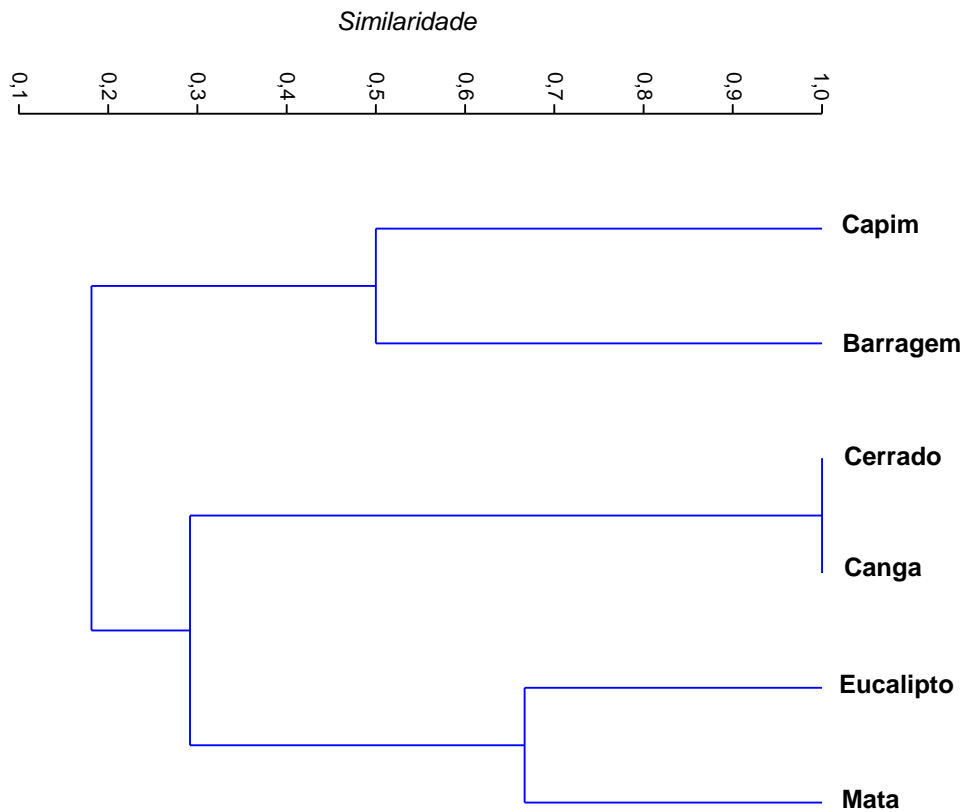


Figura 16. Similaridade entre as comunidades de leveduras cultiváveis por área amostrada.

Provavelmente a similaridade entre Cerrado e Canga deve-se a similaridade entre a cobertura vegetal das duas áreas. O mesmo ocorre para Eucalipto e Mata, que possuíam uma composição vegetal bem similar. Uma vez que a comunidade de leveduras encontradas nos solos pode, muitas das vezes, refletir a comunidade de leveduras associadas a plantas (Phaff & Starmer, 1987; Sláviková & Vadkertiová, 2003), e ainda a composição, estrutura e diversidade de leveduras do solo podem variar conforme as características físicas, químicas e biológicas do microhabitat em que se encontram, e de acordo com o tipo de vegetação (Dias & Schwan 2010).

6.3.4 Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas dos 72 isolados de leveduradas recuperados de solo e água do CeBio foram feitas com base nas informações geradas pelo sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal, cujo fragmento possui aproximadamente 600 bp, gerando caracteres genéticos suficiente para separar bem os isolados nos Filos Basidiomycota (Clado amarelo) e Ascomycota (Clado verde), e resolver os clados a nível de gênero (Figura 17). No anexo 9.2 pode ser observado a tabela completa com a identificação dos isolados e a identidade com as sequências do BLAST (Identidade %, Similaridade % e E-value).

A Figura 17 traz uma visão geral da topologia da árvore filogenética. Nota-se que houve a separação entre os Filos e que os gêneros estão bem delimitados. Ainda percebe-se a predominância do gênero *Cryptococcus* sob os demais. A maioria dos ramos ficaram bem suportados com um valor de *bootstrap* acima de 50%. Nesta árvore os ramos foram alinhados afim de melhor se visualizar a separação entre eles, portanto não traz informações sobre a quantidade de mudanças genéticas acumuladas em cada ramo.

A politomia gerada principalmente no clado *Cryptococcus* evidencia a necessidade de mais informação genética para solucionar os ramos a nível de espécie. Conforme descrito por Fell et al (2000) para as leveduras com afinidade basidiomicética faz-se necessário também o sequenciamento da região ITS para melhor resolver a nível de espécie.

Embora também tenha gerado politomia para algumas leveduras ascomicéticas, indicando a necessidade de uma análise concatenada com mais de um marcador, como D1/D2 e ITS. Em alguns casos também faz-se uso do gene 18S do RNA ribossomal em combinação com o domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal, que confere uma análise mais robusta e melhor suportada com valores de *bootstrap* acima de 80% (Kurtzman & Suzuki, 2010). Ou ainda pode tratar-se de espécies novas, uma vez que estirpes da mesma espécie apresentam no máximo 3 nucleotídeos diferentes (0-0,05%), enquanto que espécies diferentes apresentam seis ou mais substituições em bases nucleotídicas (1%), exceto para alguns grupos de leveduras basidiomicéticas (Kurtzman & Fell, 2006).

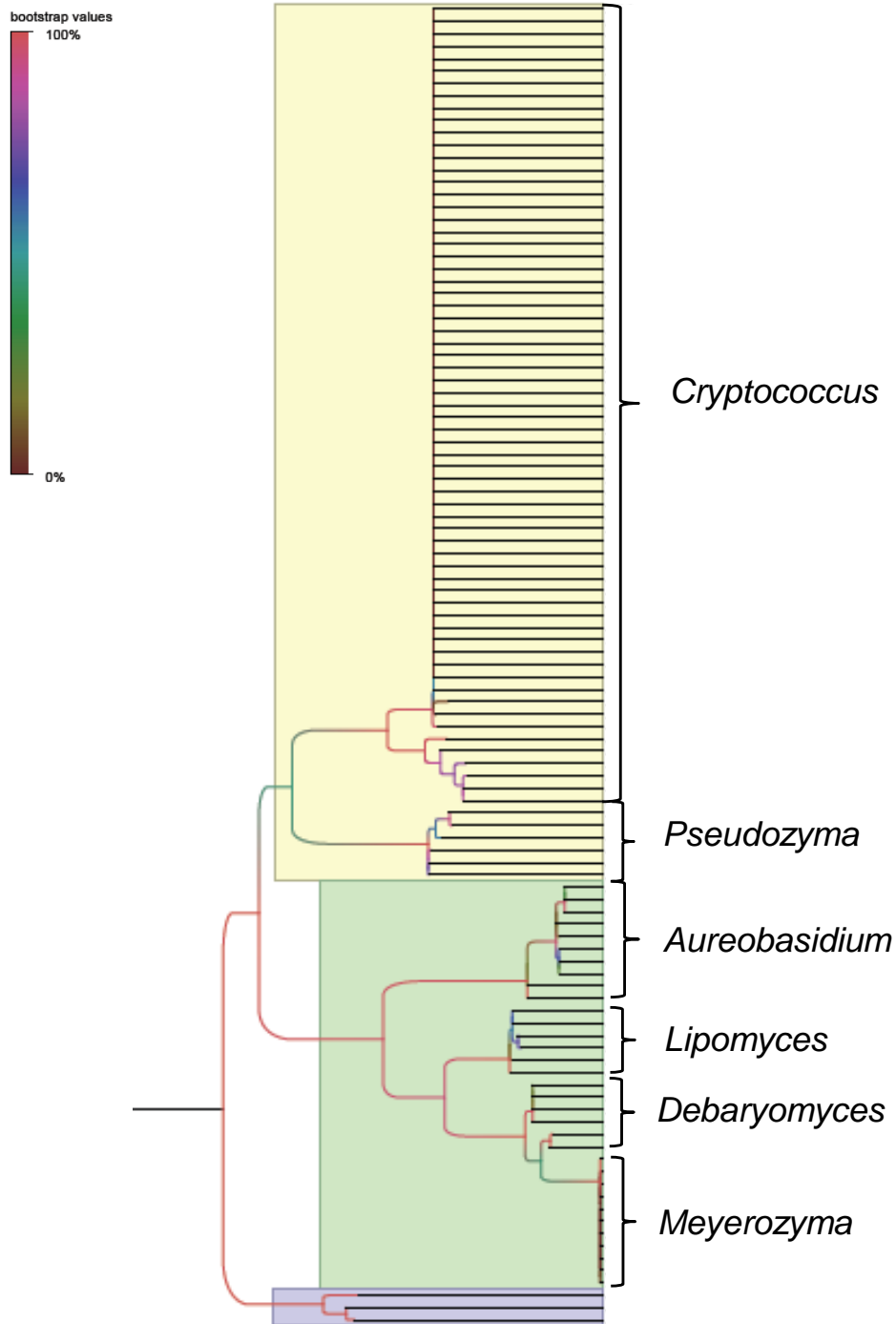


Figura 17. Árvore Filogenética, gerada a partir do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S das leveduras isoladas de amostras de solo e água, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. Os valores de bootstrap são mostrados através do gradiente de cor nos ramos, variando de 0 a 100%. O clado amarelo refere-se ao Filo Basidiomycota, o clado verde ao Filo Ascomycota e o clado azul ao Outgroup formado por espécies do gênero *Rhodotorula*.

6.3.4.1 Filo Basidiomycota

Leveduras basidiomicéticas estão atualmente distribuídas em três classes do Filo Basidiomycota: Ustilaginomycetes, Urediniomycetes e Hymenomycetes. Essas leveduras tem considerável importância médica, econômica e na agricultura, e estima-se que apenas 1% das espécies são conhecidas (Fell et al, 2000).

Das 72 leveduras recuperadas de solo e água do CeBio, 59 foram identificadas como pertencentes ao Filo Basidiomycota. Estas estão distribuídas entre os gêneros *Cryptococcus* e *Pseudozyma* (Figura 18), sendo que o gênero *Cryptococcus* predomina sobre o gênero *Pseudozyma* com 57 isolados.

O gênero *Cryptococcus* Vuillemin caracteriza-se por apresentar colônias com coloração branca ou creme, e algumas estirpes produzem pigmentos vermelhos, amarelos ou marrons; muitas espécies sintetizam amido; e são positivas para os testes de urease e azul de diazônio B (Fell & Stetzell-Tallman, 1998). Além disso, apresentam células em diferentes formatos e podem formar pseudohifa ou hifa verdadeira, conforme foi observado na análise microscópica (ver Figura 12).

Os isolados de leveduras do clado *Cryptococcus* estão filogeneticamente próximos de duas espécies desse gênero, sendo *Cryptococcus podzolicus* e *Cryptococcus laurentii* (Sinonímia: *Cryptococcus flavescens* (Mycobank - <http://www.mycobank.org>)).

As leveduras relacionadas a *Cr. podzolicus* (Bab'eva & Reshetova) Golubev formaram uma politomia, indicando a necessidade de incluir outro marcador molecular para resolver esse ramo. Porém observa-se que esses isolados estão mais próximos a *Cr. podzolicus* (FN428872; JQ672617; KJ159041) do que as outras espécies relacionadas como *Cr. aureus* (JQ219324); e essa separação entre *Cr. podzolicus* e as outras espécies está bem suportada com um *bootstrap* de 99%.

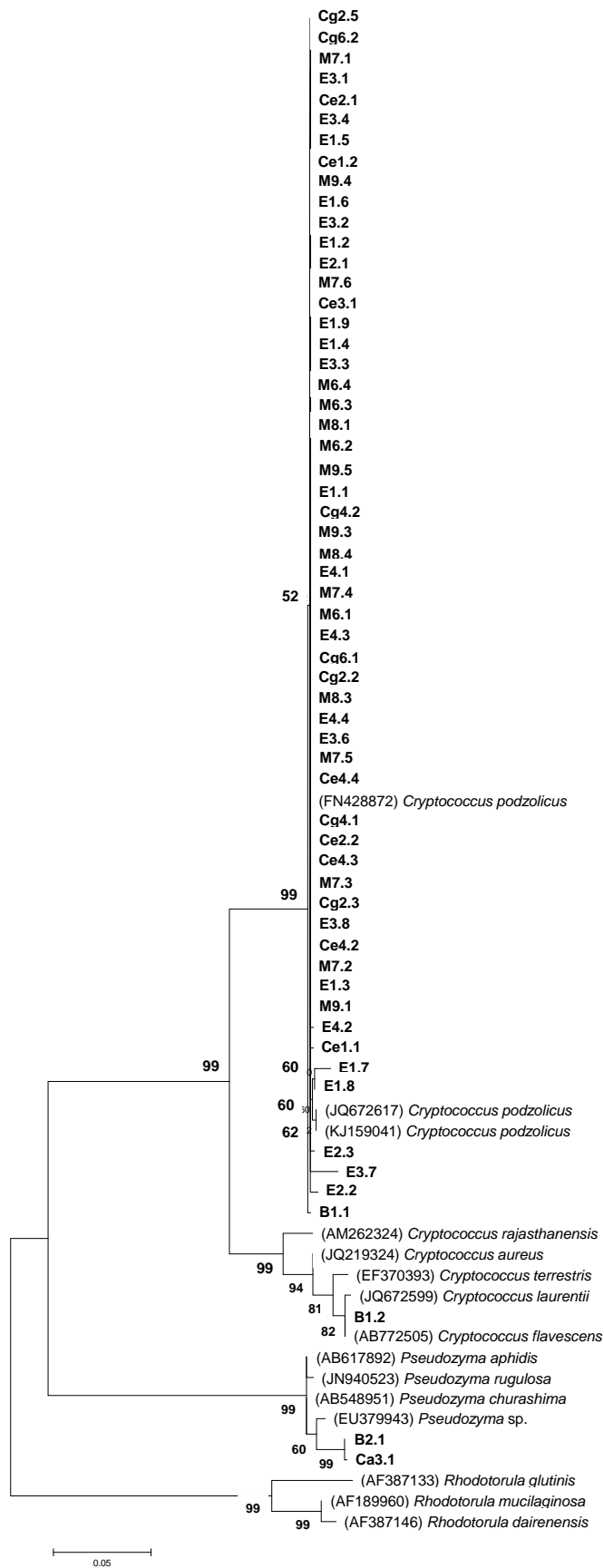


Figura 18. Árvore Filogenética do Filo Basidiomycota, gerada a partir do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S das leveduras isoladas de amostras de solo e água, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. *Rhodotorula* spp. foram utilizadas como outgroup.

Já o isolado **B1.2** está filogeneticamente relacionado a *Cryptococcus laurentii* (Sinonímia: *Cryptococcus flavescens*), em um ramo bem suportado com valor de bootstrap de 82%.

A espécie *Cr. podzolicus* foi primeiramente relatada em espodossolos em uma floresta da Rússia, e tem sido encontrada somente em solos, não havendo relatos de isolamento em plantas (Fell & Statzell-Tallman, 1998). Espodossolos possuem um horizonte espódico que se caracteriza pelo acúmulo de matéria orgânica, óxidos de alumínio e ferro. É encontrado também em solos lixiviados sob florestas de climas úmidos, normalmente em material de origem de textura arenosa e ácidos (Brady & Weil, 2013).

Vários trabalhos focando a diversidade de leveduras em solos tem relatado o isolamento de espécies do gênero *Cryptococcus*. Wuczkowski & Prillinger (2004) relatam que o gênero *Cryptococcus* foi o mais frequente nas amostras de solo florestal da Áustria, sendo encontrado em todos os horizontes do solo; e ainda os autores também constataram que leveduras ascomicéticas são minorias no solo, quando comparadas com leveduras basidiomicéticas, conforme foi encontrado também neste trabalho.

Vital et al (2002) relata a espécie *Cr. laurentii* como uma das mais dominantes em amostras de solo da Amazônia Brasileira. Assim como Wuczkowski & Prillinger (2004) que também isolaram *Cr. laurentii* nas amostras de solo florestal da Áustria. Vishniac (2006) também relata que espécies de *Cryptococcus* dominaram várias amostras de solo, incluindo solos de deserto, sob diferentes tipos de vegetação e em diferentes gradientes latitudinais, encontrando também as espécies *Cr. podzolicus* e *Cr. laurentii*.

Sláviková & Vadkertiová (2003) isolaram *Cr. laurentii* como uma das espécies mais dominantes em amostras de solo da Eslováquia, estando presente em todas as amostras sob 4 diferentes tipos de culturas agrícolas. E também foi a mais isolada em solos florestais da Eslováquia (Sláviková & Vadkertiová, 2003).

Cr. podzolicus foi o isolado mais frequente em amostras de solos associados a florestas de *Nothofagus pumilio* na Argentina, e leveduras basidiomicéticas foram dominantes em todas as amostras analisadas (Mestre et al, 2011). Connel et al (2007) também relata a dominância do gênero *Cryptococcus* em amostras de solos

da Antártica. Yurkov et al (2012) também relatam a ocorrência de *Cr. podzolicus* em amostras de solo sob diferentes tipos de manejo.

O gênero *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout caracteriza-se por apresentar colônias esbranquiçadas, rosadas, laranja ou amarela e geralmente são dimórficos, alterando-se entre a fase leveduriforme e micelial de acordo com as condições ambientais. São positivas para os testes de urease e azul de diazônio B (Boekhout & Fell, 1998). A análise microscópica de um representante desse gênero revelou células com formatos variados, podendo ser ovóide, elipsóide ou cilíndrico, além da formação de hifas verdadeiras (ver Figura 13).

Dois isolados, **B2.1** e **Ca3.1**, estão próximos de espécies de *Pseudozyma* porém não chega-se a uma conclusão a nível de espécie. Nesse caso faz-se necessário o sequenciamento com outro marcador molecular, como por exemplo, a região ITS do RNA ribossomal.

Os trabalhos aqui citados sobre diversidade de leveduras em solos não relatam o isolamento de espécies de *Pseudozyma*. Renker et al (2005) relata que espécies de *Pseudozyma* são geralmente habitantes da filosfera, mas uma vez que a folha cai podem concluir seu ciclo de vida no solo.

6.3.4.2 Filo Ascomycota

A Figura 19 mostra as relações filogenéticas entre os isolados com afinidade ascomicética. Embora os valores de *bootstrap* tenha sido altos (maioria acima de 50%) alguns clados apresentam politomia, indicando a necessidade de se incluir mais um marcador molecular na análise. Das 72 leveduras isoladas 13 foram identificadas como pertencentes ao Filo Ascomycota, sendo que os gêneros encontrados foram: *Meyerozyma*, *Debaryomyces*, *Lipomyces* e *Aureobasidium*.

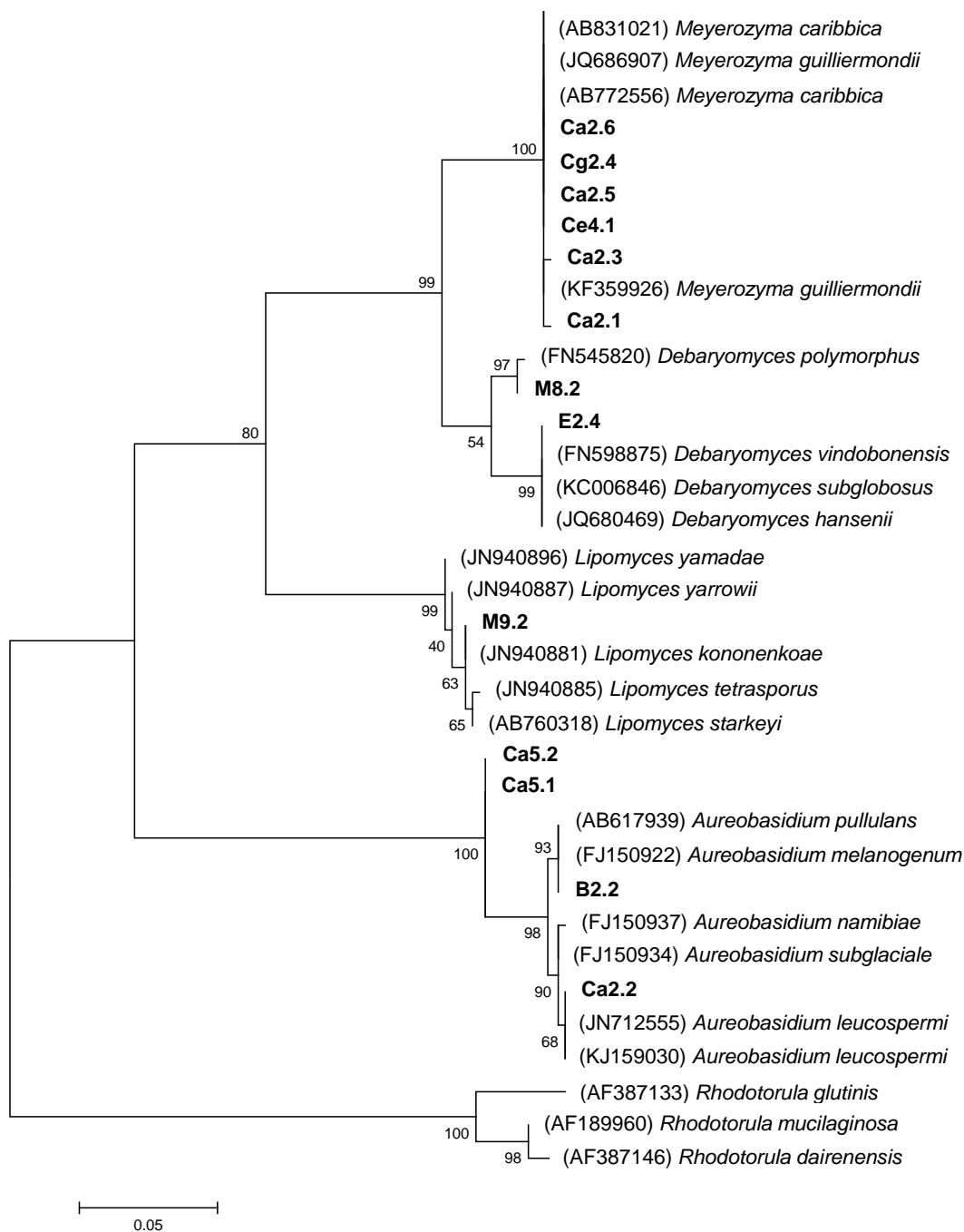


Figura 19. Árvore Filogenética do Filo Ascomycota, gerada a partir do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S das leveduras isoladas de amostras de solo e água, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. *Rhodotorula* spp. foram utilizadas como outgroup.

Dentro do Filo Ascomycota o gênero *Meyerozyma* foi dominante, porém não chegou a uma identificação conclusiva a nível de espécie, embora o ramo esteja bem suportada com um *bootstrap* de 100%.

O gênero *Meyerozyma* Kurtzman et M. Suzuki foi criado em 2010 afim de recolocar as espécies de *Pichia guilliermondii* e *Pichia caribbica* em um novo gênero, pois divergiam das demais espécies as quais estavam relatadas em um gênero em comum. Atualmente são aceitas duas espécies dentro desse gênero, sendo: *Meyerozyma guilliermondii* e *Meyerozyma caribbica* (Kurtzman & Suzuki, 2010).

A análise microscópica feita com um representante desse gênero revelou células em diferentes formatos e a formação de pseudohifas (ver Figura 12).

M. guilliermondi e *M. caribbica* foram isoladas de amostras de solos rizosférico e solos superficiais, respectivamente, por Nakayan et al (2013), e suas propriedades como promotoras do crescimento vegetal foram testadas, concluindo que *M. guilliermondi* possui a capacidade de solubilizar fosfato, reduzindo assim a aplicação de fertilizantes químicos em culturas de milho. Bautista-Rosales et al (2013) relatam que uma estirpe de *M. caribbica* tem propriedades antagônicas no controle do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* em mangas, utilizando os mecanismos de competição por nutrientes e espaço e parasitismo.

Espécies do gênero *Meyerozyma* são geneticamente próximas formando um complexo de espécies, possuem importância médica, biotecnológica e potencial para uso em controle biológico. *M. guilliermondi* e *M. caribbica* são extremamente difíceis para diferenciar por métodos fenotípicos, e as sequências provenientes do domínio D1/D2 falha ao discriminar essas duas espécies, sendo necessário uma análise concatenada com a região ITS para separação das espécies (Romi et al, 2014), fato observado nos isolados identificados no clado *Meyerozyma*.

O gênero *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij tem sido frequentemente relatado em solos (Sláviková & Vadkertiová, 2000; Vital et al, 2002; Sláviková & Vadkertiová, 2003; Wuczkowski & Prillinger, 2004; Toro et al, 2005; Yurkov et al, 2012).

Debaryomyces spp. são osmotolerantes e podem crescer em meio contendo concentrações de NaCl acima de 4 M (Breuer & Harms, 2006). Isso lhes confere vantagem para crescer em ambientes com baixa atividade de água, como os solos.

Os isolados **M8.2** e **E2.4** mostraram proximidade genética com o gênero *Debaryomyces*. **M8.2** está filogeneticamente relacionado a espécie *Debaryomyces polymorphus*, em um ramo bem suportado com 97% de *bootstrap*, enquanto que para o isolado **E2.4** não é possível chegar a uma conclusão a nível de espécie.

O gênero *Lipomyces* Lodder & Kreger-van Rij têm sido isolado exclusivamente de solos (Dias & Schwan, 2010). O isolado **M9.2** mostrou maior proximidade genética com a espécie *Lipomyces kononenkoae*, porém faz-se necessário o uso de mais um marcador molecular para chegar a resultados conclusivos. Espécies desse gênero são conhecidas por serem oleaginosas, ou seja, possui a capacidade de acumular lípidos intracelularmente, o que lhes confere possíveis potenciais biotecnológicos na produção de biocombustíveis e lípidos (Lin et al, 2011).

Aureobasidium Viala & G. Boyer é um gênero composto por fungos leveduriformes, geralmente de coloração escura, comumente denominada de leveduras negras. As espécies desse gênero são ubíquas, ocorrendo em áreas tropicais e temperadas. São frequentemente encontradas em associações com plantas, principalmente no filoplano, sendo epifítica ou endofítica, podendo ser encontradas em inúmeros habitats. Possuem capacidade intrínseca de adaptação a estresse ambiental devido a rápida alteração entre as formas leveduriforme e micelial (Gostincar et al, 2014).

Para o gênero *Aureobasidium* a análise microscópica detectou a presença de pseudohifa ou hifa verdadeira, o que é comum pois trata-se de um gênero de fungos leveduriformes. As células apresentaram-se com formato diferenciado das demais, sendo mais alongadas e muitas vezes apresentando papilas (ver Figura 12).

Zalar et al (2008) utilizaram diferentes regiões como o gene 28S do RNA ribossomal, o gene para β -tubulina e fator de alongação (EF 1 α) para separar as espécies dentro do complexo *Aureobasidium pullulans* e tentar definir as suas variedades, pois são filogeneticamente próximas.

Aureobasidium pullulans possui ampla aplicação biotecnológica, como na produção de enzimas hidrolíticas e possui alta plasticidade genética, podendo alterar suas propriedades morfológicas e fisiológicas dependendo das condições em que é cultivada (Zalar et al, 2008).

Ignatova et al (2013) isolaram *A. pullulans* de amostras de solos cultivados e não cultivados do Cazaquistão, sendo uma das espécies dominante nas amostras analisadas, e verificaram suas características como promotora do crescimento vegetal, encontrando que o isolado possui ação fitoestimulante.

De acordo com dados depositados no MycoBank, *A. melanogenum* pode ser uma variedade de *A. pullulans*. O isolado **B2.2** está intimamente relacionado com *A. pullulans* e *A. melanogenum*, com suporte de *bootstrap* de 93%.

Porém Gostincar et al (2014) demonstra que os genomas de *A. pullulans*, *A. melanogenum*, *A. subglaciale* e *A. namibiae*, que muitas vezes são consideradas variedades de *A. pullulans*, acumulam variações suficientes para justificar a sua separação em 4 diferentes espécies, e não mais considera-las como variedades de *A. pullulans*. Os pesquisadores sequenciaram o genoma completo das 4 espécies e concluíram que as várias famílias de genes encontrados podem estar associados à versatilidade nutricional dessas espécies e sua especial capacidade de tolerância a estresse ambiental, e capacidade de sobreviver em ambientes oligotróficos, como o solo.

O isolado **Ca2.2** mostrou identidade com *A. leucospermi* em um ramo com 68% de *bootstrap* (Figura 19). *A. leucospermi* Crous é uma espécie nova descrita em 2011 por Crous como um fitopatógeno em *Leucospermum* spp., causando manchas foliares. Embora as espécies do gênero *Aureobasidium* sejam geralmente considerados como saprófitas, vários táxons tem a habilidade de formar seu estado anamórfico, conhecido por *Kabatiella*, que geralmente causam manchas foliares e são considerados fitopatogênicos (Zalar et al, 2008; Crous et al, 2011).

6.6 Análise do Gel de Eletroforese com Gradiente Desnaturante (DGGE) das amostras de Solo

Das 16 amostras de solo apenas 15 entraram na análise de DGGE. Não foi possível conseguir DNA extraído das amostras de solo do Cerrado e a amostra **Mata**

8 não amplificou por meio da *nested* PCR, o que pode indicar que a quantidade de DNA proveniente de leveduras nessa amostra foi pouco ou insuficiente para ser detectado pela PCR, uma vez que houve isolamento de leveduras pelo método de cultivo.

O gel de DGGE teve um gradiente de 30 a 60%, formado por acrilamida e bis-acrilamida (37,5: 1), que foi satisfatório para a separação e resolução das bandas avaliadas.

A análise das amostras de solo por DGGE mostrou um padrão de diversidade diferenciado para cada área. Os géis de DGGE foram analisados no programa Bionumerics, e as comparações de similaridade foram feitas pelo método UPGMA utilizando o Coeficiente Dice. As diferenças entre os perfis estão indicadas por porcentagem de similaridade.

A tendência de agrupamento com base no *fingerprint* demonstrou uma maior similaridade entre as áreas Mata (M) e Eucalipto (E), com uma maior diversidade; e entre as áreas Capim (CA) e Canga (CG), com uma menor diversidade quando comparado ao padrão de bandas gerado em Mata e Eucalipto (Figura 20).

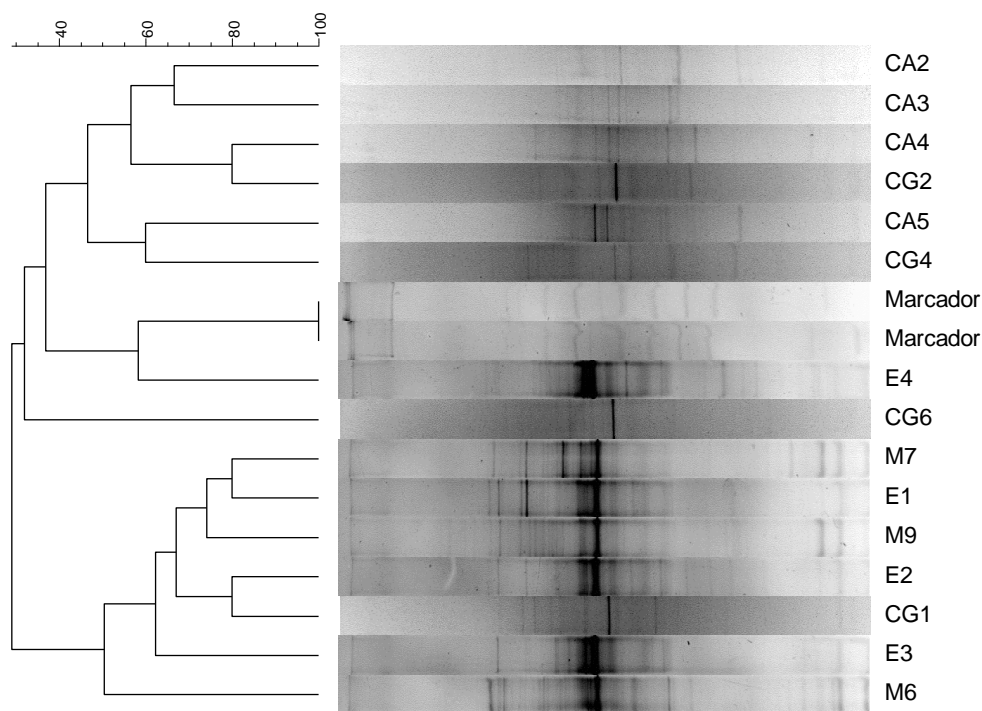


Figura 20. Perfil eletroforético de fragmentos de DNA de 15 amostras de solos das áreas de Mata (M), Eucalipto (E), Capim (CA) e Canga (CG), amplificados por nested-PCR com o primer NL1-GC e LS2 e agrupados pelo programa BioNumerics® (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica).

Os padrões de bandeamento gerado foi característico para cada amostra, revelando bandas específicas por amostras e bandas compartilhadas entre as amostras. O agrupamento por UPGMA formou dois *clusters* principais e bem definidos, um com as amostras Mata e Eucalipto e outro com as amostras Capim e Canga, apresentando um coeficiente de similaridade abaixo de 80%, o que caracteriza comunidades bem diferentes nas áreas analisadas.

As bandas dominantes e mais frequentes nas amostras foram excisadas e enviadas para sequenciamento. O resultado do sequenciamento das bandas retiradas do gel de DGGE corrobora os resultados do isolamento em meio de cultivo, uma vez que o gênero *Cryptococcus* também foi detectado no DGGE, nas amostras de Mata, Eucalipto e Canga. E ainda, assim como no isolamento em cultivo, no DGGE o gênero *Cryptococcus* não foi detectado nas amostras de Capim. Esses resultados foram obtidos comparando as sequências das bandas com as sequências depositadas no GenBank.

A análise filogenética das bandas do DGGE não ficou bem suportada e resolvida, quando observados os baixos valores de *bootstrap*, devido principalmente ao pequeno tamanho das sequências analisadas, que totalizam 250bp, ou seja, não há caracteres suficientes para chegar a conclusões exatas sobre a identidade de cada banda sequenciada (Figura 21). Além disso, os *primers* utilizados não foram específicos para detectar apenas leveduras, pois algumas bandas sequenciadas deram identidade com fungo filamentososo do solo, inclusive fungos micorrízicos.

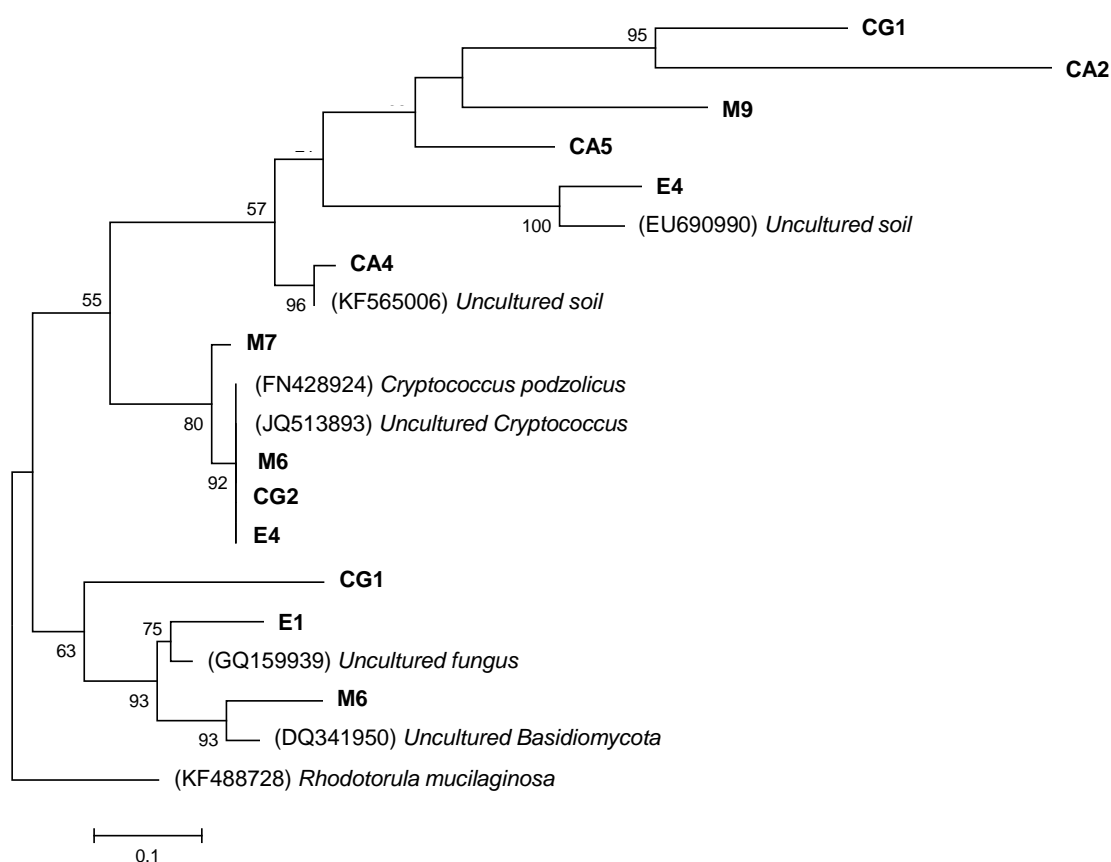


Figura 21. Árvore Filogenética, gerada a partir do sequenciamento de bandas excisadas do gel de DGGE e amplificadas com os *primers* NL1 e LS2, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de *bootstrap* com 1000 replicatas. Valores de *bootstrap* <50 não são mostrados. *Rhodotorula mucilaginosa* é utilizada como outgroup.

Os *primers* utilizados já foram relatados em estudos de análise da diversidade de leveduras por meio de DGGE durante processos de fermentação para fabricação de vinhos (Cocolin et al, 2000); para caracterizar a comunidade de leveduras em frutos do gênero *Physalis* (El Sheikha et al, 2009); para avaliar a dinâmica de

populações de leveduras em reatores durante a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos (Hesham et al, 2006); para caracterizar as leveduras presentes durante os estágios fermentativos de *Coffea arabica* (Masoud et al, 2004) e Cacao (Nielsen et al, 2005); ainda não há relatos na literatura do uso de DGGE para avaliar a diversidade de leveduras em amostras de solos.

Esse fato pode explicar a baixa resolução dos *primers* utilizados em detectar somente leveduras nas amostras de solo, uma vez que eles foram amplamente aplicados para detecção de leveduras em frutos, que caracteriza-se como um ambiente propício para o crescimento de leveduras, devido a alta concentração de açúcares, em detrimento de fungos filamentosos. Diferentemente das amostras de solo, nas quais os fungos filamentosos são mais dominantes em termos de biomassa (Thorn, 1997; Oros-Sichler et al, 2006), e ainda devido a sua capacidade de produção de estruturas de resistência, o que favorece a sua permanência em ambientes oligotróficos, como é o solo.

A especificidade dos *primers* e a informação filogenética contida nos fragmentos amplificados são fatores decisivos para o grau de resolução com o qual a estrutura da comunidade será revelada (Oros-Sichler et al, 2006), portanto para uma melhor resolução da comunidade de leveduras nas amostras analisadas talvez fosse necessário o desenvolvimento de um novo conjunto de *primers* para a região utilizada.

A maioria dos trabalhos utilizando PCR-DGGE em amostras de solo tem seu foco principal nas comunidades de bactérias e fungos, nas quais não discrimina entre fungo filamentoso e levedura. Para o estudo da comunidade de fungos de solos tem-se usado o gene 18S do RNA ribossomal (Agnelli et al, 2004; Oros-Sichler et al, 2006).

Contudo o uso da ferramenta de PCR-DGGE foi útil para confirmar os dados do isolamento em cultivo, e concluir que *Cryptococcus* é o gênero dominante nas amostras de solo do CeBio mesmo quando se utiliza métodos de estudo independentes de cultivo. Essa abordagem polifásica é satisfatória em estudos de biodiversidade para compreender a diversidade e estrutura de determinados grupos de micro-organismos em seu habitat natural.

6.7 Promoção do crescimento vegetal

A análise estatística dos 56 isolados testados mostrou que os resultados de crescimento não foram significativos ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 7). Ou seja, os 56 isolados de leveduras avaliados não aumentaram o crescimento de plântulas de arroz.

Praticamente todos os isolados (tratamentos) não diferiram do grupo controle, ou seja, o isolado não aumentou o crescimento das plântulas. Alguns isolados diferiram do controle de forma negativa, ou seja, na presença do tratamento as plântulas não se desenvolveram.

A grande maioria dos trabalhos visando a promoção de crescimento vegetal por leveduras tem utilizado a técnica de microbiolização de sementes, que consiste basicamente na inoculação da semente em solução contendo a levedura em questão.

Essa técnica é utilizada para favorecer a adesão das leveduras no tegumento da semente. Nesse trabalho as sementes foram microbiolizadas por 1 hora sob agitação. Possivelmente os resultados não foram significativos devido ao curto tempo de microbiolização, o que conseqüentemente não permitiu a adesão da levedura ao tegumento da semente, impedindo assim a sua ação promotora, nos casos em que os tratamentos não diferem do controle. Ou ainda, as condições em que as sementes foram microbiolizadas pode ter favorecido a produção de substâncias inibitórias do crescimento por parte das leveduras, no caso em que o tratamento difere negativamente do controle. Dessa forma, torna-se necessário uma otimização do protocolo de microbiolização.

Tabela 7. Crescimento de parte aérea (cm) e raiz (cm) dos 56 tratamentos e controle.

Tratamento	Parte aérea (cm)	Raiz (cm)	Tratamento	Parte aérea (cm)	Raiz (cm)
Controle	11.2 ab	11.2 a	Controle	11.2 ab	11.2 a
Ca2.1	10.6 ab	8.7 ab	E4.2	6.6 ab	4.34 cd
Ca2.3	11.4 ab	7.4 ab	E3.6	6.68 ab	5.54 ab
Ca2.5	8.8 ab	8.8 ab	E4.4	9.02 ab	7.32 ab
Ca2.6	11.5 ab	9 ab	M9.5	7.74 ab	5.38 ab
Ca3.1	12.2 ab	7.4 ab	M9.4	8.96 ab	7.38 ab
M6.1	10.6 ab	9.4 ab	E2.3	7 ab	5.16 ab
M6.2	14.2 a	8.6 ab	E3.3	5.7 cd	5.4 ab
M6.3	9.9 ab	9 ab	E3.7	8.4 ab	6.5 ab
M6.4	5.7 cd	4.3 cd	Ca5.1	14 ab	8.4 ab
M7.1	11.7 ab	7.1 ab	M9.5	12.2 ab	8.2 ab
M7.2	11.4 ab	9.3 ab	B2.1	10.6 ab	6.8 ab
M7.3	9.2 ab	6 ab	Ce1.1	7.4 ab	5.6 ab
M7.4	8.8 ab	7.7 ab	Ce4.4	8.6 ab	6 ab
M7.5	6.8 ab	6.8 ab	Cg6.1	9 ab	7.8 ab
M7.6	11.6 ab	8.3 ab	M8.3	12.1 ab	8.4 ab
M8.1	7.1 ab	7.1 ab	B2.2	9.6 ab	6 ab
M8.2	4.5 de	4.1 de	B1.2	13.9 ab	10.1 ab
E1.1	6 bc	5.4 ab	Ce4.1	11.7 ab	11 ab
E1.6	9.5 ab	7.1 ab	Cg6.2	7 ab	4.4 cd
E1.3	8.9 ab	7.7 ab	Ce2.1	10.4 ab	6.2 ab
E1.5	6.1 bc	5.4 ab	Cg4.1	13.4 ab	9 ab
E2.1	11.3 ab	8.6 ab	Cg2.4	10.7 ab	6.8 ab
E1.7	9.6 ab	7.3 ab	Cg4.2	8.4 ab	5 bc
M8.4	4.1 e	2.8 f	M9.4	6.8 ab	6 ab
M9.1	8.4 ab	5.2 ab	Cg2.3	9.2 ab	6.7 ab
Cg2.2	10.3 ab	9.9 ab	Ce3.1	12.2 ab	10.4 ab
E2.2	6.9 ab	4 de	Ce4.3	4.8 de	3.4 ef
E3.8	13.2 ab	9.7 ab	E2.4	7.8 ab	6.6 ab

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. Foi aplicado o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Ponto médio: 8.0. CV%: 54.13

Amprayn et al (2012) verificaram que uma estirpe de *Candida tropicalis* foi capaz de aumentar o crescimento de plântulas de arroz em até 35% com testes *in vitro*, inoculando as sementes de arroz com a solução da levedura. Porém, antes dos testes *in vitro* os pesquisadores verificaram que a levedura possuía características de promotora de crescimento vegetal, tais como: produção de Ácido Indolacético (AIA), atividade de ACC deaminase, produção de poliaminas e fitases e solubilização de fosfato.

Naturatat et al (2014) avaliaram 1035 isolados de leveduras quanto as suas características como promotoras do crescimento vegetal, tais como: produção de

AIA, produção de sideróforos, produção de poliaminas, solubilização de fosfato e zinco, produção de amônia, atividade de ACC deaminase e atividade de antagonismo contra fungos patogênicos; encontrando resultado positivo na levedura *Torulaspota globosa* para todos os testes, indicando que a levedura pode ser utilizada como promotora do crescimento vegetal de arroz e como agente de biocontrole.

Nassar et al (2005) verificaram que a levedura endofítica *Williopsis saturnus* possui habilidade de produzir AIA e portanto foi eficiente em aumentar o crescimento de plântulas de milho em experimentos em casa de vegetação.

Cloete et al (2009) estudando a interação da levedura do solo *Cryptococcus laurentii* com o arbusto medicinal *Agathosma betulina* verificaram que a levedura possui a habilidade de produzir poliaminas, que por sua vez, aumentou o crescimento da raiz da planta em até 51%, em experimentos conduzidos em casa de vegetação.

Para os isolados testados nesse trabalho não foram feitos os testes iniciais para verificação de presença de algumas dessas características de promotoras do crescimento vegetal. Talvez seja necessário a realização desses testes para selecionar as estirpes positivas e posteriormente otimizar o protocolo para testes *in vitro* e em casa de vegetação.

As espécies de leveduras mais relatadas, em literatura, por possuírem características de promotoras do crescimento vegetal estão inseridas nos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, *Williopsis* e *Yarrowia* (Cloete et al, 2009; El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006; Nassar et al, 2005; Medina et al, 2004). Nenhum desses gêneros foram encontrados nesse trabalho, o que pode explicar a ausência de resultado positivo relacionado a promoção de crescimento de plântulas de arroz.

6.8 Tolerância a metal

Dos 72 isolados recuperados de solo e água do CeBio - Vale, 22 foram tolerantes a concentrações de 20 mM de ferro, e 5 foram tolerantes a 5 mM de cádmio. Dentre os gêneros encontrados *Cryptococcus* foi o mais tolerante, seguido por *Meyerozyma* e *Debaryomyces*. A Tabela 8 traz os isolados mais tolerantes ao metal Ferro e Cádmio e sua respectiva identificação.

Apenas os isolados **Ce4.4** e **M6.1**, identificados como *Cryptococcus podzolicus*, foram tolerantes aos dois metais nas concentrações máximas de 20 mM para ferro e 5 mM para cádmio.

Tabela 8. Isolados de leveduras mais tolerantes ao Ferro e Cádmio.

Metal	Espécie	Isolados	Concentração (mM)
Ferro	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	Ce3.1; Ce4.3; Ce4.4; M6.1; M6.2; M6.3; M6.4; M7.1; M7.2; M7.4; M7.6; M8.4; M9.1; E3.6; E3.7; E3.8; E4.2; E4.4; Cg4.1	20 mM
	<i>Meyerozyma sp.</i>	Ce4.1; Ca2.5	20 mM
	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	M8.2	20 mM
Cádmio	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	Ce4.4; M6.1; E1.5; E3.1	5 mM
	<i>Meyerozyma sp.</i>	Ca2.1	5 mM

O cádmio pertence aos metais pesados não essenciais com conhecido efeito prejudicial para animais, plantas e células microbianas (Vadkertiová & Sláviková, 2006). As principais fontes contaminantes de cádmio de ação antrópica são a combustão de carvão mineral, metalúrgica não ferrosa, agricultura, manufaturados e deposição de lodo de esgoto (Moreira & Siqueira, 2006).

A Figura 22 mostra os testes feitos em placa com meio de cultura contendo cádmio, onde percebe-se que a maioria dos isolados não cresceram nem nas concentrações de 1 mM quando comparado com o controle, demonstrando assim a toxicidade desse metal.

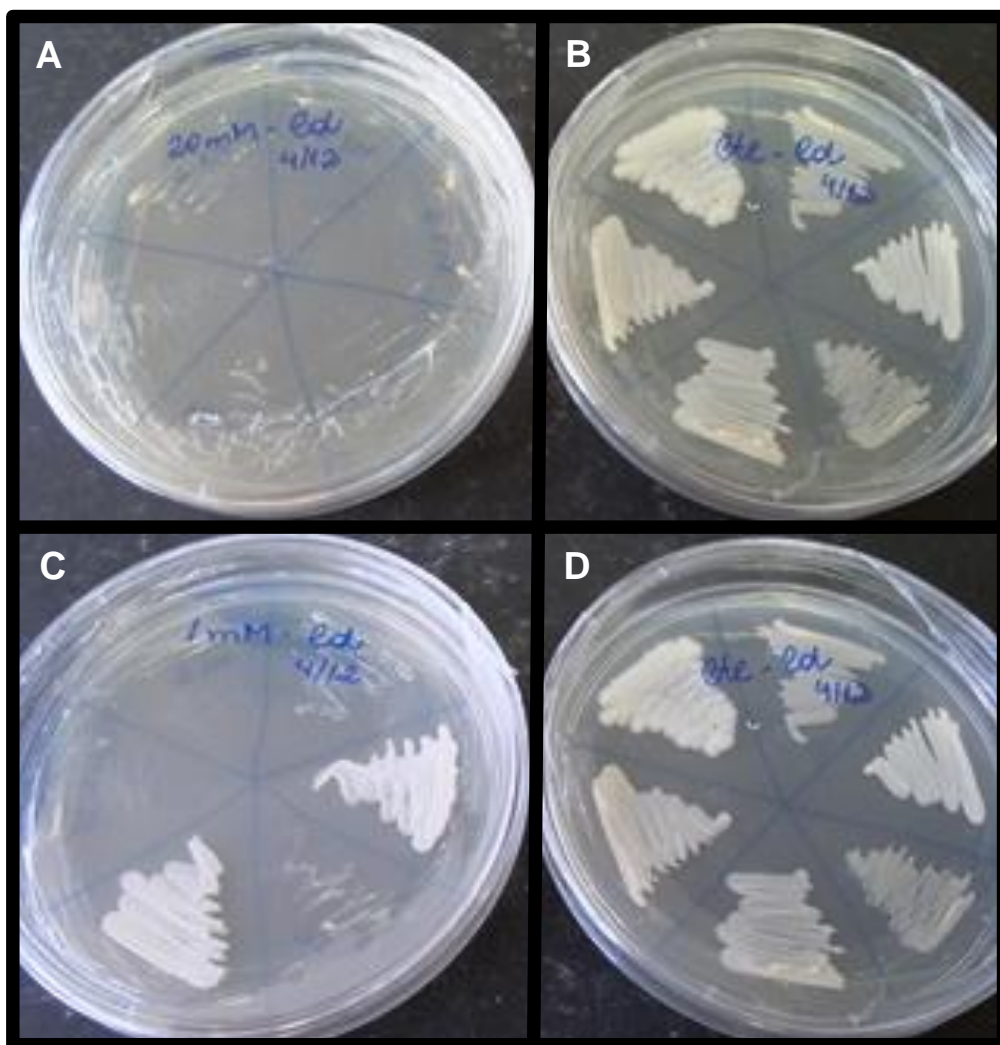


Figura 22. Teste de tolerância ao metal Cádmio com seis isolados da área Mata, crescidos em Meio TM por 5 dias, a 28°C. **A:** 20mM de Cádmio; **B:** Controle; **C:** 1mM de Cádmio; **D:** Controle.

Vadkertiová & Sláviková (2006) encontraram duas estirpes de *Rhodotorula glutinis*, resistentes a concentrações de 25 e 15 mM de cádmio, isoladas de água de rio e lago. Li et al (2014) demonstraram que *Zigosaccharomyces rouxii* possui habilidade para remover cádmio sob baixas concentrações através do mecanismo de bioacumulação. Demonstrando que são poucas as estirpes que toleram esse metal, devido a sua alta toxicidade.

Singh et al (2013) encontraram uma estirpe de *Cryptococcus*, isolada de sedimentos marinhos, tolerante a concentração de 100 mg/mL dos metais cádmio, zinco, cobre e chumbo. Além disso verificaram que a biosorção e a bioacumulação são os mecanismos utilizados na tolerância aos metais, e ainda, constataram

alterações morfológicas na superfície das células de leveduras na presença dos metais.

Li et al (2008) verificaram diferentes mudanças na composição do conteúdo celular de uma estirpe de *Rhodotorula* sp., na presença de cádmio, como a concentração de carotenóides, proteínas totais, açúcar solúvel e conteúdo de fosfato. E ainda, verificaram que a tolerância ao cádmio se dá inicialmente pela biosorção do metal seguida pela bioacumulação.

A composição das glicoproteínas extracelulares pode desempenhar papel importante na absorção de cádmio, e provavelmente, o nível de tolerância ao cádmio é influenciado por elas. Além disso, a composição das glicoproteínas extracelulares é alterado durante a adaptação da levedura na presença de íons de cádmio (Breierová et al, 2002). Para os isolados tolerantes encontrados nesse trabalho faz-se necessário ainda investigar qual o mecanismo utilizado.

A Figura 23 mostra alterações no formato da colônia e na morfologia celular do isolado **Ce4.4** crescendo em cádmio e ferro. Observa-se a iniciação da formação de pseudomicélios (indicado pela seta branca na Figura 23-A) no meio contendo 5 mM de cádmio, o mesmo não ocorre no meio contendo 20 mM de ferro (Figura 23-B). A aparência da colônia no meio contendo cádmio também se altera, uma vez que apresenta uma textura cotonosa indicando a formação de pseudomicélio, o que não ocorre no meio sem a adição do metal.

Conforme já descrito em literatura, sabe-se que micro-organismos expostos a concentrações elevadas de metais pesados podem apresentar mudanças morfológicas (Fomina et al, 2000); alterações na composição do conteúdo celular (carotenóides, proteínas totais, açúcares solúveis e teor de fosfato); e alterações na superfície celular como o encolhimento e distorção da parede celular e depressões da parede celular (Singh et al, 2013).

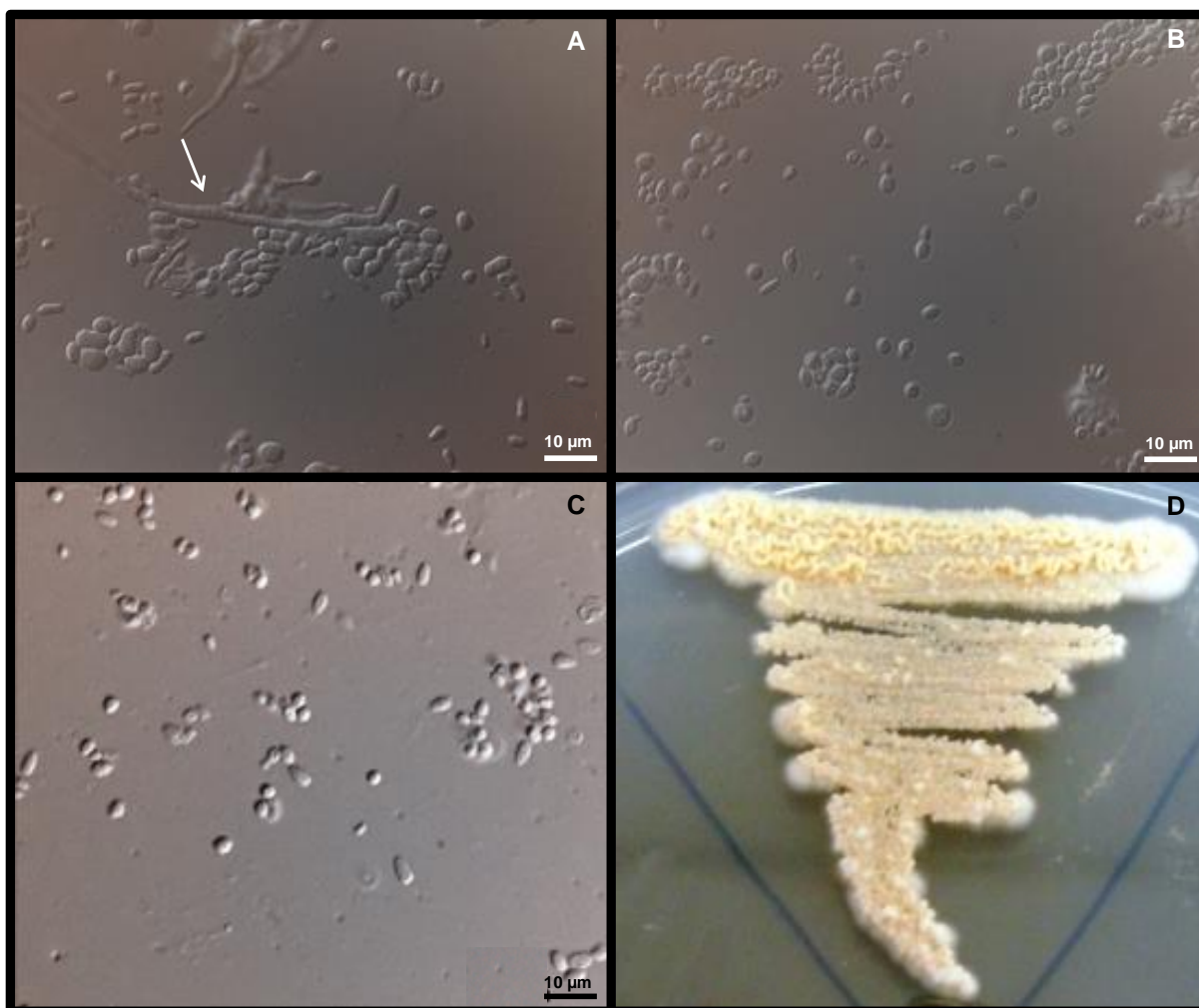


Figura 23. Morfologia celular e colonial do isolado **Ce4.4**, crescido em Meio TM por 5 dias, a 28°C. **A:** 5mM de Cádmio, pseudomicélio indicado pela seta branca; **B:** 20mM de Ferro; **C:** Controle; **D:** Crescimento em 5mM de Cádmio.

O metal ferro não mostrou a mesma toxicidade que o cádmio, uma vez que a maioria dos isolados cresceram bem nas concentrações de 1 a 10 mM, diminuindo o crescimento na concentração de 20 mM (Figura 24). O bom crescimento em meio contendo ferro pode ser explicado pelo local em que as leveduras foram recuperadas, por se tratar de uma região de mineração de ferro, os solos são ricos nesse metal, logo as leveduras já estão adaptadas à substratos ricos em ferro. Além disso o ferro é um micronutriente essencial para o desenvolvimento de micro-organismos, e não está inserido no grupo de metais pesados como o cádmio (Vullo, 2003).

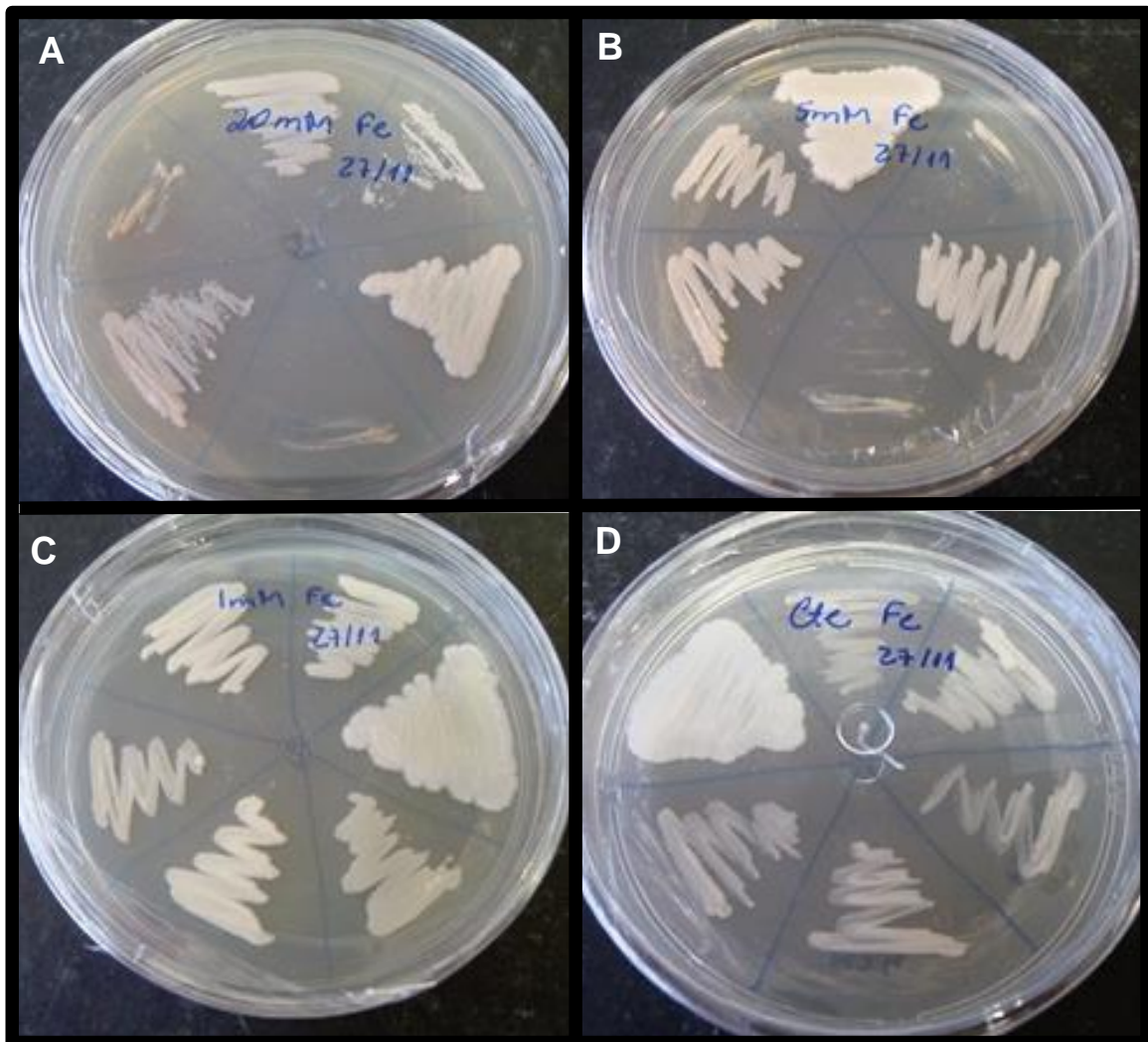


Figura 24. Teste de tolerância ao metal Ferro (Fe) com seis isolados da área Mata, crescidos em Meio TM por 5 dias, a 28°C. **A:** 20mM de Fe; **B:** 5mM de Fe; **C:** 1mM de Fe; **D:** Controle.

A verificação do crescimento de leveduras em meio contendo diferentes concentrações de metais pesados é apenas um passo inicial na investigação de estirpes tolerantes. Ainda faz-se necessário investigar quais os mecanismos utilizados pelas estirpes positivas para depois utiliza-las em processos de biorremediação de áreas contaminadas pelo metal referente.

7. CONCLUSÕES

Foram recuperados 72 isolados de leveduras das amostras de solos das áreas de Mata, Eucalipto, Cerrado, Canga e Capim e das amostras de água da Barragem do Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio).

A análise morfológica gerou 23 diferentes morfotipos com base nas características coloniais em meio MYGP.

A análise do perfil genético dos isolados utilizando MSP-PCR com o *primer* M13 gerou alta diversidade genética porém não foi útil para realizar o agrupamento de espécies, visto que estirpes da mesma espécie geraram perfis genéticos diferentes.

O sequenciamento do Domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal revelou a presença de 6 gêneros nas amostras estudadas, sendo eles: *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Meyerozyma*, *Debaryomyces*, *Lipomyces* e *Aureobasidium*.

O gênero *Cryptococcus* foi dominante nas amostras de solo e água, estando ausente apenas nas amostras de Capim.

A composição das comunidades de leveduras associadas a solos e água de cinco diferentes áreas do CeBio mostrou-se homogênea entre as áreas, sendo similar nas áreas de Cerrado e Canga.

As análises de PCR-DGGE corroboram que o gênero *Cryptococcus* é dominante nas amostras de solo do CeBio, e revela um perfil de diversidade bem homogêneo e similar entre as amostras com cobertura vegetal similar, conforme revelado por meio do cultivo.

Os 56 isolados recuperados das amostras de solo e água não apresentaram habilidade para promover o crescimento de sementes de arroz pré-germinadas *in vitro*.

Os testes de tolerância a metais mostraram que um total de 27 isolados toleram os metais cádmio e ferro, sendo que apenas os isolados **Ce4.4** e **M6.1**, identificados como *Cryptococcus podzolicus*, cresceram em ambos metais nas concentrações máximas de 5 mM para cádmio e 20 mM para ferro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-HAFEZ, A. E.; SHEHATA, S. F. Field evaluation of yeasts as a biofertilizer for some vegetable crops. **Arab Univ J Agric Sci**, 9:169– 182, 2001.

AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M. T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.859-868, 2004.

ALMEIDA, J. M. G. C. F. de. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, v.53, p.295-303, 2005.

AMPRAYN, K.; ROSE, M. T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, H. T.; KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v.61, p.295-299, 2012.

ANDREOLA, F.; FERNANDES, S. A. P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo de culturas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. 312p. Campinas: Instituto Agronômico, 2007.

AZEVEDO, U. R.; MACHADO, M. M. M.; CASTRO, P. T. A.; RENGER, F. E.; TREVISOL, A.; BEATO, D. A. C. Geoparque Quadrilátero Ferrífero (MG). In: SCHOBENHAUS, C. & SILVA, C. R. da. Geoparques do Brasil – propostas, Volume 1. 750p. CPRM – Serviço Geológico do Brasil, 2012.

BALEIRAS COUTO, M. M.; EIJSMA, B.; HOFSTRA, H.; HUIS IN'T VELD, J. H.; van der VOSSSEN, J. M. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied and environmental microbiology**, v.62, n.1, p.41-46, 1996.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. London: Cambridge, pg.13-18, 1986.

BARNETT, J.A; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast, Characteristics and Identification**, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 811p, 2000.

BARRETO, M. L. Mineração e Desenvolvimento Sustentável: desafios para o Brasil. CETEM/MCT. Rio de Janeiro – RJ, 215p, 2001.

BENJAMIN, S. & PANDEY, A. *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. **Yeast**, 14: 1069-1087, 1998.

BOEKHOUT, T. & FELL, J. W. *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout and a comparison with the yeast state of *Ustilago maydis* (De Candolle) Corda. In:

KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. *The Yeast: A Taxonomic Study*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.

BOUNDY-MILLS, K. Methods for Investigating Yeast Biodiversity. In: ROSA, C. A.; PETER, G. eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, p.67-100, 2006.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, 43(1), 1–8, 2011.

BRADY, N. C.; WEIL R. R. *The nature and properties of soils*. Pearson, New Jersey, Ohio, 2008.

BRADY, N. C. & WEIL, R. R. *Elementos da natureza e propriedades dos solos*. Bookman, 3ed., 2013.

BREIEROVÁ, E.; VAJČZIKOVÁ, I.; SASINKOVÁ, V.; STRATILOVÁ, E.; FIŠERA, M.; GREGOR, T.; ŠAJBIDOR, J. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. **Z. Naturforsch.**, v.57, p.634–637, 2002.

BREUER, U. & HARMS, H. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, 23: 415-437, 2006.

CABRAL JUNIOR, M.; SUSLICK, S. B.; OBATA, O. R.; SINTONI, A. A mineração no estado de São Paulo: situação atual, perspectivas e desafios para o aproveitamento dos recursos minerais. **Geociências**, v.27, n.2, p.171-192, 2008.

CAPRONI, A. L.; FRANCO, A. A.; BERBARA, R. L. L.; GRANHA, J. R. D. de O.; MARINHO, N. F. Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita. **Revista Árvore**, v.29, n.3, p.373-381, 2005.

CARMO, F. F.; CARMO, F. F.; SALGADO, A. A. R.; JACOBI, C. M. Novo sítio espeleológico em sistemas ferruginosos, no Vale do Rio Peixe Bravo, norte de Minas Gerais, Brasil. **Espeleo-Tema**, v.22, n.1, 2011.

CHOI, G.-W.; UM, H.-J.; KIM, Y.; KANG, H.-W.; KIM, M.; CHUNG, B.-W. & KIM, Y.-H. Isolation and characterization of two soil derived yeasts for bioethanol production on Cassava starch. **Biomass and Bioenergy**, 34(8), 1223–1231, 2010.

COCOLIN, L.; ALESSANDRIA, V.; DOLCI, P.; GORRA, R. & RANTSIOU, K. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 167, 29–43, 2013.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F. & MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, 189, 81–87, 2000.

CONNELL, L.; REDMAN, R.; CRAIG, S.; SCORZETTI, G.; ISZARD, M. & RODRIGUEZ, R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. **Microbial Ecology**, 56(3), 448–59, 2007.

CROUS, P. W.; SUMMERELL, B. A.; SWART, L.; DENMAN, S.; TAYLOR, J. E.; BEZUIDENHOUT, C. M.; PALM, M. E.; MARINCOWITZ, S.; GROENEWALD, J. Z. Fungal pathogens of Proteaceae. **Persoonia**, v.27, p.20-45, 2011.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews, Microbiology**, 3(6), 470-478, 2005.

DEPARTAMENTO NACIONAL DA PRODUÇÃO MINERAL – DNPM. Anuário Mineral Brasileiro 2006. Brasília: Departamento Nacional da Produção Mineral, 2010.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras – MG: Editora UFLA, 368p, 2010.

DUARTE, R. P. S. & PASQUAL, A. Avaliação do Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. **Energia na Agricultura**, v.15, n.1, 2000.

DUARTE, W. F.; DAYO-OWOYEMI, I.; NOBRE, F. S.; PAGNOCCA, F. C.; CHAUD, L. C. S.; PESSOA, A.; FELIPE, M. G. A. & SETTE, L. D. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, 17(6), 1023–35, 2013.

DURAND, N.; EL SHEIKHA, A. F.; SUAREZ-QUIROS, M.-L.; OSCAR, G.-R.; NGANOU, N. D.; FONTANA-TACHON, A. & MONTET, D. Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. **Food Control**, 34(2), 466–471, 2013.

EL SHEIKHA, A. F.; CONDUR, A.; MÉTAYER, I.; NGUYEN, D. D. L.; LOISEAU, G.; MONTET, D. Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR–DGGE: preliminary application to *Physalis* fruits from Egypt. **Yeast**, 26: 567–573, 2009.

EL-TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **J Appl Microbiol**, 96:69–75, 2004.

EL-TARABILY, K. A. & SIVASITHAMPARAM K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, v.47, p.25–35, 2006.

FALIH, A. M. Comparative toxicity of heavy metals to some yeasts isolated from Saudi Arabian soil. **Bioresource Technology**, 64: 193-198, 1998.

FELL, J. W. & STATZELL-TALLMAN, A. *Cryptococcus* Vuillemin. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. The Yeast: A Taxonomic Study. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G. & STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.1351-1371, 2000.

FIDALGO, C. I. A. **Heavy metal resistance in extremophilic yeasts: a molecular and physiological approach**. Dissertação (Mestrado) 57p. - Universidade de Lisboa – Portugal, 2011.

FOMINA, M.; RITZ, K.; GADD, G. M. Negative fungal chemotropism to toxic metals. **FEMS Microbiology Letters**, 193: 207-211, 2000.

FOSSI, B. T.; TAVEA, F.; NDJOUENKEU, R. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.1, p.14-18, 2005.

GADANHO, M. Polyphasic taxonomy of taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospirium*: *R. azoricum* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.47, p.213-227, 2001.

GADANHO, M. L. D. & SAMPAIO, J. P. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov. **FEMS Yeast Research**, 2: 47-58, 2002.

GADANHO, M.; ALMEIDA, J. M. G. C. F.; SAMPAIO, J. P. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.217-227, 2003.

GADANHO, M. L. D. & SAMPAIO, J. P. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. **Microbial Ecology** v.52 p.552–563, 2006.

GELLISSEN, G.; KUNZE, G.; GAILLARDIN, C.; CREGG, J. M.; BERARDI, E.; VEENHUIS, M.; KLEI, I. van der. New yeast expressions platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. **FEMS Yeast Research**, 5: 1079-1096, 2005.

GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biology & Biochemistry**, v.30, n.10/11, p.1389-1414, 1998.

GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. Heavy metals and soil microbes. **Soil Biology & Biochemistry**, 41: 2031-2037, 2009.

GOLLNER, M. J.; PUSCHEL, D.; RYDLOVÁ, J.; VOSÁTKA, M. Effect of inoculation with soil yeasts on mycorrhizal symbiosis of maize. **Pedobiologia**, v.50, p.341-345, 2006.

GOSTINCAR, C.; OHM, R. A.; KOGEJ, T.; SONJAK, S.; TURK, M.; ZAJC, J.; ZALAR, P.; GRUBE, M.; SUN, H.; HAN, J.; SHARMA, A.; CHINIQUY, J.; NGAN, C. Y.; LIPZEN, A.; BARRY, K.; GRIGORIEV, I. V.; GUNDE-CIMERMAN, N. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. **BMC Genomics**, v.15, n.549, 2014.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4, n.1, 2001.

HESHAM, A.; KHAN, S.; LIU, X. & ZHANG, Y. Application of PCR–DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered. **Yeast**, 879–887, 2006.

HOFMAN, J.; BEZCHLEBOVÁ, J.; DUŠEK, L.; DOLEŽAL, L.; HOLOUBEK, I.; AND—L, P.; ANSORGOVÁ, A. ALÝ, S. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. **Environment International**, Amsterdam, v. 28, n. 8 , p. 771- 778, 2003.

IGNATOVA, L. V.; BRAZHNIKOVA, Y. V.; MUKASHEVA, T. D.; OMIRBEKOVA, A. A.; BERZHANOVA, R. Zh.; SYDYKBKOVA, R. K.; KARPENYUK, T. A.; GONCHAROVA, A. V. Biodiversity of Micromycetes Isolated from Soils of Different Agricultures in Kazakhstan and Their Plant Growth Promoting Potential. **International Scholarly and Scientific Research & Innovation**, v.7, n.7, 2013.

JACOBI, C. M. & CARMO, F. F. The Contribution of Ironstone Outcrops to Plant Diversity in the Iron Quadrangle, a Threatened Brazilian Landscape. **Ambio**, v.37, n.4, p.324-326, 2008.

JIANG, C.; SHENG, X.; QIAN, M.; WANG, Q. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. **Chemosphere**, 72: 157-164, 2008.

JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast Biotechnology. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: a taxonomic study**. 5 ed. Elsevier, 2011.

JOSÉ, M.; VITAL, S.; ABRANCHES, J.; HAGLER, A. N. & MENDONÇA-HAGLER, L. C. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 5, 230–235, 2002.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Yeast systematics and phylogeny – Implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. **Biodiversity and Ecophysiology of yeasts**. Springer: 2006.

KURTZMAN, C. P. & SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleromyces*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v.51, p.2-14, 2010.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a taxonomic study**. 5. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v.2, 1062 p., 2011.

KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. **The Yeasts, a taxonomic study**. Elsevier, 4 ed., 1998.

KURTZMAN, C. P. & ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek** v.73, p.331-371, 1998.

LACHANCE, M-A. & STARMER, W. T. Ecology and yeasts. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. **The Yeasts, a taxonomic study**. Elsevier, 4 ed., 1998.

LANDELL, M. F. **Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do parque de Itapuã-Viamão/RS**. Porto Alegre – RS, 2006. 127p. Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

LANDELL, M. F. **Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no parque de Itapuã-Viamão/RS**. Porto Alegre, 2009. 187p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v.23, p.2947-2948, 2007.

LASKER, B. A.; RAN, Y. Analysis of Polimorphic Microsatellite Markers for Typing *Penicillium marneffe* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p.1483-1490, 2004.

LI, Z.; YUAN, HL.; HU, XD. Cadmium-resistance in growing *Rhodotorula* sp. Y11. **Bioresource Technology**, 99: 1339-1344, 2008.

LI, C.; JIANG, W.; MA, N.; ZHU, Y.; DONG, X.; WANG, D.; MENG, X.; XU, Y. Bioaccumulation of cadmium by growing *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, 155: 116-121, 2014.

LIBKIND, D.; BRIZZIO, S.; RUFFINI, A.; GADANHO, M.; VAN BROOCK, M. & SAMPAIO, J. P. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic

environments in Patagonia, Argentina. **Antonie van Leeuwenhoek**, 84(4), 313–22, 2003.

LIN, J.; SHEN, H.; TAN, H.; ZHAO, X.; WU, S.; HU, C.; ZHAO, Z. K. Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. **Journal of Biotechnology**, v.152, p.184-188, 2011.

LINS, C. E. L.; MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E. V. de S. B. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena leucocephala* (LAM.) de WIT. em solos de Caatinga sob impacto de mineração de cobre. **Revista Árvore**, v.31, n.2, p.355-363, 2007.

LIU, P.; LUO, L.; LONG, C-A. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. **Biological Control**, v.67, p.157-162, 2013.

LOBO, F. Jazida Ecológica. Disponível em: http://oeco.org.br/reportagens/2289-oeco_28415. Acesso em: 12 de fevereiro de 2014.

LOREAU, M. Microbial diversity, producer-decomposer interaction and ecosystem processes: a theoretical model. **Proceedings: Biological Sciences**, London, v. 268, p. 303-3098, 2001.

LOUREIRO, S. T. A.; CAVALCANTI, M. A. Q.; NEVES, R. P.; PASSAVANTE, J. Z. O. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.333-337, 2005.

LV, X-C.; HUANG, X-L.; ZHANG, W.; RAO, P-F.; NI, L. Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Control**, v.34, p.183-190, 2013.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, 22: 249-270, 2005.

MANGUNWARDYO, W.; APRILISMULAN; OETARI, A.; SJAMSURIDZAL, W. Screening Cellulose Activity of Yeast Isolated from Soil, Sediment and Water River from Taman Nasional Gunung Halimun, West Java, Indonesia. **Malaysian Journal of Microbiology**, v.7, n.4, p.210-216, 2011.

MARIANO-DA-SILVA, S.; BASSO, L. C. Efeitos do Cádmiu sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904, e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 24(1): 16-22, 2004.

MATOS, P. N. **Fauna do Solo, Fungos Micorrízicos Arbusculares e Bactérias Diazotróficas em Áreas de Mineração de Bauxita no Noroeste do Pará**

Revegetadas com Dendê. 2009. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ,2009.

MASOUD, W.; CESAR, L. B.; JESPERSEN, L. & JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, 21(7), 549–56, 2004.

MECHI, A. & SANCHES, D. J. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, v.24, n.68, p.209-220, 2010.

MEDINA, A.; VASSILEVA, M.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R. Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Chemosphere**, v.56, p.449–456, 2004.

MENDES FILHO, P. F.; VASCONCELLOS, R. L. F.; PAULA, A. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Evaluating the potential of forest species under microbial management of the restoration of degraded mining areas. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 208, n.1/4, p.79-89, 2010.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.28, p.85-93, 2004.

MESTRE, M. C.; ROSA, C. A.; SAFAR, S. V. B.; LIBKIND, D.; FONTENLA, S. B. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. **FEMS Microbiology Ecology**, v.78, p.531-541, 2011.

METTING, F. B. Structure and Physiological Ecology of Soil Microbial Communities. In: METTING, F. B. Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management. Ed. Dekker, 1992.

MOAWAD, H.; SALEM, S. H.; BADR EL-DIN, S. M. S.; KHATER, T.; ISKANDAR, M. Yeasts in soils of Egypt. **Zentralblatt fur Mikrobiologie**, v.141, p.431-435, 1986.

MORAIS, C. G.; CADETE, R. M.; UETANABARO, A. P. T.; ROSA, L. H.; LACHANCE, M-A.; ROSA, C. A. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, v.60, p.19-28, 2013.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2ed. Lavras: Editora UFLA. 729p, 2006.

MUSHTAQ, M. & HASHMI, M. H. Isolation and identification of yeast flora from soil of Karachi. **Pakistan**, 36(1), 173–180, 2004.

MUSTACCHI, R.; HOHMANN, S.; NIELSEN, J. Yeast systems biology to unravel the network of life. **Yeast**, 23: 227-238, 2006.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.317-322, 1999.

NAKAYAN, P.; HAMEED, A.; SINGH, S.; YOUNG, L-S.; HUANG, M-H.; YOUNG, C-C. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant Soil**, v.373, p.301-315, 2013.

NALLY, M. C.; PESCE, V. M.; MATURANO, Y. P.; MUNOZ, C. J.; COMBINA, M.; TORO, M. E.; CASTELLANOS de FIGUEROA, L. I.; VAZQUEZ, F. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. **Postharvest Biology and Technology**, v.64, p.40-48, 2012.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biol Fertil Soils**, v.42, p.97-108, 2005.

NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S.; TANO-DEBRAH, K. & JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast**, 22(4), 271–84, 2005.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v.118, n.8, p.683-694, 2014.

O'DONNELL, A. G.; YOUNG, I. M.; RUSHTON, S. P.; SHIRLEY, M. D.; CRAWFORD, J. W. Visualization, modelling and prediction in soil microbiology. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, 2007.

OROS-SICHLER, M.; GOMES, N. C. M.; NEUBER, G.; SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v.65, p.63-75, 2006.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts: Biology of yeasts**. Academic, London, 1987.

PRAKITCHAIWATTANA, C. J.; FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, v.4, p.865-877, 2004.

RENKER, C.; OTTO, P.; SCHNEIDER, K.; ZIMDARS, B.; MARAUN, M.; BUSCOT, F. Oribatid Mites as Potential Vectors for Soil Microfungi: Study of Mite-Associated Fungal Species. **Microbial Ecology**, v.50, p.518-528, 2005.

ROANE, T.; PEPPER, I. Microorganisms and metal pollutants. In: Maier, R.; Pepper, I.; Gerba, C. Environmental Microbiology, London: Academic Press, pp. 403-423, 2000.

RODARTE, M. P.; DIAS, D. R.; VILELA, D. M.; SCHWAN, R. F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.33, n.3, p.457-464, 2011.

ROMI, W.; KEISAM, S.; AHMED, G.; JEYARAM, K. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. **BMC Microbiology**, v.14, n.52, p.1-10, 2014.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces LAC* genes. **Biotechnology Advances**, 24: 212-225, 2006.

RUSSO, G.; LIBKIND, D.; SAMPAIO, J. P.; BROOCK, M. R. van. Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). **FEMS Microbiology Ecology**, v.65, p.415-424, 2008.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A. & FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51(2), 687-97, 2001.

SCHENBERG, A. C. G. Biotecnologia e Desenvolvimento Sustentável. **Estudos Avançados**, v.24, n.70, 2010.

SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R. Diversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Editora UFLA, 2008.

SHALABY, M. E-S. & EL-NADY, M. F. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. **Acta Biologica Szegediensis**, v.52, n.2, p.271-275, 2008.

SILVA, F. de A. S. e. & AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

SINGH, P.; RAGHUKUMAR, C.; PARVATKAR, R. R.; MASCARENHAS-PEREIRA, M. B. L. Heavy metal tolerance in the psychrotolerant *Cryptococcus* sp. isolated from deep-sea sediments of the Central Indian Basin. **Yeast**, 30: 93-101, 2013.

SINGH, P.; TSUJI, M.; SINGH, S. M.; ROY, U.; HOSHINO, T. Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic. **Cryobiology**, v.66, p.167-175, 2013.

SKIRY CZ, A.; CASTILHO, A.; CHAPARRO, C.; CARVALHO, N.; TZOTZOS, G.; SIQUEIRA, J. O. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in Plant Science**, v.5, 2014.

SLÁVIKOVÁ, E., & VADKERTIOVÁ, R. The occurrence of yeasts in the forest soils. **J. Basic. Microbiol**, 40(3), 207-212, 2000.

SLÁVIKOVÁ, E. & VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeasts in the agricultural soil. **Journal of Basic Microbiology**, 43(5), 430–6, 2003.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; BARONI, S. Fungos na Biorremediação de Áreas Degradadas. **Arq. Inst. Biol.**, v.78, n.2, p.341-350, 2011.

SOTTERO, A. N.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; TRANI, P. E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.30, p.225-234, 2006.

SPERANDIO, E. M. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado**. Brasília, 2012. 93p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília – UnB.

SWIFT, M.; BIGNELL, D. Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice. **International Centre for Research in Agroforestry**, 2001.

SWIFT, M. J.; BIGNELL, D. E.; MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J. The inventory of soil biological diversity: concepts and general guidelines. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. *A handbook of Tropical Soil Biology: Sampling and characterization of below-ground biodiversity*. London: Earthscan, pg.1, 2008.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol. Biol. Evol**, v.30, n.12, p.2725-2729, 2013.

THORN, G. The fungi in soil. In: van ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. *Modern Soil Microbiology*. Marcel Decker, Inc., New York, p.63-127, 1997.

TORO, M. E.; ORO, N. P.; VEGA, A. D.; MATURANO, Y. P.; NALLY, M. C.; FERNÁNDEZ, E.; PUCHETA, E.; VÁZQUEZ, F. Diversidad de levaduras en canopias y suelos asociados con *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata*. **Revista Argentina de Microbiología**, v.37, p.209-213, 2005.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, 5: 240-245, 2002.

TROEH, F. R. & THOMPSON, L. M. Solos e fertilidade do solo. 6 ed. Andrei Editora, 2007.

VADKERTIOVÁ, R.; SLÁVIKOVÁ, E. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. **Journal of basic Microbiology**, v.46, n.2, p.145-152, 2006.

VALENTE, P.; RAMOS, J. P.; LEONCINI, O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.45, p. 949-958, 1999.

VASSART, G.; GEORGES, M.; MONSIEUR, R.; BROCAS, H.; LEQUARRE, A. S.; CHRISTOPHE, D. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. **Science**, v.235, p.683-684, 1987.

VITAL, M. J. S.; ABRANCHES, J.; HAGLER, A. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Mycocinogenic yeasts isolated from amazon soils of the Maraca Ecological Station, Roraima-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.230-235, 2002.

VULLO, D. L. Microorganismos y metales pesados: una interaccion em beneficio del medio ambiente. Revista Química Viva, n.3, 2003.

ZALAR, P.; GOSTINCAR, C.; HOOG, G. S. de; URSIC, V.; SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**, v.61, p.21-38, 2008.

ZINJARDE, S.; APTE, M.; MOHITE, P.; KUMAR, A. R. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. **Biotechnology Advances**, v.32, p.920-933, 2014.

ZONG, Y.; LIU, J.; LI, B.; QIN, G.; TIAN, S. Effects of yeast antagonists in combination with hot water treatment on postharvest diseases of tomato fruit. **Biological control**, 54: 316-321, 2010.

WUCZKOWSKI, M. & PRILLINGER, H. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). **Microbiological Research**, 159(3), 263-75, 2004.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. **The Yeasts, a taxonomic study**. Elsevier, 4 ed., 1998.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M. & BEGEROW, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. **Fungal Ecology**, 5: 24-35, 2012.

9. ANEXOS

9.1 Análises do solo



Universidade Federal de Lavras

Laboratório de Análises de Solo
Departamento de Ciência do Solo



Nome: MARCO AURÉLIO CARBONE
Cidade: Lavras - MG
Endereço: DCS/ UFLA - KATIA COELHO
Telefone:

Bairro:
Município: Lavras - MG
Valor: 0,00

Entrada: 09/10/2013
Saída: 30/10/2013
CEP:

Resultados Analíticos

Protocolo	Identificação Amostra	pH(KCl)	pH	K	P	Na	Ca	Mg	Al	H+Al
				---mg/dm ³ ---			---cmol/dm ³ ---			
9055	MATA 6	-	4,7	74,00	1,71	-	0,40	0,20	1,70	8,80
9056	MATA 7	-	4,7	60,00	1,42	-	0,10	0,30	2,40	10,99
9057	MATA 8	-	4,5	60,00	2,00	-	0,80	0,50	1,50	9,83
9058	MATA 9	-	4,7	80,00	2,60	-	1,00	0,70	1,40	9,83
9059	CERRADO 1	-	4,9	44,00	2,60	-	0,40	0,10	1,60	7,87

Protocolo	SB	t	T	V	m	M.O.	P-Rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
	---cmolc/dm ³ ---			---%---		dag/kg	mg/L	---mg/dm ³ ---					
9055	0,79	2,49	9,59	8,24	68,27	3,70	17,71	23,20	132,51	30,30	2,54	0,19	12,14
9056	0,55	2,95	11,54	4,80	81,36	3,99	12,93	2,16	73,58	20,32	2,16	0,13	10,34
9057	1,45	2,95	11,28	12,89	50,85	5,43	22,30	2,68	79,91	111,56	5,05	0,15	9,06
9058	1,91	3,31	11,74	16,23	42,30	5,96	18,38	2,20	92,18	109,14	2,36	0,13	13,08
9059	0,61	2,21	8,48	7,23	72,40	4,45	19,91	0,96	87,49	16,24	2,45	0,10	10,78

Protocolo	Classificação do Solo	Argila	Silte	Areia	Areia(Grossa)	Areia(Fina)
		---dag/kg---				
9055	solo tipo2	28	38	34	-	-
9056	solo tipo3	37	47	16	-	-
9057	solo tipo2	27	40	33	-	-
9058	solo tipo2	30	44	26	-	-
9059	solo tipo2	33	37	30	-	-

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5

Ca - Mg- Al- Extrator: KCl - 1 mol/L

SB= Soma de Bases Trocáveis

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

m= Índice de Saturação de Alumínio

P-rem: Fósforo Remanescente

S - Extrator - Fosfato monocálcio em ácido acético

P- Na - K- Fe - Zn- Mn- Cu- Extrator Mehlich 1

H + Al- Extrator: SMP

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

V= Índice de Saturação de Bases

Mat. Org. (MO) - Oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N+ H₂SO₄ 10N

B- Extrator água quente

Solo Tipo 1: Textura Arenosa

Solo Tipo 2: Textura Média

Solo Tipo 3: Textura Argilosa

Protocolo	Identificação Amostra	pH(KCl)	pH	K	P	Na	Ca	Mg	Al	H+Al
				---mg/dm ³ ---			---cmol/dm ³ ---			
9060	CERRADO 2	-	4,9	48,00	1,42	-	0,60	0,20	1,40	6,30
9061	CERRADO 4	-	5,1	60,00	1,13	-	0,70	0,20	0,90	5,05
9062	CERRADO 3	-	4,9	40,00	0,84	-	0,30	0,10	1,50	7,04
9063	EUCALIPTO E. 1	-	4,7	36,00	2,30	-	0,10	0,10	2,60	12,28
9064	EUCALIPTO 2	-	4,7	42,00	1,42	-	0,10	0,10	2,60	12,28

Protocolo	SB	t	T	V	m	M.O.	P-Rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
	---cmolc/dm ³ ---			---%---		dag/kg	mg/L	---mg/dm ³ ---					
9060	0,92	2,32	7,22	12,78	60,34	3,14	22,30	1,01	103,86	26,21	1,91	0,13	11,23
9061	1,05	1,95	6,10	17,28	46,15	2,87	22,92	0,84	98,06	28,27	1,95	0,06	11,23
9062	0,50	2,00	7,54	6,67	75,00	3,41	18,32	0,71	121,53	19,12	2,10	0,06	11,23
9063	0,29	2,89	12,57	2,33	89,97	5,26	10,26	0,99	216,07	19,13	3,61	0,10	17,15
9064	0,31	2,91	12,59	2,44	89,35	5,09	13,75	0,82	95,60	23,73	2,54	0,13	18,26

Protocolo	Classificação do Solo	Argila	Silte	Areia	Areia(Grossa)	Areia(Fina)
		---dag/kg---				
9060	solo tipo2	26	37	37	-	-
9061	solo tipo2	24	37	39	-	-
9062	solo tipo2	27	36	37	-	-
9063	solo tipo3	37	42	21	-	-
9064	solo tipo2	30	33	37	-	-

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5

Ca - Mg- Al- Extrator: KCl - 1 mol/L

SB= Soma de Bases Trocáveis

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

m= Índice de Saturação de Alumínio

P-rem: Fósforo Remanescente

S - Extrator - Fosfato monocálcio em ácido acético

P- Na - K- Fe - Zn- Mn- Cu- Extrador Mehlich 1

H + Al- Extrator: SMP

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

V= Índice de Saturação de Bases

Mat. Org. (MO) - Oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N+ H₂SO₄ 10N

B- Extrator água quente

Solo Tipo 1: Textura Arenosa

Solo Tipo 2: Textura Média

SoloTipo 3: Textura Argilosa

Protocolo	Identificação Amostra	pH(KCl)	pH	K	P	Na	Ca	Mg	Al	H+Al
				---mg/dm ³ ---			---cmol/dm ³ ---			
9065	EUCALIPTO 3	-	4,8	44,00	1,42	-	0,10	0,10	1,80	8,80
9066	EUCALIPTO 4	-	4,7	30,00	2,60	-	0,20	0,30	3,40	15,33
9067	CANGA 1	-	5,2	62,00	1,42	-	0,80	0,20	0,60	9,83
9068	CANGA 2	-	4,1	50,00	8,31	-	1,40	0,20	1,90	37,29
9069	CANGA 4	-	4,3	54,00	2,91	-	0,60	0,10	2,30	23,91

Protocolo	SB	t	T	V	m	M.O.	P-Rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
	---cmolc/dm ³ ---			---%---		dag/kg	mg/L	---mg/dm ³ ---					
9065	0,31	2,11	9,11	3,43	85,31	4,76	17,71	0,77	80,43	20,75	2,26	0,13	15,05
9066	0,58	3,98	15,91	3,63	85,43	5,26	8,87	0,48	98,54	9,44	2,64	0,13	19,40
9067	1,16	1,76	10,99	10,55	34,09	7,34	9,21	1,82	76,95	14,61	0,37	0,19	10,78
9068	1,73	3,63	39,02	4,43	52,34	14,14	30,17	2,60	511,10	15,29	0,36	0,26	12,14
9069	0,84	3,14	24,75	3,39	73,25	10,28	6,29	1,46	257,43	11,81	0,61	0,24	16,61

Protocolo	Classificação do Solo	Argila	Silte	Areia	Areia(Grossa)	Areia(Fina)
		---dag/kg---				
9065	solo tipo2	26	31	43	-	-
9066	solo tipo3	50	30	20	-	-
9067	solo tipo2	27	7	66	-	-
9068	solo tipo1	12	20	68	-	-
9069	solo tipo1	14	21	65	-	-

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5

Ca - Mg- Al- Extrator: KCl - 1 mol/L

SB= Soma de Bases Trocáveis

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

m= Índice de Saturação de Alumínio

P-rem: Fósforo Remanescente

S - Extrator - Fosfato monocálcio em ácido acético

P- Na - K- Fe - Zn- Mn- Cu- Extrador Mehlich 1

H + Al- Extrator: SMP

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

V= Índice de Saturação de Bases

Mat. Org. (MO) - Oxidação: Na₂C₂O₇ 4N+ H₂SO₄ 10N

B- Extrator água quente

Solo Tipo 1: Textura Arenosa

Solo Tipo 2: Textura Média

SoloTipo 3: Textura Argilosa

Protocolo	Identificação Amostra	pH(KCl)	pH	K	P	Na	Ca	Mg	Al	H+Al
				----mg/dm ³ ----			----cmol/dm ³ ----			
9070	CANGA 6	-	4,4	58,00	2,60	-	0,30	0,10	1,40	19,15
9071	CAPIM 2	-	5,9	36,00	3,53	-	0,40	0,20	0,10	1,49
9072	CAPIM 3	-	5,8	16,00	4,81	-	0,70	0,30	0,10	1,33
9073	CAPIM 4	-	6,1	48,00	7,21	-	2,20	0,70	0,10	1,49
9074	CAPIM 5	-	6,0	30,00	11,05	-	1,30	0,50	0,10	1,66

Protocolo	SB	t	T	V	m	M.O.	P-Rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
	----cmolc/dm ³ ----			----%----		dag/kg	mg/L	----mg/dm ³ ----					
9070	0,55	1,95	19,70	2,79	71,79	6,53	12,93	1,33	101,39	26,68	1,45	0,31	18,26
9071	0,69	0,79	2,18	31,76	12,66	1,07	17,86	0,33	42,94	48,74	0,39	0,21	42,41
9072	1,04	1,14	2,37	43,93	8,77	1,18	32,08	0,58	32,16	25,11	0,53	0,17	15,56
9073	3,02	3,12	4,51	67,03	3,21	1,41	9,23	1,13	65,46	58,19	1,66	0,21	30,47
9074	1,88	1,98	3,54	53,02	5,05	1,64	9,49	0,41	32,75	35,59	0,36	0,15	27,31

Protocolo	Classificação do Solo	Argila	Silte	Areia	Areia(Grossa)	Areia(Fina)
		----dag/kg----				
9070	solo tipo2	29	22	49	-	-
9071	solo tipo1	12	32	56	-	-
9072	solo tipo1	8	44	48	-	-
9073	solo tipo2	34	26	40	-	-
9074	solo tipo2	28	29	43	-	-

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5

Ca - Mg- Al- Extrator: KCl - 1 mol/L

SB= Soma de Bases Trocáveis

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

m= Índice de Saturação de Alumínio

P-rem: Fósforo Remanescente

S - Extrator - Fosfato monocálcio em ácido acético

P- Na - K- Fe - Zn- Mn- Cu- Extrator Mehlich 1

H + Al- Extrator. SMP

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

V= Índice de Saturação de Bases

Mat. Org. (MO) - Oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N+ H₂SO₄ 10N

B- Extrator água quente

Solo Tipo 1: Textura Arenosa

Solo Tipo 2: Textura Média

Solo Tipo 3: Textura Argilosa

9.2 Identificação dos Isolados de Solo e Água e listagem dos códigos de acesso das sequências, identidade, similaridade e e-value do GenBank.

Amostra	Isolado	Espécie (GenBank)	Acesso	Filo	Identidade %	Similaridade %	E-value
Cerrado 1	CE 1.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	100	100	0
	CE 1.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FJ743620	Basidiomycota	99,7	100	0
Cerrado 2	CE 2.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FJ743621	Basidiomycota	99,3	100	0
	CE 2.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	100	0
Cerrado 3	CE 3.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	100	0
	CE 4.1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	AB773382	Ascomycota	99,4	100	0
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	JQ398673	Ascomycota	99,4	100	0
Cerrado 4	CE 4.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,5	100	0
	CE 4.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	100	0
	CE 4.4	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	100	100	0

Amostra	Isolado	Espécie (GenBank)	Acesso	Filo	Identidade %	Similaridade %	E-value
Mata 6	M 6.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,7	100	0
	M 6.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,7	100	0
	M 6.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,8	100	0
	M 6.4	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	100	0
Mata 7	M 7.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,8	100	0
	M 7.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,5	100	0
	M 7.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	100	0
	M 7.4	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,8	100	0
	M 7.5	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,8	100	0
	M 7.6	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,4	100	0
Mata 8	M 8.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	100	0
	M 8.2	<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	FR774544	Ascomycota	99,8	100	0
		<i>Debaryomyces polymorphus</i>	FN545820	Ascomycota	99,8	100	0
	M 8.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	100	0
M 8.4	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99	99,8	0	
Mata 9	M 9.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,5	100	0
	M 9.2	<i>Lipomyces starkeyi</i>	AB760318	Ascomycota	99,6	100	0
		<i>Lipomyces kononenkoae</i>	JN940881	Ascomycota	100	100	0
	M 9.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,3	100	0
	M 9.4	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	100	100	0
M 9.5	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,5	100	0	

Amostra	Isolado	Espécie (GenBank)	Acesso	Filo	Identidade %	Similaridade %	E-value
Eucalipto 1	E 1.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,5	100	0
	E 1.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,8	100	0
	E 1.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,5	100	0
	E 1.4	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,8	100	0
	E 1.5	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FJ797568	Basidomycota	99,8	100	0
	E 1.6	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	100	100	0
	E 1.7	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,6	100	0
	E 1.8	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	100	100	0
	E 1.9	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,6	100	0
Eucalipto 2	E 2.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,8	100	0
	E 2.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,6	100	0
	E 2.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,5	100	0
	E 2.4	<i>Debaryomyces hansenii</i>	KF830186	Ascomycota	100	100	0
	E 3.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,8	100	0
Eucalipto 3	E 3.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	100	100	0
	E 3.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	100	100	0
	E 3.4	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,8	100	0
	E 3.6	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,6	100	0
	E 3.7	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	98,7	100	0
	E 3.8	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,3	100	0
	E 4.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,5	100	0
Eucalipto 4	E 4.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,3	100	0
	E 4.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,3	100	0
	E 4.4	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidomycota	99,8	99,8	0

Amostra	Isolado	Espécie (GenBank)	Acesso	Filo	Identidade %	Similaridade %	E-value	
Capim 2	CA 2.1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	AB831021	Ascomycota	98,2	100	0	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	AB916575	Ascomycota	98	100	0	
	CA 2.2	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	KJ159030	Ascomycota	99,6	99,6	0	
		<i>Aureobasidium pullulans</i>	KC798413	Ascomycota	99,2	99,6	0	
	CA 2.3	<i>Meyerozyma caribbica</i>	AB772556	Ascomycota	99,6	100	0	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	JQ686905	Ascomycota	99,6	100	0	
	CA 2.5	<i>Meyerozyma caribbica</i>	AB772556	Ascomycota	100	100	0	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KJ794711	Ascomycota	100	100	0	
	CA 2.6	<i>Meyerozyma caribbica</i>	AB831044	Ascomycota	100	100	0	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KF359926	Ascomycota	100	100	0	
	Capim 3	CA 3.1	<i>Anomalomyces panici</i>	DQ459347	Basidiomycota	99,5	100	0
			<i>Pseudozyma aphidis</i>	AB617892	Basidiomycota	97,9	100	0
<i>Pseudozyma churashimaensis</i>			AB548951	Basidiomycota	97,9	100	0	
Capim 5	CA 5.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KJ159028	Ascomycota	99,3	100	0	
	CA 5.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KJ159028	Ascomycota	99,4	99	0	

Amostra	Isolado	Espécie (GenBank)	Acesso	Filo	Identidade %	Similaridade %	E-value
Canga 2	CG 2.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,8	100	0
	CG 2.3	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	100	0
	CG 2.4	<i>Meyerozyma caribbica</i>	AB773382	Ascomycota	100	100	0
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	JQ398673	Ascomycota	100	100	0
	CG 2.5	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	FJ797568	Basidiomycota	99,7	100	0
Canga 4	CG 4.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	99,8	0
	CG 4.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,5	100	0
Canga 6	CG 6.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,3	100	0
	CG 6.2	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672617	Basidiomycota	99,6	100	0
Barragem	B1.1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	JQ672618	Basidiomycota	98,8	99,6	0
	B1.2	<i>Cryptococcus flavescens</i>	JQ672619	Basidiomycota	99,3	100	0
	B2.1	<i>Pseudozyma aphidis</i>	JQ672620	Basidiomycota	97,7	100	0
		<i>Ustilago echinata</i>	JQ672621	Basidiomycota	97,7	100	0
		<i>Sporisorium sp.</i>	JQ672622	Basidiomycota	97,6	100	0
		<i>Anomalomyces panici</i>	JQ672623	Basidiomycota	99,3	100	0
		<i>Aureobasidium pullulans</i>	JQ672624	Ascomycota	99,6	100	0
	B2.2						